

Mecanismos de resistencia en bacterias que frecuentemente producen infecciones nosocomiales importantes

Jonathan Faldasz Pharm D.¹, Edward R. Cachay M.D; M.A.S.²

Desde el descubrimiento de la penicilina ha existido una carrera biológica continua entre el desarrollo de nuevos antibióticos y la capacidad de las bacterias de hacerse inmunes a ellos. Los diversos mecanismos de resistencia bacteriana resultan de la interacción compleja de factores que evidencian la capacidad de evolución bacteriana pero también reflejan prácticas institucionales individuales. El presente artículo revisa los conceptos actuales en mecanismos de resistencia bacteriana con énfasis en su importancia clínica.

***Pseudomonas* y el prototipo de resistencia mediada por medio de la membrana celular**

La membrana y pared celular bacterianas preservan su forma pero sobretodo crean un ambiente controlado, mediante el cual la bacteria regula el tráfico de pequeñas moléculas que entran o salen de su citoplasma⁽¹⁾. Las bacterias gram-negativas poseen una membrana adicional externa que limita aún más el paso de sustratos fuera o dentro de la bacteria⁽²⁾.

Las moléculas hidrofóbicas con cargas positivas pueden pasar a través de la membrana celular directamente⁽³⁾, pero las moléculas hidrofílicas cargadas negativamente, como lo son muchos antibióticos, solo pueden acceder al interior bacteriano a través de 'porinas' (canales anclados en la membrana celular que selectivamente permiten el flujo de agua y pequeñas moléculas), figura 1⁽⁴⁾. Las porinas son diversas, pero en general todas restringen el flujo de sustratos a moléculas hidrofílicas con un tamaño entre 300-700 daltons⁽⁵⁾. Antibióticos como vancomicina (~1,450 daltons)⁽⁶⁾ y daptomicina (~1,600 daltons)⁽⁷⁾, son demasiado grandes para pasar por las 'porinas' y por consiguiente no tienen efecto en contra de bacterias gram-negativas. Las *Pseudomonas* llevan al extremo este modelo de 'restricción de paso de medicamentos a través de la membrana celular', y representa el prototipo de resistencia intrínseca en bacterias gram-negativas.

Las características de las 'porinas' en *Pseudomonas* difieren de las otras bacterias gram-negativas en su número y

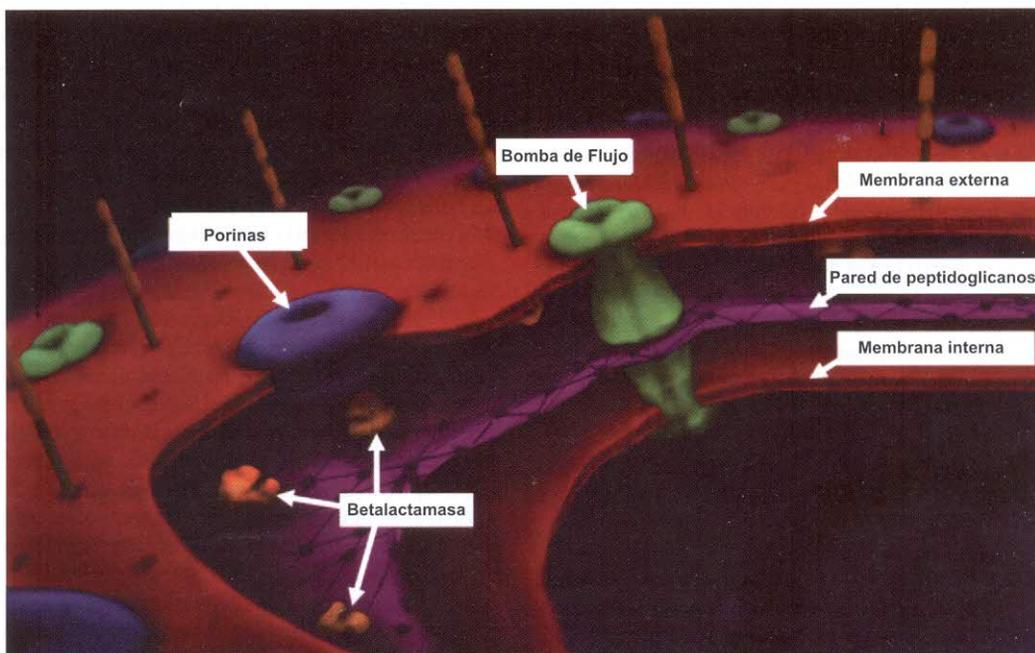


Figura 1. Estructura de la membrana celular.

¹ Departamento de Farmacia, Universidad de California, San Diego, Estados Unidos. ² Departamento de Medicina, Universidad de California, San Diego, Estados Unidos. Correspondencia: Edward R. Cachay, 200 west Arbor Drive, San Diego, California, 92103-8681. Teléfono: 619-5453-3995, Fax: 619-543-3178. Correo electrónico: ecachay@ucsd.edu

forma. El número de porinas en *Pseudomonas* es reducido resultando en una permeabilidad equivalente al 1-8% de la capacidad de *Escherichia coli* ⁽⁸⁾. Además, las porinas de *Pseudomonas* son 'específicas' para ciertas moléculas, confiriendo resistencia a cualquier antibiótico que no simule de manera exacta la forma del sustrato en el sitio activo en la 'porina' ⁽⁸⁾. Cada una de estas 'porinas específicas' pueden ser sobreexpresadas o inhibidas en presencia de un antibiótico afin a la porina, lo cual puede incrementar los niveles de resistencia incluso a los pocos antibióticos que inicialmente eran activos contra la *Pseudomonas*. Un ejemplo es la porina "OprD" la cual permite captar arginina y lisina y péptidos dibásicos. Los antibióticos carbapenemes, como imipenem y meropenem, son estructuralmente análogos a los sustratos de la porina OprD y usan esta porina para acceder al interior bacteriano, pero en presencia de la presión inducida por estos carbapenemes, la *Pseudomonas* puede inhibir la producción de OprD, generando resistencia clínica ⁽⁹⁾.

