



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOANÁLISIS

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y EFECTIVIDAD MICROBIOLÓGICA
DE VANCOMICINAS GENÉRICAS Y COPIAS

(Modalidad: Tesis de Grado)

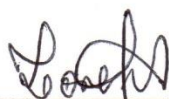
BEATRIZ MARÍA HIDALGO MARCANO

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOANÁLISIS

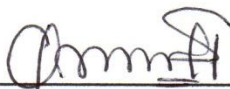
CUMANÁ, 2016

CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA Y EFECTIVIDAD MICROBIOLÓGICA
DE VANCOMICINAS GENÉRICAS Y COPIAS

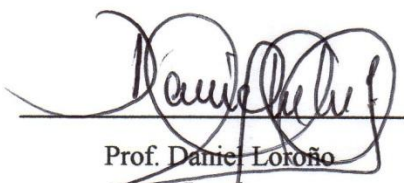
APROBADO POR:



Dra. Lorena Abadía Patiño
Asesora



Dra. Maribel Morillo
Jurado



Prof. Daniel Loroño
Jurado

ÍNDICE

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN	vi
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA.....	10
Cepas de estudio.....	10
Antimicrobianos	10
Determinación de pH	10
Espectros de las vancomicinas	10
Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).....	11
Preparación del inóculo.....	11
Concentración Mínima Inhibitoria.....	11
En agar	11
Microdilución en caldo.....	12
Bioensayo	12
Curva de muerte	13
Inducción de mutantes con vancomicina	13
Efectividad de las vancomicinas para la erradicación de endocarditis experimental en modelo animal.	14
Análisis estadístico.....	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	65
RECOMENDACIONES.....	67
BIBLIOGRAFÍA	68
HOJAS DE METADATOS	87

DEDICATORIA

A

Dios Todopoderoso, quien me ayuda a levantarme con mayor fortaleza cada vez que caigo.

Mis abuelos Eleida Marcano (†) y Luis Presilla, ejemplos de respeto, integridad y dedicación.

Mis hermanos, Sailis, Ricardo y Cecilia, mis máximos ejemplos a seguir, porque son ellos los que siempre han estado a mi lado, los que me han enseñado a esforzarme por las cosas en las que creo, a mirar siempre hacia adelante aprendiendo de los errores. Gracias por su cariño, comprensión y apoyo incondicional; son uno de los pilares fundamentales de mi vida.

Mauricio, a quien tengo que agradecerle muchas cosas. Gracias por tu apoyo incondicional, por ayudarme en mis malos momentos y compartir conmigo los buenos, por tus sabios consejos, por tus ánimos, por confiar en mí más que yo misma, sencillamente, por todo.

Todas aquellas personas que de una u otra forma influyeron positivamente en la realización de una de mis grandes metas. Gracias.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, doy gracias a Dios por darme salud, fortaleza y por todas sus bendiciones para alcanzar esta meta en mi vida.

A la Universidad de Oriente y a los profesores que laboran en el Departamento de Bioanálisis por darme las herramientas para crecer tanto profesional como personal.

A mi asesora académica Dra Lorena Abadía Patiño, quien me brindó la oportunidad de desarrollar este trabajo de grado y compartió todos sus conocimientos y experiencias profesionales.

AL Instituto de Investigación en Biomedicina y Ciencias Aplicadas de la Universidad de Oriente (IIBCAUDO) y a todo su personal, por facilitarme sus instalaciones, sobre todo al Laboratorio de Resistencia Bacteriana.

Al Director del IIBCAUDO, por la ayuda económica prestada.

Al Licenciado José Luis Prin y la Dra. Blanca Rojas por su aporte e importante participación en el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Luz Marina Rojas por facilitarme el Laboratorio de Retina para realizar uno de los objetivos de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio Oreana, Carlos, Mariela, Adny, Zuliannys, María Fernanda, Francisco, Leonati, Lusdelis, Dayana y amigas Arceli y Karen.

A la Licenciada Sophy Nazaret, Rafael y Ernesto por su ayuda y apoyo incondicional.

Al Profesor Saúl Mosqueda por su ayuda en la realización del análisis estadístico.

A todas las personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización y culminación de este trabajo de grado.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Características organolépticas y solubilidad de vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan) analizadas en este trabajo.	16
Tabla 2. Variación de pH de vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan) diluidas en diferentes soluciones, analizadas en este estudio.	19
Tabla 3. Evolución del pH de vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan) reconstituidas con agua desionizada, al inicio, a los 3 y 6 meses de experimentación.	20
Tabla 4. Estudio del área de C-Cl de los espectros de todas las moléculas de vancomicina y la determinación de su concentración y número de moléculas disponibles.	27
Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria obtenidas por el método de dilucion en agar de cepas certificadas con las cinco vancomicinas en estudio.	31
Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria por Microdilución en caldo de cepas certificadas con las cinco vancomicinas (genéricas y copias) en estudio.	32
Tabla 7. Inducción de mutantes de la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 a una concentración de $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	46
Tabla 8. Inducción de mutantes de la cepa <i>S. aureus</i> Mu50 a una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Uniones vitales para la correcta farmacodinamia entre la vancomicina y el precursor del péptidoglicano terminado en D-Ala-D-Ala.	3
Figura 2. Curva espectral teórica de la molécula vancomicina, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.	22
Figura 3. Curva espectral de Behrens por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.	22
Figura 4. Curva espectral de Vancocyn por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.	23
Figura 5. Curva espectral de Vancomax por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.	23
Figura 6. Curva espectral de Celovan por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.	24
Figura 7. Curva espectral de Fada Pharma por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.	24
Figura 8. Morfología estructural de las cinco vancomicinas (genéricas y copias) analizadas en este trabajo por Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM).	28
Figura 9. Bioensayo de las cinco vancomicinas genéricas y copias diluidas en SSF 0,9% frente a <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (1A3), <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (1A7) y <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (1A2).	39
Figura 10. Bioensayo de las cinco vancomicinas genéricas y copias diluidas en soluciones de agua destilada, agua desionizada y Ringer lactato frente <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 (1A2).	40

Figura 11. Curva de muerte de la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923 frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora.....	40
Figura 12. Curva de muerte de la cepa <i>S. aureus</i> ATCC 29213 frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora.....	41
Figura 13. Curvas de muerte de la cepa <i>E. faecalis</i> ATCC 29212 frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora.....	42
Figura 14. Curva de muerte de la cepa <i>S. aureus</i> Mu50 con resistencia intermedia frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora.....	43
Figura 15. Curva de muerte de la cepa <i>E. faecalis</i> V583 con resistencia inducida a vancomicina frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora.....	45

RESUMEN

En este estudio se planteó caracterizar físico-químicamente y la efectividad microbiológica de vancomicinas genéricas (Behrens, Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan). Para ello, se determinó el pH de todas las vancomicinas en soluciones, para estudiar la estabilidad de los antibióticos, reconstituidas en agua destilada, agua desionizada, SSF 0,9%, cloruro de sodio 0,45% y Ringer lactato; además de verificar las interacciones iónicas del agua destilada con las otras soluciones antes mencionadas. A través de la espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier se detectaron de 9 a 10 grupos funcionales de los 23 que contiene la molécula original, siendo estos los más importantes para que ocurran las interacciones farmacodinámicas. Con el uso del Microscopio Electrónico de Transmisión se observaron diferentes morfologías en los cinco antibióticos. Para determinar el perfil de susceptibilidad de las cepas ATCC y otras cepas certificadas, se determinó la concentración mínima inhibitoria de todas las cepas, por dos métodos; dilución en agar y microdilución en caldo a diferentes concentraciones de vancomicina ($0,5$ hasta $128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se observó, que el método de microdilución es más sensible y específico que el de dilución en agar. Se determinó la potencia de las cinco vancomicinas mediante el análisis de bioensayo, empleando varias matrices biológicas, observándose un comportamiento igual para las tres cepas ATCC usadas, a pesar de variar las soluciones y el pH. En el estudio *in vivo* se demostró la efectividad de tres vancomicinas (Behrens, Vancocyn y Celovan), para erradicar la endocarditis experimental en ratas; al aplicar la prueba Q de de Cochran se determinó que hubo diferencias significativas ($Q_{0,01}=72,5$), con un nivel de confianza 1% entre las 5 vancomicinas que se utilizaron. Estos resultados demuestran la efectividad (equivalencia terapéutica) de los medicamentos genéricos y copias, a pesar de que en varias investigaciones se ha demostrado el fracaso de estos medicamentos.

INTRODUCCIÓN

Vancomicina es un antibiótico perteneciente a la familia de los glicopéptidos; fue aislado por primera vez en el año 1955 en una muestra procedente de Borneo, a partir de cepas de *Amycolatopsis orientalis*, antes conocido como *Streptomyces orientalis*, un actinomiceto (McCormick *et al.*, 1955). Este antibiótico inicialmente fue denominado como compuesto 05865, y posteriormente se le dio el nombre de vancomicina, que deriva de la palabra inglesa “vanquish” (vencer). Al principio, el preparado contenía un alto porcentaje de impureza, con un aspecto de color marrón, que fue llamado “barro de Mississippi”. No fue sino hasta 1985, cuando con técnicas de purificación, utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), se pudo obtener un mejor producto, el cual tiene menos efectos adversos asociados, inicialmente, a la administración del antibiótico (Marshall, 1965; García, 1997).

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 antimicrobiano eficaz frente a bacterias Gram positivas y, sobre todo, frente a cepas de *Staphylococcus* productoras de β -lactamasas; pero el desarrollo de los nuevos antibióticos con menos efectos adversos limitó su uso. Debido a la aparición en 1980, de cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino-resistentes (MRSA, por sus siglas en inglés), *Staphylococcus* coagulasas-negativas y *Enterococcus*, favoreció nuevamente el uso de vancomicina (Anderson *et al.*, 1961; Griffith, 1981).

La estructura química de la vancomicina fue identificada con estudios de difracción de rayos X en 1978 tras varios años de investigación. Se trata de un compuesto polipeptídico de masa molar (1448 Daltons) muy superior al de otros antibióticos y cuya fórmula molecular es $C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$; constituida por residuos de glucosa, ácido aspártico, N-metil-leucina, ácido 3-metil-4cetoheptanoico, dos grupos *orto*-metil-hidroxibenceno y dos grupos *para*-metil-hidroxibenceno (Sheldrick *et al.*, 1978; Dámaso, 1990).

Vancomicina, actúa en dos sitios de la célula bacteriana: la pared celular y la membrana plasmática, con lo cual se altera la permeabilidad de la membrana, pero también impide la correcta síntesis del ARN bacteriano. La síntesis de péptidoglicano comprende tres etapas: a) síntesis de precursores citosólicos del pentapéptido fijado sobre un disacárido N-acetil-glucosamina y N-acetil-muramina (NAcGlc-NAcMur), b) acoplamiento de estos precursores a un lípido transportador y transferencia de moléculas resultantes a la superficie exterior de la membrana, y c) formación de “malla” entre cada uno de los precursores mediante reacciones de transpeptidación y transglicosilación acompañado de la liberación de los lípidos de transporte y su reciclaje a la cara interna de la membrana (Jordan y Inniss, 1959; Jordan y Mallory, 1964; Reynolds, 1989; Kapsnisk-Unec *et al.*, 1996).

El mecanismo de acción de vancomicina, consiste en la inhibición extracelular de la síntesis de péptidoglicano, que interactúa con los residuos D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) de los precursores del péptidoglicano, mediante cinco puentes de hidrógeno (L-alanina, D-glutamina, L-lysina, D-alanil y D-alanina), evitando así la unión cruzada entre diferentes cadenas, con la consecuente inhibición de la acción de transpeptidasas y transglicosilasas. Además, requiere del acceso de moléculas de alto peso molecular a la superficie del péptidoglicano en formación, lo cual explica su especificidad por las bacterias Gram positivas. Ya que el péptidoglicano de las Gram negativas está protegido por una membrana externa de lipopolisacárido impermeable a moléculas complejas como vancomicina (Reynolds, 1989; Arthur *et al.*, 1996; Pootoolal *et al.*, 2002).

Aunque vancomicina es un antibiótico específico contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* (ya sean cepas sensibles a meticilina o meticilino-resistentes), *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, existen excepciones con algunos Gram negativos, como *Neisseria gonorrhoeae* (Rotschafer, 1986; Dámaso, 1990).

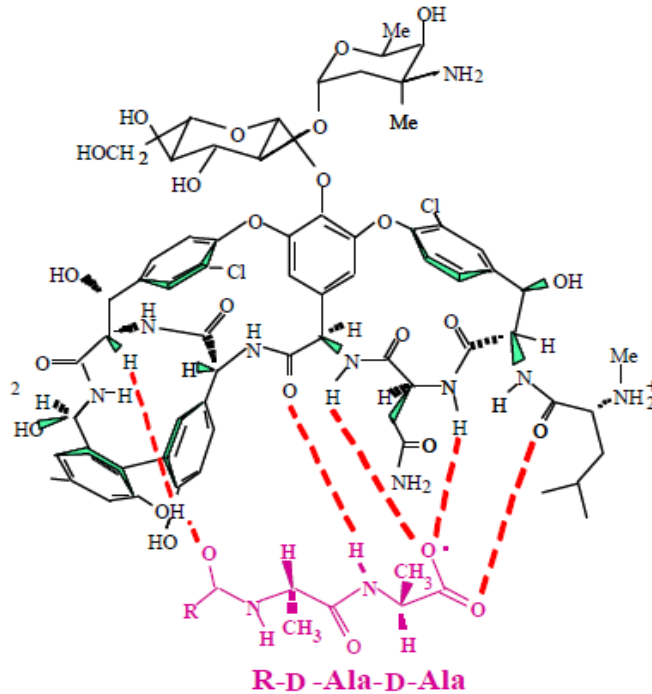


Figura 1. Uniones vitales para la correcta farmacodinamia entre la vancomicina y el precursor del péptidoglicano terminado en D-Ala-D-Ala.

El mecanismo de resistencia a vancomicina está generado por la posesión de genes que alteran la diana y por un sistema de regulación que induce o reprime la expresión del operón *vanA*, en concreto los genes *vanH*, *vanA*, *vanX*; *vanH* codifica para una α -ceto-ácido-reductasa que genera un isómero D-lactato (D-Lac), posteriormente, *vanA* codifica una ligasa resistente que une D-Ala y D-Lac para formar el depsipéptido D-Ala-D-Lac. El nuevo depsipéptido pierde drásticamente su afinidad por el antibiótico y no se une a este, de forma que puede completar el ensamblaje del péptidoglicano y continuar la síntesis de la pared. Pero para ello, debe contar con el gen *vanX* para que esa unión tenga efecto, ya que es una dipeptidasa que hidroliza el dipéptido D-Ala-D-Ala pero no D-Ala-D-Lac, eliminando así la síntesis del precursor con afinidad por el antibiótico. La sustitución del dipéptido D-Ala-D-Ala por el depsipéptido D-Ala-D-Lac, impide la formación de un puente clave ($R_2C=O \cdots HN$) para la unión de vancomicina con su blanco de acción, disminuyendo mil veces la afinidad del antibiótico por la bacteria, lo cual se traduce en una alta resistencia (Arthur *et al.*, 1996).

Vancomicina se administra principalmente por vía intravenosa (IV); y debe hacerse lentamente en un tiempo de 90 minutos, en una solución diluida, debido al riesgo de liberación de histaminas por los mastocitos lo cual puede desencadenar una serie de complicaciones relacionadas a la velocidad de perfusión, como síndrome de cuello rojo, reacciones anafilácticas, hipotensión y falla cardíaca; además de nefrotoxicidad y ototoxicidad que están relacionadas con concentraciones plasmáticas altas, tanto el nivel pico como valle. Sin embargo, existen otras vías de administración con menos efectos de absorción como la oral, que solo se aplica para el tratamiento de colitis pseudomembranosa y la vía intramuscular que tiene poca penetración tisular, además de provocar intensos dolores (Griffith, 1956; Bryan y White, 1978; Matzke *et al.*, 1986).

Dicho antibiótico se distribuye en un volumen aparente de 0,4 y 1 l·kg⁻¹ y representa 10% del volumen de distribución. Estos valores son compatibles con una adecuada penetración a los diferentes fluidos y tejidos corporales del organismo (sinovial, pericárdico, pleural, peritoneal), pero es relativamente baja en los pulmones y no atraviesa la barrera hematoencefálica en ausencia de inflamación (Moellering, 1984; Cruciani *et al.*, 1996).

Vancomicina se une de forma moderada a proteínas plasmáticas, siendo el porcentaje medio de unión entre 33-55%. La eliminación tiene lugar principalmente por vía renal, de modo que 90% de la dosis se excreta de forma inalterada en las primeras 24 horas tras su administración, mediante filtración glomerular, sin evidencia de que se produzca secreción tubular ni reabsorción. La vida media de eliminación en pacientes con función renal normal es alrededor de 6 horas, pero en pacientes con patologías renales tiende a incrementarse entre 200-250 horas, siendo necesario el ajuste de la dosificación, que en el caso de vancomicina se realiza aumentando el intervalo de dosis (Moellering *et al.*, 1981).

Para obtener un resultado exitoso debe existir una interacción específica que se establece entre el fármaco, agente patógeno, lugar de infección y hospedero, además de la concentración mínima inhibitoria (CMI) que para vancomicina, varía en un amplio

rango de 0,25 a $>256 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ frente a diferentes microorganismos. Los dos principios a considerar en la farmacodinamia son: el efecto post-antibiótico (EPA) y el tiempo de relación muerte bacteriana y concentración del antibiótico. Debido a que vancomicina es un fármaco dependiente del tiempo, su EPA es de moderado a prolongado. Tanto la farmacocinética como la farmacodinamia buscan cuantificar la actividad *in vivo* y garantizar la eficacia terapéutica (Craig, 2001; Pea y Pierluigi, 2006).

Los medicamentos genéricos, se caracterizan por presentar las mismas características (cualitativas y cuantitativas) del principio activo, es decir, que tengan la misma forma farmacéutica y que se demuestre bioequivalencia con el innovador, mediante estudios de biodisponibilidad. Aunque los medicamentos copias tengan la misma fórmula química que el genérico, la preparación y los excipientes que se usan para su elaboración pueden no ser los mismos, por lo tanto varía su biodisponibilidad y farmacocinética. En teoría no existe gran diferencia entre genéricos y copias cuando se administran por vía intravenosa ni intramuscular (García *et al.*, 2010).

Al respecto, Vesga *et al.* (2010) realizaron un estudio comparativo de la eficacia *in vivo* de tres productos genéricos de vancomicina en experimentos simultáneos con el innovador; demostrando que ningún producto tenía diferencias en cuanto al ensayo *in vitro*, curva de letalidad, ni farmacocinética en ratones infectados. A pesar de estas similitudes los productos genéricos fracasaron en el estudio *in vivo*, mientras que el innovador presentó eficacia terapéutica, concluyendo que la equivalencia farmacéutica no implica equivalencia terapéutica.

Hay estudios que indican que antes de 2005, las vancomicinas genéricas vendidas en Colombia, tenían una efectividad *in vivo* significativamente menor, cuando se comparaba con la vancomicina original en experimentos animales. De todos los producidos después de 2005, sólo uno (Baxter) presentó actividad perfectamente equivalente con el original. La ineffectividad viene dada en estos estudios por la presencia de impurezas en los genéricos. Esto no quiere decir que los originales no

tengan impurezas, pero su relación con respecto al principio activo es mucho menor (Zuluaga *et al.*, 2009; Vesga *et al.*, 2010; Zuluaga *et al.*, 2010). Los antibióticos originales poseen 4% de impurezas (productos de degradación cristalina) contra 16% encontrada en los genéricos. Hay autores que sugieren, que el fracaso de los antibióticos genéricos se debe al efecto Eagle observado en estudios *in vivo* con cepas de *S. aureus* (Agudelo *et al.*, 2010).

Los laboratorios farmacéuticos invierten demasiado dinero para desarrollar cada molécula debido a la comprobación de su efectividad, estabilidad, estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos, en modelos experimentales y la patente. Una vez finalizados todos los ensayos realizados por los laboratorios, deben ser estudiados los pro y contra de los medicamentos por la FDA en Estados Unidos y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en Europa. Son muchas las formulaciones farmacológicas que nunca serán aprobadas para su uso clínico humano, después de haber sido evaluadas en modelos experimentales animales e incluso voluntarios humanos, debido a los estrictos controles de esas agencias con respecto a las reacciones adversas y la toxicidad de los mismos.

Una vez pasadas todas las pruebas, otorgada la certificación para su uso humano, el medicamento puede al fin salir a la venta. Por todas estas razones, cuando un medicamento nuevo sale al mercado, su costo es elevado. Las patentes de los medicamentos pueden ir de 10 a 12 años, lo que significa que durante ese tiempo, el medicamento no puede ser copiado por nadie, pero finalizado ese tiempo, otros laboratorios pueden sintetizar esa molécula, a un costo mucho menor, debido a que no han invertido todo el dinero que invirtió el laboratorio farmacéutico innovador (Bera y Mukherjee, 2012).

Teniendo en cuenta la importancia clínica de la administración intravenosa de quimioterapias anti-infecciosas, en términos de control de enfermedades y por la aparición de resistencias por el uso inadecuado de antibióticos, es necesario demostrar

que la equivalencia farmacéutica de la concentración del principio activo en un producto genérico se encuentra dentro de una escala aceptada respecto al innovador, conjuntamente con la precisión y exactitud, siendo los criterios más importantes, que constituyen el punto central para asumir la equivalencia terapéutica de drogas por vía intravenosa. En un estudio realizado por Zuluaga *et al.* (2009), se demostró la equivalencia farmacéutica de 21 productos genéricos de un total de 22 analizados frente al innovador, entre dichos antibióticos se estudiaron tres vancomicinas genéricas de las cuales dos demostraron equivalencia farmacéutica. Confirmándose que los antibióticos genéricos si presentan equivalencia farmacéutica con respecto al innovador.

Técnicas como la Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR, por sus siglas en inglés) y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM, por sus siglas en inglés), son utilizadas básicamente para verificar y contrastar compuestos de importancia clínica. La FTIR, es una técnica cuya radiación infrarrojo (IR) es transmitida (o reflejada) a través de una muestra. Una parte de la radiación IR es absorbida por la muestra y otra es transmitida. El espectro resultante representa la absorción molecular y la transmisión, creando una impresión digital molecular de la muestra. Igual que con una impresión digital, no existen dos estructuras moleculares que generen el mismo espectro IR, lo que hace a este método muy útil para varios tipos de análisis (Saptari, 2004).

En cuanto a la técnica TEM, utiliza como fuente de iluminación un haz de electrones que son generados por un filamento de tungsteno cuando este por efecto termoiónico se pone incandescente. Estos electrones son acelerados y dirigidos hacia la muestra mediante lentes electromagnéticas en condiciones de alto vacío. La imagen que se obtiene es plana y monocromática (en blanco y negro) y se puede llegar a un límite de resolución de 0,3 nm (Clarke, 2002). Estas técnicas son de gran utilidad a la hora de determinar grupos funcionales y morfologías estructurales de macromoléculas como vancomicina, que permiten estudiar las interacciones de dicho antibiótico con el sitio diana de las bacterias Gram positivas.

Con estos estudios se puede determinar la equivalencia farmacéutica, más no terapéutica. Y se sabe, que medicamentos con equivalencia farmacéutica no garantizan la terapéutica. Se ha demostrado que la co-administración de cloranfenicol, penicilina G potásica y succinato sódico pueden ocasionar la precipitación de vancomicina. Por otro lado, Aztreonan, bencilpenicilina, ceftazidima, ceftriaxona, meticilina sódica, ticarcilina, barbitúricos, clorotiazida sódica y fosfato sódico de dexametasona, pueden alterar el perfil sérico de vancomicina. Incluso, se pueden observar reacciones más graves como el riesgo de hemorragias, al asociar warfarina con vancomicina (Anguran *et al.*, 1987). La administración de metformina más vancomicina permite el desarrollo de acidosis láctica (Stockley, 2002; Montañés, 2008). Para prolongar la vida del antibiótico, los viales deben ser almacenados a 25°C y protegidos de la luz solar (MHRA, 2011).

La frecuencia con la que se producen estas interacciones medicamentosas junto con las complicaciones que estas originan, y en particular aquellas interacciones con potencial de riesgo para la vida del paciente, son los aspectos que determinan su relevancia clínica, ya que son modificaciones que sufren los medicamentos por la administración simultánea de uno o varios fármacos, además de sustancias exógenas no medicamentosas en el organismo, que pueden generar la aparición de un efecto terapéutico o tóxico de mayor o menor intensidad de lo habitual (Sellers y Romach, 1998; De Blas *et al.*, 2004). Por ello, es necesario conocer ciertas características de los fármacos, sobre todo aquellos que sean fundamentales para tratar patologías graves y que estos sean el tratamiento de elección contra esa enfermedad, para así evitar en lo posible las consecuencias adversas derivadas de dichas interacciones (Moro, 2002; De Cos *et al.*, 2003). Además, hay que tener en cuenta, que existen pacientes con diversas patologías que requieren de la co-administración de varios fármacos y son ellos los más afectados con estas interacciones.

Este estudio fue diseñado para evaluar las características organolépticas y la solubilidad; así como la estabilidad mediante la determinación de pH en diferentes soluciones empleadas en el área hospitalaria. Verificar y contrastar los espectros y las estructuras de

las cinco vancomicinas en estudio utilizando las técnicas de FTIR y TEM respectivamente. Por otro lado, evaluar el estudio *in vitro* por medio de las concentraciones mínimas inhibitorias CMI en agar y por microdilución en caldo, así como determinar las curvas de muerte con cepas bacterianas certificada frente a los cinco antibióticos; se indujeron mutantes bajo diferentes perfiles de susceptibilidad. Por último, se demostró la efectividad clínica de las cinco vancomicinas mediante la erradicación de una endocarditis experimental en modelo animal.

Es necesario realizar estudios que permitan determinar si las diferentes vancomicinas genéricas y copias en estudio tienen variaciones en sus características físico-químicas que modifiquen su efectividad microbiológica, ya que se han reportado varias muertes de pacientes tratados con estas vancomicinas genéricas y copias en el Hospital de Cumaná, razón por la cual es menester realizar estudios regionales que demuestren si hay variaciones de estos medicamentos, responsables de los fracasos terapéuticos, ya que los publicados no indican que se hayan realizado con estas mismas vancomicinas.

METODOLOGÍA

Cepas de estudio

Las cepas bacterianas que se emplearon en esta investigación fueron: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (vancomicino sensible), *E. faecalis* V583 (genotipo *vanB*), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (vancomicino sensible, productora de betalactamasa), *S. aureus* ATCC 25923 (vancomicino sensible, no productora de betalactamasa), *S. aureus* Mu50 (cepa SAIV).

