

Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias

Gerardo Becerra,*
Arturo Plascencia,**
Antonio Luévanos,**
Miguel Domínguez,*
Iván Hernández*

Antimicrobial resistance mechanism in bacteria

Fecha de aceptación: enero 2009

Resumen

La resistencia a antimicrobianos es un problema de salud pública. Los mecanismos pueden ser intrínsecos o adaptativos. Los primeros pueden capacitar a la bacteria para que produzca enzimas que destruyan al fármaco antibacteriano, expresar sistemas *efflux* de excreción que eviten que el fármaco alcance su blanco intracelular, modificar el sitio blanco del antimicrobiano o generar una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco. Entre los mecanismos adaptativos, encontramos las adaptaciones fenotípicas, sea por el estado metabólico de la bacteria, o por ser secundaria a su capacidad de producir biopelículas. En esta revisión, mencionamos los principales mecanismos relacionados con la resistencia a antimicrobianos.

Palabras clave: resistencia a antimicrobianos, biopelículas, sistemas de excreción *efflux*

Abstract

Antimicrobial resistance is a problem in public health. The mechanisms may be intrinsic or adaptive. The adaptive mechanisms could give to the bacteria an ability to destroy the antibacterial drug, to express the *efflux* system that excrete the drug so that cannot get the intracellular target, or some bacteria could generate a metabolic via that protect them with the active drug. The adaptive mechanism may shown the phenotypic adaptations that involve the metabolic state of the bacteria and their ability to produce biofilms. In this review we mention the principals mechanisms related to the resistance to antibiotics.

Keywords: antimicrobial resistance, *efflux* system, biofilms

Introducción

Para la década de 1950, con la aparición de una gama importante de antimicrobianos, se pensaba que virtualmente todas las infecciones bacterianas eran tratables con éxito. Poco tiempo después el mundo se vio obligado a abandonar esa idea, debido a la aparición de resistencias a antibióticos de patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Micobacterium tuberculosis*. Muchos han sido los factores que han contribuido al incremento de cepas multiresistentes a antibióticos, como su uso inadecuado, migración nacional e internacional que facilita la diseminación,

aglomeraciones de personas, entre otros.

Paradójicamente, al aumentar las bacterias resistentes, también lo ha hecho el conocimiento de los mecanismos moleculares de resistencia antimicrobiana, por lo que se detectan nuevos blancos terapéuticos y se generan pocos fármacos nuevos.

Las bacterias pueden ser resistentes intrínsecamente a uno o más agentes antimicrobianos, pueden adquirir la resistencia por mutaciones *de novo* o por genes de resistencia de otros organismos, así como por adaptaciones metabólicas al fármaco.

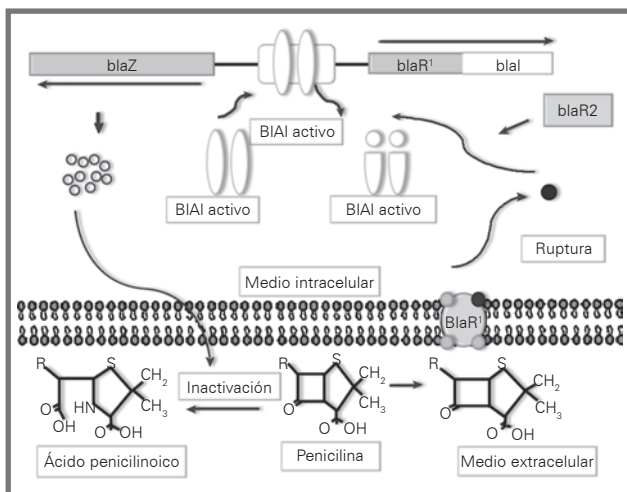
*Departamento de Microbiología y Patología, CUCS, U de G.; **Servicio de Infectología y Pediatría, Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde"

Resistencia intrínseca

La adquisición de material genético por las bacterias susceptibles a antimicrobianos de bacterias con resistencia ocurre a través de conjugación, transformación o transducción con transposones que a menudo facilitan la incorporación de genes de resistencia múltiple al genoma o plásmido. El uso de agentes antimicrobianos también crea una presión selectiva para el surgimiento de cepas resistentes.¹