Si bien las porinas limitan el flujo de moléculas hidrofílicas cargadas negativamente, el principal mecanismo de resistencia hacia compuestos hidrofóbicos es usando 'bombas de flujo' ⁽¹⁰⁾. Estas son proteínas que atraviesan las capas de membrana celular bacteriana. Biológicamente son transportadores activos, cuya función es expulsar compuestos químicos tóxicos (incluyendo antibióticos) del interior bacteriano ⁽¹⁰⁾. Como el paso de antibióticos a través de la membrana bacteriana es lento, las 'bombas de flujo' pueden prevenir que los antibióticos alcancen su destino. Las 'bombas de flujo' pueden conferir resistencia a una sola familia de antibióticos, tal como la 'bomba-específica para tetraciclinas' que es codificada por la familia de genes 'tet'; o pueden actuar en diferentes clases de antibióticos tal como la 'Bomba de flujo múltiple' MexAB-OprM ⁽¹¹⁾.

En el ambiente hospitalario, la exposición constante a varios antibióticos ha originado que la *Pseudomonas* adquiera además otros mecanismos de resistencia bacteriana, ej. betalactamasas de espectro extendido (ver más adelante), resultando en que muchas cepas de *Pseudomonas* se conviertan en multidrogosresistentes. Estos mecanismos de resistencia, aunados a su capacidad para secretar 'biopelículas' (biofilms) han ocasionado que en algunos casos las infecciones por *Pseudomonas spp* sean catalogadas como incapaces de ser tratadas con antibióticos.

Enterobacterias productoras de betalactamasas de espectro extendido

La capa de peptidoglicanos de la pared celular es rígida en comparación con la membrana celular citoplasmática bacteriana; aquella es necesaria para mantener la gran presión osmótica interna (Figura 1). Sin ella la bacteria literalmente se 'desinfla' y sufre lisis celular. Para prevenir que esto ocurra, las bacterias poseen enzimas que construyen y reparan continuamente la capa de peptidoglicanos, previniendo 'fugas'. Los antibióticos betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, car-

bapenemes y monobactames) actúan a través del bloqueo de estas enzimas (las cuales pertenecen a la familia de 'proteínas ligadoras de penicilina' o "PBPs"), alterando de esta manera la habilidad bacteriana para reparar la capa de peptidoglicanos.

La mayoría de bacterias gram-negativas (también algunas gram-positivas) poseen una o más betalactamasas: un grupo de enzimas que degrada químicamente el anillo betalactámico (por el cual esta familia de antibióticos recibe su nombre) convirtiéndolo en inactivo. Las primeras betalactamasas fueron descritas en *Stafilococcus sp*, denominadas 'penicilinas simples' porque inactivaban las penicilinas naturales (penicilina, amoxicilina y ampicilina) ⁽¹²⁾. En respuesta a ellas, los científicos desarrollaron nuevos antibióticos betalactámicos, incluyendo las penicilinas semisintéticas o 'resistentes a las penicilinasas' (metecilina, oxacilina, nafcilina) y las cefaloporinas de primera generación. Esta carrera biológica ha continuado durante décadas y ha resultado en la expansión de fármacos disponibles, pero también en la expansión de las betalactamasas con actividad en contra de cada uno de los nuevos antibióticos creados. Estas betalactamasas han sido clasificadas de varias formas: de acuerdo a su homología genética, al espectro de su actividad fenotípica o a la composición de su sitio activo. La clasificación más aceptada es la propuesta por Ambler, que las divide en cuatro grupos (A-D) basado en su secuencia molecular y homología ⁽¹³⁾. Las clases A, C y D contienen un residuo de serina en el sitio activo y, al menos *in vitro*, estas serino-betalactamasas son suprimidas por los inhibidores de betalactamasas. La clase B abarca las metalo-betalactamasas, y se caracterizan por tener un átomo de zinc en su sitio activo. Esta clase incluye la recientemente descubierta metalo-proteínasa Nueva Delhi (NDM-1). La clase A incluye las enzimas TEM y SHV, comunes entre bacterias gram-negativas, las cuales confieren resistencia a penicilinas y a las cefalosporinas de primera generación, y a las penicilinasas para *Stafilococcus sp*. Las clase C y D incluyen las categorías de betalactamasas tradicionales AmpC y las betalactamasas de espectro extendido producidas por enterobacterias (BLEE, o en inglés ESBL) respectivamente.

En el ambiente hospitalario existen un incremento alarmante de las 'BLEEs', que confieren resistencia a una gran variedad de antibióticos betalactámicos. Las BLEEs, en su mayoría de la clase A de la clasificación de Ambler, confieren resistencia a las penicilinas naturales, cefalosporinas de primera generación (ej: cefazolina, cefalexina, cefadroxilo), cefalosporinas de tercera generación (ej: cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima) y frecuentemente a cefalosporinas de cuarta generación (cefepime). Existen varias subcategorías de BLEEs clase A, la mayoría de las cuales son derivadas de betalactamasas previas tales como las familias TEM y SHV ⁽¹⁴⁾. En Sudamérica se ha identificado una nueva familia llamada CTX-M que se ha convertido en el grupo predominante de BLEEs en esta región. Las betalactamasas CTX-M han sido identificadas en muchas bacterias gram-negativas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Salmonella* y *Enterobacter*. Estas betalactamasas CTX-M confieren resistencia a cefotaxima,

ceftriaxona y aztreonam, con respuestas variables observadas a cefepime, cefpirome y ceftazidima⁽¹⁵⁾. Las cepas que expresan CTX-M a menudo son susceptibles *in vitro* a combinaciones de betalactámicos/inhibidores de betalactamasas, sin embargo la sobre-expresión de esta enzima *in vivo* puede negar los beneficios de la combinación de estos fármacos, por lo cual muchos expertos prefieren usar carbapenemes en enterobacterias con sospecha de ser productoras de BLEEs, independientemente de las susceptibilidades *in vitro*⁽¹⁶⁾.