Antimicrobianos

Se probaron cinco vancomicinas dos genéricas (Behrens, Fada Pharma) y tres copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan) de diferentes casas comerciales, cuya presentación farmacéutica es polvo liofilizado.

Determinación de pH

Se pesaron 0,0256 g de cada una de las cinco vancomicinas entre genéricas y copias, en la balanza analítica y se diluyeron en 10 ml de diferentes soluciones: Ringer lactato, cloruro de sodio 0,45%, Solución Salina Fisiológica (SSF) 0,9%, agua destilada y agua desionizada. Posteriormente, se midieron los pH de cada vancomicina en las diferentes soluciones con el pHMetro (marca JENWAY, modelo 3510 pH Meter), el primer día, a los tres y seis meses de experimentación. La lectura del pH a los tres y seis meses solo se midió en el agua desionizada (Williamson y Williams, 1984).

Espectros de las vancomicinas

Se tomaron cinco muestras sólidas de vancomicina en polvo comercial, se sometieron a una mufla a 110°C durante 10 días; culminado este tiempo, se mezclaron con bromuro de potasio (KBr) cada una. Esta mezcla se trituro y se prensó con el fin de obtener una pastilla translúcida que permito el paso del haz de luz. Una vez obtenidas las pastillas, se analizaron en el FTIR, marca PERKIN ELMER, modelo 1000 PC, con resolución de 2 cm⁻¹, en un rango de 4000 a 400 cm⁻¹. En función de los espectros de cada muestra, se

determinaron las áreas totales y corregidas en modo de Absorbancia. Obtenidas las áreas, se analizaron los espectros de las cinco vancomicinas con el espectro teórico para ubicar los grupos funcionales (Base de datos SDBS).

Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM)

Los antibióticos sólidos de vancomicina genéricos y copias se pulverizaron en un mortero, de manera de reducir significativamente la granulometría; una vez reducida se colocaron las muestras en un vial y mediante acción de gravedad fueron cayendo las partículas de diferentes tamaños en una rejilla de 3 mm de diámetro preparada en 100 mesh; se sacudieron técnicamente de manera de eliminar las partículas grandes y dejar las más pequeñas. Culminado el proceso de preparación de las muestras se analizaron en un TEM, modelo H-600, marca HITACHI con un voltaje de aceleración de 100 kV en un modo de señal de campo claro. Finalmente, los negativos fotográficos se pasaron a positivos (Morales y Lozano, 1865).

Preparación del inóculo

Los inóculos de cada una de las cepas *E. faecalis* (ATCC 29212, V583), y *S. aureus* (ATCC 29213, ATCC 25923 y Mu50), se prepararon de la siguiente manera. En primer lugar, se reactivaron las cepas guardadas a -20°C en placas de infusión cerebro corazón (ICC) durante 24 horas a 35°C. Al siguiente día se tomó una colonia de las placas sembradas previamente y se resuspendió en 3 ml de SSF, hasta obtener una turbidez comparable al estándar 0,5 McFarland (CLSI, 2015).

Concentración Mínima Inhibitoria

En agar

Se determinó por dilución en agar Mueller-Hinton (MH). Los cultivos bacterianos líquidos fueron preparados al igual que el inóculo 0,5 McFarland para luego realizar diluciones 1:10. Colocando 2 ml de vancomicina en cada placa de Petri y vertiendo 18 ml del medio mezclando bien. Las placas de agar que contenían diferentes concentraciones de vancomicina (0,5 hasta 128 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), fueron incubadas con 5 μl de

las cepas en estudio ($1,5 \times 10^8$ UFC·ml⁻¹) por depósito y se incubaron por 24 horas a 35°C (Freitas *et al.*, 2006).

Microdilución en caldo

En placas de ensayo inmunoenzimático (ELISA) se colocaron en cada pocillo de cada línea 95 µl de caldo MH, con la ayuda de una pipeta multicanal. Se prepararon soluciones de trabajo de las diferente vancomicinas cuyas concentraciones fueron 2 µg·ml⁻¹. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1:2 a partir de la primera columna, para obtener concentraciones decrecientes 128 a 0,25 µg·ml⁻¹. Los pocillos 11 y 12 se tomaron como control positivo y negativo respectivamente. Las primeras cinco filas correspondieron a una muestra a analizar y así sucesivamente, hasta completar las cinco vancomicinas en estudio, con las cinco cepas controles.

Finalmente, se añadieron 5 µl del inóculo bacteriano de 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC·ml⁻¹) de cada una de las cepas en estudio. Todas las placas se incubaron a 35°C durante 24 horas, tras ese período se realizó la lectura del mismo. El experimento se realizó por duplicado (CLSI, 2015).

Bioensayo

Basándose en la metodología de Hewitt, 2003, con modificaciones en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana del IIBCA; empleando el método de difusión en placas con agar MH. Para ello se preparó la solución patrón de cada una de las cinco vancomicinas (genéricas y copias), con 0,003 g de cada antibiótico en estudio, diluidos en 1 ml de SSF 0,9 %, agua destilada, agua desionizada y Ringer Lactato, utilizando tres cepas controles *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* ATCC 25923. Previamente se inactivaron los discos en la autoclave a 121°C por 15 min, una vez inactivados cada uno de los discos se les agrego 10 µl de la solución patrón y se guardaron en la nevera hasta su uso, y las placas se incubaron a 35°C por 24 h. La lectura de los halos de inhibición se realizó midiendo en milímetros (mm) el diámetro alrededor de cada uno de los discos por la cara inferior de la placa de Petri.

Curva de muerte

Se determinó mediante el método de Krogstad-Mollering, 1986; modificado en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana del IIBCA. 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 muerte o disminución de la población). Se empleó un volumen de 10 ml de caldo ICC y un inóculo 0,5 McFarland de cada una de las cepas en estudio y se añadieron concentraciones de $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* V583, respectivamente y *S. aureus* ATCC 29213 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *S. aureus* ATCC 25923 ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), *S. aureus* Mu50 ($4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Los tubos se incubaron a 37°C en Baño de María por agitación. Se midió la Densidad Óptica de cada cepa (con y sin antibiótico) en el espectrofotómetro (marca JENWAY, modelo 6405-UV Visible Spectrophotometer), a una longitud de onda 600 nm a las 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas. El experimento se realizó por duplicado (Krogstad y Moellering, 1986).

Inducción de mutantes con vancomicina

Los mutantes fueron inducidos por el método de Pfeltz con algunas modificaciones. Las cepas de *S. aureus* ATCC 25923 y Mu50 fueron crecidas en 4 ml de caldo ICC con $2 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de vancomicina (con cada una de las marcas en estudio) en agitación (250 rpm) de 1 a 7 días a 37°C hasta cuando se observó turbidez. Los cultivos crecidos fueron sembrados en agar ICC con $2 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de vancomicina (con la marca que permitió el crecimiento). Se incubaron por 24 horas a 35°C . Las colonias que crecieron en la placa, fueron sometidas a cultivos líquidos con una concentración mayor de vancomicina de 1 a 7 días a 37°C hasta cuando se observó turbidez. Los ciclos de cultivos en agar y en caldo fueron repetidos hasta alcanzar $16 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de vancomicina (con la marca que permitió el crecimiento) (Pfeltz *et al.*, 2000).

Se contó el número de colonias totales en los cuatro cuadrantes de cada placa, se les aplicó una media y se multiplicó por el factor de dilución, con estos resultados se

calcularon las UFC·ml⁻¹, utilizando la siguiente fórmula (Wootton *et al.*, 2001; Howden *et al.*, 2010).

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{Factor de Dilución}}{\text{ml de muestra}}$$

Efectividad de las vancomicinas para la erradicación de endocarditis experimental en modelo animal.

Basándose en el Código de Ética del Fondo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación (FONACIT) y en la metodología de Fantin *et al.*, 2001, modificada en el Laboratorio de Resistencia Bacteriana del IIBCAUDO, las ratas blancas de 0,3 kg (*Rattus norvegicus Sprague-Dawley*), se anestesiaron mediante la administración de 0,02 ml·kg⁻¹ de la solución del compuesto activo Xilazina (Clorhidrato) (Hidrocloruro de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3 tiacina) por vía intramuscular.

Una vez anestesiadas las seis ratas, se les administró el inóculo de *E. faecalis* ATCC 29212 (1,5x10⁸ UFC·ml⁻¹) por vía intravenosa. Para ello, se sujetaron cada una de las ratas en forma horizontal y con una jeringa de insulina de 1 ml se les colocaron 120 µl del inóculo por la vena lateral de la cola para producir una endocarditis experimental. La rata control se sacrificó a las 48 horas después de la inoculación. A las cinco ratas restantes, también inoculadas con la bacteria se les aplicó el tratamiento durante cinco días por vía intramuscular, una rata por cada vancomicina en estudio con una dosis de 15 mg·kg⁻¹ de peso corporal cada 12 horas.

Las ratas se sacrificaron con una inyección intramuscular de Succinilcolina 50 mg·ml⁻¹, ocho horas después de la última dosis del tratamiento. Con técnicas asépticas se realizó la apertura del tórax con un equipo de disección; luego con pinzas estériles se extrajo el corazón de cada una de las ratas y se colocaron en placas de Petri estériles para ser pesados en la balanza analítica. Seguidamente, se diseccionó cada uno de los corazones por separado con la ayuda de un bisturí estéril y se colocaron en 6 ml de caldo ICC; se incubaron en Baño de María a 37°C. Se realizaron diluciones dependiendo de la turbidez

del tubo que contenía cada uno de los corazones. Se sembraron 100 µl de las tres últimas diluciones y del tubo sin diluir en placas de agar ICC con la ayuda de una varilla de vidrio previamente estéril y se incubaron por 24 horas a 35°C.

Transcurrido ese tiempo se realizó la verificación de la capacidad de cada una de las vancomicinas de esterilizar el corazón, mediante el conteo de colonias en placas. El régimen de dosificación fue elegido en función de las concentraciones plasmáticas similares a las obtenidas en seres humanos y la dosis estándar de vancomicina corresponde estrechamente a un g cada 12 horas, régimen estándar en seres humanos. Los experimentos se realizaron por triplicado (Fantin *et al.*, 2001).

Finalmente, se realizó el recuento de colonias en cada una las placas, se les aplicó una media y se calculó las UFC por gramos de tejido cardiacos. La fórmula utilizada fue la siguiente (Perez, 2009).

$$UFC/g = \frac{\frac{\text{Número de colonias}}{\text{Volumen del sembrado (ml)}} \times \frac{1}{\text{Dilución}} \times \text{Volumen tubo ml} + \text{Peso(g)}}{\text{Peso (g)}}$$

Análisis estadístico

Los resultados de esta investigación se presentan en figuras y tablas, además se realizó un análisis estadístico no paramétricas como el Análisis de Varianza Bidimensional y la Prueba Q de Cochran para verificar la existencia o no de diferencias significativas con un nivel de significancia del 1% (Siegel y Castellan, 1995).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron macroscópicamente las características organolépticas de las cinco vancomicinas genéricas y copias, donde Vancocyn (copia) y Fada Pharma (genérico) precipitaron al cabo de los seis meses (Tabla 1). No obstante, todas las vancomicinas en estudio solubilizaron de forma inmediata y ninguna presentó turbidez al principio de su reconstitución. Según la literatura, vancomicina es soluble a pH 4 y disminuye su solubilidad a medida que aumenta el pH (Sweetman, 2007).

Tabla 1. Características organolépticas y solubilidad de vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan) analizadas en este trabajo.

Vancomicinas	Forma	Color	Gránulos	Nº de lote	Precipitado
Behrens ^a (genérico)	500mg, polvo liofilizado	Ligeramente rosada	Gruesos	0053005	No
Vancocyn ^b (copia)	500mg, polvo liofilizado	Rosada	Mediano	V061420	Precipitó a los 6 meses
Vancomax ^c (copia)	500mg, polvo liofilizado	Blanca	Finos	K9303	No
Celovan ^d (copia)	500mg, polvo liofilizado	Blanca	Finos	7600236	No
Fada Pharma ^e (genérico)	500mg, polvo liofilizado	Rosada clara	Finos	27109	Precipitó a los 6 meses

a.) México, b.) India, c.) Argentina, d.) India, e.) Argentina, N°: número

En diferentes artículos se han reportado vancomicinas blancas, semi blancas, ligeramente amarillentas a marrones, sin olor, con un sabor amargo (MHRA, 2011), dependiendo del fabricante. Según la fabricación del medicamento, se van a formar cristales, generando polimorfismos del mismo medicamento. La consecuencia de estas modificaciones físico-químicas, es que el principio activo precipite, impactando la

solubilidad y velocidad de disolución (biodisponibilidad), estabilidad del estado sólido (potencia), características de deformación (compactibilidad), y el tamaño de partícula y forma (densidad del polvo y propiedades de flujo).

En la síntesis de los medicamentos, se puede producir durante el proceso diferencias en el tamaño de los gránulos (Manzano y Morales, 2001), como se observó en este estudio, las cinco vancomicinas tuvieron diferencias ópticas en el tamaño de los granos del polvo y en el color. Como se puede observar en la tabla 1, Behrens es la de grano más grueso. Sin embargo, cuando se pesaron las cinco vancomicinas, se evidenció una diferencia importante, entre Celovan y las otras vancomicinas, ya que ésta, ocupó un mayor volumen con la misma cantidad pesada con respecto a las otras vancomicinas. La que ocupó menor espacio volumétrico fue vancomax.

En la tabla 2 y 3 se muestran las variaciones de pH, las cuales reflejaron que al reconstituir el polvo liofilizado de las cinco vancomicinas con distintas soluciones, éstas arrojaron diferentes valores de pH; en el caso del agua destilada presentaron valores de 6,5-6,8; en SSF 0,9% y cloruro de sodio 0,45% 3,4-3,9; en la solución Ringer lactato 5,4-5,6 (Tabla 2) y para el caso del agua desionizada, un pH inicial de 3,1-3,9 (Tabla 3). Cabe resaltar, que la determinación de pH en agua desionizada también se realizó a los 3 y 6 meses, mostrándose un incremento progresivo del pH inicial a lo largo del tiempo de experimentación alcanzando un valor de 4,2 para Vancocyn (copia) y de 4,6 para Vancomax (copia); observándose que solo Vancocyn (Tabla 3), presentó valores que se encuentran dentro de los límites o rangos teóricos (2,5-4,5) de la molécula original. Al aplicar el Análisis de Varianza Bidimensional se determinó que no hubo diferencias significativas ($p>0,01$) con 1% de confianza, al comparar las cinco soluciones utilizadas (agua destilada; agua desionizada; SSF 0,9%; cloruro de sodio 0,45% y Ringer lactato) en el experimento.

El incremento del pH puede producir la disminución de la solubilidad del fármaco, y este a su vez generar la formación de precipitado. Se ha demostrado previamente, que la

flebitis a menudo está relacionada con la precipitación de drogas solubilizadas tras la inyección en el torrente sanguíneo (Johnson *et al*, 2003; Sweetman, 2007; Revilla, 2009). No obstante, en otros estudios han considerado estable el antibiótico a un pH mayor a cuatro, tal es el caso de los resultados reportados por Nair *et al.* (2012), al evaluar la actividad *in situ* de iones de gel con vancomicina hidrociorada de liberación ocular, mostraron que el pH de la fórmula oftálmica era estable en un rango de 6,5 a 7,4.

Está descrito que vancomicina se puede reconstituir en SSF 0,9%, glucosa 5%, o Ringer acetato. Vancomicina en solución tiene pH bajo que puede causar inestabilidad físico-química cuando se mezcla con otros compuestos, razón por la cual, se decidió verificar si existían cambios de pH al disolverlas en diferentes soluciones disponibles en los medios hospitalarios y así prevenir mezclar el antibiótico con sustancias que lo inactiven. Aplicar sustancias alcalinas al mismo tiempo de administración de vancomicina se debe evitar. Dicho esto, no se debe administrar simultáneamente los siguientes medicamentos: polimixina B, colistina, aminoglucósidos, bacitracina, anfotericina B, viomicina, ni cisplatina (droga oncológica) porque potencia sus efectos neurotóxicos y nefrotóxicos (Anguran *et al.*, 1987).

El pH del cuerpo humano es neutro, por lo tanto las funciones biológicas del mismo deberían realizarse bajo esta condición. En farmacología, el pH influye en la solubilidad del fármaco, por lo que la relación entre pH y la solubilidad de los medicamentos ionizados tiene gran importancia en relación a la ionización de ácidos y bases débiles. En el caso de la estructura de vancomicina que presenta grupos ionizables que se relacionan con algunas características químicas del fármaco como la capacidad de unirse a iones metálicos para formar complejos con ciertas secuencias de aminoácidos terminales de péptidos bacterianos presentes en la pared celular, que pueden generar además de partículas sólidas insolubles, la no unión de la bacteria a la vancomicina (Revilla, 2009).

Por lo que, en el presente estudio se determinó el pH en SSF 0,9%, cloruro de sodio 0,45%, Ringer lactato, agua destilada y agua desionizada; las primeras tres soluciones

contienen electrolitos en concentraciones similares al suero sanguíneo y estas soluciones son las que se usan para pasar medicamentos a los pacientes; además se verificó la estabilidad de cada una de las vancomicinas genéricas y copias en las diferentes soluciones, debido a que presentan distintos valores de pH. No obstante, es importante que el personal de enfermería, que es el encargado de suministrar los medicamentos, tenga conocimiento del tipo de solución que debe utilizar para reconstituir ciertos fármacos de pH muy ácidos, ya que al modificarlo el pH alterará su estructura y por lo tanto afectará la farmacocinética y la farmacodinamia (Nath *et al.*, 2004; Sweetman, 2007).

Hay que recordar que el éxito terapéutico de un antibiótico no depende solamente de la interacción antibiótico-bacteria, sino que existen otros factores asociados a ello. El pH del medio es fundamental, razón por la cual, en este estudio se verificó el pH de las vancomicinas diluidas en otros solventes, diferentes de agua destilada. Está descrita la efectividad disminuida de aminoglucósidos y macrólidos a pH ácido; es bien sabido que en abscesos, el pH del medio es ácido (Bryan y van den Elzen 1976). Así como también, la ausencia de oxígeno es otro factor importante porque disminuye notablemente el pH del medio. Los antibióticos activos en la pared, necesitan que las células estén en división para poder actuar, si no, no serán efectivos y las condiciones en los abscesos, no son las adecuadas para la división celular (Neu, 1987).

Tabla 2. Variación de pH de vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan) diluidas en diferentes soluciones, analizadas en este estudio.

	Agua destilada	SSF 0,9%	NaCl 0,45%	Ringer Lactato
Behrens	6,8	3,9	3,9	5,5
Vancocyn	6,8	3,4	3,4	5,4
Vancomax	6,5	3,4	3,4	5,5
Celovan	6,5	3,9	3,7	5,4
Fada Pharma	6,5	3,9	3,9	5,6

SSF: Solución Salina Fisiológica. NaCl: cloruro de sodio

Tabla 3. Evolución del pH de vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan) reconstituidas con agua desionizada, al inicio, a los 3 y 6 meses de experimentación.

Agua desionizada			
	pH inicial	pH 3 meses	pH 6 meses
Behrens	3,1	3,4	3,6
Vancocyn	3,9	4,1	4,2
Vancomax	3,7	4,0	4,6
Celovan	3,1	3,2	3,5
Fada Pharma	3,1	3,1	3,3

En un estudio se evaluó el impacto del pH del antibiótico con respecto a la actividad inhibidora de varios betalactámicos (ampicilinas, cefalosporinas y carbapenémicos); variar el pH de 7 a 6,5 generó distorsiones en los bordes de los halos de inhibición con ceftriaxona, impidiendo la correcta lectura de los mismos. Cuando se alteró el pH del medio de cultivo (6,5; 7; 7,5 y 8), se observaron diferencias de los halos de cefotaxime a pH 8, con una reducción, concluyendo que la bacteria era resistente cuando a otros pH no lo era; dicho cambio pudo deberse a la hidrólisis de la molécula asociada al pH (Meléndez *et al.*, 2005). Al ser vancomicina un antibiótico con un pH muy bajo, éste puede precipitar y por ende degradar otros fármacos, por lo que se debe evitar en lo posible dichas interacciones medicamentosas para no generar fracaso terapéutico *in vivo* (Nath *et al.*, 2004; Sweetman, 2007).

Considerandose que, vancomicina puede verse afectada por la variación del pH, se decidió verificar los espectros de dicho antibiótico y así comprobar si están los grupos funcionales necesarios para interactuar con el pentapéptido de la bacteria, para ello, se utilizó la técnica de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), la cual permite identificar grupos funcionales de un determinado compuesto. Basándose en el hecho de que los enlaces químicos de las sustancias tienen frecuencias de vibraciones específicas, que corresponden a los niveles de energía de las moléculas. La región infrarrojo está dividida en tres zonas: IR cercano 12800-4000 cm^{-1} ; IR medio 4000-400

cm^{-1} ; IR lejano 400-10 cm^{-1} , siendo en IR medio donde se da la mayoría de las aplicaciones analíticas y los estados de excitación que se producen en esta región son de vibración-rotación, los cuales se refieren a las deformaciones que se producen en los enlaces de los átomos de las moléculas en estudio (Günzler y Gremlich, 2002; Saptari, 2004; Nakamoto, 2004).

En la figura 2, se muestran las bandas características de los grupos funcionales más importantes de las cinco vancomicinas (genéricas y copias). Para Behrens, Vancocyn, Vancomax y Celovan se observaron ocho grupos funcionales de los 23 que contiene la molécula original, sin embargo, para Fada Pharma, solo se detectaron siete grupos funcionales, y sin la detección del grupo NH_2 del intervalo de 1640-1560 cm^{-1} . Las bandas reportadas en este estudio fueron: bandas O-H en intervalos de 2900-3400 cm^{-1} ; N-H 3180-3500 y 1640-1500 cm^{-1} ; C=O 1700-1730 cm^{-1} ; NH_2 1640-1560 cm^{-1} ; C-O 1000-1300 cm^{-1} ; C-Cl 780-580 cm^{-1} , basado en los grupos funcionales del espectro teórico de vancomicina de la base de datos SDBS.

Zarif *et al.* (2012) realizaron un estudio sobre IR de vancomicina obteniendo bandas OH con longitudes de ondas entre 3383-3381 cm^{-1} ; C=C 1439 cm^{-1} ; C=O rango 1664-1708 cm^{-1} y C-O-C 1230 cm^{-1} . Asimismo, Nair *et al.* (2012) en su investigación sobre la actividad iónica *in situ* de vancomicinas hidrocioradas de liberación ocular, reportaron otra banda no determinada en el presente estudio, como la de Ar-O-Ar, que son grupos aromáticos unidos al oxígeno. En Irán Loveymi, *et al.* (2012) encontraron otras bandas que no se mostraron en los estudios citados anteriormente, como son las bandas CH_2 y CH_3 con longitudes de ondas de 2950-3000 cm^{-1} .

Resultados opuestos a este estudio fueron encontrados en India por Lankalapalli *et al.* (2015) quienes detectaron los grupos funcionales COOH con longitudes de onda de 3387 cm^{-1} ; R- CH_2 - CH_3 2935 cm^{-1} ; R-NH-R 2842 cm^{-1} ; R-CO- NH_2 1632 cm^{-1} ; R-O-R 1093 cm^{-1} , R- NH_2 687 cm^{-1} .

A pesar de que en este estudio se encontraron de 7 a 8 grupos funcionales, del total (23), los grupos funcionales detectados aquí son de gran importancia, ya que son los

responsables de las interacciones intermoleculares de vancomicina con el precursor del péptidoglicano terminado en D-Ala-D-Ala, para formar los cinco puentes que le confieren estabilidad al dominio bacteria-antibiótico.

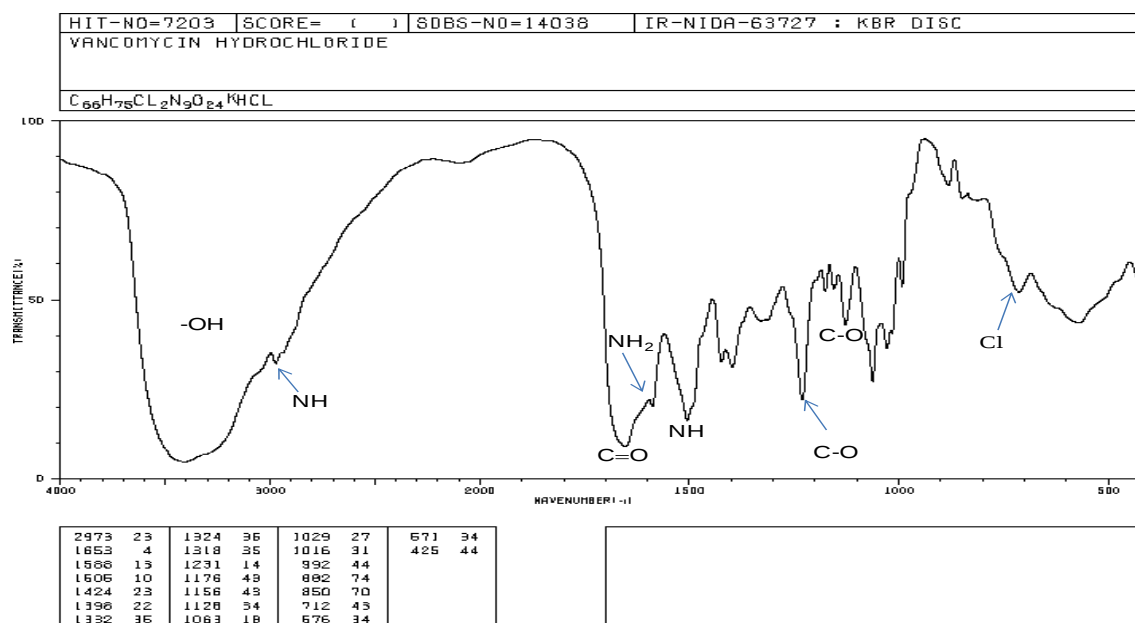


Figura 2. Curva espectral teórica de la molécula vancomicina, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.