S. aureus es un ejemplo claro de esta situación. En la era previa a los antibióticos, la mortalidad de pacientes era del 80% al 70%, y para la década de 1940, con la llegada de la penicilina, el pronóstico de los pacientes con infecciones estafilocócicas era muy alentador. Sin embargo, ya desde 1942 se identificaron cepas resistentes, primero en los hospitales y después en la comunidad.² Para la década de 1960, más del 80% de los estafilococos aislados eran resistentes a la penicilina. La resistencia a la penicilina está mediada por el gen *blaZ*, cuyo producto es la β -lactamasa, que hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina y lo inactiva (Figura 1).²

Figura 1



La resistencia a la penicilina está mediada por el gen *blaZ* que codifica para una β -lactamasa, con el control del antirrepresor BlaR1 y el represor Blal. En presencia de penicilina, estimula una autotranslocación de BlaR1 que fragmenta secuencialmente a Blal y permite así la expresión del gen *blaZ*, cuyo producto hidroliza a la penicilina para producir ácido peniciloico inactivo.⁵

En este contexto surge la meticilina, la primera penicilina semisintética resistente a la β -lactamasa, pero rápidamente se reportaron cepas resistentes a la meticilina (MRSA).³ El gen *mecA* es el responsable de la resistencia a la meticilina, que forma parte de

un elemento genético móvil encontrado en todas las cepas resistentes a la meticilina.⁴ Con este mismo comportamiento, se generaron cepas resistentes a las quinolonas, aminoglucósidos y cefalosporinas, con la identificación de los genes responsables en cada caso.⁵ Con la llegada de la vancomicina, las cepas MRSA se trataban con éxito y el uso de este fármaco se incrementó para tratar infecciones estafilocócicas resistentes a la meticilina, *Clostridium difficile* y enterococos, pero con el tiempo aparecieron cepas resistentes a la vancomicina.⁶ Para 1997 se reportaron cepas con una resistencia intermedia a vancomicina; y para 2002, cepas con resistencia completa a la vancomicina. Esta resistencia se debe al producto del operon *vanA*, adquirido por conjugación con *Enterococcus faecalis*.⁷ En este panorama, *S. aureus* representa un riesgo muy grave, tanto hospitalario como comunitario. La mortalidad por una bacteriemia causada por *S. aureus* va del 20% al 40%, a pesar de la gran disponibilidad actual de antibióticos, y se incrementa proporcionalmente con su patrón de resistencia.

E. aureus no es la única bacteria con este comportamiento, sino sólo un modelo ejemplar. Los microorganismos *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *E. coli* y *K. pneumoniae* de igual manera, a lo largo de la historia, han mostrado adaptaciones a muchos de los antibióticos actualmente disponibles y se han identificado los genes responsables en cada adaptación. En estos casos, podemos mencionar al grupo de genes Bla, que produce las resistencias a beta-lactámicos de espectro ampliado y cefalosporinas, los *erm A*, *B* y *C* para macrólidos, *mecA* meticilina, etc.^{8,9,10} Todos estos microorganismos causan más del 60% de las infecciones hospitalarias y un porcentaje considerable de las comunitarias.

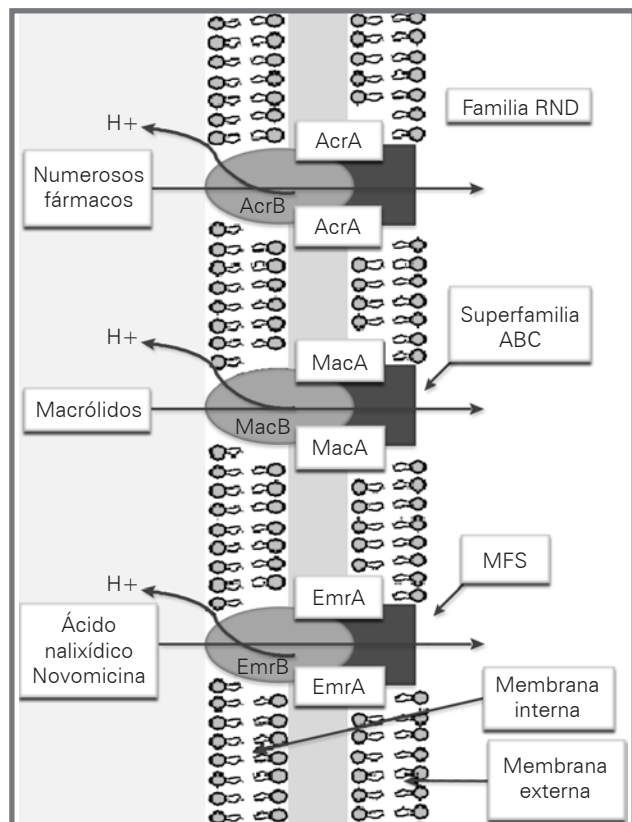
Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) puso en marcha programas mundiales de vigilancia epidemiológica de genes de resistencia. En 1993, dio comienzo el programa para la vigilancia de genes de resistencia a tuberculosis, lo cual permitirá estrategias de tratamiento más racionales.¹¹