Otro grupo de BLEEs pertenecen a la clase C de la clasificación de Ambler, teniendo a la AmpC como su prototipo. Ella confiere resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas (con la posible excepción de cefepime) y combinaciones de betalactámicos/inhibidores de betalactamasas⁽¹⁷⁾. La temocilina y el mecillinam/pivmecillinam han mostrado efectividad contra las enterobacterias productoras de betalactamasa AmpC⁽¹⁸⁾ pero la experiencia limitada, las dificultades farmacocinéticas y la falta de disponibilidad en la mayoría de países impide su uso clínico, lo cual deja a los carbapenemes como la única alternativa betalactámica en esta situación clínica. Hay que resaltar que se han descrito formas inducibles de la enzima AmpC⁽¹⁷⁾, donde inicialmente las susceptibilidades *in vitro* pueden engañosamente mostrar que las bacterias son sensibles a las cefalosporinas pudiendo predisponer a fracaso clínico. Inicialmente el gen de AmpC era mediado cromosomalmente y estaba restringido a un número reducido de bacterias gram-negativas. Las AmpC mediadas cromosomalmente son comunes entre especies de *Enterobacter*, con una frecuencia relativa que se estima entre 30-40% en el Reino Unido⁽¹⁹⁾ y 15-25% en Norteamérica⁽²⁰⁾. Recientemente, se ha descrito que el gen de AmpC puede ser codificado a través de plásmidos, y su resistencia asociada puede ser transferida entre bacterias de la misma especie y aún entre especies. Esta BLEE AmpC codificada a través de plásmidos ha sido aislada de *K. pneumoniae* y *E. coli*, especies en las cuales nunca antes se había descrito presencia de AmpC de origen cromosomal⁽²¹⁾.

El grupo más reciente de betalactamasas identificadas con gran significado clínico son las carbapenemasas. Como su nombre lo indica estas enzimas inactivan carbapenemes además de una gran variedad de antibióticos betalactámicos. Las carbapenemasas fueron descritas en 1993⁽²²⁾ pero no ha sido hasta los últimos cinco años que han generado gran atención debido al incremento de su prevalencia en los ambientes nosocomiales. Dos son de particular importancia: la carbapenemasa de *K. pneumoniae* o KPC (carbapenemasa clase A), y la recientemente descrita metaloproteínasa Nueva Delhi, o NDM-1 (un miembro de la clase B de metalo-betalactamasas). KPC es una enzima codificada a través de plásmidos, y sin bien es cierto fue descrita inicialmente en cepas de *K. pneumoniae*, como resultado de transferencia bacteriana conjugativa, ha sido identificada también en otras cepas de bacterias como *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*⁽²¹⁾, dando origen a la nueva clase llamada 'enterobacterias resistentes a los carbapenemes' (CRE)⁽²³⁾. NDM-1 fue originalmente descrita en una cepa de *K. pneumoniae* aislada de un paciente en Suecia que había sido

previamente hospitalizado en Nueva Delhi⁽²⁴⁾. Hasta el momento solo se la ha encontrado en cepas de *K. pneumoniae*, pero se han identificado similares enzimas metalo-betalactamasas en *pseudomonas* y *enterobacterias*⁽²⁵⁻²⁷⁾. NDM-1 confiere resistencia a todos los antibióticos betalactámicos excepto monobactams (ej. aztreonam)⁽²⁸⁾. Ver tabla 1 para seguir modelo de interpretación clínica de betalactamasas.

Estafilococo resistente a la meticilina (MRSA): resistencia por modificación de la proteína ligadora de Penicilina (PBP)

Los *Staphylococcus aureus* eran capaces de secretar 'penicilasas simples' aun antes del descubrimiento de la penicilina en 1928 por Sir Alexander Fleming^(12,29). Ellas son encontradas en el 90% de cepas de estafilococos actuales. De manera análoga, en el mismo año que las penicilinas semisintéticas fueron usadas clínicamente se identificaron cepas de estafilococo que eran resistentes a ellas. Esta nueva variante se denominó '*Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina' o 'MRSA' (por ser la meticilina el fármaco prototipo de las penicilinas semisintéticas)⁽³⁰⁾. Los MRSA, sin embargo, surgieron como resultado de la modificación de los sitios activos de los antibióticos betalactámicos y no como resultado de producción de nuevas betalactamasas⁽³⁰⁾.

Existen varios tipos de 'proteínas ligadoras de la penicilina' (PBPs) con afinidad variable para diferentes antibióticos betalactámicos. El MRSA utiliza la 'proteína ligadora de penicilina' PBP2a, que es una enzima glicosiltransferasa con mínima afinidad por los antibióticos betalactámicos. Por consiguiente, la mayoría de antibióticos betalactámicos (con la excepción de los recientemente desarrollados con poder 'MRSA' como la ceftarolina y ceftobiprole) no puede unirse en absoluto a PBP2a, y no tienen efecto en estas cepas de estafilococos⁽³¹⁾.

La presencia de la PBP2a depende de la expresión del gen *mecA*, el cual se encuentra dentro de un cassette cromosómico del estafilococo llamado *mec* (*SCCmec*). Este 'cassette' genético puede ocasionalmente contener otros genes que confieren resistencia a muchas clases de antibióticos. Los estafilococos pueden compartir el *SCCmec* por medio de 'transferencia horizontal', lo cual facilita que el *SCCmec* pueda insertarse dentro del cromosoma del nuevo *Staphylococcus aureus*, anfitrión que lo acoge. En condiciones normales el gen *mecA* es reprimido dentro del *SCCmec*, pero en respuesta a la exposición a betalactámicos el *mecA* puede desreprimirse y expresarse⁽³²⁾. *In vitro* se ha observado que la liberación de la presión selectiva de agentes betalactámicos reconstituye la susceptibilidad a estos antibióticos dentro de las cepas de *Staphylococcus aureus*. Esto es la base para que muchos postulen que el uso de PBP2a reduce la 'integridad/balance' (*fitness*) de la bacteria. Si esto es correcto, se esperaría que una disminución del uso de antibióticos betalactámicos en el ambiente nosocomial restauraría la susceptibilidad de las cepas de *S. aureus* a esta clase importante de medicamentos⁽³³⁾. La