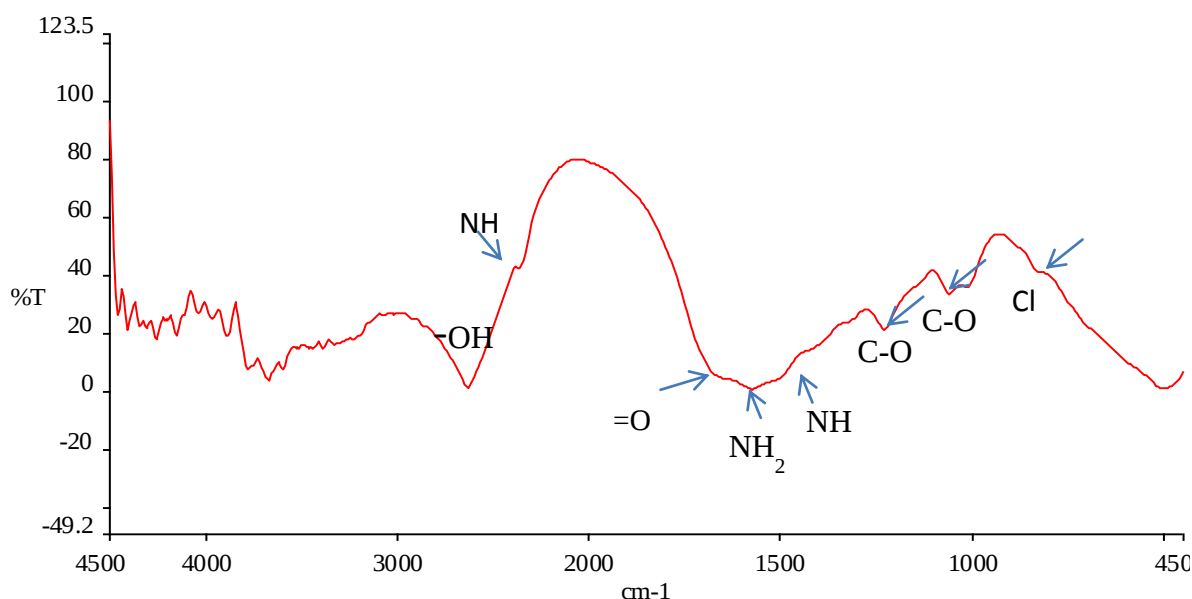


Figura 3. Curva espectral de Behrens por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.

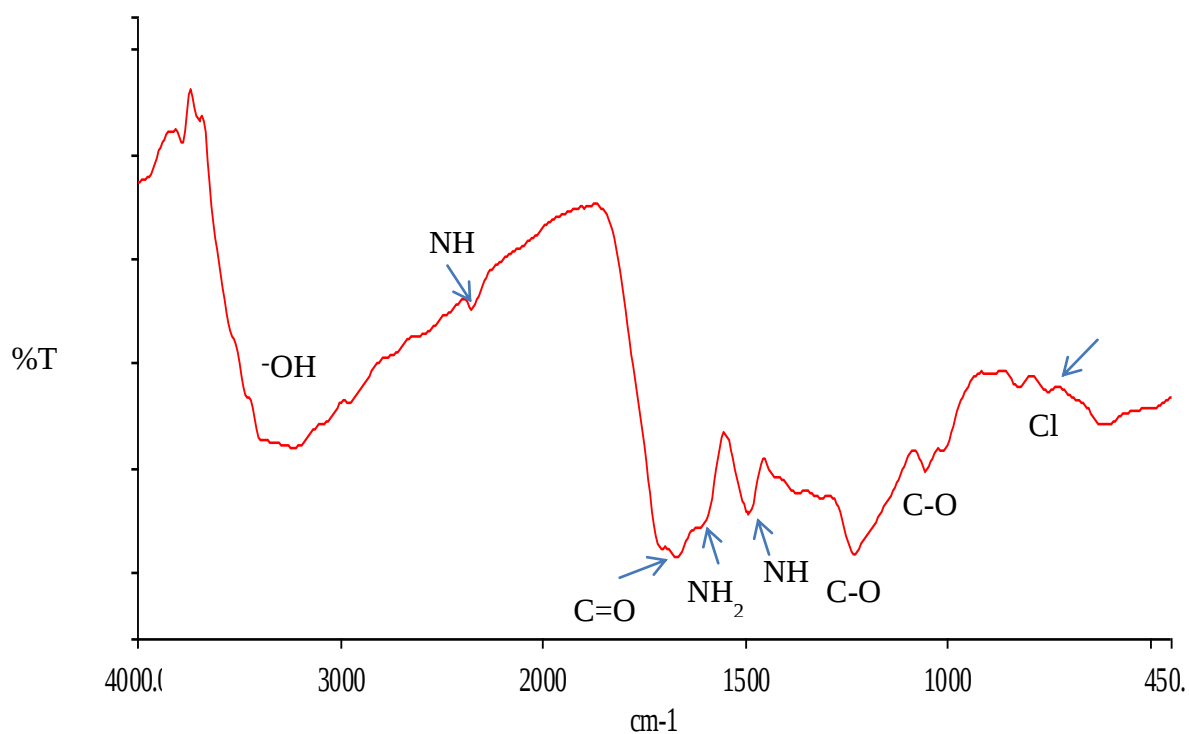


Figura 4. Curva espectral de Vancocyn por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.

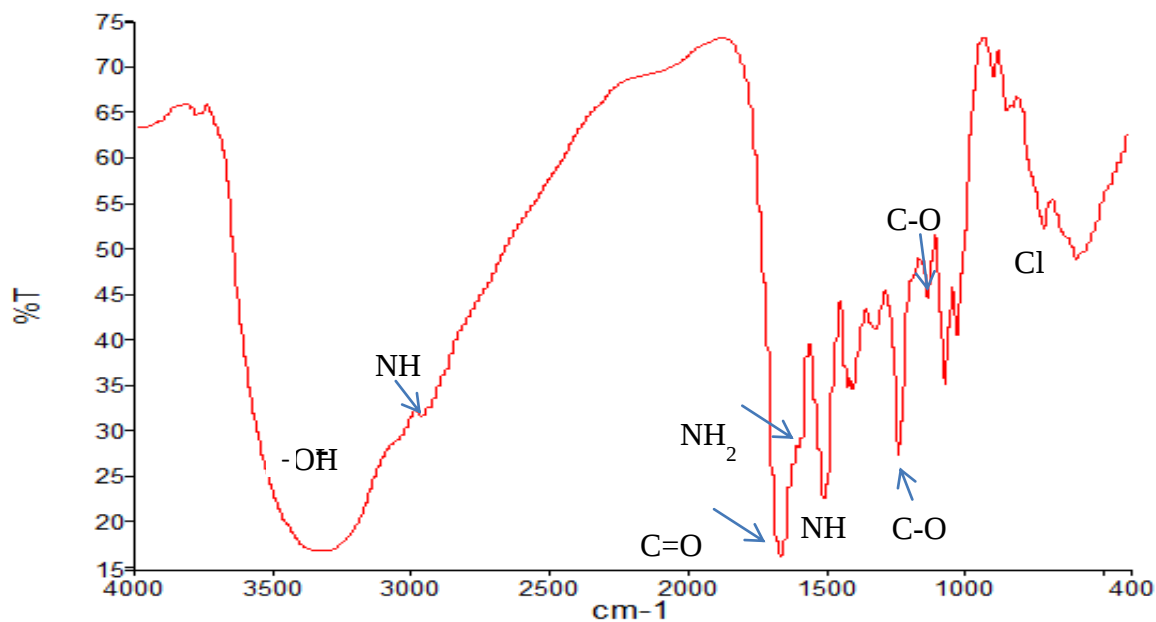


Figura 5. Curva espectral de Vancomax por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.

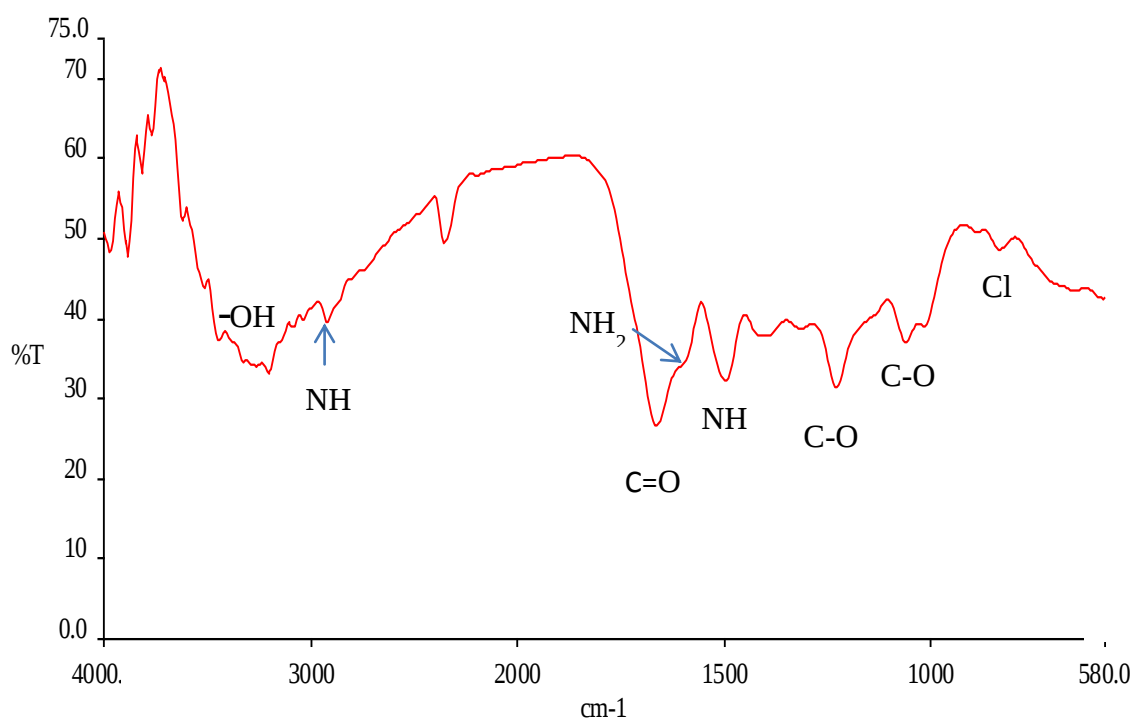


Figura 6. Curva espectral de Celovan por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.

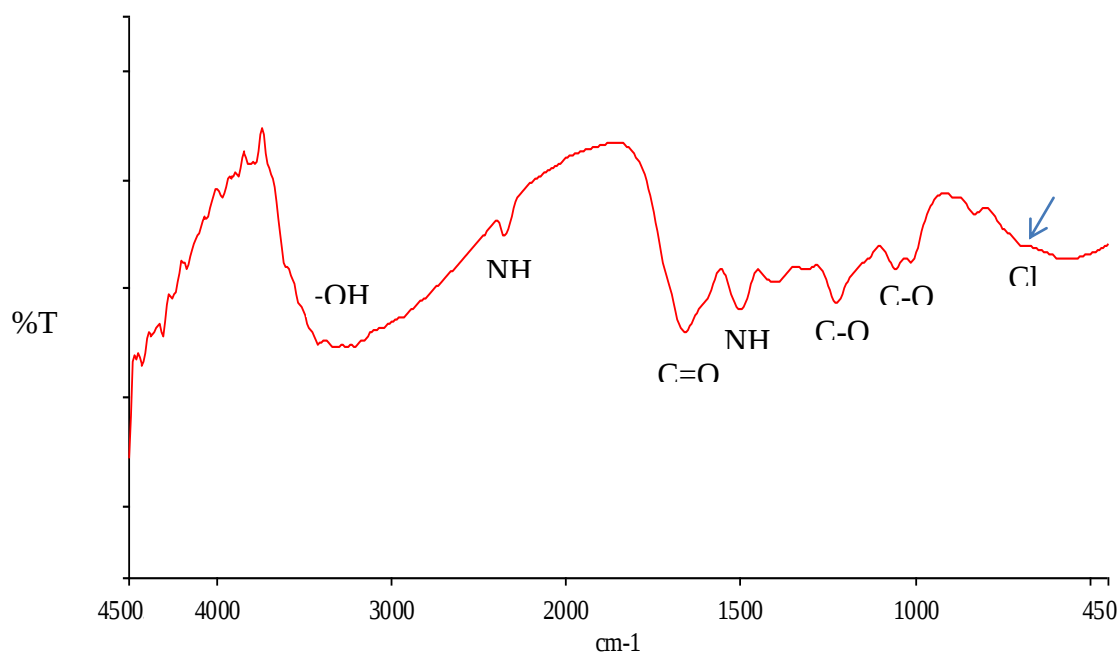


Figura 7. Curva espectral de Fada Pharma por el método de Espectrometría Infrarrojo con Transformada de Fourier, mostrando los principales grupos funcionales involucrados en la interacción bacteria-antibiótico.

Las vegetaciones de la endocarditis, albergan de 10^8 a 10^{10} microorganismos por gramo de tejido (Bayer y Norman, 1990). Esta conformación bacteriana tan densa, dificulta el paso de cualquier compuesto hacia su interior (antibióticos o respuesta inmune tanto humoral como celular). La localización de las vegetaciones (endocarditis de válvula derecha o válvula izquierda), las comorbilidades, e intervenciones quirúrgicas, determinan el éxito del tratamiento (Fowler *et al.* 2005). Cuando las bacterias están dentro de la biopelícula, su tasa de crecimiento disminuye, debido a la restricción de nutrientes, la falta de oxígeno y la respuesta adaptativa al estrés; lamentablemente, los antibióticos que actúan a nivel de pared, son activos solamente en bacterias en crecimiento, por lo tanto, si no se dividen, no son efectivos (Brown *et al.*, 1988; Donlan y Costerton, 2002; Gotz, 2002).

Determinar los espectros de cada vancomicina estudiada permitió demostrar la presencia de los grupos funcionales necesarios para interactuar con el pentapéptido de la bacteria. Para que vancomicina tenga acción bactericida, deben estar presentes los grupos amida (N-H) que se unen a los carboxilos del pentapéptido (C=O). En las cinco vancomicinas (genéricas y copias) aquí analizadas, se encontraron todos los grupos necesarios para la farmacodinamia correcta. De hecho, no se observó ninguna diferencia entre las cinco vancomicinas en todos los ensayos *in vitro*. La diferencia vino cuando se hicieron los ensayos *in vivo*, ya que entran en juego otras variables, ausentes en los ensayos *in vitro*, como el suero, las proteínas plasmáticas, el complemento, los anticuerpos, la respuesta celular del paciente, etc.

Vancomicina tiene una molécula de asparagina la cual establece un enlace peptídico del H de uno de los grupos amida con el carboxilo de alanina (sitio blanco de la bacteria), formando un enlace covalente ($R_2C=O \cdots HN$). Alanina es un aminoácido hidrofóbico, el cual crea una interacción hidrofóbica y las variaciones en la entropía provocan cambios en el plegamiento peptídico, razón por la cual toma peso la teoría de que el fracaso terapéutico de Vancomax y Fada Pharma viene dado por problemas en la farmacodinamia debido a la variante morfología, (claramente evidenciada por

Microscopía Electrónica de Transmisión) y no por la ausencia de algún grupo funcional indispensable para la interacción con el sitio blanco de la bacteria.

Se estima que en un tratamiento de vancomicina por cada $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ diarios, hay 1×10^{18} moléculas de vancomicina disponibles para unirse a los precursores del péptidoglicano. En dado caso de que exista una infección por cepas SAIV, la bacteria producirá pentapéptidos terminados en D-Ala-D-Ala y dipéptidos D-Ala-D-Ala que serán liberados al medio externo para atrapar la vancomicina presente en el medio, mientras se sigue formando la pared celular sin interferencia de vancomicina (Cui *et al.*, 2006). En dicha infección, habrá 10^6 dipéptidos D-Ala-D-Ala y entre $10^3 - 10^4$ pentapéptidos terminados en D-Ala-D-Ala. Pero para neutralizar $10^{12} - 10^{13}$ precursores del péptidoglicano, solo se necesitan 10^3 moléculas de vancomicina (Hiramatsu, 1998). En las dosis administradas a las ratas con endocarditis experimental por *E. faecalis* ATCC 29212, (ver efectividad de las vancomicinas para la erradicación de endocarditis experimentalen modelo animal en la página 51) Behrens tuvo $0,9 \times 10^{18}$, Vancocyn $0,6 \times 10^{18}$, Vancomax $0,2 \times 10^{18}$, Celovan $5,00 \times 10^{18}$ y Fada Pharma $0,2 \times 10^{18}$ moléculas de vancomicina. Como se puede observar, Celovan es la vancomicina que más moléculas disponibles tuvo; los antibióticos que tuvieron éxito terapéutico fueron Behrens, Vancocyn y Celovan.

En la tabla 4, se visualiza que las vancomicinas Vancomax y Fada Pharma, tuvieron la menor concentración, por debajo de 30 mg, sin embargo, cuando se estimó el número de moléculas necesarias para unirse a los precursores del péptidoglicano, (basados en el área C-Cl de los espectros de las vancomicinas) todas las vancomicinas de este estudio tenían las moléculas completas para alcanzar el éxito terapéutico, como de hecho ocurrió en todos los ensayos *in vitro* con un inóculo de 0,5 McFarland, ($1,5 \times 10^8 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$), lo cual viene siendo $1,5 \times 10^{11}$ precursores del péptidoglicano. Vancomicina se une a las proteínas plasmáticas entre 33 a 55%, suponiendo que vancomicina se una 30%, quedaría 70% libre para unirse a los precursores del péptidoglicano, todavía con ese cálculo, las vancomicinas probadas tendrían moléculas suficientes para alcanzar los

precursores del péptidoglicano, ya que están disponibles $1,05 \times 10^{18}$ moléculas de vancomicina.

Tabla 4. Estudio del área de C-Cl de los espectros de todas las moléculas de vancomicina y la determinación de su concentración y número de moléculas disponibles.

Tipo de vancomicina	Área (cm ²) del grupo C-Cl	Concentración del antibiótico mg	Número de moléculas disponibles
Behrens (genérico)	0,533	86	$0,9 \times 10^{18}$
Vancocyn (copia)	0,412	66	$0,6 \times 10^{18}$
Vancomax (copia)	0,165	27	$0,2 \times 10^{18}$
Celovan (copia)	3,103	500	$5,00 \times 10^{18}$
Fada Pharma (genérico)	0,144	23	$0,2 \times 10^{18}$

En la figura 8 se visualizan diferentes estructuras morfológicas de las vancomicinas (genéricas y copias) obtenidas por TEM. Según las imágenes, se pudo observar que las estructuras de las cinco vancomicinas no presentaron uniformidad en su morfología. En la estructura de Behrens se observan grumos aglomerados con superficies irregulares, Vancocyn y Fada Pharma se visualizan morfologías laminares, Vancomax también presenta morfología laminar pero con tendencia a la formación de grumos, Celovan presentó una morfología con tendencia esférica pero separada.

En medicamentos sólidos, la morfología puede comprometer la calidad de la droga debido a los cambios en sus propiedades físico-químicas, particularmente, la solubilidad (Martins *et al.*, 2014). Sin embargo, 80% de los productos se expenden en formulaciones sólidas ya que ofrece mayor estabilidad química si se compara con las formulaciones líquidas. Por otro lado, el desarrollo, manufactura, transporte, almacenamiento y suministro de formulaciones sólidas es más simple y menos costoso (Nunn *et al.*, 2005), pero a pesar de todas estas virtudes, existe un inconveniente y es, que se crean compuestos con morfologías diferentes en las formulaciones sólidas.

El agua está siempre presente en los compuestos sólidos y tiende a formar puentes de hidrógeno con las moléculas del medicamento. Esos puentes de hidrógeno pueden darle mayor estabilidad a los medicamentos sólidos; los cambios morfológicos se atribuyen a la presencia de los puentes de hidrógeno intermoleculares; pero no solo hay puentes de hidrógeno, sino otras uniones no covalentes como las fuerzas de van der Waals, interacciones electrostáticas y las interacciones π - π que influyen notablemente en el rearrreglo de los medicamentos sólidos (Desiraju, 2001; Purohit *et al.*, 2009). Cualquier cambio en el rearrreglo intermolecular de medicamentos sólidos alterará sus características físico-químicas, ya que esas características serán afectadas intrínsecamente por las conformaciones de los medicamentos, afectando no solo su estabilidad sino también su biodisponibilidad (Byrn *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2011).

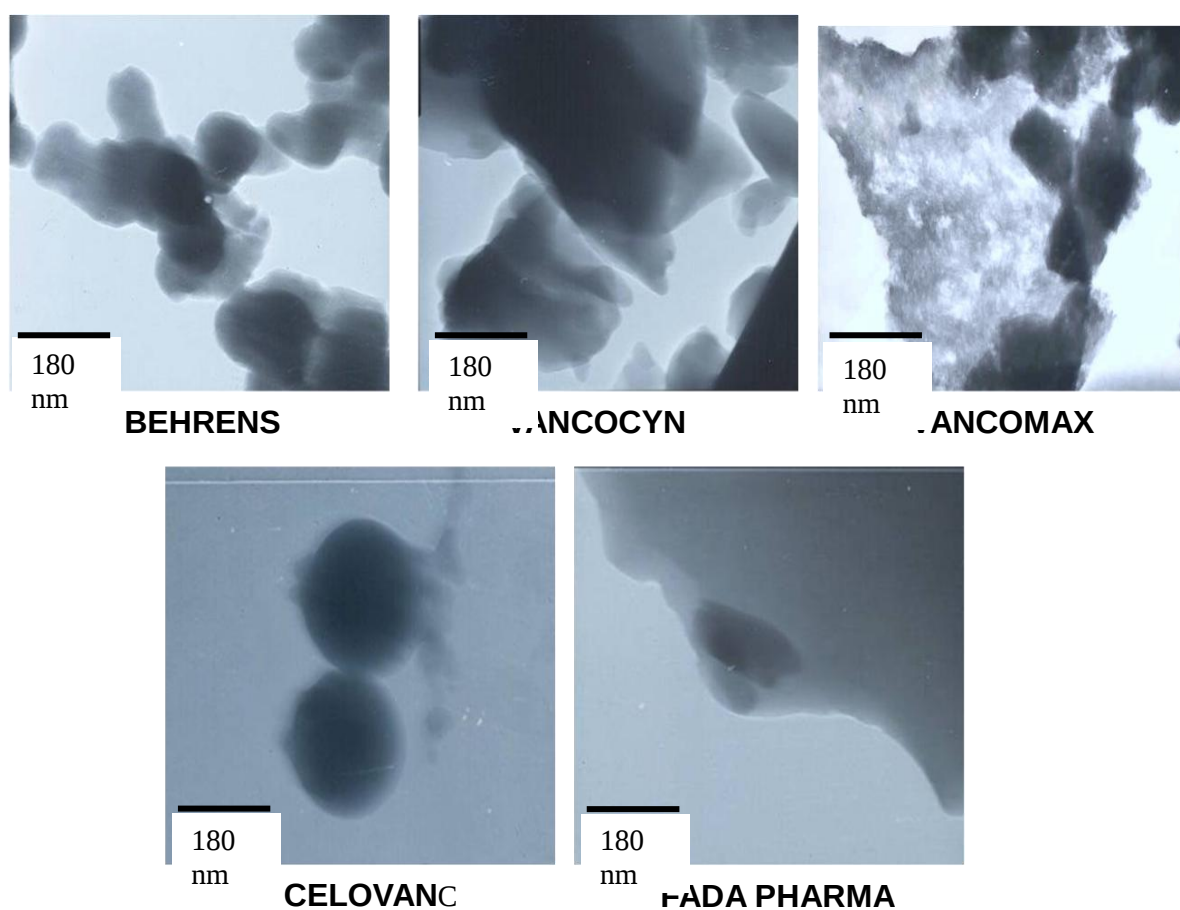


Figura 8. Morfología estructural de las cinco vancomicinas (genéricas y copias) analizadas en este trabajo por Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Vancomicina es una molécula demasiado grande, producto de un metabolito secundario de *Amiclatopsis orientalis*. Su estructura está compuesta de β -OH-Tyr2, β -OH-Tyr6, 4-OH-Phe-Gly4, 4-OH-Phe-5, 3,5-(OH) 2-Phe-Gly7, Leu1, Asn3 y dos azúcares (glucosil y vancosaminil), en conjunto producen una estructura bioactiva final (Nolan y Walsh, 2009). Está bien documentado que hay propiedades que se alteran a causa de las diferentes morfologías del principio activo de los medicamentos; entre esas propiedades están la tasa de disolución y la estabilidad de la droga; la reactividad química y fotoquímica, lo cual afecta la farmacocinética del medicamento; por otro lado, la tensión interfacial, el área de superficie y la superficie libre de energía, morfología de las partículas, modifican la farmacodinamia de la droga (Lee *et al.*, 2011).

En la figura 8, se puede observar que las vancomicinas con mayor área de superficie son Vancocyn y Fada Pharma lo cual genera una mayor tensión interfacial, que en teoría aumentaría la interacción bacteria-antibiótico, sin embargo, Fada Pharma no fue exitosa en la endocarditis experimental desarrollada en el laboratorio (ver página 51), lo cual hace pensar que la morfología de las partículas en esta vancomicina, están acumulando demasiada energía y al no estar la superficie libre de energía se generan trastornos, afectando la farmacodinamia *in vivo*, ya que *in vitro* no hubo ningún problema con respecto a Vancomax que tampoco tuvo éxito terapéutico, se puede observar en la figura 8, la irregularidad en la morfología de las partículas.

Los métodos que se emplearon para comprobar las CMI de las cepas controles utilizadas en este estudio fueron, los de dilución en agar y microdilución en caldo, cuyos métodos de laboratorio permiten determinar la menor cantidad de antibiótico para inhibir el crecimiento de la bacteria para poder saber si esta información es importante para el médico, las concentraciones séricas alcanzadas en el paciente serán suficientes para lograr el éxito terapéutico (Andrews, 2001).

En este estudio se usaron cinco vancomicinas entre genéricas (dos) y copias (tres), frente a cinco cepas con diferentes niveles de susceptibilidad, expresadas en las tablas 5 y 6.

Los resultados demuestran que la mayoría de las vancomicinas se encuentran dentro del rango de las CMI de las cepas certificadas, lo cual confirma las potencias microbiológicas de los antibióticos genéricos y copias analizadas en este estudio. *E. faecalis* ATCC 29212 tuvo un valor de CMI por dilución en agar por encima del rango teórico de las cepas certificadas, solo para el antibiótico Vancocyn (Tabla 5). Asimismo, se muestran los resultados por microdilución en caldo (Tabla 6), observándose que la mayoría de las vancomicinas se encuentran dentro del rango teórico de las cepas certificadas. La cepa *E. faecalis* ATCC 29212 presentó una dilución por debajo del rango de la cepa certificada con una vancomicina genérica (Behrens) y una copia (Celovan). Sin embargo, según el manual M100-S25 de CLSI (2015) este valor no interfiere en los resultados obtenidos de acuerdo a lo planteado en este estudio, ya que es aceptable una variación de una o dos diluciones por encima o por debajo del valor teórico.