Multiresistencia (MR) mediada por bombas de excreción *efflux*

Otro mecanismo de resistencia importante es evitar que el antibiótico se incorpore a la célula bacteriana y lo exporte activamente al medio extracelular, sin permitir el alcance de la molécula diana por el fármaco (bombeo de excreción *efflux* [BE]).

Los genes y proteínas de las BE están presentes en todos los organismos. En las bacterias, los genes que codifican las bombas *efflux* se localizan en el cromosoma o los plásmidos.

Figura 2

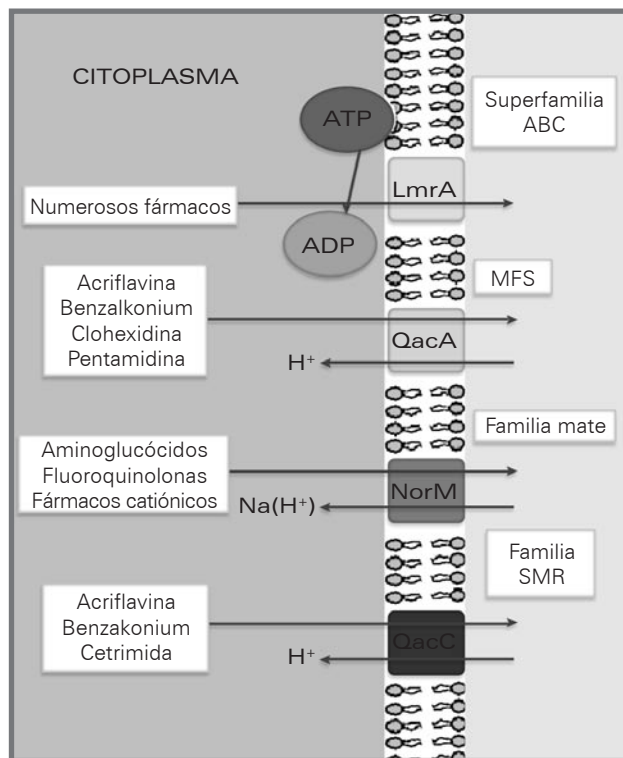


Bombas de excreción en Gram negativas. Éstas poseen las familias RND, ABC y MFS, además de presentar componentes proteínicos accesorios en la membrana externa, denominados TolC P. Se mencionan los fármacos.

Existen cinco superfamilias de proteínas de BE: 1) familia de casete de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, *ATP binding cassette*); 2) superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*); 3) familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, *multidrug and toxic-compound extrusion*); 4) familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, *small multidrug resistance*); y 5) familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*) (Figuras 2 y 3).

Un solo organismo puede expresar más de una familia de BE. En el caso de *P. aeruginosa* y *E. coli*, pueden expresar más de un tipo de BE de la familia RND, las cuales se expresan por bacterias Gram negativas y se relacionan con multirresistencias clínicamente significativas.¹²

Figura 3



Representación de las bombas de excreción (*efflux*) en bacterias Gram positivas. Existen cinco familias de bombas de excreción multiresistentes a fármacos: la superfamilia casete de unión a ATP (ABC), la superfamilia del máximo facilitador (MFS), la familia de extrusión de compuestos tóxicos y multifármacos (MATE), la familia de resistencia de bajo espectro (SMR) y la familia de resistencia división nodular (RND). Las bacterias Gram positivas poseen las bombas de las familias ABC, MFS, MATE y SMR. En el esquema, se mencionan los fármacos más afectados por estas bombas de excreción.¹³

En bacterias Gram negativas, TolC puede funcionar como el canal proteico para las diferentes BE miembros de la familia RND, también pueden interactuar con transportadores MFS y la superfamilia ABC.¹³