Tabla I

CARACTERIZACIÓN DE LAS BETALACTAMASAS DE AMPLIO ESPECTRO EN UN GRUPO SELECCIONADO DE BACTERIAS

	BLEE "Clásicas"	Hiperproducción de AmpC	Carbapenemasas			
	A	C	A	B	D	
Clases de Ambler	A	C	A	B	D	
Familias representativas	SHV, TEM, CTX-M	AmpC	KPC, GES, SME	IMP, NDM, SPM	OXA	
Transmisión/tipo	Cromosomal, plásmido	Cromosomal, plásmido *inducible	Cromosomal; descrito raramente por plásmido	Cromosomal; descrito raramente por plásmido	Cromosomal; descrito raramente por plásmido	
Patrón de resistencia	Penicilinas	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	
	Cefalosporinas: 1ª gen	Resistente	Resistente	Resistente	Resistente	
	Cefalosporinas: 2ª gen	Variable (cefamicinas)	Resistente	Resistente	Resistente	
	Cefalosporinas: 3ª gen	Variable	Resistente	Resistente	R - cefotaxima R - ceftriaxona S - ceftazidima Susceptible	
	Cefepime	Variable	Variable	Resistente	Resistente	
	Combinaciones de inhibidores de Beta lactamasas	Variable	Resistente	Resistente	Resistente	
	Monobactams	Resistente	Resistente	Resistente	Susceptible	
	Carbapenems	Susceptible	Susceptible	Resistente	Resistente	
Presencia en las Bacterias	<i>Acinetobacter</i>	Sí	Inherente, cromosomal (cefepime activo)	---	Sí	Ubicuo
	<i>Citrobacter</i>	Sí	Sí, cromosomal	Descrito	Descrito	---
	<i>Enterobacter</i>	Sí, plásmido	Sí, cromosomal	Descrito	Descrito	Descrito
	<i>E. coli</i>	Sí	Descrito, cromosomal y plásmido	Sí	Descrito	Descrito
	<i>Klebsiella</i>	Sí	Descrito, plásmido	Sí	Sí	Descrito
	<i>Morgnella</i>	Sí	Sí, cromosomal	Descrito	Descrito	---
	<i>Proteus</i>	Sí	Sí	Descrito	Descrito	Descrito
	<i>Providencia</i>	Sí	Sí, cromosomal	---	Descrito	---
	<i>Pseudomonas</i>	Sí, plasmido	Sí, cromosomal	Descrito	Sí	Sí, cromosomal y plásmido
	<i>Serratia</i>	Sí, cromosomal y plásmido	Común, cromosomal	Descrito, plásmido	Sí, plásmido	---
	<i>Stenotrophomonas</i>	Sí (Acido Clavulánico OK)	Sí	---	Sí	---
	BLEE "Clásica"	Hiperproducción de AmpC	Carbapenemasas			

Ejemplo: Se descubre que un *Acinetobacter* es resistente a carbapenems y aztreonam. La tabla muestra que *Acinetobacter* puede poseer carbapenemasas Clase B y Clase D, pero no Clase A. Observando los patrones de resistencia de estas carbapenemasas, podemos ver que solo la Clase B de carbapenemasas no hidrolizan monobactámicos (aztreonam). Es muy probable que esta carbapenemasa pertenezca a la Clase D que codifica la enzima OXA, y podría ser susceptible a ceftazidima y cefepime*. Por consiguiente se deberían completar los exámenes de susceptibilidades para estos antibióticos si es que no se los han hecho.

***Nota:** Las cepas aisladas de bacterias pueden tener múltiples betalactamasas. Esta tabla representa una muestra de betalactamasas, y no pretende reemplazar el criterio clínico.

identificación *in vitro* de resistencia a meticilina por parte de *S. aureus* puede hacerse a través de la observación de resistencia a cualquiera de las penicilinas semisintéticas (oxacilina, nafciclina, etc), a cefalosporinas (ej. cefazolina) o combinaciones betalactámico/inhibidor de betalactamasas (ej. ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, ticarcilina/ácido clavulánico, amoxicilina/ácido clavulánico). La resistencia a cualesquiera de estos medicamentos debe ser interpretada como resistencia a todos los agentes betalactámicos (excepto ceftarolina y ceftobirprole que tienen actividad intrínseca

contra MRSA) y por consiguiente su uso debe ser evitado en infecciones por MRSA.

Resistencia inducida a la clindamicina en bacterias gram-positivas

El cassette *SCCmec* puede contener genes que confieren resistencia a muchos antibióticos además de penicilina. El *mls_B*, una enzima que confiere resistencia a los

'macrólidos, lincosaminas y estreptograminas'⁽³⁴⁾. La expresión de esta enzima es variable, y es inducida en diferentes proporciones en presencia de diferentes antibióticos: Los macrólidos (ej. eritromicina) tiende a inducir inmediatamente la expresión de *mls_B*, mientras que las lincosaminas como la clindamicina causan una inducción más tardía lo cual no puede ser detectado en las pruebas de resistencia de laboratorio iniciales^(35,36). Por ello hay que ser cautos al interpretar los exámenes de susceptibilidad de cepas de *S. aureus* que muestran 'susceptibilidad a la clindamicina' pero 'resistencia a la eritromicina'. Si el perfil de susceptibilidad refleja resistencia estricta a macrólidos, el uso de clindamicina eliminaría de manera efectiva la infección. Si por el contrario el patrón de resistencia refleja que eritromicina induce la expresión del gen *mls_B*, el uso de clindamicina conllevaría a fracaso clínico a pesar de la aparente susceptibilidad a 'clindamicina'.

En el laboratorio se puede detectar resistencia mediada por el gen *mlsB*, a través de una prueba sencilla llamada 'prueba D' (D-test)⁽³⁷⁾. Se siembra la bacteria en una placa de agar con sangre, a la cual se agregan discos de eritromicina y clindamicina contiguos y cercanos. Si *mls_B* no está presente, resultará en una zona circular homogénea de no crecimiento alrededor del disco de la clindamicina y una zona pequeña de inhibición bacteriana alrededor del disco de la eritromicina debido a que la bacteria crecerá rápidamente en presencia de eritromicina pero será inhibida por clindamicina. En cambio si *mls_B* está presente, la eritromicina en suficiente concentración inducirá la expresión de *mls_B*, confiriendo resistencia a ambos antibióticos. Así, el área entre los discos de eritromicina y clindamicina mostrará una ligera zona de sobrecrecimiento bacteriano hacia el disco de clindamicina. Esta inhibición asimétrica en la placa de agar crea una forma de "D" en la zona de no crecimiento que circunda al disco de clindamicina. Un resultado positivo para la 'prueba D' implica que existe resistencia inducible a la clindamicina y este antibiótico debe ser evitado para tratar infecciones por *S. aureus*⁽³⁸⁾.