Determinar la CMI es una necesidad imperiosa para elegir el tratamiento con vancomicina en infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus*, ya que no hay puntos de corte para el antibiograma, desde 2008 en el manual M100-S18 del CLSI. Hay dos métodos manuales y no automatizados, como son dilución en agar o microdilución en caldo disponibles para su detección. Obtener una CMI de 1 o 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en una prueba con la misma cepa, no tiene mayor implicación clínica y dependerá del método empleado para su detección (Ayala-Gaytán *et al.*, 2014).

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. Dependiendo de la expresión del nivel de susceptibilidad, la prueba E o E-test presenta una dilución mayor cuando la CMI de vancomicina es baja. Cuando se compara con la CMI obtenida por los métodos automatizados, MicroScan proporciona un resultado con una dilución mayor, mientras que con el método Vitek2, la CMI tiene una dilución menor a la obtenida por microdilución en caldo (van Hal *et al.*, 2011; Kruzel *et al.*, 2011). Otros estudios señalan que no solo el método utilizado para la detección de la

CMI sino el modo de almacenamiento de la cepa, influenciará la CMI a vancomicina expresada en cepas de *Staphylococcus* (Edwards *et al.*, 2012).

Tabla 5. Concentración Mínima Inhibitoria obtenidas por el método de dilución en agar de cepas certificadas con las cinco vancomicinas en estudio.

Cepas	CMI en Agar ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)					
	Valor teórico	Behrens	Vancocyn	Vancomax	Celovan	Fada Pharma
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,5-2 ^a	1	1	2	2	1
<i>S. aureus</i> Mu50	4-8 ^b	4	4	8	4	4
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1-2 ^c	2	2	2	2	2
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1-4 ^d	4	8	4	4	4
<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.

Con respecto a los resultados de la CMI por dilución en agar y por microdilución en caldo se observaron diferencias en ambos métodos. Por el método de dilución en agar la cepa *S. aureus* ATCC 29213 presentó CMI de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ con Berhens (genérica), Vancocyn (copia) y Fada Pharma (genérica), como se observa en la tabla 5, mientras que, por el método de microdilución en caldo, todas mostraron una CMI de $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Tabla 6).

La cepa *S. aureus* ATCC 25923 presentó una CMI de $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, por el método de dilución en agar (Tabla 5), mientras que por el método de microdilución en caldo fue de

1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para todas las vancomicinas, excepto para Fada Pharma (genérica). De acuerdo con los resultados expresados en la tabla 5 y 6 se deduce que el método de microdilución en caldo resultó más sensible y específico que el de dilución en agar.

Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria por Microdilución en caldo de cepas certificadas con las cinco vancomicinas (genéricas y copias) en estudio.

CMI en caldo (Microdilución) ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)						
Cepas	Valor teórico	Behrens	Vancocyn	Vancomax	Celovan	Fada Pharma
<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.

Al aplicar el Análisis de Varianza Bidimensional se determinó que no existen diferencias significativas ($p>0,01$) con un 1% de confianza entre las cinco vancomicinas genéricas y copias utilizadas con respecto a las cinco cepas certificadas empleadas en este estudio con los métodos de microdilución en caldo y dilución en agar; a pesar de ser el método de microdilución en caldo mas sensible y específico que el otro método empleado.

Entre febrero y junio de 2007, en un trabajo realizado, con cepas *Staphylococcus* spp. aisladas en el Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Estado Sucre, para detectar la susceptibilidad disminuida a vancomicina, se determinó la CMI por los métodos microdilución en caldo y dilución en agar, donde se evaluaron un total de 14 cepas de *S. aureus* en pacientes de UCI y hemodiálisis, obteniendo como resultado por el método de dilución en agar, 12 cepas con una CMI de $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y una con CMI de $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pero por el método de microdilución en caldo, 12 presentaron CMI de $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y 2 cepas $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, coincidiendo este estudio con el método de microdilución en caldo, demostrando que dicho método es más sensible y específico que el de dilución en agar (Manosalva, 2013).

Vesga *et al.* (2010) demostraron en su estudio el fracaso *in vivo* de productos genéricos de vancomicina a pesar de tener equivalencia farmacéutica *in vitro*, con el innovador. Determinaron la CMI por el método de microdilución en caldo con la cepa control *S. aureus* ATCC 29213, la cual fue $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, tanto para el producto innovador como para los productos genéricos, coincidiendo estos resultados con los de la presente investigación, particularmente con Behrens, Vancocyn y Fada Pharma. Resultados similares a este estudio fueron obtenidos por Vaudaux *et al.* (2010) al emplear el método de microdilución en caldo utilizando como cepa control *S. aureus* ATCC 29213 para detectar aislados de *S. aureus* intermedios a glicopéptidos (SAIV) con vancomicina obteniendo una CMI de $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, pero difieren con los obtenidos por Vesga *et al.* (2010), por una dilución.

Al igual que en este estudio, Walsh *et al.* (2001), determinaron la CMI por dos métodos (microdilución en caldo y dilución en agar) en cepas con sensibilidad reducida a glicopéptidos, empleando como cepa control *S. aureus* Mu50; con dicha cepa, obtuvieron una CMI de $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por microdilución en caldo y $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ por dilución en agar, coincidiendo estos resultados, solo por el método de dilución en agar, con los del presente estudio (Tabla 5). Asimismo, Swenson *et al.* (2009), al utilizar los métodos de microdilución en caldo y dilución en agar para detectar cepas de *S. aureus* con

sensibilidad intermedia a vancomicina (SAIV), un total de 45 cepas de los cuales 40 fueron detectadas con el método de microdilución en caldo y 5 por el método de dilución en agar, en un intervalo de CMI de 4 a 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ coincidiendo con este estudio para ambos métodos.

Hay muchos reportes de cepas SAMR con susceptibilidad disminuida a vancomicina, que indican fracasos terapéuticos, lo cual se relaciona con la resistencia a vancomicina y son cepas con CMI que varían entre 1 a 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (cepas SAIV heteroresistentes) (Rong y Leonard, 2010) y de 4 a 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (cepas SAIV homoresistentes) (Howden *et al.*, 2010). El problema de este tipo de cepas, es que parecen sensibles, pero no lo son, pues poseen un mecanismo de trampa, el cual consiste en enviar a la superficie de la bacteria dipéptidos D-Ala-D-Ala, que son el blanco de acción de vancomicina y las moléculas de antibiótico quedan fijadas al dipéptido, mientras que la pared se sigue produciendo debajo de esa nube de antibiótico-péptidos (Cui *et al.*, 2006). En 2005, Wotton *et al.*, publicaron un estudio en el cual demostraron por qué debían cambiar los puntos de corte de susceptibilidad para vancomicina (sensible y resistente), ya que más de 505 de las cepas SAIV estaban con CMI de 4 a 8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y más de 75% de las cepas SAIVh estaban entre 2 y 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Hoy por hoy, el punto de corte de sensibilidad propuesto en el Manual M100-S25 para vancomicina y *S. aureus* es de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (hasta 2008 fue de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Hubo que cambiarlo debido a la gran cantidad de fallos terapéuticos reportados; se comenzaron a publicar bacteriemias por *S. aureus* con mortalidad de 12% en cepas con $\text{CMI} \leq 2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y con $\text{CMI} \geq 4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ la mortalidad ascendió a 63% (Fridkin *et al.*, 2003); casos de bacteriemia por *S. aureus* con $\text{CMI} \leq 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ fracaso de 44% y cepas con CMI 1 - 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ fracaso de 90,5% (Sakoulas *et al.*, 2004). Como conclusión, la CMI, es el ensayo fundamental para decidir emplear o no vancomicina como opción terapéutica, ya que no hay puntos de cortes disponibles desde 2008, para realizar antibiogramas; y aún con cepas “sensibles” existe riesgo de fracaso terapéutico con vancomicina en estudios clínicos en donde no se emplean vancomicinas genéricas ni copias, sino el innovador;

por lo tanto, vancomicina, no es un buen agente antiestafilocócico y hay que replantearse el uso de vancomicina en infecciones estafilocócicas (Ayala-Gaytán *et al.*, 2014).

Hay muchas infecciones que son ocasionadas por bacterias productoras de biopelículas y determinar que la CMI no es indicativo de éxito terapéutico. La CMI de una bacteria es la representación de la respuesta de células libres (planctónicas) frente al antibiótico, no es en lo absoluto la CMI de bacterias conformando biopelículas; para ello hay que determinar la concentración mínima de inhibición de biopelículas (CMIB), pero lo que realmente se necesita saber, es la concentración mínima de erradicación de biopelículas (CMEB), ya que la CMI no será información importante para lograr eliminar las bacterias presentes dentro de las vegetaciones en las endocarditis bacterianas, es por ello que hay tantos reportes de fracasos terapéuticos empleando vancomicinas originales o innovadoras. Sakoulas *et al.*, (2004), sacaron unas conclusiones a propósito de las CMI de la cepas de *S. aureus* con vancomicina y es que si la CMI es $\leq 0,5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ solo habrá 55,60 % de éxito terapéutico y que si la CMI está entre $1 - 2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, el éxito terapéutico será apenas de 9,50 % (Sakoulas *et al.*, 2004).

En un estudio realizado con cepas de *S. aureus* aisladas en el Hospital Universitario de Bratislava-Staré Mesto, en República Checa, provenientes de catéteres venosos centrales, tubos intratraqueales de drenaje, fueron $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ la CMI y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) en 80% de las cepas estudiadas, sin embargo, la CMEB ($8 - 32 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) fue mucho mayor que la CMB en todas las cepas estudiadas, convirtiéndolas en resistentes, por lo tanto, vancomicina no fue la opción terapéutica para los pacientes con infecciones por esas bacterias (Kotulová y Slobodníková, 2010). Hay diferencias significativas en la composición de la matriz de las biopelículas de cepas de *S. aureus* meticilino resistentes, puesto que cepas *ica*-positivas tienen una biopelícula principalmente compuesta de proteína de adhesión poli-intercelular (API), mientras que las cepas *ica*-negativas poseen ADN extracelular. La CMI de vancomicina para las cepas

ica-negativas fue de $16 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la CMB fue de $32 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. No obstante, en las cepas *ica*-positivas la CMI estuvo por encima de $1024 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Ahora bien, no solo es importante la composición de la biopelícula sino el tiempo de evolución de su constitución o lo que es lo mismo, la edad de la biopelícula, pues mientras más joven sea, mayor posibilidad de erradicación; así fue demostrado en biopelículas jóvenes producidas por cepas de *S. aureus* meticilino resistentes *ica*-negativas tratadas con vancomicina a pesar de la presencia de la biopelícula, pero fue un fracaso rotundo en la erradicación de *S. aureus* meticilino resistentes *ica*-positivas en las biopelículas jóvenes y peor aún, cuando se trataron biopelículas viejas con vancomicina (Chopra *et al.*, 2015). En un estudio realizado con 58 cepas de *Enterococcus* spp. aisladas de puntas de catéteres intravasculares que estaban produciendo infecciones por biopelículas, se les determinaron las CMI, CMB y CMIB para vancomicina. La CMI fue de $4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, mientras que la CMB fue $> 128 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y la CMIB fue de $4096 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Sandoe *et al.*, 2006).

Como se puede observar, la determinación de la CMI de una bacteria planctónica en el laboratorio, no garantiza el éxito terapéutico de una infección producida por bacterias que se organizan en biopelículas, ya que la CMIB en este caso fue 1024 veces superior a la obtenida en el laboratorio; por ser vancomicina un antibiótico nefrotóxico, es imposible que se puedan alcanzar concentraciones terapéuticas exitosas en un paciente con una cepa con estas características. De ahí, que ocurran fracasos terapéuticos empleando vancomicina, sin importar que sean genéricas ni copias. Ya que el fracaso no vendrá dado por el origen (innovador, genérico y copia) del antibiótico sino por la compleja disposición de la bacteria en la estructura de biopelícula.

La carga bacteriana experimental de la punta del dispositivo para desarrollar biopelícula *in vitro* fue de 10^4 – 10^5 UFC, muy similar a la encontrada en la placa bacteriana dental para determinar la CMIB a vancomicina, ampicilina y linezolid; dicha concentración fue mil veces mayor que la CMI de las bacterias planctónicas, muy por encima de los

niveles alcanzados en suero con los antibióticos probados (Rozen *et al.*, 2001). Por lo tanto, la detección del perfil de susceptibilidad de una bacteria *in vitro*, en cepas de *Enterococcus* spp., causando infecciones sistémicas no tendrá valor predictivo para el éxito del tratamiento *in situ* (Sandoe *et al.*, 2002). La terapia combinada de un aminoglucósido con un inhibidor de pared, puede reducir la CMIB solo contra algunas cepas de *Enterococcus* spp, no contra todas (Sandoe *et al.*, 2006).

En la figura 9, se muestran los halos de inhibición obtenidos con las vancomicinas genéricas y copias de este estudio, colocadas en disco de papel Whatman número 1, para obtener una concentración constante de 30 µg de vancomicina (dicha carga es la misma de los discos comerciales y para la cual, el manual M100-S18 tiene puntos de corte), empleando la cepa *S. aureus* ATCC 29213, se observaron halos de inhibición de 29 mm para Behrens; 28 mm para Celovan, y 30 mm para Vancocyn, Vancomax y Fada Pharma, diluidas en SSF 0,9%. Para *S. aureus* ATCC 25923 las cinco vancomicinas presentaron halos de inhibición de 30 mm. Sin embargo, para *E. faecalis* ATCC 29212 los resultados fueron menores; 19 mm para Behrens y 20 mm para las cuatro vancomicinas restantes. Al utilizar las soluciones agua destilada, agua desionizada y Ringer lactato para reconstituir las vancomicinas; con la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 no hubo diferencia en los halos de inhibición, con agua destilada se observaron halos similares a los obtenidos con SSF 0,9 % a excepción de Fada Pharma que presentó halos de 21 mm; en agua desionizada todas las vancomicinas presentaron halos de 20 mm y para Ringer lactato los halos de inhibición fueron de 19 mm para las cinco vancomicinas (Figura 9). El bioensayo realizado con las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y ATCC 25923 y las vancomicinas reconstituidas con agua destilada, agua desionizada y Ringer lactato fue exactamente igual al de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 (datos no presentados).

Al aplicar la prueba estadística no paramétrica de Análisis de Varianza Bidimensional, no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p>0,01$) entre los halos de inhibición de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 con respecto a las cuatro soluciones empleadas; sin embargo, entre los halos de inhibición de los cinco antibióticos para las cepas

certificadas *S. aureus* ATCC 29213 y *S. aureus* ATCC 25923 con respecto a la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 si hubo diferencias significativas ($p < 0,01$), con un nivel de confianza de 1%.

Según el manual M100-S18 los puntos de corte para 30 µg de vancomicina, empleando la cepa *S. aureus* ATCC 25923 van de 17 a 21 mm, observándose que los valores obtenidos en este trabajo caen dentro de ese rango cuando se empleó la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 y están muy por encima cuando se utilizaron las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y ATCC 25923.

No obstante, los productos farmacéuticos deben cumplir con normas de estándares de calidad de la farmacopea internacional, los cuales incluyen eficacia, confiabilidad, y otros atributos que son determinados por varios organismos (The United States pharmacopoeia. XXVII, sin año de publicación). Siempre que se habla de genéricos o copias, se pone en duda la calidad de estos medicamentos, porque no son producidos por el laboratorio que lo elaboró en primera instancia (innovador), habiendo publicaciones que afirman que los medicamentos genéricos y copias, no cumplen con los estándares necesarios para alcanzar el mismo efecto terapéutico del innovador (Moeta *et al.*, 2009), incluso, que su comportamiento no es igual en modelos animales (Zuluaga *et al.*, 2009). Uno de los ensayos que deben pasar los antibióticos, son las pruebas de potencia o actividad biológica, ya que no basta con tener una composición similar al innovador, sino que sean efectivos clínica y bacteriológicamente. Lamentablemente, son muchas las publicaciones que afirman que vancomicinas genéricas y copias carecen de esa efectividad, razón por la cual, se realizaron los bioensayos con las cinco vancomicinas y cepas certificadas (Souza *et al.*, 2004; Méndez *et al.*, 2005).

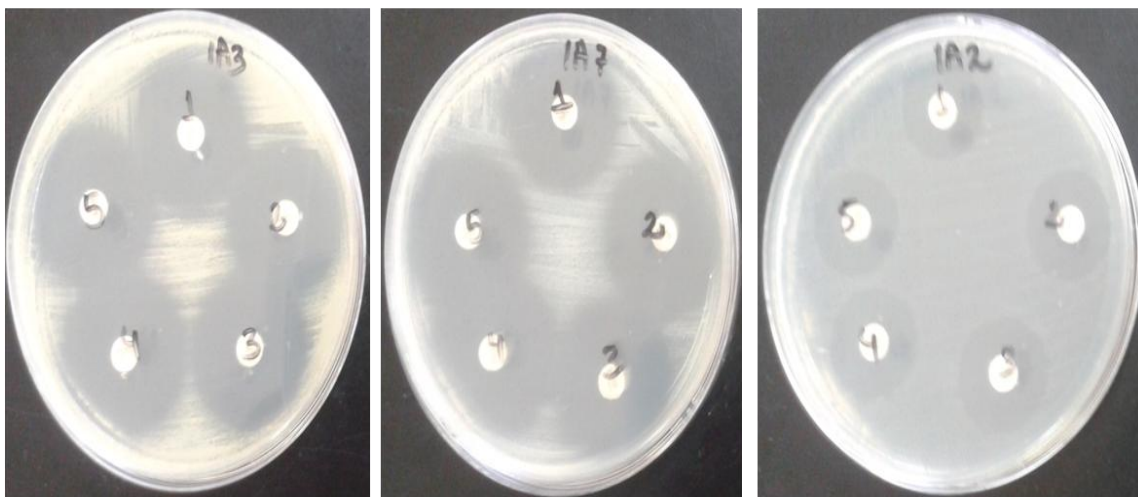


Figura 9. Bioensayo de las cinco vancomicinas genéricas y copias diluidas en SSF 0,9% frente a *S. aureus* ATCC 29213 (1A3), *S. aureus* ATCC 25923 (1A7) y *E. faecalis* ATCC 29212 (1A2).

Zuluaga *et al.* (2009) aplicaron un ensayo microbiológico (bioensayo), para determinar la equivalencia farmacéutica de 22 antibióticos genéricos intravenosos contra el innovador, de los cuales tres eran vancomicina, donde emplearon como cepa estándar *S. aureus* ATCC 6538p, utilizando cinco concentraciones diferentes ($8-128 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) y como diluyente agua destilada y suero murino, observándose como resultados que solo dos vancomicinas (VAN-APP, VAN-Proclin), presentaron equivalencia farmacéutica con respecto al innovador, sin embargo, en este estudio se emplearon tres cepas estándares, pero la concentración fue la misma para las cinco vancomicinas usadas, obteniendo como resultado halos de inhibición de tamaños similares para las cepas *S. aureus* ATCC 29213 y ATCC 25923 pero con una mayor diferencia en los halos de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 (figura 9 y 10).

En la India Lankalapalli *et al.* (2015) demostraron que al aumentar la concentración del fármaco aumenta el porcentaje de inhibición. Además, de mostrar que no hay una liberación constante del fármaco y que esta es capaz de inhibir la cepa de *S. aureus* durante las 24 horas. Esto indica que las soluciones de vancomicina son eficientes y también pueden inhibir el crecimiento de *S. aureus* debido a la difusión alta de la droga.

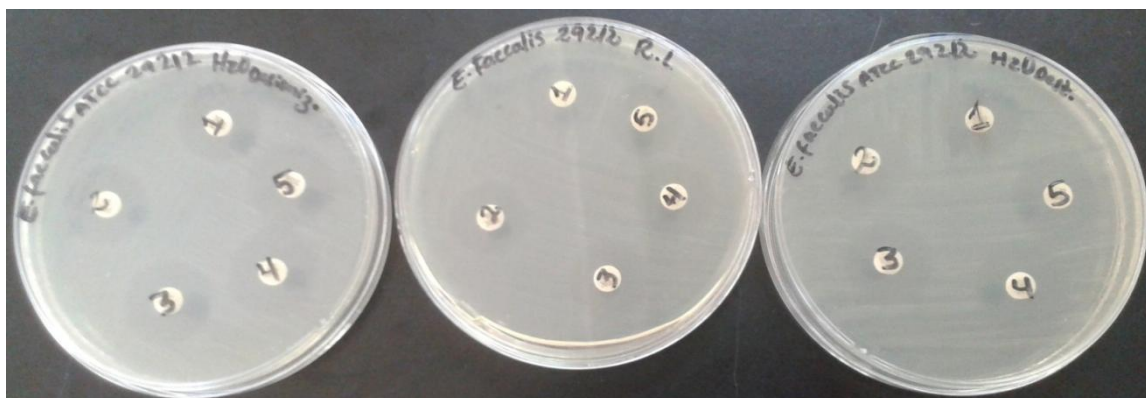


Figura 10. Bioensayo de las cinco vancomicinas genéricas y copias diluidas en soluciones de agua destilada, agua desionizada y Ringer lactato frente *E. faecalis* ATCC 29212 (1A2).

La curva de letalidad o muerte se emplea fundamentalmente para el estudio de nuevos antimicrobianos y para determinar el sinergismo o antagonismo de la combinación de dos o más sustancias administradas conjuntamente (Jacqueline *et al.*, 2003). Además, de suministrar una información dinámica de la actividad bactericida, y sobre la relación entre la concentración de antimicrobiano y su actividad microbicida (Brady *et al.*, 2006).

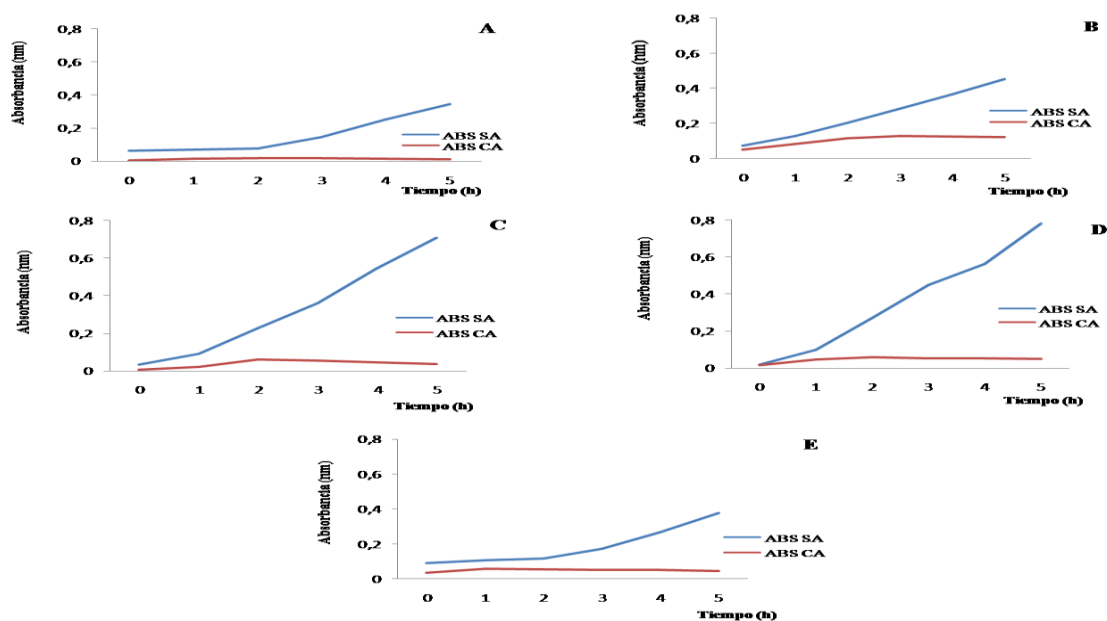


Figura 11. Curva de muerte de la cepa *S. aureus* ATCC 25923 frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora

En la figura 11, se puede observar que las diferentes vancomicinas produjeron un descenso de la población bacteriana en la primera hora del tiempo de exposición (cinco horas); en la cepa *S. aureus* ATCC 25923, a concentraciones por debajo de la CMI teórica, empleando como control, en todas las curvas de muerte, paralelamente se hizo crecer la cepa sin antibiótico para demostrar la viabilidad de la misma. Con este ensayo se demuestra la efectividad bacteriológica de las cinco vancomicinas (genéricas y copias) *in vitro*. La cepa *S. aureus* ATCC 25923 carece de mecanismos de resistencia a betalactámicos y glicopéptidos.

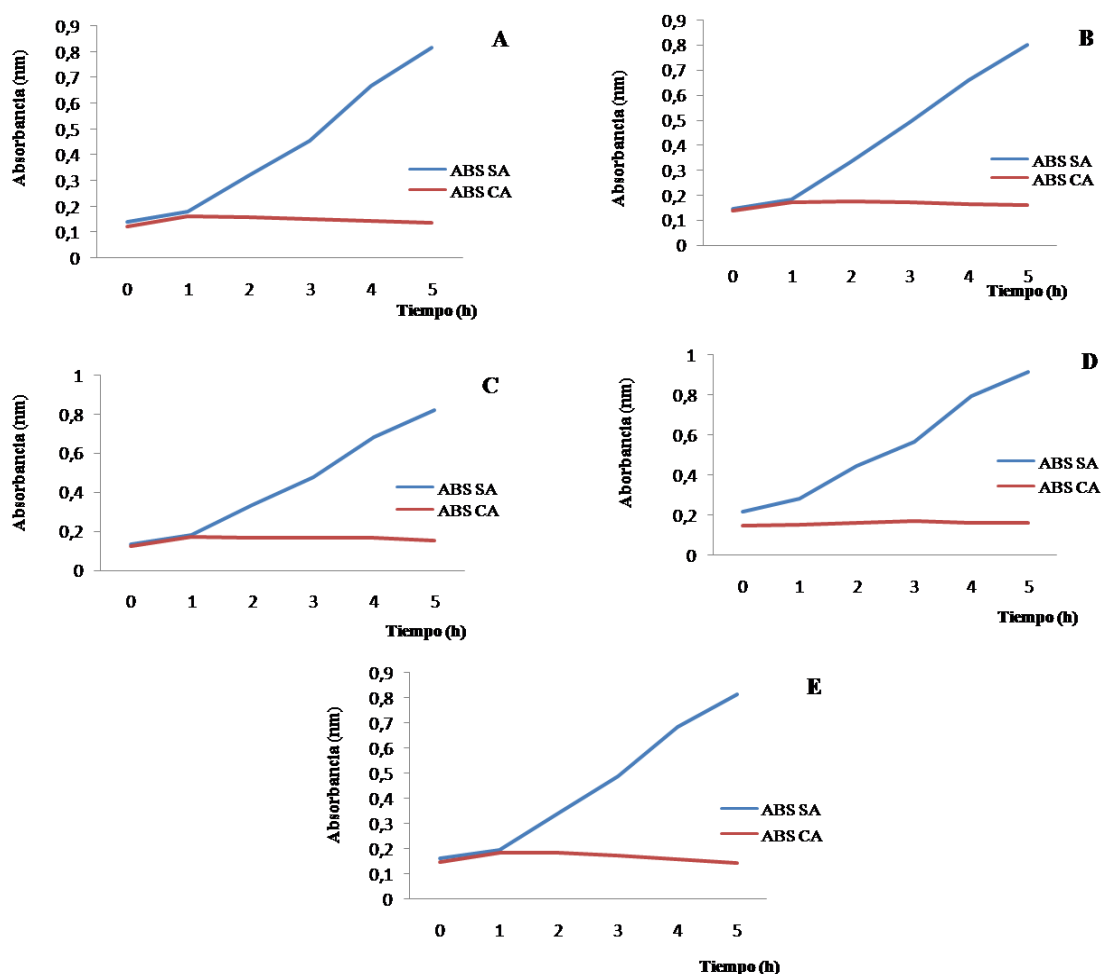


Figura 12. Curva de muerte de la cepa *S. aureus* ATCC 29213 frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora.