Algunos agentes antibacterianos no son útiles para el tratamiento de infecciones por algunas bacterias Gram negativas, pues éstas tienen resistencia intrínseca a estos agentes. Tal resistencia se atribuyó al principio a la deficiente permeabilidad de la membrana bacteriana a la droga, lo cual ya se ha reportado e indica que la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* a varios antibióticos se debe a BE.¹²

La BE es el mecanismo de sospecha de la resistencia antimicrobiana cuando se incrementa la concentración mínima inhibitoria (CMI) de tres o más antibióticos para una bacteria en particular, en comparación con la CMI de estos antibióticos frente a la cepa na-

tiva. La CMI de estos agentes antimicrobianos para BE mutante puede ser de dos a ocho veces más alta que la CMI de estos agentes para la cepa susceptible. Cuando el CMI se incrementa más de 100 veces, por lo general se asocia con cualquier expresión de enzimas que inactive agentes antimicrobianos.

Los sustratos de BE bacterianos específicos han sido detallados por Poole.^{13,14}

Relevancia clínica de bacterias Gram negativas y BE

Para las bacterias Gram negativas se expresan sobre todo BE del tipo RND, mientras las comunes para Gram positivas son las MFS (Figuras 2 y 3).

En los seres humanos, *P. aeruginosa* causa varias infecciones oportunistas, como en la piel y en tejido blando en pacientes con quemaduras, y neumonía en individuos con fibrosis quística. La *P. aeruginosa* posee bombas de la familia RND MexAB-OprM, MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN, cada una de las cuales puede exportar varios tipos de antibióticos, como cloranfenicol, fluoroquinolonas y tetraciclinas, aunque no todos los sistemas Mex se expresan constitutivamente.¹³ Estas BE, además, exportan otras sustancias, como acriflavina, bromuro de etidio y algunos solventes orgánicos.¹⁵ La sobreexpresión de BE Mex se ha asociado con niveles relevantes de MR en aislados clínicos de *P. aeruginosa*.^{16,17,18}

Los perfiles de fármacos sustrato de las BE de *E. coli* AcrAB-TolC (familia RND) son los antibióticos cloranfenicol, fluoroquinolonas, antibióticos lipofílicos, β -lactámicos, ácido nalidíxico, novobiocina, rifampicina y tetraciclina, así como acriflavina, bromuro de etidio, sales biliares, ácidos carboxílicos de cadena corta, SDS, tritón X-100 y triclosán.¹⁹⁻²¹ A pesar de haber aislado otras BE, sólo AcrAB-tolC se ha encontrado sobreexpresado en aislados clínicos.²²⁻²⁴

El sistema ACrAB-Tolc encontrado en *Salmonella* es muy similar a *E. coli*, y su sustrato incluye los antibióticos cloranfenicol, quinolonas y tetraciclinas, así como acriflavina, bromuro de etidio, sales biliares, SDS, tritón X, ceftriaxona y triclosán.²⁵⁻²⁷

En el caso de *N. gonorrhoeae*, el sustrato de su BE, MtrCDE (familia RND), incluye penicilinas.²⁸ La expresión de esta BE es insuficiente para conferir niveles de resistencia clínicamente relevantes. En líneas celulares resistentes a la penicilina de *N. gonorrhoeae*, la sobreexpresión de MtrCDE ocurre concomitantemen-

te con otros mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos, como la restricción de proteínas formadoras de poros de membrana externa (como las codificadas por penB) y alteraciones en la proteínas de unión a penicilina.²⁸

Relevancia clínica de bacterias Gram positivas y BE

Entre las bacterias Gram positivas que expresan BE clínicamente relevantes se encuentran *S. aureus* y *S. pneumoniae*. La sobreexpresión de BE NorA (familia MFS) en *S. aureus* confiere resistencia a cloranfenicol y fluoroquinolonas, así como pigmentos y biocidas, como ceftriaxona.²⁹⁻³³ De los antibióticos utilizados para el tratamiento de *S. aureus* susceptibles y resistentes a metilicina, sólo fluoroquinolonas y ciprofloxacina son sustratos de Nor A. Varios estudios han encontrado cepas aisladas resistentes a la fluoroquinolona y norfloxacina sobreexpresada NorA.^{32,34,35}