Resistencia a linezolid en estafilococo y enterococo producto de la modificación ribosomal

Linezolid es el primer antibiótico derivado de la familia oxazolidinonas, una clase relativamente nueva con actividad contra muchas bacterias gram-positivas y algunas gram-negativas. El mecanismo de acción de las oxazolidinonas no está totalmente elucidado. Pero al parecer linezolid inhibe la iniciación de síntesis de péptidos bacterianos al unirse a la porción 23s del ARNr de la subunidad 50s ribosomal bacteriana. De esta manera evitaría que el ARN transcripcional bacteriano (fMET-tARN) se una a la subunidad 50S⁽³⁹⁾.

El mecanismo de resistencia a linezolid ocurre a través de la modificación del sitio activo donde se une al 23s-ARNr. Mutaciones puntuales en los genes que codifican la subunidad 23s del ARNr hacen que linezolid pierda afinidad por su unión

final en la subunidad 50s⁽⁴⁰⁾. Afortunadamente, el enterococo y el estafilococo contienen múltiples copias de los genes responsables por la producción del 23s-ARNr y parece ser necesario la presencia de mutaciones en múltiples copias para crear resistencia a linezolid. Es decir, la resistencia a linezolid parece ser directamente proporcional al número de genes mutados en una cepa determinada, pero el número necesario de copias mutadas para desarrollar resistencia clínica varía entre especies. Por ejemplo, en *S. aureus*, 2-6 mutaciones en genes han sido asociadas a 'concentración mínima inhibitoria' (CMI) de linezolid de 8 µg/mL⁽⁴¹⁾. Mientras que el mismo número de genes mutados (2-6) en *E. faecium* se correlaciona con un CMI para linezolid de 32 µg/mL⁽⁴²⁾. Independiente de la especie bacteriana, el desarrollo de resistencia cromosomal a linezolid tiende a ser gradual y no parece ser transmisible entre especies, al menos por ahora.

Modificaciones en *Enterococcus faecium* que producen resistencia a glicopéptidos (VRE)

Los enterococos son intrínsecamente resistentes a muchos antibióticos. Similar a lo que sucede en el MRSA, las PBP's en la pared celular del enterococo tienen baja afinidad por la gran mayoría de betalactámicos, lo cual explica su resistencia a la mayoría de penicilinas y cefalosporinas⁽⁴³⁾. Aunque 'in vitro' existen CMIs que pudieran mostrar que los organismos son aparentemente susceptibles a la penicilina, es común encontrar tolerancia antibacteriana clínica y son necesarias concentraciones mucho más altas que las predichas 'in vitro' para obtener eficacia terapéutica⁽⁴⁴⁾. Ampicilina es una de las pocas penicilinas que retiene actividad contra el enterococo. Pero es posible encontrar 'niveles elevados' de resistencia a ampicilina en algunas cepas de enterococos. El 'nivel elevado de resistencia' puede ser observado predominantemente en *E. faecium*, y es mediada por una modificación de la PBP5, la cual resultará en la disminución de la afinidad hacia la penicilina⁽⁴⁵⁾.

La gran habilidad del enterococo para manipular la permeabilidad de su pared celular le confiere su característica 'resistencia de bajo nivel' a los aminoglucósidos⁽⁴⁶⁾. Este 'bajo nivel de resistencia' puede ser superado en la práctica clínica por medio de la extensión del intervalo de la dosis de aminoglucósidos y/o la adición sinérgica de un agente con acción a nivel de la pared celular, tal como un betalactámico con actividad en contra del enterococo. Sin embargo, algunas cepas de enterococos también poseen un 'resistencia elevada' a los aminoglucósidos, con CMIs por encima de 2000mg/L. El mecanismo por el cual el enterococo desarrolla esta 'resistencia elevada' es diferente, y obedece a la existencia de la sobreexpresión de enzimas modificadoras de aminoglucósidos. Mediante acetilación, adenilación o fosforilación estas enzimas modifican el 'sitio activo' del aminoglucósido, convirtiéndolo en un antibiótico ineficaz. Cuando están presentes, el enterococo posee grandes concentraciones de estas enzimas, y las concentraciones necesarias de aminoglucósidos para tratar de revertir el efecto de estas enzimas no puede ser alcanzado de manera clínica segura mediante el incremento de dosis tradicio-

nales. Esto explica por qué tampoco pueden ser superadas por medio de la práctica común de agregar un antibiótico con actividad sinérgica por acción en la pared celular⁽⁴⁷⁾.

Los glicopéptidos vancomicina y teicoplanina se une a los residuos D-Alanyl-D-Alanina en los extremos terminales de las hebras de los ácidos N-acetilmurámico (MAN) y N-acetilglucosamina, que son los precursores del anclaje en la construcción de la pared celular de peptidoglicanos⁽⁶⁾. Por consiguiente, los glicopéptidos previenen que los polímeros formen uniones cruzadas entre ellos, debilitando al extremo la pared celular bacteriana. Las cepas de *E. faecium* y *E. faecalis* resistentes a la vancomicina (VRE) producen una forma alterna de NAM y NAG, porque terminan en residuos D-Alanyl-D-Lactato en vez de D-Alanyl-D-Alanina⁽⁴⁸⁾. Estos péptidos alternos tienen afinidad reducida a la vancomicina permitiendo la síntesis y reparación de la pared celular aún en presencia de vancomicina⁽⁴⁹⁾.