En la figura 12, se observó un descenso o muerte de la población a la primera hora del tiempo de exposición con vancomicina, a excepción de Celovan que la inhibición bacteriana se visualizó desde el inicio de la exposición con el antibiótico. En un estudio realizado por Vesga *et al.* (2010) probaron vancomicinas genéricas e innovador, utilizando como cepa control *S. aureus* ATCC 29213, encontraron que para el control las concentraciones bactericidas y bacteriostáticas actuaron como se esperaba, evidenciándose que no hay diferencias *in vitro* entre los genéricos y el innovador; al igual que este trabajo. La cepa empleada en este experimento, es *S. aureus* ATCC 29213, productora de betalactamasa, metilicilina sensible. Aquí se visualiza el gran poder bacteriológico *in vitro* de las cinco vancomicinas estudiadas en este trabajo. La cepa en ausencia de vancomicina crece exponencialmente durante todo el experimento.

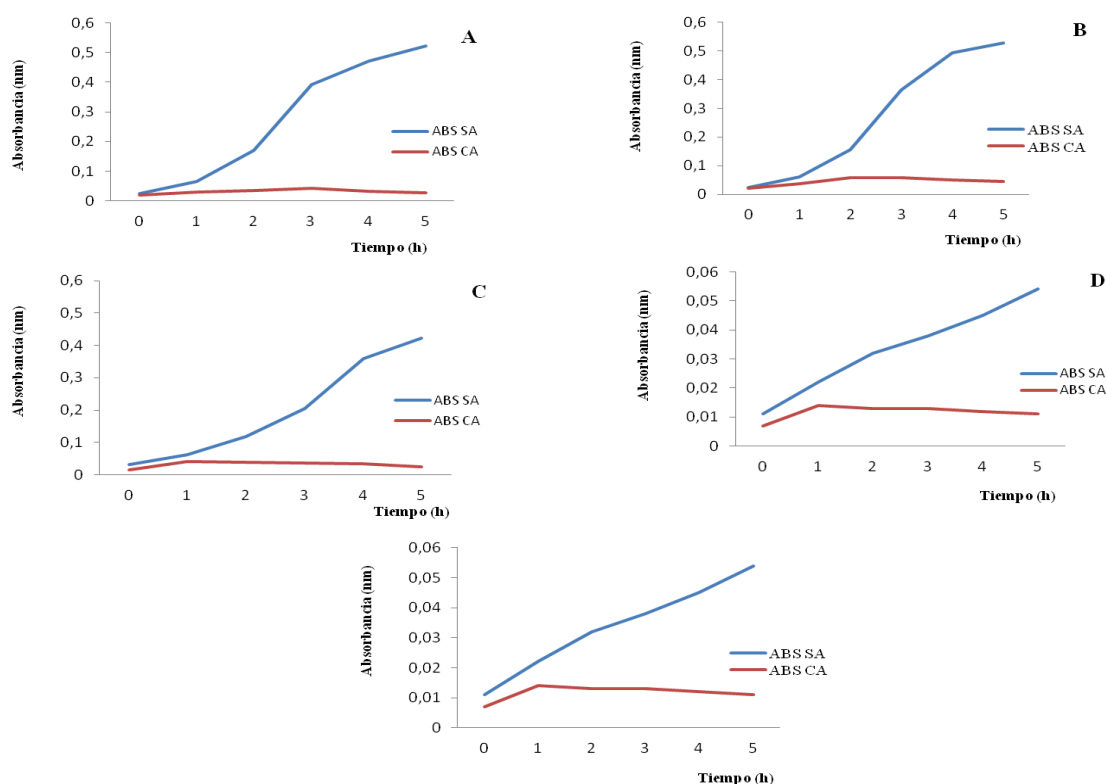


Figura 13. Curvas de muerte de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora.

En la figura 13, se confirma la sensibilidad de la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 frente a las cinco vancomicinas genéricas y copias en estudio, observándose disminución de la población bacteriana a la primera hora del tiempo de exposición (cinco horas), excepto Behrens que presentó un efecto bactericida desde el inicio de exposición de la bacteria con el antibiótico. A diferencia de las dos curvas de muerte anteriores, que fueron realizadas con *S. aureus* esta fue realizada con *E. faecalis* ATCC 29212; esta cepa carece de mecanismo de resistencia a betalactámicos o glicopéptidos. Esto se hizo con el objeto de verificar la acción de estas vancomicinas (genéricos y copias) con las dos especies que causan mas infecciones a nivel hospitalario. Como se puede observar, las cinco vancomicinas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *E. faecalis*, demostrándose el poder bacteriológico *in vitro* de todas las vancomicinas.

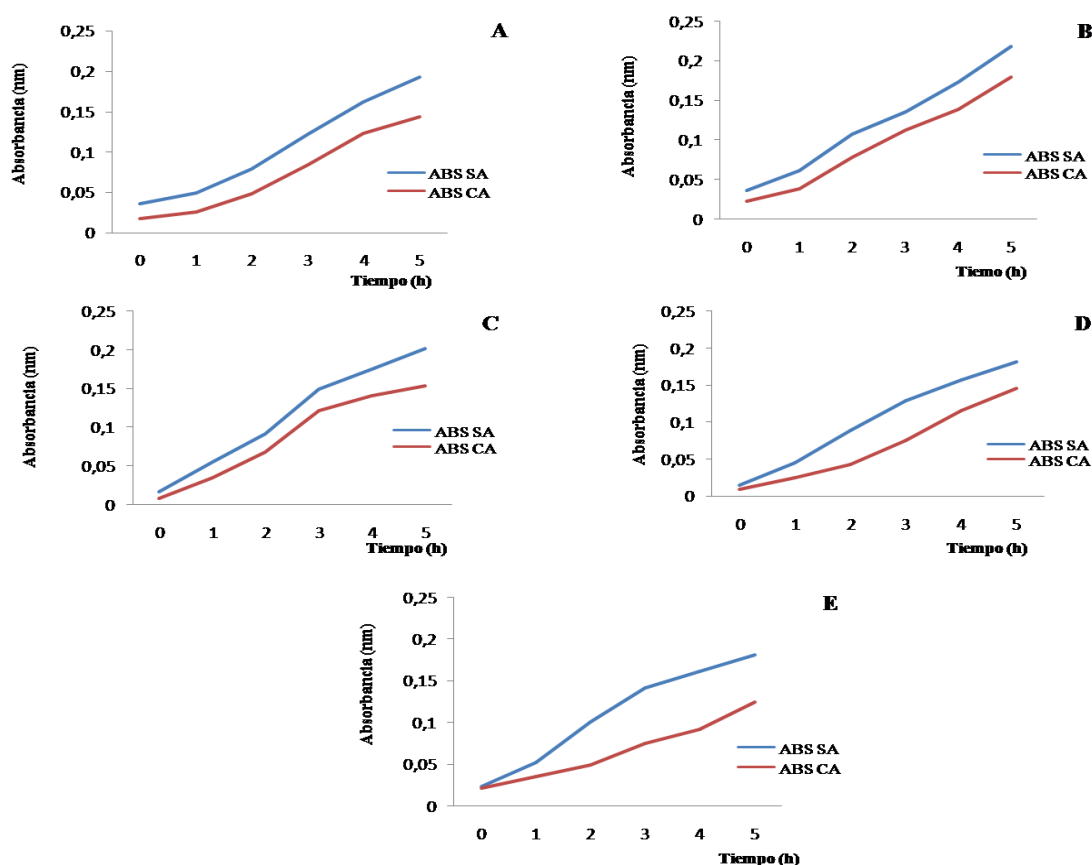


Figura 14. Curva de muerte de la cepa *S. aureus* Mu50 con resistencia intermedia frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Behrens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora

Con respecto a la curva de muerte empleando la cepa con susceptibilidad disminuida a vancomicina *S. aureus* Mu50, se observó tanto en el inóculo bacteriano sin antibiótico como en el inóculo bacteriano con antibiótico, un crecimiento exponencial similar cuando la bacteria se expuso a las cinco vancomicinas (genéricas y copias) (Figura 14); lo cual sugiere una expresión constitutiva del mecanismo de resistencia albergado en esa cepa, ya que en ningún momento la población se resintió ante la presencia del antibiótico. Cuando se extrapola esta experiencia *in vitro* a la respuesta intratratamiento en un paciente con un proceso infeccioso con una cepa de *Staphylococcus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina, la bacteria va a persistir en el organismo del paciente; es preferible retirar el tratamiento y dejar que el sistema inmune se encargue, ya que vancomicina es un antibiótico altamente tóxico con efectos adversos irreversibles.

El problema de este mecanismo de resistencia, es que se generan subpoblaciones resistentes a bajo nivel en poblaciones totalmente sensibles, que no son detectadas en las pruebas corrientes disponibles en los laboratorios de bacteriología, haciendo creer a los médicos de su falsa efectividad, ya que la población mayoritaria es sensible y va a ser eliminada, pero la resistente rápidamente va a crecer. Al eliminar la población sensible el paciente expresará una ligera mejoría, pero cuando la población resistente comienza a crecer y a colonizar el espacio que antes estaba ocupado por la sensible, el paciente retrocederá en su evolución clínica.

En vista de los varios fracasos terapéuticos de vancomicina frente a las endocarditis, se ha sugerido el uso de betalactámicos o glicopéptidos (vancomicina o teicoplanina), asociados a aminoglucósidos (gentamicina o estreptomina) en pacientes con endocarditis por *S. aureus*. Sin embargo, la asociación de vancomicina con gentamicina fue aditiva, no sinérgica frente a las cepas SAIV, por lo tanto, no mejoraron las respuestas terapéuticas de los pacientes (Houlihan *et al.*, 1997).

En un trabajo científico realizado por Pérez (2009) sobre la eficacia terapéutica de cloranfenicol, linezolid y vancomicina frente a cepas *S. aureus* sensibles y resistentes a

meticilina para el tratamiento de neumonía experimental, mostraron un comportamiento similar frente a las dos cepas de *S. aureus* meticilino resistente. Para la cepa MR30 a una concentración igual a su CMI permaneció estable. Sin embargo, a concentraciones de 2x y 4x CMI mostraron una actividad bactericida entre las 8 y las 24 horas. No obstante, en la cepa MR33 se observó un descenso de la población con una concentración de 1x CMI y para las concentraciones 2x y 4x CMI, se evidenció una actividad bactericida a las 24 horas de exposición con vancomicina. Por el contrario, en este estudio se produjo un incremento de la población bacteriana a la primera hora de exposición con vancomicina (figura 14).

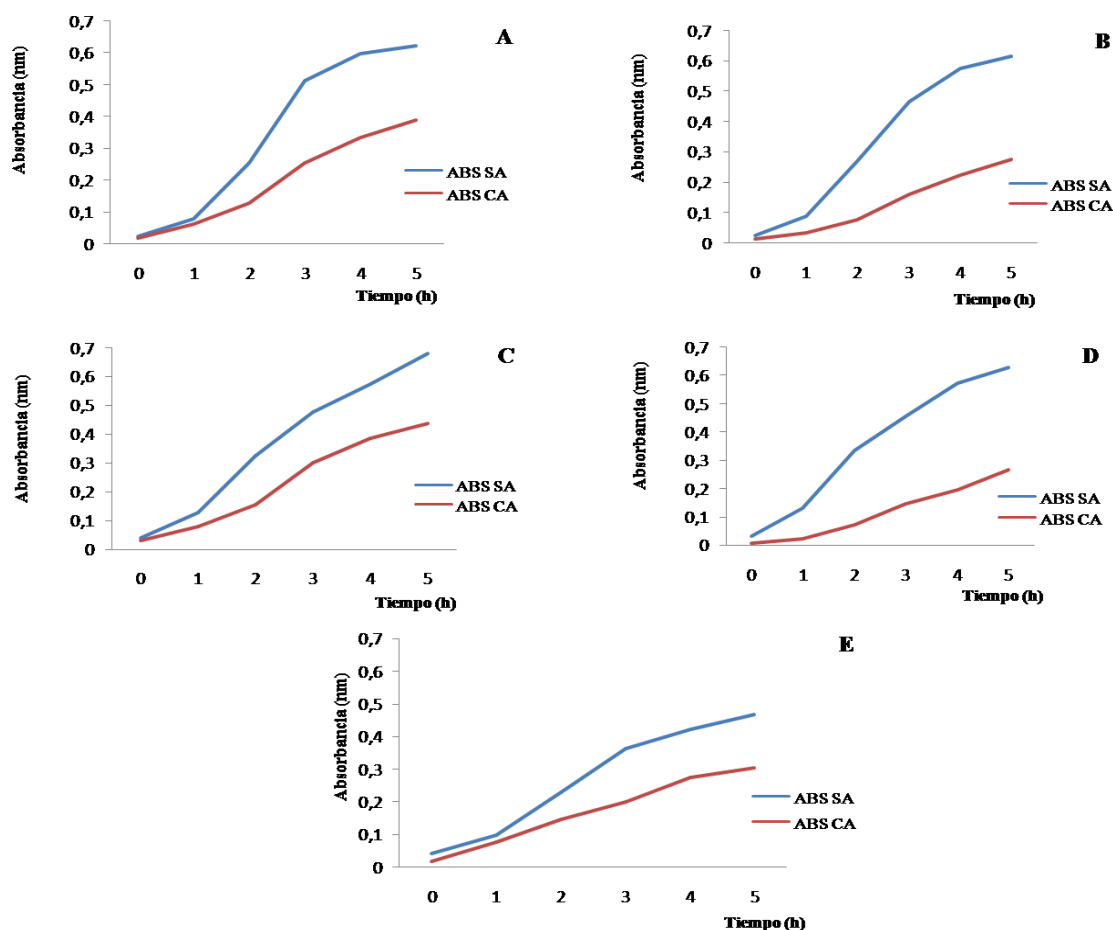


Figura 15. Curva de muerte de la cepa *E. faecalis* V583 con resistencia inducida a vancomicina frente a vancomicinas genéricas (Behrens y Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax y Celovan). A: Berhens, B: Vancocyn, C: Vancomax, D: Celovan, E: Fada Pharma. ABS: Absorbancia, SA: Sin Antibiótico, CA: Con Antibiótico, h: hora.

En un modelo de endocarditis experimental con una cepa de *S. aureus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina y con régimen de dosificación de 1,125 g cada 12 horas, la curva de muerte fue mucho menor a la observada con una cepa sensible a vancomicina. No obstante, un régimen de 1,25 o 1,5 g cada 12 horas, produjo una actividad bactericida mayor incluso en la cepa con sensibilidad intermedia. Vancomicina se administra en dosis mayores en pacientes hospitalizados, dichas dosis exceden 20 mg·ml⁻¹ sin causar efectos adversos como la nefrotoxicidad (James *et al.*, 1996; Moreira *et al.*, 1997; Rybak *et al.*, 1997).

La tabla 7 muestra los resultados del crecimiento por inducción de mutantes con las diferentes vancomicinas (genéricas y copias), observándose que solo Behrens indujo mutaciones en la cepa *S. aureus* ATCC 25923 a una concentración de 2 mg·l⁻¹ a las 24 horas. No obstante, al exponer nuevamente la cepa en estudio a una concentración de 3 mg·l⁻¹ con las cinco vancomicinas solo indujo mutantes en Fada Pharma en un promedio de 5,6 x 10⁻⁸ UFC·ml⁻¹; pero al incrementar dicha concentración (3 mg·l⁻¹) expuestas con las cinco vancomicinas no se produjo ningún crecimiento, lo cual indicó que a una concentración superior a 3 mg·l⁻¹ se inhibe el crecimiento y por lo tanto no genera mutantes. Está descrito que la cepa *Staphylococcus* con susceptibilidad disminuida a vancomicina son meticilino resistente. Esta cepa ATCC 25923 es meticilino sensible. No se hicieron pruebas de estos mutantes para verificar la estabilidad de los mutantes ni se expusieron por más de 360 generaciones.

Tabla 7. Inducción de mutantes de la cepa *S. aureus* ATCC 25923 a una concentración de 2 mg·l⁻¹

Vancomicinas	Cepas	UFC·ml ⁻¹
Behrens	9D10	2,8x10 ⁻⁸
Vancocyn	9E1	-
Vancomax	9E2	-
Celovan	9E3	-
Fada Pharma	9E4	-

Cuando aparece resistencia bacteriana por mutantes en un solo paso, la CMI aumenta ligeramente, lo que hace que, dependiendo de la susceptibilidad inicial al antibiótico, la bacteria cae o no en categoría de resistente. 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, pero obtener niveles superiores a PMC del fármaco sería fundamental durante el tratamiento, para evitar la selección de cepas mutantes resistentes (Olofsson y Marcusson, 2006; Firsov *et al.*, 2006).

En la tabla 8 se reflejó un crecimiento bacteriano de *S. aureus* Mu50 a las 24 horas con una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de las diferentes vancomicinas (genéricas y copias), 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 $16 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, observándose crecimiento en las diferentes concentraciones con las cinco vancomicinas. Sin embargo, se observó que al aumentar las concentraciones disminuía el crecimiento de mutantes expresados en $\text{UFC}\cdot\text{ml}^{-1}$, lo cual es lógico.

En un estudio realizado por Pfeltz *et al.* (2000) se evaluó un total de doce cepas de *S. aureus* que fueron sometidas a vancomicina para obtener mutantes intra-tratamiento; seis cepas adquirieron el fenotipo esperado rápidamente, dos lentamente y cuatro fracasaron en el desarrollo de las mutaciones para obtener el fenotipo SAIV. Las CMI de las cepas SAIV estaban en un rango comprendido de 4 a $16 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ y fueron estables en 20 pasajes no selectivos. No hubo correlación en la inducción de mutantes a vancomicina con los fenotipos de resistencia a meticilina (heterogéneos vs. homogéneos) ni la deficiencia autolítica.

Las cepas que fracasaron en la obtención de mutantes fueron meticilino sensibles. Los mutantes rápidos se obtuvieron en dos a cinco ciclos en una semana, los mutantes lentos

en cinco ciclos en siete semanas o siete ciclos en 11 semanas, sin embargo, este estudio difiere en cuanto a las cepas empleadas, ya que se utilizó una cepa sensible a vancomicina (*S. aureus* ATCC 25923) y otra con sensibilidad disminuida a vancomicina (*S. aureus* Mu50), observándose en la primera cepa la presencia de mutantes a una concentración de $2 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ para Behrens y a una concentración $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ solo para Fada Farma, pero al exponerla a una concentración superior a $3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ no se observó la presencia de mutantes y para la cepa Mu50 a concentraciones de vancomicina de $16 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Otros investigadores han reportado mutantes pero con una exposición mayor a la presentada en este estudio y con cepas meticilino resistente. Al aplicar el Analisis de Varianza Bidimencinal 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 nivel de confianza de 1% entre las cinco vancomicinas genéricas y copias empleadas con respecto a la cepa antes mencionada.

Tabla 8. Inducción de mutantes de la cepa *S. aureus* Mu50 a una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

Vancomicinas	Cepas	UFC·ml ⁻¹
Behrens	10C7	$4,9 \times 10^{-8}$
Vancocyn	10C8	$1,7 \times 10^{-8}$
Vancomax	10C9	$6,0 \times 10^{-8}$
Celovan	10C10	$8,6 \times 10^{-7}$
Vanco de Fada Pharma	10D1	$3,2 \times 10^{-8}$

Los experimentos de tasas de mutaciones deben ser realizados con antibióticos que ejerzan una presión selectiva que sea capaz de desarrollar mutaciones puntuales para generar un mecanismo de resistencia, de lo contrario, no serán efectivos para la inducción de mutantes (Gillespie *et al.*, 2003). Hay que tomar en cuenta tres factores para el desarrollo de mutantes *in vitro*, como el número esperado de eventos mutacionales, el número de cultivos a ser examinados y el tamaño del inóculo (Pope *et al.*, 2008).

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* (Asteris y Sarkar, 1996). Pero no basta solo hacer muchos cultivos, sino cultivos grandes, pues mientras más pequeños sean los volúmenes de los cultivos, menos nutrientes, y menos posibilidad de que aparezcan mutantes (Crane *et al.*, 1996.). Por otro lado, un parámetro importante es el tamaño del inóculo, ya que, mientras menos cargado sea, menor riesgo de arrastrar con mutantes previos al ensayo en evolución. Y justamente, para asegurarse de que los mutantes que aparezcan en los experimentos, no eran mutantes pre-existentes en el inóculo sino desarrollados intra-exposición de la bacteria al antibiótico, se deben montar muchos cultivos, para poder estimar la tasa de mutación en todos los cultivos (Luria y Delbrück, 1943).

Cuando la tasa de mutación de una bacteria es alta, no es necesario emplear volúmenes grandes de cultivo, ya que se van a obtener mutantes de todas formas, pero si la tasa de mutación es baja, mientras mayor sea el volumen del cultivo, mejor será la evolución de la bacteria hacia la mutación bajo la presión de selección del antibiótico (Pope *et al.*, 2008). Otro punto a tener en cuenta para la obtención de mutantes es la complejidad de la mutación alcanzada durante el ensayo, ya que si la mutación implica el cambio de una sola base, es mucho más factible que ocurra, a que si se deben generar varias mutaciones para poder obtener un mutante; los antibióticos que necesitan de una sola mutación para no ser efectivos son los betalactámicos, aminoglucósidos, quinolonas, ansamicinas, pirazinamida e isoniazida (Gillespie *et al.*, 2003). Lamentablemente, este no es el caso con vancomicina; se necesitan muchas mutaciones para poder obtener mutantes con sensibilidad disminuida a vancomicina.

Los modelos farmacodinámicos usan una concentración para seleccionar mutantes, que se ubique entre el valor de la CMI de la cepa sensible y la de la cepa resistente, pues se

apoyan en la teoría de la ventana de selección de mutantes, ya que suponen que concentraciones por debajo de ese límite (CMI cepa sensible), no seleccionarán mutantes (Drlica y Zhao, 2007). Pero se ha demostrado que concentraciones bastante distantes de la CMI de las cepas originales, son capaces de seleccionar bacterias resistentes (Baquero *et al.*, 1998).

Este concepto de concentración de prevención de mutantes es bueno cuando hay una población de 10^{10} células en el medio de cultivo, ya que inhibe el crecimiento de mutantes de un paso y alcanza la concentración más baja que impide el crecimiento de colonias. Si la concentración de antibiótico en el sitio de la infección, se mantuviera por encima de dicha concentración, no ocurrirían mutantes intra-tratamiento (Karl, 2003). Hay autores que sostienen que las mutaciones de *Staphylococcus* frente a vancomicina pueden ser evitadas bajo este principio (Shoji *et al.*, 2011). Sin embargo, varios artículos demuestran que las mutaciones de un solo paso de *Staphylococcus* no originan cepas con susceptibilidad disminuida a vancomicina o no sensibles (Zhao *et al.*, 2012; Hope *et al.*, 2008; Biavasco *et al.*, 2000).

Las infecciones con alta densidad bacteriana (abscesos y endocarditis de válvula nativa), pueden no ser erradicadas por el inóculo tan grande (efecto inóculo), a menos que la concentración de vancomicina en el sitio de infección alcance la concentración de prevención de mutantes y es muy difícil que eso pueda ser alcanzado que no sea en suero, seleccionando mutantes, porque vancomicina penetra muy mal el sitio de infección por el tamaño tan grande de la molécula, enfrentando a la bacteria a concentraciones sub-óptimas. Mutantes seleccionados con vancomicina, tuvieron CMI de $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (cepas parenterales CMI 2 – $4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) y CMI de $4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (cepas parenterales CMI 1 – $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). No obtuvieron mutantes con concentraciones más altas de la mitad de la concentración de prevención de mutantes (con diluciones dobles). Todos los mutantes seleccionados permanecieron inmodificables después de cinco días consecutivos de pasajes en placas sin antibiótico (Li-Guang *et al.*, 2013).

Hay estudios que han seleccionado cepas mutantes provenientes de *Salmonella typhimurim* y *E. coli* empleando estreptomycin y ciprofloxacina, respectivamente. Con

solo $\frac{1}{4}$ de la CMI de estreptomycin en un período de 700 generaciones se obtuvieron mutantes de *Salmonella typhimurium*. Pero en período menor (200 a 400 generaciones), se comenzaron a aislar mutantes con concentraciones de 2 a 16 veces las CMI de las cepas originales, y de 500 a 600 generaciones, mutantes tan resistentes que las CMI superan las 24 y 32 veces la CMI original. Mientras que en cepas de *E. coli* expuestas a ciprofloxacina, con concentraciones mucho más pequeñas a las empleadas con *Salmonella*, de apenas $\frac{1}{10}$ de la CMI, se detectaron en 500 generaciones subpoblaciones de nuevos mutantes (0,1%) con bajo nivel de resistencia (Gullberg *et al.*, 2011). El efecto inóculo aumenta la concentración de prevención de mutantes, así como la CMI y la curva de muerte (Udekwu *et al.*, 2009). Mientras mayor sea la cantidad de bacterias presentes, mayor será la cantidad de precursores de péptidoglicano que quedará libre sin unirse a moléculas de vancomicina y eso incrementa el riesgo de fracaso terapéutico.

Cualquier mutante espontáneo o célula resistente preexistente dentro de una población, será seleccionada inoculándola en medios enriquecidos con concentraciones de antibiótico de la ventana de prevención de mutantes (Firsov *et al.*, 2003). Desafortunadamente, las mutaciones presentes y la metodología empleada no estiman bien los puntos de corte de las cepas intermedias, pues no hay indicios de sensibilidad o resistencia y se confunde la CMB (Gunnar *et al.*, 2003; Mouton, 2002). El abuso de los antibióticos, basado en una falsa CMB resulta en consecuencias indeseables, como la toxicidad de la droga y la fuerte selección de bacterias resistentes intra-tratamiento (Rang *et al.*, 1999; Drlica, 2003).