La resistencia a la vancomicina en *E. faecium* y *E. faecalis* es mediada por las enzimas *VanA* y/o *VanB*, las cuales son inducibles. La enzima *VanB* es mediada cromosomalmente y otorga resistencia a la vancomicina pero no a la teicoplanina. El gen para la enzima *VanA* es codificada a través de plásmidos y produce resistencia a todos los glicopéptidos⁽⁵⁰⁾. Los genes de ambas enzimas pueden ser transferidos mediante 'conjugación bacteriana'⁽⁵¹⁾, lo cual permite la posibilidad teórica de transferir resistencia a la vancomicina entre diferentes especies de bacterias. Así, una de las teorías afirma que el origen de resistencia a la vancomicina en *Staphylococcus aureus* surgió producto de la transferencia por conjugación del plásmidos que codificaba la enzima *VanA*⁽⁵²⁾. La resistencia a vancomicina es observada en mayor frecuencia en *E. faecium* que en *E. faecalis*, y desafortunadamente a menudo acompañada de resistencia a la ampicilina.

Cambios en la pared celular de *Estafilococos* y *Enterococos* que resultan en resistencia a la daptomicina

La daptomicina es un polipéptido cíclico activo en contra de bacterias gram-positivas; para cumplir su acción primero tiene que unirse a y luego despolarizar la membrana celular interna⁽⁷⁾. En otras palabras daptomicina 'electrocuta' las bacterias, resultando en inhibición de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, seguido por muerte celular. Su tamaño (~1,600 Kda) constituye una barrera natural para que sea eficaz en contra de las bacterias gram-negativas⁽⁷⁾. El mecanismo de resistencia en contra daptomicina no está completamente aclarado, pero estudios fenotípicos y genéticos *in vitro* de *S. aureus* y *E. faecium* muestran dos mecanismos. En el primero la pared celular se agranda y se hace más compacta creando una barrera relativamente impermeable que no permite que daptomicina se adhiera o pase^(53,54). En el segundo, ocurre un cambio en la polaridad de la membrana celular^(55,56). El incremento de las cargas positivas en la membrana celular impide que daptomicina se una y cumpla su acción. De acuerdo

a esto, la administración de una molécula que se encuentre cargada apropiadamente y que se una a la membrana celular bacteriana podría teóricamente restaurar la polaridad en la membrana celular y mitigar la resistencia a daptomicina. Estudios preliminares han mostrado que la combinación de daptomicina y un agente betalactámico microbiológicamente inactivo (ej. oxacilina en caso de MRSA o ampicilina en el caso de VRE) modifica la carga de la superficie celular bacteriana e incrementa la potencia de daptomicina⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾. No está claro cuál es el mecanismo predominante, o si la 'resistencia' puede transmitirse entre diversas especies bacterianas, pero afortunadamente, por ahora es raro observar cepas de *enterococo* y *estafilococo* que sean resistentes a daptomicina.

La tabla 2 resume las principales mecanismos de resistencia en un grupo común de bacterias que producen infecciones nosocomiales.

Biopelículas

En cierto grupo de infecciones tales como endocarditis, osteomielitis y catéteres endovenosos se desarrolla una 'biopelícula' protectora, por efecto de la actividad bacteriana, que es muy difícil de erradicar. Esta biopelícula es una matriz visco-elástica secretada por las bacterias, cuya función es protegerlas del sistema inmune del ser humano^(60,61).

La característica bacteriana fundamental para la formación de una biopelícula es la 'adherencia a las superficies'⁽⁶²⁻⁶⁴⁾. Esto no es sencillo para la bacteria en órganos bien vascularizados donde el sistema inmune y el proceso de regeneración celular previene que las bacterias formen colonias 'concentradas'. Sin embargo en ausencia o pobre vascularización como en los casos de presencia de cuerpos extraños (ej. catéteres, prótesis), algunas estructuras anatómicas (ej. válvulas cardíacas, hueso, pulmón con fibrosis quística) favorece que las bacterias se adhieren en colonias concentradas y forman biopelículas.

En el caso de *Pseudomonas*, sus biopelículas también contienen grandes concentraciones de betalactamasas, creando una defensa primaria devastadora contra muchos antibióticos betalactámicos susceptibles a las enzimas⁽⁶⁵⁾. Adicionalmente el ambiente producido por la biopelícula no es homogéneo. Las bacterias localizadas en la superficie reciben nutrientes de su ambiente circundante, viven y se replican en condiciones similares a lo que sucede *in vitro*. Pero las bacterias que se encuentran en la profundidad de la biopelícula tienen una fuente de nutrientes disminuida y existen en un estado 'semi-dormido', con mínima capacidad de síntesis de proteínas y casi sin replicación celular⁽⁶⁶⁾. Como casi todos los antibióticos requieren de bacterias en replicación activa para que sean eficaces, estas bacterias en estado 'semi-dormido' son difíciles de erradicar. Esto resulta en el aforismo clínico para el manejo de infecciones asociadas a biopelículas: "a menos que se proceda con resección quirúrgica, el fracaso clínico es común con terapia antibiótica".

Tabla 2

MECANISMOS DE RESISTENCIA EN BACTERIAS SELECCIONADAS

		Gram-positivas			Gram-negativas		
		Enterococos	Enterobacterias	Pseudomonas	Acinetobacter	Estenotrofomomas	
Antibióticos que actúan en la pared celular							
Betalactámicos	Penicilinas simples; Modifican sitio de acción: PBP2a (MRSA)	Baja afinidad a PBPs (intrínseco); Modifican PBPs (Resistencia a AMP)	Beta-lactamasas, incluyendo: BLEE, AmpC, carbenemasas	-Membrana celular (inherente) -Pérdida de Porinas -Betalactamasas -Bombas de flujo multidrogorresistente	-Membrana celular (inherente) -Pérdida de Porinas -Betalactamasas -Bombas de flujo multidrogorresistente - Modifica PBPs	-Membrana celular (inherente) -Betalactamasas (cromosomal y plásmido) -Bombas de flujo multidrogorresistente	
Glicopéptidos	Modifican sitio de acción: D-Ala-D-Lac Peptidoglicanos terminales	Modifican sitio de acción: D-Ala-D-Lac Peptidoglicanos terminales	Restringen el acceso a través de la membrana (intrínseco)	Restringen el acceso a través de la membrana (inherente)	Restringen el acceso a través de la membrana (inherente)	Restringen el acceso a través de la membrana (inherente)	
Daptomicina	<i>Mecanismo no aclarado</i>	<i>Mecanismo no aclarado</i>	Restringen el acceso a través de la membrana celular externa (inherente)	Restringen el acceso a través de la membrana celular externa (inherente)	Restringen el acceso a través de la membrana celular externa (inherente)	Restringen el acceso a través de la membrana celular externa (inherente)	
Colistina	Estructura de la pared celular: Ausencia de membrana celular externa (intrínseco)	Estructura de la pared celular: Ausencia de membrana celular externa (intrínseco)	Alteración de la membrana celular	Alteración de la membrana celular	Alteración de la membrana celular	Alteración de la membrana celular	
Inhibidores de síntesis de proteínas							
Linezolid	Modifican sitio de acción: Mutaciones ribosomales acumulativas	Modifican sitio de acción: Mutaciones ribosomales acumulativas	Restringen el acceso a través de la membrana (inherente)	Restringen el acceso a través de la membrana (inherente)	Restringen el acceso a través de la membrana (inherente)	Restringen el acceso a través de la membrana (inherente)	
Aminoglucósidos	Enzimas inactivadoras de aminoglucósidos (Resistencia a GENT/TOB); Modifican sitio activo: ribosoma (resistencia STRP)	Alteración de la respiración celular (bajo-nivel de resistencia); Enzimas inactivadoras de aminoglucósidos / modifican sitio activo (Alto nivel de resistencia)	Eflujo (bajo-nivel de Resistencia) Enzimas inactivadoras de aminoglucósidos / modifican sitio activo (Alto nivel de resistencia)	Eflujo (bajo-nivel de Resistencia); Enzimas inactivadoras de aminoglucósidos / modifican sitio activo (Alto nivel de resistencia)	Eflujo (bajo-nivel de Resistencia); Enzimas inactivadoras de aminoglucósidos / modifican sitio activo (Alto nivel de resistencia)	Bombas de flujo multidrogorresistentes.	
Tetraciclinas & Tigeciclina	Bombas de flujo	Bombas de flujo	Bombas de flujo; (Resistencia inherente a <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> , <i>Serratia</i>)	Resistencia inherente Bombas de flujo multidrogorresistentes	Bomba de flujo específica de tetraciclina * Bombas de flujo multidrogorresistentes inducible Protección ribosomal	Bombas de flujo multidrogorresistentes	
Cloramfenicol	Inactivación de fármaco	Inactivación de fármaco	intrínseco	Bombas de flujo multidrogorresistentes	Bombas de flujo multidrogorresistentes	Bombas de flujo multidrogorresistentes	
Macrólidos	Modificación sitio activo: (MLS _S); Bombas de flujo	Modificación sitio activo: (MLS _S); intrínseco	intrínseco	Bombas de flujo multidrogorresistentes	Bombas de flujo multidrogorresistentes	Bombas de flujo multidrogorresistentes	
Clindamicina	Modificación sitio activo: (MLS _S)	Modificación sitio activo: intrínseco	intrínseco	Bombas de flujo multidrogorresistentes	Bombas de flujo multidrogorresistentes	Bombas de flujo multidrogorresistentes	
Inhibidores de ácidos nucleicos							
Fluoroquinolonas	Mutaciones puntuales en sitio activo (Topoisomerasa IV)	Mutaciones puntuales en sitio activo (Topoisomerasa IV) Bombas de flujo	Mutaciones puntuales en sitio activo (ADN girasa); Bombas de flujo Cierre de porina	Mutaciones puntuales en sitio activo (ADN girasa); Bombas de flujo *Todas son cromosomales	Mutaciones puntuales en sitio activo (ADN girasa); Bombas de flujo multidrogorresistente	Bajo nivel: Intrínseco Alto nivel: Mutaciones puntuales en sitio activo (ADN girasa); Bombas de flujo multidrogorresistentes	

Conflictos de intereses: Los autores declaran no tener conflictos relacionados al tema revisado.

Agradecimientos y financiamiento: El presente trabajo fue apoyado en parte por el Centro de Investigación Clínica de

la Universidad de California para la investigación de SIDA [Ai036214], y el CFAR Sistemas Clínicos Integrados (CNICS)[R24AI067039-01A1].