Los modelos de experimentación animal son las piezas fundamentales en las ciencias médicas; ya que son utilizados para investigar y entender las causas, diagnósticos y tratamiento de enfermedades que afectan al ser humano y desarrollar terapias efectivas para su erradicación. La evaluación de modelos animales es un requisito básico como paso previo al ensayo clínico; debido a que, la información aportada es esencial para la eficacia y seguridad en el caso de medicamentos nuevos, (basicamente las propiedades relacionadas con la farmacocinética y la farmacodinámica de la molécula en estudio) o

sobre la pérdida de eficacia (von-Hoosier, 1999; Zuñida *et al.*, 2001). En el ámbito de las enfermedades infecciosas estos estudios son relevantes debido al dinamismo intrínseco de las bacterias que evoluionan constantemente generando cepas resistentes a la acción de los antibióticos y por ende al fracaso terapéutico (Obrink y Rehbinder, 2000).

En los resultados del estudio de eficacia terapéutica de la endocarditis experimental inducida en ratas con la cepa *E. faecalis* ATCC 29212, se pudo evidenciar que la rata control, la cual fue sacrificada a las 48 horas de ser inoculada con $1,5 \times 10^8$ UFC·ml⁻¹ con la cepa mencionada anteriormente, hubo crecimiento bacteriano de $1,8 \times 10^{12}$ UFC·g⁻¹ de tejido cardíaco.

En cuanto a las cinco ratas restantes luego de las 48 horas de exposición con la bacteria antes mencionada, se les aplicaron cinco días de tratamiento con vancomicinas genéricas y copias (15 mg·kg⁻¹ cada 12 horas); al ser sacrificadas después de los cinco días de tratamiento, se determinó que Behrens, Vancocyn y Celovan lograron eliminar la endocarditis experimental al esterilizar el corazón, ya que no se evidenció presencia de bacterias, mientras que con Vancomax y Fada Pharma se determinó crecimiento bacteriano con un promedio de $2,8 \times 10^{12}$ UFC·g⁻¹ y $4,2 \times 10^{10}$ UFC·g⁻¹, respectivamente; presentando solo Fada Pharma recuentos bacterianos inferiores a los encontrados en el control. Pero se observaron recuentos bacterianos superiores al inóculo inicial ($1,5 \times 10^8$ UFC·ml⁻¹) que se utilizó para inducir la endocarditis experimental tanto para el control como para las dos vancomicinas (Vancomax y Fada Pharma) que no lograron erradicar dicha infección. No obstante, al efectuar curva de muerte con la cepa *E. faecalis* ATCC 29212 se evidenció un descenso de la población bacteriana, *in vitro* al aplicar Vancomax y Fada Pharma.

Fantin *et al.* (2001) quienes utilizaron una dosis estándar de vancomicina (50 mg·kg⁻¹) demostrándose que el tratamiento no fue tan efectivo contra la cepa resistente BM4405 con fenotipo VanE que frente al control. Sin embargo, al aplicar la misma dosis de vancomicina en las dos cepas BM4405-1 y JH2-2 sensibles a vancomicina produjo una reducción bacteriana de aproximadamente 2-log₁₀. El resultado obtenido en este estudio

con Vancomax y Fada Pharma y una cepa sensible de *E. faecalis in vitro* parecido al obtenido por Fantin *et al.* (2001) con cepas resistentes; fracaso terapéutico, totalmente opuesto al observado *in vitro* (figura 12).

En este trabajo se emplearon inóculos de $1,5 \times 10^8$ UFC·ml⁻¹ de la cepa de *E. faecalis* ATCC 29212 (CMI vancomicina 4 µg·ml⁻¹) para inducir la endocarditis bacteriana en las ratas y se observó que tres de cinco vancomicinas no originales, hubo erradicación bacteriana, a las ocho horas post-tratamiento. En otros estudios, el inóculo de la cepa *S. aureus* GRP-0057 fue menor (10^4 UFC·ml⁻¹) con una CMI a vancomicina de 0,5 mg·l⁻¹ y ninguna de las vancomicinas genéricas comercializadas en Colombia funcionaron *in vivo*, a pesar de tener equivalencia farmacéutica (Rodríguez *et al.*, 2009).

Dichas variaciones pudieran deberse a que ambos estudios utilizaron parámetros diferentes, lo que explicaría parte de las discrepancias en los resultados. Fantin *et al.* (2001) en su estudio utilizó como modelo animal conejos blancos de Nueva Zelanda (2,0 a 2,5 kg), su vía de inoculación fue a través de una vena de la oreja por un catéter de polietileno, sin embargo, en este estudio se utilizó la vena lateral de la cola en ratas blancas *Rattus norvegicus Sprague-Dawley* (0,3 kg). No se realizó la aplicación del tratamiento vía intravenosa en este estudio, como está establecida su administración en humanos, debido a su difícil manipulación, dicha dificultad se podría evitar anestesiando las ratas. El análisis estadístico permitió apoyar la validez de los resultados obtenidos en este estudio, ya que al aplicar la Prueba Q de Cochran se determinó que hubo diferencias significativas ($Q_{0,01}=72,5$), con un nivel de confianza 1% entre las cinco vancomicinas que se utilizaron para tratar la endocarditis experimental, entre las que fracasaron con las que no.

Se debe tener en cuenta que, el perfil farmacocinético de los antimicrobianos en los animales de experimentación a menudo, difiere notablemente con el ser humano, debido a que los antibióticos se eliminan más rápido en los animales (Mizen y Woodnutt, 1988; Zak y O'Reilly, 1991). Algunos autores han establecido pautas, en infecciones experimentales en relación a la dosificación y eficacia para poder simular los parámetros

farmacocinéticos en humanos. Generalmente, la dosis debe relacionarse con la concentración sérica y los intervalos de dosificación de la vida media del antimicrobiano, ya que la vida media del fármaco en animales es menor, porque su metabolismo es mayor, dichos factores pueden afectar la farmacodinamia (Vogelman *et al.*, 1988; Legget *et al.*, 1991).

Los parámetros farmacocinéticos representan un factor determinante a la hora de valorar su efectividad *in vivo*. En el caso de vancomicina, los efectos secundarios van a limitar su margen terapéutico, adquiriendo mayor relevancia el estudio farmacodinámico para tratar de predecir la eficacia terapéutica (Taccone *et al.*, 2010; Taccone *et al.*, 2011). En pacientes críticos, la farmacocinética es muy diferente a la descrita en sujetos sanos (Birkett, 2002; Moise-Broder *et al.*, 2004; Nightingale *et al.*, 2007) ya que las condiciones fisiológicas en estado crítico están alteradas como consecuencia de disfunción orgánica, interacciones entre fármacos e intervenciones terapéuticas agresivas (Giannoni, *et al.*, 2006; Taccone *et al.*, 2011).

Los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, les van a permitir al personal médico optimizar el modo de administración de antimicrobianos en pacientes con ciertas patologías; que puedan generar variaciones en el volumen extracelular, que causen alteraciones en las concentraciones séricas o tisulares de los medicamentos; es decir, la inadecuada dosificación de la terapia antimicrobiana puede inducir al fracaso terapéutico (Scaglione y Paraboni; 2008; Lortholary *et al.*, 2008). Algunos investigadores han demostrado que tanto en pacientes neutropénicos como en modelos animales se reportaron bajas concentraciones séricas, tisulares y en líquidos corporales de antimicrobianos, lo cual se asocia con niveles terapéuticos inadecuados y estos a su vez provocan ineficacia en el tratamiento (Rolston, 2005). En el caso de los antibióticos hidrofílicos entre ellos vancomicina, conlleva a un mayor riesgo de presentar variaciones diarias en las concentraciones plasmáticas que pueden requerir el ajuste de dosis. De hecho, los fármacos hidrofílicos presentan un volumen de distribución limitado al espacio extracelular y sus concentraciones plasmáticas e intersticiales pueden disminuir notablemente (Vrhovac *et al.*, 1995).

En pacientes con insuficiencia renal es importante ajustar la dosis de vancomicina debido a la relación que se produce entre la toxicidad del antibiótico y la dosis administrada, ya que 90% de vancomicina se elimina por los riñones mediante filtración glomerular; debido a que, en este tipo de pacientes la eliminación de vancomicina es más lenta que en individuos sanos, una dosis superior a la habitual puede provocar nefrotoxicidad. Además, se ha demostrado que el desarrollo de nefrotoxicidad también se produce en pacientes tratados con dosis $> 4 \text{ g}\cdot\text{día}^{-1}$ con respecto a los que han recibido dosis inferiores (Lodise *et al.*, 2008). Por lo tanto, se debería limitar el uso de dosis altas de vancomicina al inicio del tratamiento y, 48-72 horas después, ajustar la dosis siguiente si la CMI es $< 1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ o sustituir el antibiótico por otro, en caso de que la CMI sea $> 1,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$.

No obstante, debería tenerse en cuenta la importancia de optimizar la eficacia del tratamiento antimicrobiano ya que las primeras 24-48 horas son críticas, sobre todo en pacientes con infecciones graves (Rybak *et al.*, 2000; Lodise *et al.*, 2003), como se ha demostrado en un estudio realizado en UCI, en el cual 33% de los pacientes que recibieron dosis habitual es de vancomicina, tenían valores de $\text{AUC}_{24\text{h}}/\text{CMI}$ inferiores a las recomendadas para tratar la infección originada por *S. aureus* (Fernández de Gatta *et al.*, 2007).

Los antibióticos son activos contra las bacterias cuando están libres; no importa la cantidad de antibiótico presente en el plasma, si está unido a proteínas, no estará disponible para unirse a las bacterias. Y eso está estrechamente relacionado con la CMI de la bacteria, si la concentración de antibiótico libre en plasma, está por debajo de la bacteria en cuestión, no habrá éxito terapéutico (Garrison *et al.*, 1990). Un caso relacionado en la literatura internacional, fue presentado con una cefalosporina, que *in vitro* es altamente efectiva pero en endocarditis por *S. aureus*, no funciona (Chambers *et al.*, 1984). Vancomicina no siempre resulta en la erradicación del microorganismo, aún cuando se demuestre en el laboratorio su perfil de sensibilidad (Castellano *et al.*, 2008).

En contraste, en un estudio de pacientes con infección respiratoria baja por *S. aureus*, la respuesta clínica y bacteriológica a la terapia con vancomicina estuvo correlacionada con el valor de la razón AUC/CMI, pero ninguna relación fue identificada entre el éxito y el tiempo en el que las concentraciones fueron mayores a la CMI (Moise-Broder *et al.*, 2004). En otro estudio con bacteriemia por *S. aureus* con CMI de 0,25 a 1 mg·l⁻¹, ninguna relación fue hallada entre el éxito terapéutico y el valor de la razón AUC/CMI (Drew *et al.*, 2004).

Cuando la tasa de acción bactericida de vancomicina aumenta, puede ocurrir el conteo bacteriano residual más bajo durante el intervalo de dosificación, siempre y cuando los niveles del antibiótico disminuyan tan bajo como la CMI; esto pudiera prolongar los intervalos antes de que ocurra un recrecimiento significativo, y permita un intervalo de dosificación más largo o más corto, dependiendo de la eliminación acelerada de la bacteria en el sitio de infección. Se sugiere la combinación de antibióticos inhibidores de pared conjuntamente con aminoglucósidos, para aumentar el efecto bactericida, ya que vancomicina sola en *Enterococcus* tiene un efecto bactericida pobre, así como los aminoglucósidos, pero combinados, potencian su efecto (Levison y Levison, 2009).

Otros estudios han demostrado que la combinación de penicilina G sódica o ampicilina mas estreptomycin no produce sinergismo contra las cepas de *Enterococcus*. Por lo que la falta de sinergismo entre estos antimicrobianos se consideró la causa del fracaso en el tratamiento de endocarditis enterocócica. Sin embargo, existen varios casos de endocarditis enterocócicas que fueron tratadas con éxito con penicilina o ampicilina más gentamicina en combinación, confirmándose la eficacia de este régimen terapéutico (Murray, 2000; Kak *et al.*, 2000).

Los antibióticos genéricos pueden contener partículas contaminantes, que generan daños en la microcirculación de los pacientes críticos, causando síndrome de disfunción multiorgánica. La disfunción microcirculatoria, ocasionada por la isquemia, trae consigo el deterioro del paciente y no es precisamente por fracaso de la acción del antibiótico sobre el microorganismo (Kirkpatrick *et al.*, 1996; Lehr *et al.*, 2000; Peters *et al.*, 2003;

Ghanaati *et al.*, 2009). Un estudio realizado con diferentes genéricos de cefotaxime, demostró la presencia de partículas extrañas, retenidas sobre una membrana filtro. Estas partículas contaminantes de los genéricos, son poblaciones heterogéneas que pueden ir desde fibras alargadas a pequeñas, densas o esféricas. La inyección intravenosa de esas partículas comprometen la microcirculación sanguínea, demostrado por análisis histológicos de los lúmenes de los capilares con partículas incrustadas (Lehr *et al.*, 2002). La eventual presencia de partículas contaminantes en los antibióticos genéricos es un riesgo para la salud de los pacientes, pues puede ocasionar bloqueo mecánico de la microcirculación.

Hay estudios de pacientes críticos con síndrome de disfunción multiorgánica con varios grados de disfunción microcirculatoria independientemente de eventos post-traumáticos, o post-infecciosos, entre otros (Lehr *et al.*, 2000). La formación de sales de los medicamentos genera inestabilidad e impurezas (Meredith, 2009). Dentro de las impurezas descritas en los viales de vancomicina, están: ácido pentanoico, (2*RS*)-2-ácido etilpentanoico, (2*RS*)-2-(1-metiletil) ácido pentanoico, 2,2-ácido dipropilpentanoico, pentanamida (valeramida), 2-propilpentanamida, 2,2-dipropilpentanamida, pentanenitrilo (valeronitrilo), 2-propilpentanenitrilo, 2,2-dipropilpentanenitrilo, *N*-demetilvancomicina B, desamidovancomicina B, aglucovancomicina B, desvancosaminilvancomicina B, producto de procesos de degradación o fermentación de las moléculas de vancomicina; ello se debe a la contaminación ambiental por microorganismos capaces de producir estos procesos en los medicamentos, razón por la cual, se recomienda la detección de endotoxinas presentes en cada vial, la cual no debe de pasar $0,25 \text{ UI} \cdot \text{mg}^{-1}$ (European pharmacopoeia 5.0. Vancomycin hydrochloride, 2005). Hay estudios que dicen que la cantidad de impurezas presentes en vancomicina no debe ser superiores a 4% (Harris *et al.*, 1983).

Los productos de degradación cristalina, ocurren por la desaminación del aminoácido asparagina de la estructura de vancomicina (Duquesne *et al.*, 2007). Esta transformación se acelera en presencia de pH alcalinos y altas temperaturas, resultando en cambios de

solubilidad de la molécula y por ende, su inter-relación con los precursores del péptidoglicano de las bacterias. La hipótesis es que, las impurezas actúan como antagonistas, logrando afectar la potencia y eficacia del antibiótico (Selsted y Ouellette, 2005; De Smet y Contreras, 2005; Fischbach y Walsh. 2006).

Por otro lado, se ha descrito que el fracaso de tratamientos antibióticos con genéricos, debido a la biodisponibilidad en pacientes críticos, es un riesgo asociado a la subdosificación de los antibióticos que inducen resistencia bacteriana intratratamiento (Pea y Viale, 2009), independientemente de los resultados *in vitro* de los laboratorios de bacteriología que comparan los genéricos con el innovador. Esto no ocurre con vancomicina administrada intravenosa, 100% biodisponible. Al comparar varias vancomicinas, que fueron similares con respecto a las CMI, y las CMB, los mutantes resistentes desarrollados intratratamiento, etc., encontraron equivalencia farmacéutica (Díaz *et al.*, 2011). Pero equivalencia farmacéutica (*in vitro*) no implica equivalencia terapéutica (*in vivo*), como fue demostrado en un estudio realizado con varias vancomicinas genéricas en Colombia, al tratar ratones neutropénicos infectados con cepas de *S. aureus* (Vesga *et al.*, 2010). No sólo los genéricos de vancomicina no fueron efectivos para combatir la infección en los ratones, sino que permitieron recuperar subpoblaciones resistentes de *S. aureus* estando bajo terapia antibiótica (Rodríguez *et al.*, 2012).

La farmacopea europea, japonesa y americana, sugieren fuertemente la verificación de los genéricos con técnicas de membrana de filtro por microscopía óptica, con el objetivo de determinar la pureza de los medicamentos suministrados a los pacientes críticos, pero dichas recomendaciones no son seguidas. Con este hecho tan simple, evitarían la compra de medicamentos contaminados con partículas dañinas para la microcirculación de los pacientes críticos y así eliminarlos de la lista de proveedores de los hospitales (Kirkpatrick *et al.*, 2013).

Vancomicina no registra fracasos terapéuticos solo con moléculas genéricas o copias; hay publicaciones que demuestran que infecciones de endocarditis enterocócica fracasan

con terapias con este antibiótico glicopéptido. Vancomicina tiene una actividad bactericida mucho menor que los agentes betalactámicos por su pobre penetración en los tejidos infectados; vale la pena recordar que es una molécula voluminosa, que aunado al estado de salud comprometido de algunos pacientes, son factores de riesgo para el fracaso de estos tratamientos o tener respuestas lentas en la mejoría del paciente (Chuard *et al.*, 1993; Houlihan *et al.*, 1997; Small y Chambers, 1990).

Por otro lado, los mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias, son otro factor importante para el fracaso de los tratamientos con vancomicina, sin que la molécula tenga implicaciones directas en la respuesta terapéutica. Esto ocurre con bacterias como las cepas de *S. aureus* con sensibilidad disminuida a vancomicina llamadas SAIV o SAIVh (por su heterogeneidad), e incluso las cepas de *Enterococcus* que han adquirido operones de resistencia a los glicopéptidos, que expresan bajos niveles de resistencia y no son detectados en el laboratorio de bacteriología (Daum *et al.*, 1992; Hiramatsu, *et al.*, 1997) Se desconocen las razones para explicar el índice farmacodinámico más bajo de la actividad de vancomicina, tanto en modelos experimentales como en infecciones en paciente hospitalizados, pero no cabe duda, de que la expresión heterogénea de los mecanismos de las cepas SAIV (SAIVh), juegan un rol importante (Aeschlimann *et al.*, 1999).

La patogénesis de *Enterococcus* está asociada con la habilidad para expresar proteínas de superficie las cuales le permiten colonizar y formar biopelículas en el hospedero humano, entre las cuales se citan citolisina, gelatinasa, serino-proteasa y la proteína G1s24, específicas de *E. faecalis* (Gilmore *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1998). Siendo la proteína G1s24 la responsable de la virulencia de *E. faecalis* en el modelo de endocarditis en ratas, aunque su función no está del todo determinada (Nannini *et al.*, 2005). Otro factor importante es la presencia de *pili* en la superficie de los patógenos Gram positivos que ha sido un paso esencial para la comprensión de la virulencia bacteriana. Ya que en *E. faecalis* la presencia de *pili* han conducido a la formación de biopelículas y son importantes en la patogénesis de endocarditis (Nallapareddy *et al.*, 2006).

En cuanto a la formación de biopelícula, cabe destacar que es un importante factor patogénico en las infecciones enterocócicas, y en este caso *E. faecalis* las produce, de manera más frecuente que *E. faecium*. Es por ello, que los *Enterococcus* inmersos en las biopelículas son más resistentes a los antibióticos que aquellos que crecen libres en la superficie. De hecho un estudio demostró que se requiere concentraciones más altas de ampicilina, linezolid y vancomicina para inhibir las biopelículas (Sandoe *et al.*, 2006). Se ha evidenciado que vancomicina o ampicilina en monoterapia fracasan frecuentemente en la erradicación de la bacteria que forman biopelículas con bacteriemia relacionada con catéteres, cuando se deja *in situ* (Sandoe *et al.*, 2002).

En un modelo experimental de formación de biopelícula sobre un catéter venoso central, para comprobar la farmacodinamia de linezolid y vancomicina en *Staphylococcus* y *Enterococcus* se demostró fallo microbiológico por la falta de actividad de linezolid y vancomicina frente a los microorganismos integrados en biopelículas (Wiederhold *et al.*, 2005). Los antibióticos que han demostrado mayor actividad frente a las biopelículas son daptomicina, quinupristin/dalfopristin y minociclina comparados con linezolid (Raad *et al.*, 2005). Así mismo, hay que recordar que, la endocarditis es una infección basada en biopelícula. Las comunidades bacterianas que crecen dentro de las biopelículas, están protegidas por la matriz polimérica secretada por los microorganismos que la integran, protegiéndolos de la acción de los antibióticos, respuesta inmune y sustancias antisépticas (Quie *et al.*, 1987; Stewart y Costerton, 2001).

Existen reportes controversiales de la farmacodinamia de vancomicina en modelos de endocarditis experimental por *S. aureus* en conejos que predicen la erradicación bacteriana y el éxito clínico (Chambers y Kennedy, 1990) además de septicemia por *S. aureus* (Harding *et al.*, 2000). Estos estudios demostraron su acción tiempo-dependiente, ya que la concentración plasmática de vancomicina libre es mayor que la CMI terapéuticamente relevante. En el caso de vancomicina que es un antibiótico tiempo-dependiente, requiere que la concentración de fármaco libre alcanzado en el sitio de la infección permanezca al menos 50% del intervalo de dosificación por sobre la CMI, si no, no habrá éxito terapéutico y si se expondrá la bacteria a concentraciones

subinhibitorias, capaces de seleccionar mutantes intratratamiento (Quintiliani y Quintiliani, 2008; Owens y Shorr, 2009).

A pesar de todos los avances tecnológicos en el diagnóstico y en la cirugía de las endocarditis, así como en la disposición de nuevas moléculas antibióticas para el tratamiento de endocarditis enterocócica, ha sido imposible modificar la tasa de muerte de la misma, permaneciendo en 20% los últimos 30 años (Fernández *et al.*, 2007). Un paciente de 84 años de edad fue tratado por una endocarditis enterocócica con daptomicina y ceftriaxona, con dosis por encima de los límites establecidos en las guías. El paciente no tenía co-morbididades, no adquirió la cepa de *E. faecium* en un hospital, la cepa no era multirresistente y sin embargo el tratamiento no funcionó, resultando en la muerte del paciente (Piszczek *et al.*, 2015). El éxito de la terapia de daptomicina con betalactámico, se le adjudica a que los betalactámicos (ampicilina y ceftaroline) pueden alterar la carga de la superficie bacteriana tanto de *Enterococcus* spp. como *Staphylococcus* spp., por lo tanto aumentan la habilidad de daptomicina de unirse y mejorar la actividad bactericida (Sakoulas *et al.*, 2012; Werth *et al.*, 2013; Dhand *et al.*, 2011).

Entre las barreras para tratar endocarditis enterocócica se incluyen agentes sin actividad bactericida demostrable y por consiguiente, falla en la cura microbiológica (Baddour *et al.*, 2005), producción de biopelículas por *Enterococcus* (Mohamed y Huang, 2007), y adquisición de mecanismos de resistencia a los antibióticos más empleados para su erradicación como ampicilina, penicilina y vancomicina (Biedenbach *et al.*, 2004). La endocarditis bacteriana es una infección producida principalmente por la disposición de la bacteria en biopelícula y está demostrado mundialmente, que *E. faecalis*, produce de 26 a 100% de las endocarditis bajo este rearrreglo bacteriano, y en Estados Unidos, 93% de los casos, así han sido reportados (Mohamed y Huang, 2007).

Por todo lo antes expuesto, la endocarditis enterocócica debe ser tratada con una terapia combinada, más que monoterapia; hay que tener en cuenta que el tamaño de la molécula de vancomicina es muy grande, por ello, su especificidad por las bacterias Gram

positiva; y no por las Gram negativas, ya que el péptidoglicano está protegido por una membrana externa de lipopolisacárido impermeable a las moléculas vancomicina (Quintiliani *et al.*, 1995; Pootoolal *et al.*, 2002) y que esto impide su paso a través de la biopelícula. *Enterococcus* spp. es intrínsecamente resistente a varias familias de antibióticos, lo cual dificulta un tratamiento exitoso en una infección causada por dicho microorganismo (Geraci y Martin, 1954).

La interacción y penetración de los antibióticos con la sustancia polimérica extracelular de las biopelículas ha sido estudiada por varios investigadores, como por ejemplo, la habilidad que tiene la biopelícula producida por *S. epidermidis* para esconder la sensibilidad de *B. subtilis* frente a un gran número de antibióticos; lo curioso es que no fueron afectados todos de igual manera, porque las ansamicinas, lincosaminas y macrólidos no fueron afectados o muy poco, pero con glicopéptidos, fueron totalmente inefectivos (Souli y Giamarellou, 1998). Un estudio demostró que la difusión de ceftazidime, cefsulodine y piperacilina, aunada a los geles de alginato, (producida natural o sintéticamente) fue mucho mayor en la matriz de la biopelícula que la presentada por gentamicina y tobramicina en los geles (Gordon *et al.*, 1988).

El salicilato de sodio tiene actividad antibacteriana, que potencia el efecto de algunos antibióticos y no solo eso, sino que además inhibe la adherencia bacteriana, el crecimiento y la formación de biopelícula en cepas de *S. epidermidis* (Farber *et al.*, 1992; Muller *et al.*, 1998). En experimentos *in vitro*, se demostró la efectividad de salicilato de sodio asociado con vancomicina para inhibir >99.9% la formación de biopelícula en cepas de *S. epidermidis* en comparación con el tratamiento de vancomicina sola o salicilato de sodio solo; vale destacar que salicilato de sodio tuvo mejor respuesta que vancomicina sola (Polonio *et al.*, 2001). Otros estudios han demostrado el efecto limitado de vancomicina en la adherencia y formación de biopelícula (Carsenti-Etesse *et al.*, 1993; Muller *et al.*, 1998; Rupp *et al.*, 1998). Se pudiera comenzar a emplear salicilato de sodio en pacientes con dispositivos extraños, como catéteres, prótesis, implantes, marcapasos, etc., para evitar la formación de

infecciones por biopelículas, las cuales son de mal pronóstico por el difícil acceso de los antibióticos al interior de la matriz del exopolisacárido.