Referencias bibliográficas

- Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E, et al. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets*. 2008;9(9):750-759.
- Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(4):593-656.
- Dantzig AH, de Alwis DP, Burgess M. Considerations in the design and development of transport inhibitors as adjuncts to drug therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003;55(1):133-150.
- Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of beta-lactam antibiotics through the porin channels of *Escherichia coli* K-12. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27(1):84-92.
- Schulz GE. The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1565(2):308-317.
- Vancomycin. Package insert. Lake Forest, IL: Hospira, Inc. 2008.
- Cubicin. Package insert. Lexington, MA: Cubist pharmaceuticals. 2010.
- Hancock RE BF. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol*. 2002(56):17-38.
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):582-610.
- Borges-Walmsley MI, Walmsley AR. The structure and function of drug pumps. *Trends Microbiol*. 2001;9(2):71-79.
- Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*. 2009;69(12):1555-1623.
- Kirby WM. Bacteriostatic and Lytic Actions of Penicillin on Sensitive and Resistant Staphylococci. *J Clin Invest*. 1945;24(2):165-169.
- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-331.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):933-951. (Table of contents).
- Canton R, Gonzalez-Alba JM, Galan JC. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*. 2012;3:110.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):1-14.
- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161-82. (Table of contents).
- Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(5):415-419.
- Potz NA, Hope R, Warner M, Johnson AP, Livermore DM. Prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae in London and South-East England. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58(2):320-326.
- Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2005;53(4):257-264.
- Rapp RP, Urban C. Klebsiella pneumoniae Carbapenemases in Enterobacteriaceae: History, Evolution, and Microbiology Concerns. *Pharmacotherapy*. 2012.
- Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91(16):7693-7697.
- Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2011;53(1):60-67.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046-5054.
- Heller I, Grif K, Orth D. Emergence of VIM-1-carbapenemase-producing *Enterobacter cloacae* in Tyrol, Austria. *J Med Microbiol*. 2012;61(Pt 4):567-571.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791-1798.
- Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2010;300(6):371-379.
- Shakil S, Azhar EI, Tabrez S, Kamal MA, Jabir NR, Abuzenadah AM, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): an update. *J Chemother*. 2011;23(5):263-265.
- Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Path*. 1929(X):3-13.
- Jevons MP, Coe AW, Parker MT. Methicillin resistance in staphylococci. *Lancet*. 1963;1(7287):904-907.
- Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1984;158(2):513-516.
- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*. 2001;9(10):486-493.
- Zapun A MP, Vernet T. Penicillin-Binding Proteins and β -lactam resistance. In: Mayers DL, Lerner SA, Ouellette M, Sobel JD, eds. *Antimicrobial drug resistance*. (New York, NY: Humana Press;) 2009:145-170.
- Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(3):577-585.
- Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2002;46(9):2727-2734.
36. **Weisblum B.** Insights into erythromycin action from studies of its activity as inducer of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(4):797-805.
 37. **Woods CR.** Macrolide-inducible resistance to clindamycin and the D-test. *Pediatr Infect Dis J.* 2009;28(12):1115-1118.
 38. **Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J.** Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. *Clin Infect Dis.* 2003;37(9):1257-1260.
 39. **Zyvox.** Package insert. New York, NY: Pharmacia & Upjohn Company. 2012.
 40. **Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL, Mankin AS.** Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol Biol.* 1999;294(1):93-101.
 41. **Meka VG, Pillai SK, Sakoulas G, Wennersten C, Venkataraman L, DeGirolami PC, et al.** Linezolid resistance in sequential *Staphylococcus aureus* isolates associated with a T2500A mutation in the 23S rRNA gene and loss of a single copy of rRNA. *J Infect Dis.* 2004;190(2):311-317.
 42. **Marshall SH, Donskey CJ, Hutton-Thomas R, Salata RA, Rice LB.** Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(10):3334-3336.
 43. **Williamson R, le Bouguenec C, Gutmann L, Horaud T.** One or two low affinity penicillin-binding proteins may be responsible for the range of susceptibility of *Enterococcus faecium* to benzylpenicillin. *J Gen Microbiol.* 1985;131(8):1933-1940.
 44. **Murray BE.** The life and times of the *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990;3(1):46-65.
 45. **Rice LB, Carias LL, Rudin S, Lakticova V, Wood A, Hutton-Thomas R.** *Enterococcus faecium* low-affinity pbp5 is a transferable determinant. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(12):5007-5012.
 46. **Leclercq R.** Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clin Infect Dis.* 1997;24 Suppl 1:S80-84.
 47. **Llano-Sotelo B, Azucena EF, Jr, Kotra LP, Mobashery S, Chow CS.** Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site. *Chem Biol.* 2002;9(4):455-463.
 48. **Bugg TD, Wright GD, Dutka-Malen S, Arthur M, Courvalin P, Walsh CT.** Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. *Biochemistry.* 1991;30(43):10408-10415.
 49. **Arthur M, Molinas C, Bugg TD, Wright GD, Walsh CT, Courvalin P.** Evidence for in vivo incorporation of D-lactate into peptidoglycan precursors of vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992;36(4):867-869.
 50. **Arthur M, Reynolds PE, Depardieu F, Evers S, Dutka-Malen S, Quintiliani R, Jr, et al.** Mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *J Infect.* 1996;32(1):11-16.
 51. **Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P.** Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *N Engl J Med.* 1988;319(3):157-161.
 52. **Weigel LM, Clewell DB, Gill SR, Clark NC, McDougal LK, Flannagan SE, et al.** Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science.* 2003;302(5650):1569-1571.
 53. **Patel JB, Jevitt LA, Hageman J, McDonald LC, Tenover FC.** An association between reduced susceptibility to daptomycin and reduced susceptibility to vancomycin in *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis.* 2006;42(11):1652-1653.
 54. **Cui L, Tominaga E, Neoh HM, Hiramatsu K.** Correlation between Reduced Daptomycin Susceptibility and Vancomycin Resistance in Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(3):1079-1082.
 55. **Steed ME, Vidailiac C, Rose WE, Winterfield P, Kaatz GW, Rybak MJ.** Characterizing vancomycin-resistant *Enterococcus* strains with various mechanisms of daptomycin resistance developed in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4748-4754.
 56. **Yang SJ, Nast CC, Mishra NN, Yeaman MR, Fey PD, Bayer AS.** Cell wall thickening is not a universal accompaniment of the daptomycin nonsusceptibility phenotype in *Staphylococcus aureus*: evidence for multiple resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(8):3079-3085.
 57. **Rand KH, Houck H.** Daptomycin synergy with rifampicin and ampicillin against vancomycin-resistant enterococci. *J Antimicrob Chemother.* 2004;53(3):530-532.
 58. **Rand KH, Houck HJ.** Synergy of daptomycin with oxacillin and other beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(8):2871-2875.
 59. **Sakoulas G, Bayer AS, Pogliano J, Tsuji BT, Yang SJ, Mishra NN, et al.** Ampicillin enhances daptomycin- and cationic host defense peptide-mediated killing of ampicillin- and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(2):838-844.
 60. **Lam J, Chan R, Lam K, Costerton JW.** Production of mucoid microcolonies by *Pseudomonas aeruginosa* within infected lungs in cystic fibrosis. *Infect Immun.* 1980;28(2):546-556.
 61. **Leid JG, Shirtliff ME, Costerton JW, Stoodley P.** Human leukocytes adhere to, penetrate, and respond to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Infect Immun.* 2002;70(11):6339-6345.
 62. **Sauer K, Camper AK.** Characterization of phenotypic changes in *Pseudomonas putida* in response to surface-associated growth. *J Bacteriol.* 2001;183(22):6579-6789.
 63. **Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG.** *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 2002;184(4):1140-1154.
 64. **Otto M.** *Staphylococcus epidermidis*--the 'accidental' pathogen. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7(8):555-567.
 65. **Dibdin GH, Assinder SJ, Nichols WW, Lambert PA.** Mathematical model of beta-lactam penetration into a biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* while undergoing simultaneous inactivation by released beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 1996;38(5):757-769.
 66. **Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O.** Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(4):322-332.