El incremento en los costos de los medicamentos se ha convertido en un aspecto trascendente en la política sanitaria de muchos países incluyendo Venezuela. Por lo que se ha favorecido la presencia de medicamentos genéricos en el mercado farmacéutico con el propósito de sustituir los medicamentos innovadores que tienen un costo elevado, debido a esto, se han implementado diferentes medidas, como la sustitución por genéricos para optimizar los gastos farmacéuticos (Laosa *et al.*, 2008).

Pero la gran diversidad de definiciones adoptadas por varios países de America Latina y el Caribe, genera confusiones a la hora de sustituir medicamentos genéricos por el innovador, aun cuando ambos tengan el mismo principio activo (Homedes y Ugalde, 2005), y estas diferencias dificultan la caracterización y la comparación de los diversos mercados dentro de un mismo país o de diferentes países. Además, otros de los factores que ha frenado el avance de los medicamentos genéricos es la falta de confianza que un amplio porcentaje de médicos y de pacientes tienen en estos fármacos. Lo expresado hasta ahora refuerza la necesidad de ajustar las definiciones de medicamentos genéricos (OPS, 2006). De esta forma se recomienda mejorar no solo la aceptación, sino también la regulación estricta de los requisitos de calidad y efectividad cuando se promueve el reemplazo del medicamento prescrito por una alternativa de menor precio al público en general (Vacca *et al.*, 2006).

A pesar de no haber trabajado con ratas neutropénicas, el éxito del tratamiento con vancomicinas genéricas (Behrens) y copias (Vancocyn, Celovan) obtenido en este trabajo, no se debe a la respuesta inmune de las ratas, ya que hubo casos en los que las vancomicinas no funcionaron (Vancomax y Fada Pharma). En varios estudios se ha demostrado que aunque se trabajan con ratones neutropénicos, ninguna de las vancomicinas genéricas funcionan. Es el caso de vancomicinas genéricas que eran equivalentes farmacéuticamente, pero no terapéuticamente (Rodríguez *et al.*, 2009).

Llama la atención que las vancomicinas provenientes de Argentina (Vancomax, copia y Fada Pharma, genérico), no tuvieron efectividad *in vivo*, ninguna de las dos. Las que fueron sintetizadas en India (Vancocyn y Celovan, ambas copias) y México (Behrens, genérico) si fueron efectivas *in vivo*. Así mismo, fueron las que presentaron menor concentración de antibiótico en el análisis cuantitativo realizado en EITF. Esto permite sugerir a los centros de salud, abstenerse en la compra de medicamentos (genéricos y copias) provenientes de Argentina, ya que su equivalencia farmacológica no garantizará equivalencia terapéutica, trayendo consigo la muerte de los pacientes tratados con esas vancomicinas.

CONCLUSIONES

La coadministración de vancomicina con otros medicamentos, produce alteraciones en el pH e interacciones que afectan la farmacodinamia del antibiótico, generando fracaso terapéutico.

No existe extrapolación de los experimentos *in vitro* e *in vivo* por la variación de la matriz biológica, ya que *in vitro*, la vancomicina se encuentra reconstituida en agua y expuesta la bacteria sola, mientras que *in vivo*, está presente el suero y son muchos los factores que entran en juego que no están interfiriendo en la placa de Petri. Por otro lado, *in vitro*, las células bacterianas están libres mientras que en endocarditis, están organizadas dentro de biopelículas, limitando el acceso del antibiótico a su sitio de acción.

El fracaso de tratamientos con vancomicina después de un reporte de laboratorio con CMI en rangos de sensibilidad, viene dado porque la CMI de la bacteria involucrada en biopelícula es mucho mayor a la de la bacteria planctónica.

Los ensayos microbiológicos solos, no fueron suficientes para determinar la efectividad terapéutica de las vancomicinas (genéricas y copias) estudiadas, sino que se necesitaron pruebas más complejas, como los modelos animales experimentales asociados a los microbiológicos para medir su efectividad *in vivo*.

La potencia de las cinco vancomicinas estudiadas fue exactamente igual con las diferentes cepas ATCC a pesar de variar la matriz biológica con pH diferentes, lo cual indica que existen otros factores que intervienen en la efectividad microbiológica de vancomicina.

La inducción de mutantes en este estudio no funcionó con la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, ya que carece del determinante de la meticilino resistencia y está descrito que todas las cepas con mutaciones para generar cepas con sensibilidad disminuida a vancomicina tienen esa característica.

El fracaso terapéutico de Vancomax y Fada Pharma en la endocarditis experimental, no se debe a que falten moléculas de vancomicina para unirse al sitio blanco de la bacteria, sino a cambios físico-químicos que interfieren con la farmacodinamia.

No se deben desterrar los antibióticos genéricos basados en la simple creencia de que más costoso es igual a mayor calidad, sino por la falta de erradicación bacteriana o de la cura bacteriológica.

RECOMENDACIONES

No emplear soluciones con pH alcalinos para reconstituir vancomicina porque tiene un pH ácido y puede precipitar.

Sería conveniente determinar los espectros IR de las 5 vancomicinas genéricas y copias con los precursores del péptidoglicano de la bacteria para verificar si se obtiene el mismo espectro.

Es importante cuantificar de vancomicina por las técnicas CLAR y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Detectar las impurezas por cromatografía líquidas de ultra alta resolución-UV asociada a un espectrómetro de masa.

BIBLIOGRAFÍA

Aeschlimann, J.; Hershberger, E. y Rybak, M. 1999. Analysis of vancomycin population susceptibility profiles, killing activity, and postantibiotic effect against vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 43: 1914–1918.

Agudelo, M.; Franco, S.; Cardeno, J.; Roncancio, G.; Robledo, J.; Alvarez, M.; *et al.* 2010. Therapeutic failure of a bioequivalent generic product of imipenem against *Pseudomonas aeruginosa* in a murine meningo encephalitis model. 50th *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC)*. Boston, USA, (abstract A1–1385).

Anderson, R.; Griffith, R.; Higgins, H. y Pittinga, C. 1961. Symposium: how a drug is born. *Cincinnati Journal of Medicine*, 42: 49-60.

Andrews, J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentration. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 48(31): 5.

Anguran, D.; Dias, V. y Arom K. 1987. The comparative influence of prophylactic antibiotics on the prothrombin response to warfarin in the postoperative prosthetic cardiac valve patient. *Annals Surgery*, 206: 155-161.

Arthur, M.; Reynolds, P. y Courvalin, P. 1996. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends in Microbiology*, 40(10): 401-407.

Asteris, G., y Sarkar, S. 1996. Bayesian procedures for the estimation of mutation rates from fluctuation experiments. *Genetics*, 142: 313–326.

Ayala-Gaytán, J.; Alemán-Bocanegra, M.; Guajardo-Lara, C. y Valdovinos-Chávez, S. 2014. ¿Es tiempo de mandar a la vancomicina al baúl de los recuerdos?. *Medicine International México*, 30: 140-145.

Baddour, L.; Wilson, W.; Bayer, A.; Fowler, V.; Bolger, A.; Levison, M.; *et al.* 2005. Infective endocarditis: diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: a statement for healthcare professionals from the committee on rheumatic fever, endocarditis, and Kawasaki disease, council on cardiovascular disease in the Young, and the councils on clinical cardiology, stroke, and cardiovascular surgery and anesthesia, American Heart Association: endorsed by the infectious diseases society of America. *Circulation*, 111: e394–e434.

Base de datos SDBS. <http://sdb.db.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/cre_index.cgi> (17/10/2014).

- Baquero, F.; Negri, M.; Morosini, M. y Blazquez, J. 1998. Selection of very small differences in bacterial evolution. *International Microbiolal*, 1: 295–300.
- Bayer, A. y Norman, D. 1990. Valve site-specific pathogenetic differences between right-sided and left-sided bacterial endocarditis. *Chest*, 98: 200–205.
- Bera, A. y Mukherjee, A. 2012. The importance of generic drugs in India. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, 2(4): 575-587.
- Biavasco, F.; Vignaroli, C. y Varaldo, P. 2000. Glycopeptide resistance in coagulase negative staphylococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19: 403–417.
- Biedenbach, D.; Moet, G. y Jones, R. 2004. Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2002). *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, 50: 59–69.
- Bilton, C.; Howard, J.; Madhavi, N.; Nangia, A.; Desiraju, G.; allen, F. y Chick, C. 1999. When is a polymorph not a polymorph? Helical trimeric O-H O synthons in trans 1, 4-diethynylcyclohexane- 1, 4-diol. *Chemical Communications*, 17: 1675-1676.
- Birkett, D. 2002. Pharmacokinetics made easy. McGraw Hill Company. Pág. 131.
- Brady, A.; Loughlin, R.; Gilpin, D. .; Kearney, P. y Tunney, M. 2006. *In vitro* activity of tea-tree oil against clinical skin isolates of meticillin-resistant and - sensitive *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci growing planktonically and as biofilms. *Journal Medicine Microbiology*, 55(10): 1375.
- Brown, M.; Allison, D. y Gilbert, P. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 22: 777–780.
- Bryan, L. y van den Elzen, H. 1976. Streptomycin accumulation in susceptible and resistant strains of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 9(6): 928–938.
- Bryan, C. y White, W. 1978. Safety of oral in vancomycin in functionally anephric patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14: 634-635.
- Byrn, S.; Pfeiffer, R. y Stowell, J. 1999. *Solid-state chemistry of drugs*. 2nd edition. West Lafayette: SSCI. Pág. 574.
- Carsenti-Etesse, H.; Durant, J.; Entenza, J.; Mondain, V.; Padier, C.; Bernard, E. y Dellamonica, P. 1993. Effects of subinhibitory concentrations of vancomycin and teicoplanin on adherence of staphylococci tissue culture plates. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37: 921–923.

Castellano, I.; González, P.; Castillo, M.; Covarsí, A.; Martínez -Sánchez, J.; Suárez, M.; *et al.* 2008. Vancomycin dosing in hemodialysis patients. *Nefrología*, 28(6): 607-612.

Chambers, H. y Kennedy, S. 1990. Effects of dosage peak and trough concentrations in serum, protein binding, and bactericidal rate on efficacy of teicoplanin in a rabbit model of endocarditis. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 34: 510–514.

Chambers, H.; Mills, J.; Drake, T. y Sande, M. 1984. Failure of a once-daily regimen of cefonicid for treatment of endocarditis due to *Staphylococcus aureus*. *Reviews of Infectious Diseases*, 6(4): 870–874.

Chopra, S.; Harjai, K. y Chhibber, S. 2015. Antibiotic susceptibility of ica-positive and ica-negative MRSA in different phases of biofilm growth. *The Journal of Antibiotics*, 68: 15-22.

Chuard, C.; Vaudaux, F.; Waldvogel, A. y Lew, D. 1993. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37: 625–632.

Clarke, A. 2002. Microscopy techniques for materials science. New Your, Washinton, CRC Press, Págs. 111-485.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth information supplement. Document M100-S18. Wayne. Pennsylvania, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fourth information supplement. Document M100-S25. Wayne. Pennsylvania, USA.

Costerton, J.; Stewart, P. y Greenberg, E. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318–1322.

Courvalin, P. 2005. Genetics of glycopeptide resistance in Gram-positive pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 294: 479–486.

Craig W. 2001. Does the dose matter? *Clinical Infectious Diseases*, 33(3): 233-237.

- Crane, G.; Thomas, S. y Jones, M. 1996. A modified Luria-Delbrück fluctuation assay for estimating and comparing mutation rates. *Mutation Research*, 354: 171–182.
- Cruciani, M.; Gatti, G.; Lazzarini, L.; Furlan, G.; Broccali, G. y Malena, M. 1996. Penetration of vancomycin into human lung tissue. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 38(5): 865-869.
- Cui, L.; Iwamoto, J.; Lian, H.; Neoh, M.; Maruyama, T.; Horikawa, Y. y Hiramatsu, K. 2006. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 50: 428-438.
- Dámaso, D. 1990. *Glicopéptidos. En antibacterianos*. De Marketing Pharm. Págs. 465-477.
- Daum, R.; S. Gupta, S.; Sabbagh, R. y Milewski, W. 1992. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolates with decreased susceptibility to vancomycin and teicoplanin: isolation and purification of a constitutively produced protein associated with decreased susceptibility. *Journal Infectious Diseases*, 166: 1066–1072.
- De Blas, B.; Laredo, L. y Vargas, E. 2004. Interacciones de los fármacos más consumidos. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 28(1): 1-11.
- De Cos, M. 2003. *Interacciones de fármacos y sus implicaciones clínicas*. En: Flórez, J.; Armijo, J. y Mediavilla, A. (eds). *Farmacología Humana*. 4ª edición. Barcelona: Masson. Págs. 175-188.
- De Smet, K. y Contreras, R. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnology Letters*, 27: 1337–1347.
- Desiraju, G. 2001. Chemistry beyond the molecule. *Nature*, 412(6845): 397-400.
- Desiraju, G. 2008. Polymorphism: the same and not quite the same. *Crystal Growth Design*, 8(1): 3-5.
- Dhand, A.; Bayer, A.; Pogliano, J.; Yang, S.; Bolaris, M.; Nizet, V.; *et al.* 2011. Use of antistaphylococcal b-lactams to increase daptomycin activity in eradicating persistent bacteremia due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: role of enhanced daptomycin binding. *Clinical Infectious Diseases*, 53(2): 158–163.
- Díaz, J.; Silva, E.; Arias, M. y Garzón, M. 2011. Comparative in vitro study of the antimicrobial activities of different commercial antibiotic products of vancomycin. *BioMed Central Clinical Pharmacology*, 11: 9.
- Donlan, R. y Costerton, J. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15: 167–193.

Drew, R.; Lu, I.; Joyce, M.; Benjamin, D. y Fowler V. 2004. Lack of relationship between predicted area under the time-concentration curve/minimum inhibitory concentration and outcome in vancomycin-treated patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia, [abstract A-1493]. In: Program and abstracts of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Drlica, K. 2003. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 11–17.

Drlica, K. y Zhao, X. 2007. Mutant selection window hypothesis updated. *Clinical Infectious Diseases*, 44: 681–688.

Duquesne, S.; Destoumieux-Garzón, D., Peduzzi, J.; Rebuffat, S. 2007. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria *Natural Product Reports*, 24: 708–734.

Edwards, B.; Milne, K.; Lawes, T.; Cook, I.; Robb, A. y Gould, I. 2012. Is vancomycin MIC “creep” method dependent? analysis of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) susceptibility trends in blood isolates from north east scotland 2006-10. *Journal Clinical Microbiology*, 50:318-325.

European pharmacopoeia 5.0. Vancomycin hydrochloride. 01/2005:1058. <http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_qz/Vancomycin%20hydrochloride.pdf>.

Fantin, B.; Lafaurie, M.; Périchon, B.; Lefort, A.; Carbon, C. y Courvalin, P. 2001. Consequence of VanE-type resistance on efficacy of glycopeptides *in vitro* and in experimental endocarditis due to *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10): 2826-2830.

Farber, B., y Wolff, A. 1992. The use of nonsteroidal antiinflammatory drugs to prevent adherence of *Staphylococcus epidermidis* to medical polymers. *Journal Infectious Diseases*, 166: 861–865.

Fernández de Gatta, M.; Revilla, N.; Calvo, M.; Domínguez, A. y Sánchez, A. 2007. Pharmacokinetic/pharmacodynamic analysis of vancomycin in UCI patients. *Intensive Care Medicine*, 33: 279-285.

Fernández, M.; Goyenechea, A.; Verdejo, C.; Roblas, R. y Górgolas, M. 2007. Enterococcal endocarditis on native and prosthetic valves: a review of clinical and prognostic factors with emphasis on hospital-acquired infections as a major determinant of outcome. *Medicine*, 286(6): 363–377.

Firsov, A.; Smirnova, M. y Lubenko, I. 2006. Testing the mutant selection window hypothesis with *Staphylococcus aureus* exposed to daptomycin and vancomycin in an in vitro dynamic model. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 58: 1185-1192.

Firsov, A.; Vostrov, S.; Lubenko, I.; Drlica, K.; Portnoy, Y. y Zinner, S. 2003. In vitro pharmacodynamic evaluation of the mutant selection window hypothesis using four fluoroquinolones against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47: 1604–1613.

Fischbach, M. y Walsh, C. 2006. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms. *Chemical Reviews*, 106(8): 3468–3496.

Fowler, V.; Miro, J.; Hoen, B.; Cabello, C.; Abrutyn, E.; Rubinstein, E.; *et al.* 2005. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *JAMA*, 293: 3012–3021.

Freitas, M.; Pacheco, A.; Barbosa, D.; Silbert, S.; Sader, H. y Sesso, R. 2006. Prevalence of vancomycin-resistant *Enterococcus* fecal colonization among kidney transplant patients. *BioMed Central Infectious Diseases*, 6: 133.

Fridkin, S.; Hageman, J.; McDougal, L.; Mohammed, J.; Jarvis, W.; Perl, T. y Tenover, F. 2003. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997–2001. *Clinical Infectious Diseases*, 36(4): 429–439.

García, A.; Hernández, C. y Avendaño, C. 2010. Regulación de los medicamentos genéricos: evidencias y mitos. *Información Terapéutica del Sistema Nacional Salud*, 34(3): 71-82.

García, E. 1997. “Prescripción de fármacos”. “Farmacología”. <http://www.hup.es/ecl/far/indfa6.html> (17/10/2014).

Garrison, M.; Vance-Bryan, K.; Larson, T.; Toscano, J. y Rotschafer, J. 1990. Assessment of effects of protein binding on daptomycin and vancomycin killing of *Staphylococcus aureus* by using an *in vitro* pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 34: 1925–1931.

Geraci, J. y Martin, W. 1954. Antibiotic therapy of bacterial endocarditis. IV. Subacute enterococcal endocarditis: clinical, pathologic and therapeutic consideration of 33 cases. *Circulation*, 10: 173-194.

Ghanaati, S.; Webber, M.; Unger, R.; Orth, C.; Hulvat, J.; Kiehna, S.; Barbeck, M.; Rasic, A.; Stupp, S. y Kirkpatrick, C. 2009. Dynamic *in vivo* biocompatibility of angiogenic peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*, 30: 6202-6212.

Giannoni, E.; Moreillon, P.; Cotting, J.; Moessinger, A.; Billie, J.; Décosterd, L.; *et al.* 2006. Prospective determination of plasma imipenem concentration in critically ill children. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 50(7): 2563-2568.

Gillespie, S.; Voelker, L.; Ambler, J.; Traini, C. y Dickens, A. 2003. Fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*: evidence that *gyrA* mutations arise at a lower rate and that mutation in *gyrA* or *parC* predisposes to further mutation. *Microbial Drug Resistance*, 9:17–24.

Gilmore, M.; Segarra, R.; Booth, M.; Bogie, C.; Hall, R. y Clewell, D. 1994. Genetic structure of the plasmid PAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to antibiotic determinants. *Journal Bacteriology*, 176(23): 7335-7344.

Gordon, C.; Hodges, N. y Marriott, C. 1988. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis derived *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 22: 667–674.

Gotz, F. 2002. *Staphylococcus* and biofilms. *Molecular Microbiology*, 43: 1367–1378.
Griffith, R. 1956. Vancomycin: continous clinical studies. In: Medical Encyclopedia, editor. *Antibiotics Annals*, New York, NY, 118-122.

Griffith, S. 1981. Introduction to vancomycin. *Reviews of Infectious Diseases*, 3: 200-204.

Gullberg, E.; Cao, S.; Berg, O.; Ilbäck, C.; Sandegren, L.; Hughes, D. y Andersson, D. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathology*, 7(7): e1002158. doi:10.1371/journal.ppat.1002158.

Gunnar, K.; Brown, F.; Goldstein, F.; MacGowan, A.; Mouton, J.; Österlund, A.; *et al.* 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 145–148.

Günzler, A. y Gremlich, L. 2002. IR Spectroscopy, introduction, Wiley- VCH, New York. Pág. 374.

Harding, I.; MacGowan, A.; White, L.; Darley, E. y Reed, V. 2000. Teicoplanin therapy for *Staphylococcus aureus* septicemia: relationship between pre-dose serum concentrations and outcome. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 45: 835–841.

Harris, C.; Kopecka, H. y Harris, T. 1983. Vancomycin: structure and transformation to CDP-I. *Journal of the American Chemical Society*, 105: 6915–6922.

Hewitt, W. 2003. Microbiological assay for pharmaceutical analysis: a rational approach. Llandysul, UK, CRC Press, 1-260.

Hiramatsu, K. 1998. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resistance Updatates*, 1:135–150.

Hiramatsu, K.; Arutaka, N.; Hanaki, H.; Kawasaki, S.; Hosada, Y. y Hori, S. 1987. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously to vancomycin. *Lancet*, 350: 1670-1673.

Hiramatsu, K.; Hanaki, H.; Ino, T.; Yabuta, K.; Oguri, T. y Tenover, F. 1997. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 40:135–136.

Homedes, N. y Ugalde, A. 2005. Multisource drug policies in Latin America: survey of 10 countries. *Bull World Health Organization*, 83: 64–70.

Hope, R.; Livermore, D.; Brick, G.; Lillie, M. y Reynolds, R. 2008. BSAC Working Parties on resistance. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 62(Suppl 2): ii65–ii74.

Houlihan, H.; Mercier, R. y Rybak, M. 1997. Pharmacodynamics of vancomycin alone or in combination with gentamicin at various dosing intervals against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected fibrin platelet clots in an *in vitro* infection model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41: 2497–2501.

Howden, B.; Davies, J.; Johnson, P.; Stinear, T. y Grayson, M. 2010. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews*, 23: 99-139.

Jacqueline, C.; Caillon, J.; Le, M.; Miegerville, A.; Donnio, P.; Bugnon, D. y Potel, G. 2003. *In vitro* activity of linezolid alone and in combination with gentamicin, vancomycin or rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by time-kill curve methods. *Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 857.

James, J.; Palmer, S.; Levine, D. y Rybak, M. 1996. Comparison of conventional dosing versus continuous infusion vancomycin therapy for patients with suspected or documented gram-positive infections. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 40: 696–700.

Johnson, J.; He, Y. y Yalkowsky, S. 2003. Prediction of precipitation induced phlebitis: a statistical validation of an *in vitro* model. *Journal Pharmaceutical Science*, 92:1574-1581.

Jordan, D. y Inniss, W. 1959. Selective inhibition of ribonucleic acid synthesis in *Staphylococcus aureus* by vancomycin. *Nature*, 184(24): 1894-1895.

Jordan, D. y Mallory H. 1964. Site action of vancomycin on *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10: 489-494.

Kak, V.; Donabedian, S.; Zervos, M.; Kariyama, R.; Kumon, H. y Chow, J. 2000. Efficacy the ampicillin plus abercacy in experimental rabbit endocarditis caused by an *Enterococcus faecalis* strain with high-level gentamicin resistance, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44(9): 2545-2546.

Kapsnisk-Unec, J.; Sande, M. y Chambers, H. 1996. *Fármacos antimicrobianos, en las bases farmacológicas de la terapia*. Novena Edición. Goodman y Gilman. Interamericana McGraw-Hill, 1194-1224.

Karl, D. 2003. The mutant selection window and antimicrobial resistance. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 11-17.

Kirkpatrick, C.; Bittinger, F.; Klein, C.; Hauptmann, S. y Klosterhalfen, B. 1996. The role of the microcirculation in multiple organ dysfunction syndromes (MODS): a review and perspective. *Virchows Archive*, 427: 461-476.

Kirkpatrick, C.; Rangoonwala, R.; Reshetnykov, M.; Barbeck, M. y Ghanaati, S. 2013. Non-Equivalence of antibiotic generic drugs and risk for intensive care patients. *Pharmaceutical Regulatory Affairs*, 2: 1.

Kotulová, D. y Slobodníková, L. 2010. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to vancomycin, gentamicin and rifampin. *Epidemiology Microbiology Immunology*, 59(2): 80-87.

Krogstad, D. y Moellering, R. 1986. Antimicrobial combinations. *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Second Edition. (Lorian V, Ed). Williams & Wilkins, Baltimore. Págs. 537-578.

Kruzel, M.; Lewis, C.; Welsh, K.; Lewis, E.; Dundas, N.; Mohr, J.; *et al.* 2011. Determination of vancomycin and daptomycin MICs by different testing methods for methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Clinical Microbiology*, 49: 2272-2273.

Lankalapalli, S.; Kumar, V. y Nimmali, S. 2015. Design and Development of Vancomycin Liposomes. *Pharmaceutical Research*, 49(3): 208-215.

Laosa, O.; Guerra, P.; López, J.; Mosquera, B. y Frías, J. 2009. Estudios de bioequivalencia: La necesidad de establecer la fiabilidad de los medicamentos genéricos. *Revista Peruana de Expendio de Médico de Salud Pública*, 26(4): 553-562.

Lee, A.; Erdemir, D. y Myerson, A. 2011. Crystal polymorphism in chemical process development. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2: 259-280.

Legget, J.; Ebert, S.; Fantin, B. y Craig, W. 1991. Comparative dose-effect relations at several dosing intervals for beta-lactam, aminoglycoside and quinolone antibiotics against Gram-negative bacilli in murine thigh infection and neumonitis models. *Scand Journal Infectious Diseases*, 7: 179-184.

Lehr, H.; Bittinger, F. y Kirkpatrick, C. 2000. Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy?. *Journal Pathology*, 190: 373-386.

Lehr, H.; Brunner, J.; Rangoonwala, R. y Kirkpatrick, C. 2002. Particulate matter contamination of intravenous antibiotics aggravates loss of functional capillary density in postischemic striated muscle. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine*, 165: 514- 520.

Levisson, M. y Levison, J. 2009. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibacterial agents. *Infectious Diseases Clinical North America*, 23: 791–815.

Li-Guang, L.; Yu-lin, Z.; Li-fen, H.; Jun, C.; Ying, Y. y Jia-bin, L. 2013. Comparative study of the mutant prevention concentrations of vancomycin alone and in combination with levofloxacin, rifampicin and fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Antibiotics*, 66: 709–712.

Lodise, T.; Lomaestro, B.; Graves, J. y Drusano, G. 2008. Larger vancomycin doses (at least four grams per day) are associated with an increased incidence of nephrotoxicity. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 52: 1330-1336.

Lodise, T.; McKinnon, P.; Swiderski, L. y Rybak, M. 2003. Outcome analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical Infectious Diseases*, 36: 1418-1423.

Lortholary, O.; Lefort, A.; Tod, M.; Chomat, A.; Darras-Joly, C. y Cordonnier, C. 2008. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of antibacterial drugs in the management of febrile neutropenia. *Lancet Infectious Diseases*, 8: 612-620.

Loveymi, B.; Jelvehgari, M.; Zakeri-Milani, P. y Valizadeh, H. 2012. Design of vancomycin RS-100 nanoparticles in order to increase the intestinal permeability. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2(1): 43-56.

Luria, S. y Delbrück, M. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28: 491–511.

Manosalva, I. 2013. Análisis de cepas de *Staphylococcus* spp. con susceptibilidad disminuida a vancomicina en pacientes de Hospital Universitario “Antonio Patricio de Alcalá”, Cumaná, Venezuela. Trabajo de pregrado. Departamento de Biología, Universidad de Oriente, Cumaná.

Manzano, O. y Morales, M. Formas farmacéuticas sólidas tabletas. Parte IV. <http://datateca.unad.edu.co/contenidos/15/2001/Solidas_1.pdf>.

Marshall, F. 1965. Structure studies on vancomycin. *Journal Medicine Chemotherapy*, 8: 18-22.

Martins, O.; Dias, M.; Tavares, J.; De Sousa, M.; Savioli, J. y Doriguetto, A. 2014. Polymorphism: an evaluation of the potential risk to the quality of drug products from the Farmácia Popular Rede Própria. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50(1): 1-24. <<http://dx.doi.org/10.1590/S1984-82502011000100002>>.

Matzke, G.; Zhanel, G. y Guay, D. 1986. Clinical pharmacokinetics of vancomycin. *Clinical Pharmacokinetic*, 11(4): 257-282.

McCormick, M.; McGuire, J.; Pittenger, R. y Stark, W. 1955. Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties. *Antibiotics Annals*, 3: 606-611.

Meléndez, P.; Díaz, J.; Silva, E.; González, P.; Moreno, E.; Amaya, P.; Serrato, N. y Sáenz, E. 2005. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos *in vitro*. *Revista Colombiana de Ciencias Químicas Farmacéutica*, 34(2): 193–208.

Meredith, P. 2009. Potential concerns about generic substitution: bioequivalence versus therapeutic equivalence of different amlodipine salt forms. *Current Medicine Research Opinions*, 25: 2179-2189.

MHRA (Medicines and healthcare products regulatory agency). 2011. Public assessment report. Decentralised procedure. N° UK/H/3638-9 and 4491/001-2/DC. <<http://www.mhra.gov.uk/home/groups/par/documents/websiteresources/con114639.pdf>>.

Mizen, L y Woodnutt, G. 1988. A critique of animal pharmacokinetics. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 21: 273-278.

Moellering, R. 1984. Pharmacokinetics of vancomycin. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 14: 43-52.

Moellering, R.; Krogstad, D. y Greenblatt, D. 1981. Vancomycin therapy in patients with impaired renal function: a nomogram for dosage. *Annals of Internal Medicine*, 94(3): 343-346.

Moeta, J.; Wattersa, A.; Sadera, S. y Jones N. 2009. Expanded studies of piperacillin/Tazobactam formulations: variations among branded product lots and

assessment of 46 generics lots. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65: 319-322.

Mohamed J. y Huang, D. 2007. Biofilm formation by enterococci. *Journal Medicine Microbiology*, 56: 1581–1588.

Moise-Broder, P.; Forrest, A.; Birmingham, M. y Schentag, J. 2004. Pharmacodynamics of vancomycin and other antimicrobials in patients with *Staphylococcus aureus* lower respiratory tract infections. *Clinical Pharmacokinetic*, 43(13): 925–942.

Montañés, B. 2008. Farmacocinética de la vancomicina en administración intraperitoneal en pacientes sometidos a diálisis peritoneal continua ambulatoria. Tesis Doctoral. Departamento de Farmacia I y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Valencia.

Morales, A. y Lozano, V. 1865. *Introducción a la microscopia electrónica*. Segunda Edición. Buenos Aires-Argentina.

Moreira, B.; Boyle-Vavra, B.; Jonge, L. y Daum, R. 1997. Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 41: 1788–1793.

Moro C. 2002. Interacciones farmacológicas clínicamente relevantes. En: Manual del residente de farmacología clínica. Sociedad Española de Farmacología clínica.

Mouton, J. 2002. Breakpoints: current practice and future perspectives. *International Journal Antimicrobial Agents*, 19: 323–331.

Muller, E.; Al-Attar, J.; Wolff, A., y Farber, B. 1998. Mechanism of salicylate-mediated inhibition of biofilm in *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Infectious Diseases*, 117: 501–503.

Murray, B. 2000. Vancomycin-resistant enterococcal infection. *The New England Journal of Medicine*, 342(10): 710-721.

Nair, R.; Dhanalakshmi, P. y Prasannaraju, Y. 2012 Formulation and evaluation of ion activated *in situ* gels of vancomycin hydrochloride for ocular delivery. *JITPS*, 3(2): 39-48.

Nakamoto, K. 2004. Infrared and Raman spectra of coordination compounds. 6th Edition. Wiley, New York. Pág. 432.

Nallapareddy, S.; Singh, K.; Sillanpaa, J.; Garsin, D.; Hook, M.; Erlandsen, S.; *et al.* 2006. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *Journal Clinical Investigation*, 116(10): 2799-2807.

Nannini, E.; Teng, F.; Singh, K. y Murray, B. 2005. Decreased virulence of gls24 mutants of *Enterococcus faecalis* OGIRF in an experimental endocarditis model. *Infectious Immunology*, 73(11): 7772-7784.

Nath, N.; McNeal, E.; Obenhuber, D. 2004. Particulate contaminants of intravenous medication and the limits set by USP General Chapter. *Pharmacoepial forum*, 30: 2272-2280.

Neu, H. 1987. General concepts on the chemotherapy of infectious diseases. *Medicine Clinical North Am.* 71(6): 1051-1064.

Nightingale, C.; Ambrose, P.; Drusano, G. y Murakawa, T. 2007, Antimicrobial pharmacodynamics in theory and clinical practice. Second Edition. CRC Press, 1-487.

Nolan, E. y Walsh, C. 2009. How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics. *Chembiochem* 10(1): 34 -53.

Nunn, T. y Williams, J. 2005. Formulation of medicines for children. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 59(6): 674-676.

Obrink, K. y Rehbinden, C. 2000. Animal definition: a necessity for the validity of animal experiments?. *Laboratory Animals*, 34: 121-130.

Olofsson, S. y Marcusson, L. 2006. Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an *in vitro* kinetic model: Relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 1116-1121.

Organización Panamericana de la Salud. 2006. Informe del Grupo de Trabajo sobre los Aspectos de los Derechos de Propiedad Intelectual Relacionados con el Comercio (ADPIC) y el Acceso a Medicamentos. Washington, D.C.: OPS.

Owens, R. y Shorr, A. 2009. Rational dosing of antimicrobial agents: pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies. *Am Journal Health System Pharmaceutical*, 66(12 Suppl.4): S23-S30.

Pea, F. y Pierluigi, V. 2006. The antimicrobial therapy puzzle: Could pharmacokinetic pharmacodynamic relationships be helpful in addressing the issue of appropriate pneumonia treatment in critically ill patients?. *Clinical Infectious Diseases*, 42(12): 1764-1771.

Pea, F. y Viale, P. 2009. Bench-to-bedside review: appropriate antibiotic therapy in severe sepsis and septic shock-does the dose matter?. *Critical Care*, 13: 214.

Pérez, F. 2009. Tratamiento de la neumonía experimental por *Staphylococcus aureus*. Estudio de eficacia terapéutica de cotrimoxazol, cloxacilina, linezolid y vancomicina,

frente a cepas de *S. aureus* sensible y resistente a meticilina. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla, España.

Peters, K.; Unger, R.; Brunner, J. y Kirkpatrick, C. 2003. The molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovascular Research*, 60: 49-57.

Pfeltz, R.; Singh, V.; Schmidt, J.; Batten, M.; Baranyk, C.; Nadakavukaren, M.; *et al.* 2000. Characterization of passage-selected vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains of diverse parental backgrounds. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44(2): 294-303.

Piszczek, J.; Hutchinson, J. y Partlow, E. 2015. Failure of combination therapy with daptomycin and synergistic ceftriaxone for enterococcal endocarditis—authors' response. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(4): 1273-1284.

Polonio, R.; Mermel, L.; Paquette, G. y Sperry, J. 2001. Eradication of biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* (RP62A) by a combination of sodium salicylate and vancomycin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 45(11): 3262–3266.

Pootoolal, J.; Neu, J. y Wright, G. 2002. Glycopeptide antibiotic resistance. *Annual Reviews Pharmacology Toxicology*, 42: 381-408.

Pope, C.; O'Sullivan, D.; McHugh, T. y Gillespie, S. 2008. A Practical Guide to Measuring Mutation Rates in Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4): 1209–1214.

Purohit, R. y Venugopalan, P. 2009. Polymorphism: an overview. *Resonance*, 14(9): 882-893.

Quie, P. y Belani, K. 1987. Coagulase-negative staphylococcal adherence and persistence. *Journal Infectious Diseases*, 156(4): 543–547.

Quintiliani, R. y Courvalin, P. 1995. Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents. In Murray, P.; Baron, E.; Tenover, F. y Tenover, R. *Manual of Clinical Microbiology* (6th ed.). Washington DC: ASM Press. Pág.1319. ISBN1-55581-086-1.

Quintiliani, R. y Quintiliani, R. 2008. Pharmacokinetics/ pharmacodynamics for critical care clinicians. *Critical Care Clinical*, 24: 335-348.

Raad, I.; Hanna, H.; Boktour, M.; Chaiba, G.; Hachem, R.; Dvorak, T.; *et al.* 2005. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: catheter colonization esp gene, and decreased susceptibility to antibiotics in biofilms. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 49(12): 5046-5050.

Rang, H.; Dale, M. y Ritter, J. 1999. *Pharmacology*. 4th ed. New York, Churchill Livingstone, Edinburgh, Scotland. Pág. 492.

Revilla, N. 2009. Análisis farmacocinético-farmacodinámica de vancomicina en pacientes de UCI. Tesis Doctoral. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Salamanca.

Reynolds, P. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotic. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*, 8(11): 943-950.

Roberts, J.; Roberts, M.; Semark, A.; Udy, A.; Kirkpatrick, C.; Paterson, D.; *et al.* 2011. Antibiotic dosing in the “at risk” critically ill patients: linking pathophysiology with pharmacokinetics/pharmacodynamics in sepsis and trauma patients. *BioMed Central Anesthesiology*, 11: 3.

Rodríguez, C.; Agudelo, M.; Cataño, J.; Zuluaga, A. y Vesga, O. 2009. Potential therapeutic failure of generic vancomycin in a liver transplant patient with MRSA peritonitis and bacteremia. *Journal Infectious*, 59: 277-280.

Rodríguez, C.; Agudelo, M.; Zuluaga, A. y Vesga, O. 2010. *In vitro* and *in vivo* comparison of the anti-staphylococcal efficacy of generic products and the innovator of oxacillin. *BioMed Central Infectious Diseases*, 10: 153.

Rodríguez, C.; Agudelo, M.; Zuluaga, A. y Vesga, O. 2012. Generic vancomycin enriches resistant subpopulation of *Staphylococcus aureus* after exposure in neutropenic mouse thigh infection model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 56: 243-247.

Rolston, K. 2005. Challenges in the treatment of infections caused by gram-positive and gram-negative bacteria in patients with cancer and neutropenia. *Clinical Infectious Diseases*, 40: 246-252.

Rong, S. y Leonard, S. 2010. Heterogeneous vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: A review of epidemiology, diagnosis, and clinical significance. *The Annals of Pharmacotherapy*, 44: 844-850.

Rotschafer, J. 1986. Vancomycin. In: A textbook for the clinical application of therapeutic drug monitoring. William J. Taylor. *De Abbott Laboratories Diagnostic Division*, 353-373.

Rozen, R.; Bachrach, G.; Zachs, B. y Steinberg, D. 2001. Growth rate and biofilm thickness of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans* on hydroxapatite. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 109: 155–160.

Rupp, M. y Hamer, K. 1998. Effect of subinhibitory concentrations of vancomycin, cefazolin, ofloxacin, L-ofloxacin and D-ofloxacin on adherence to intravascular catheters and biofilm formation by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 41: 155–161.

Rybak, M.; Cappelletty, D.; Ruffing, M.; Mercier, R.; Houlihan, H.; Klepser, M. y Levine, D. 1997. Abstr. 37th Interscience Conference *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, abstr. A-46.

Rybak, M.; Hershberger, E.; Moldovan, T. y Grucz, R. 2000. *In vitro* activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against *Staphylococci* and *Enterococci* including vancomycin-intermediate and resistant strains. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44: 1062-1066.

Sakoulas, G.; Bayer, A.; Pogliano, J.; Tsuji, B.; Yang, S.; Mishra, N.; *et al.* 2012. Ampicillin enhances daptomycin- and cationic host defense peptide-mediated killing of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 56(2): 838–844.

Sakoulas, G.; Broder, P.; Schentag, J.; Forrest, A.; Moellering, R. y Eliopoulos, G. 2004. Relationship of CMI and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 2398-2402.

Sandoe, J.; Witherden, I.; Au-Yeung, H.; Kite, P.; Kerr, K. y Wilcox, M. 2002. Enterococcal intravascular catheter- related bloodstream infection: management and outcome of 61 consecutive cases. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4): 577-584.

Sandoe, J.; Wysome, J.; West, A.; Heritage, J., y Wilcox, M. 2006. Measurement of ampicillin, vancomycin, linezolid and gentamicin activity against enterococcal biofilms. *Journal Antimicrobial Chemotherap*, 57: 767–770.

Saptari, V. 2004. *Fourie transform spectroscopy instrumentation engineering*. 6th edition. Bellingham, Washington: SPIE Press. Págs. 47-48.

Scaglione, F. y Paraboni, L. 2008. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antibacterials in the Intensive Care Unit: setting appropriate dosing regimens. *Journal Antimicrobial Agents*, 32: 294-301.

Sellers, E. y Romach, M. 1998. “Drug interactions”, en *Principles of Medical Pharmacology*, (Kalan, H. ed) 6^a. Estados Unidos. Págs. 801-810.

Selsted, M.; Ouellette, A. 2005. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nature Immunology*, 6(6): 551–557.

Serra, P.; Brandimarte, C.; Martino, P.; Carlone, S. y Giunchi, G. 1977. Synergistic treatment of enterococcal endocarditis *in vitro* and *in vivo* studies. *Archive Intern Medicine*, 137(11): 1562-1567.

Sheldrick, G.; Jones, P.; Kennard, O.; Williams, D. y Smith, G. 1978. Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine. *Nature*, 271(5642): 223-225.

Shoji, M.; Cui, L.; Iizuka, R.; Komoto, A.; Neoh, H.; Watanabe, Y.; *et al.* 2011. *WalK* and *clpP* mutations confer reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 55(5): 3870–3881.

Siegel, S. y Castellan, J. 1995. *Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta*. Segunda edición. Editorial Trillas. Distrito Federal-México.

Singh, K.; Qin, X.; Weinstock, G. y Murray, B. 1998. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *Journal Infectious Diseases*, 178(5): 1416-1420.

Small, P. y Chambers, H. 1990. Vancomycin for *Staphylococcus aureus* endocarditis in intravenous drug users. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 34: 1227–1233.

Souli, M., y Giamarellou, H. 1998. Effects of slime produced by clinical isolates of coagulase-negative staphylococci on activities of various antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42: 939–941.

Stewart, P. y Costerton, J. 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358(9276): 135–138.

Stockley, I. 2002. Antibacterials and anti-infective agents drug interactions. En drug interactions. Sixth Edition. *The Pharmaceutical Press*. Págs. 128-232.

Sweetman, S. 2007. *Vancomycin. Martindale: The Complete Drug Reference*. London: *Pharmaceutical Press*. Págs. 2191-3322.

Swenson, J.; Anderson, K.; Lonsway, D.; Thompson, A.; McAllister, S.; Limbago, B.; *et al.* 2009. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(7): 2013-2017.

Taccone, F.; Hites, M.; Beumier, M.; Scolleta, S. y Jacobs, F. 2011. Appropriate antibiotic dosage levels in the treatments of severe sepsis and septic shock. *Current Infectious Diseases Reports*, 13(5): 406-415.

Taccone, F.; Laterre, P.; Dugernier, T.; Spapen, H.; Delattre, I. y Wittebole, X. 2010. Insufficient β -lactam concentration in the early phase of severe sepsis and septic shock. *Critical Care*, 14 (4): R-126.

The United States pharmacopoeia. XXVII. Biological test and assays Pharmacopoeia Convention Inc Bronx New York USA. Págs. 1883-2358.

Udekwi, K.; Parrish, N.; Ankomah, P.; Baquero, F. y Levin, B. 2009. Functional relationship between bacterial cell density and the efficacy of antibiotics. *Journal Antimicrobiology Chemotherapy*, 63: 745–757.

Vacca, C.; James, F.; Fitzgerald, J. y Bermúdez, A. 2006. Definición de medicamento genérico ¿un fin o un medio? análisis de la regulación en 14 países de la Región de las Américas. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 20(5): 314–323.

van Hal, S.; Barbaggiannakos, T.; Jones, M.; Wehrhahn, M.; Mercer, J.; Chen, D.; *et al.* 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* vancomycin susceptibility testing: methodology correlations, temporal trends and clonal patterns. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 66:2284-2287.

Vaudaux, P.; Huggler, E.; Bernard, L.; Ferry, T.; Renzoni, A. y Lew, D. 2010. Underestimation of vancomycin and teicoplanin MICs by broth microdilution leads to underdetection of glycopeptide-intermediate isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9): 3861-3870.

Vesga, O.; Agudelo, M.; Salazar, B.; Rodriguez, C. y Zuluaga, A. 2010. Generic vancomycin products fail *in vivo* despite being pharmaceutical equivalent of the innovator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8): 3271-3279.

Vogelman, B.; Gudmundsson, S.; Legget, J.; Tumidge, J.; Ebert, S. y Craig, W. 1988. Correlation of antimicrobial pharmacokinetics parameters with therapeutic efficacy in an animal model. *Journal Infectious Diseases*, 158: 831-847.

von-Hoosier, S. 1999. The age of biology: opportunities and challenges for Laboratory Animal Medicine. *Scand journal Laboratory Anim Sci*, 26(4): 176-184.

Vrhovac, B.; Sarapa, N.; Bakran, I.; Huic, M.; Macolic-Sarinic, V.; Francetic, I.; *et al.* 1995 Pharmacokinetic changes in patients with or edema. *Clinical Pharmacokinetics*, 28: 405-418.

Walsh, T.; Bolmstrom, A.; Qvarnstrom, A.; Ho, P.; Wootton, M.; Howe, R.; *et al.* 2001. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 2439-2444.

Werth, B.; Sakoulas, G.; Rose, W.; Pogliano, J.; Tewhey, R. y Ribak, M. 2013. Ceftaroline increases membrane binding and enhances the activity of daptomycin against daptomycin nonsusceptible vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 57(1): 66–73.

Wiederhold, N.; Coyle, E.; Raad, I.; Prince, R. y Lewis, R. 2005. Antibacterial activity of linezolid and vancomycin in an *in vitro* pharmacodynamic model of gram-positive catheter-related bacteraemia. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*, 55(5): 792-795.

Williamson, M. y Williams, D. 1984. Hydrophobic interactions affect hydrogen bond strengths in complexes between peptides and vancomycin or ristocetin. *European Journal Biochemistry*, 138: 345-348.

Wootton, M.; Howe, R.; Hillman, R.; Walsh, T.; Bennett, P. y MacGowan, A. 2001. A modified population analysis (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 399-403.

Zak, O y O'Reilly, T. 1991. Animal models in the evaluation of antimicrobial agents. *Antimicrobial agents Chemotherapy*, 35: 1527-1531.

Zarif, M.; Afidah, A.; Abdullah, J. y Shariza, A. 2012. Physicochemical characterization of vancomycin and its complexes with β -cyclodextrin. *Biomed Res-Indi*, 23(4): 513-520.

Zhao, C.; Sun, H.; Wang, H.; Liu, Y.; Hu, B.; Yu, Y.; *et al.* 2012. Antimicrobial resistance trends among 5608 clinical Gram-positive isolates in China: results from the Gram-Positive Cocci Resistance Surveillance program (2005-2010). *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, 73: 174-181.

Zuluaga, A.; Agudelo, M.; Rodríguez, C. y Vesga, O. 2009. Application of microbiological assay to determine pharmaceutical equivalence of generic intravenous antibiotics. *BioMed Central Clinical Pharmacology*, 9(1): 1-11.

Zuluaga, A.; Agudelo, M.; Cardeno, J.; Rodríguez, C. y Vesga, O. 2010. Determination of therapeutic equivalence of generic products of gentamicin in neutropenic mouse thigh infection model. *PLoS One*, 5(5): e10744.

Zuñiaga, J.; Tur, M.; Milocco, S. y Piñeiro, R. 2001. Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal. Mexico: McGraw-Hill Interamericana. Pág. 682.

HOJAS DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/6

Título	Caracterización fisico-química y efectividad microbiológica de vancomicinas genéricas y copias.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Hidalgo Marcano Beatriz María	CVLAC	20.347.211
	e-mail	bea3_2011@hotmail.com
	e-mail	
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Palabras o frases claves:

efectividad microbiológica de vancomicinas genéricos y copias
características fisico-química de vancomicinas genéricas y copia
ph; cmi en agar y caldo; <i>s. aureus</i> mu50 (cepa saiv); <i>e. faecalis</i> v583 (genotipo <i>vanb</i>); fitr;tem

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/6

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
CIENCIAS	BIOANÁLISIS

Resumen (abstract):

En este estudio se planteó caracterizar físico-químicamente y la efectividad microbiológica de vancomicinas genéricas (Behrens, Fada Pharma) y copias (Vancocyn, Vancomax, Celovan). Para ello, se determinó el pH de todas las vancomicinas en soluciones, para estudiar la estabilidad de los antibióticos, reconstituidas en agua destilada, agua desionizada, SSF 0,9%, cloruro de sodio 0,45% y Ringer lactato; además de verificar las interacciones iónicas del agua destilada con las otras soluciones antes mencionadas. A través de la espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier se detectaron de 9 a 10 grupos funcionales de los 23 que contiene la molécula original, siendo estos los más importantes para que ocurran las interacciones farmacodinámicas. Con el uso del Microscopio Electrónico de Transmisión se observaron diferentes morfologías en los cinco antibióticos. Para determinar el perfil de susceptibilidad de las cepas ATCC y otras cepas certificadas, se determinó la concentración mínima inhibitoria de todas las cepas, por dos métodos; dilución en agar y microdilución en caldo a diferentes concentraciones de vancomicina ($0,5$ hasta $128 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y se observó, que el método de microdilución es más sensible y específico que el de dilución en agar. Se determinó la potencia de las cinco vancomicinas mediante el análisis de bioensayo, empleando varias matrices biológicas, observándose un comportamiento igual para las tres cepas ATCC usadas, a pesar de variar las soluciones y el pH. En el estudio *in vivo* se demostró la efectividad de tres vancomicinas (Behrens, Vancocyn y Celovan), para erradicar la endocarditis experimental en ratas; al aplicar la prueba Q de Cochran se determinó que hubo diferencias significativas ($Q_{0,01}=72,5$), con un nivel de confianza 1% entre las 5 vancomicinas que se utilizaron. Estos resultados demuestran la efectividad (equivalencia terapéutica) de los medicamentos genéricos y copias, a pesar de que en varias investigaciones se ha demostrado el fracaso de estos medicamentos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/6

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Abadía-Patiño, Lorena, Dra	ROL	CA ☐ A ☒ S ☐ T ☐ U ☐ J ☐ U ☐
	CVLAC	10.952.465
	e-mail	labadia@udo.edu.ve
	e-mail	
Morillo Díaz, Maribel, Dra	ROL	CA ☐ A ☐ S ☐ T ☐ U ☐ J ☐ U ☒
	CVLAC	9.272.792
	e-mail	mdcmorillod@gmail.com
	e-mail	
Loroño, G. Daniel J	ROL	CA ☐ A ☐ S ☐ T ☐ U ☐ J ☐ U ☒
	CVLAC	9.298.555
	e-mail	dlorono@udo.edu.ve
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2016	12	02

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/6

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
Tesis-hidalgob.doc	Aplication/word

Alcance:

Espacial: UNIVERSAL

Temporal: INTEMPORAL

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado(a) en Bioanálisis

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciado(a)

Área de Estudio: Bioanálisis

Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado: Universidad de Oriente

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/6



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
CONSEJO UNIVERSITARIO
RECTORADO

CUN° 0975

Cumaná, 04 AGO 2009

Ciudadano
Prof. JESÚS MARTÍNEZ YÉPEZ
Vicerrector Académico
Universidad de Oriente
Su Despacho

Estimado Profesor Martínez:

Cumplo en notificarle que el Consejo Universitario, en Reunión Ordinaria celebrada en Centro de Convenciones de Cantaura, los días 28 y 29 de julio de 2009, conoció el punto de agenda **"SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN PARA PUBLICAR TODA LA PRODUCCIÓN INTELECTUAL DE LA UNIVERSIDAD DE ORIENTE EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UDO, SEGÚN VRAC N° 696/2009"**.

Leído el oficio SIBI – 139/2009 de fecha 09-07-2009, suscrita por el Dr. Abul K. Bashirullah, Director de Bibliotecas, este Cuerpo Colegiado decidió, por unanimidad, autorizar la publicación de toda la producción intelectual de la Universidad de Oriente en el Repositorio en cuestión.

UNIVERSIDAD DE ORIENTE
SISTEMA DE BIBLIOTECA
RECIBIDO POR *[Firma]*
FECHA 5/8/09 HORA 5:30
JUAN A. BOLANOS CUNVELO
Secretario

Comunicación que hago a usted a los fines consiguientes.

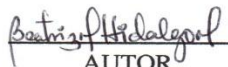
Cordialmente,

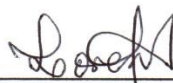
C.C: Rectora, Vicerrectora Administrativa, Decanos de los Núcleos, Coordinador General de Administración, Director de Personal, Dirección de Finanzas, Dirección de Presupuesto, Contraloría Interna, Consultoría Jurídica, Director de Bibliotecas, Dirección de Publicaciones, Dirección de Computación, Coordinación de Teleinformática, Coordinación General de Postgrado.

JABC/YGC/maruja

Apartado Correos 094 / Telfs: 4008042 - 4008044 / 8008045 Telefax: 4008043 / Cumaná - Venezuela

Artículo 41 del REGLAMENTO DE TRABAJO DE PREGRADO (vigente a partir del II Semestre 2009, según comunicación CU-034-2009): “Los trabajos de grados son de la exclusiva propiedad de la Universidad de Oriente, y solo podrá ser utilizados para otros fines con el consentimiento del consejo de Núcleo respectivo, quien deberá participarlo previamente al Consejo Universitario, para su autorización”.


AUTOR


ASESOR