S. pneumoniae causa neumonía, bronquitis y meningitis, y algunas infecciones pueden ser fatales en la población joven. El tratamiento implica la administración de antibióticos β -lactámicos, fluoroquinolonas o macrólidos. La BE PmrA (familia MFS) de *S. pneumoniae* exporta fluoroquinolonas, ciprofloxacina y norfloxacina, así como también pigmento-acriflavina y bromuro de etidio.³⁶ Además de las BE MFS, *S. pneumoniae* expresa otras de la familia ABC, como Mel, y ambos pueden conferir resistencia a macrólidos, problema de preocupación mundial.³⁷

Resistencia adaptativa a antibióticos

En contraste con la resistencia intrínseca que resulta de mutaciones de genes propios de la bacteria o adquiridos de manera externa, la adaptativa es sobre todo fenotípica, aunque algunos factores genéticos predisponen al microorganismo a activar este mecanismo. En esta sección mencionaremos los mecanismos por los cuales las poblaciones de bacterias o fracciones de estas poblaciones genéticamente homogéneas y ordinariamente susceptibles llegan a ser resistentes a antibióticos.

Indiferencia al fármaco

Las bacterias que no se están dividiendo no son eliminadas por los fármacos. Este fenómeno, que Walsh

McDermott denominó "indiferencia al fármaco", no se limita a la familia de antibióticos β -lactámicos.³⁸⁻⁴⁰ Las bacterias que no se dividen, y/o no tienen suficientes nutrientes para un metabolismo activo, son parcial o completamente resistentes a antibióticos bactericidas.

Este efecto resistente no-replicante, en subpoblaciones genéticamente susceptibles de bacterias a tratamiento con antibióticos, es particularmente bien conocido para el tratamiento de infecciones con *Mycobacterium tuberculosis*.^{41,42}

Esta "latencia" es la razón primaria para la larga duración de la quimioterapia contra tuberculosis, lo que se conoce como "curso corto". Las poblaciones residuales y "latentes" de bacterias sin división pueden contribuir a recaídas tras la suspensión del tratamiento antibiótico para infecciones micobacterianas, estafilocócicas y otras.^{43,44}

Persistencia

Es conocido que los antibióticos bactericidas no eliminan todas las bacterias aun en crecimiento activo.⁴⁵ Conforme pasa el tiempo, el rango de eliminación declina en fracción sustancial de la población bacteriana que sobrevive al encuentro con ese fármaco. Este fenómeno se denomina persistencia bacteriana, resistencia adaptativa o tolerancia fenotípica.^{45,46,47}

La razón por la cual la subpoblación persistente puede sobrevivir a la exposición de antibióticos parece la misma condición que la población a la cual le es indiferente el fármaco: las células bacterianas no estaban en replicación al momento de su exposición al fármaco.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar por qué deja de replicarse un subconjunto de bacterias (SOS *systems*) y así adopta el fenotipo de resistencia.⁴⁸ Otro mecanismo sería que, durante el curso de crecimiento, las poblaciones bacterianas incluyesen células en proceso de reparación de su ADN y no se estuviesen dividiendo, lo que generaría un fenotipo resistente.⁴⁹

Biopelículas

Aunque los genes de resistencia y sus productos son los principales mecanismos de resistencia a an-

tibióticos, existen otros menos explorados, como el relacionado con la producción de biopelículas. Las biopelículas son agregados adherentes que se forman en superficies bióticas o abióticas.⁵⁰ Se ha demostrado que las cepas que producen biopelículas son significativamente más resistentes a antibióticos y agresores antimicrobianos, incluso con respuesta del hospedero.^{51,52}

Esta forma de crecimiento bacteriano contiene células genéticamente sensibles, refractarias a muchos antibióticos, pero no a todos.^{53,54} Se han propuesto tres mecanismos por los cuales las biopelículas contribuyen a la resistencia.

Primero, se postuló que las células bacterianas encajadas en matrices de polisacáridos que constituyen la biopelícula son menos accesibles a la difusión del antibiótico.⁵⁵ La segunda razón es que se trata de una forma de indiferencia al fármaco a causa de los nutrientes y otros limitantes, pues muchas células bacterianas dentro de la biopelícula no se replican ni metabolizan lo suficiente para que el antibiótico funcione de manera eficaz.^{56,57} La tercera hipótesis, y actualmente la más apoyada, es que las bacterias dentro de las biopelículas se diferencian a estados refractarios a los antibióticos; es decir, una combinación de indiferencia y persistencia, factores ya comentados.⁵⁸

Esto debe considerarse en el tratamiento. Por ejemplo, *P. aeruginosa* produce biopelículas donde los antibióticos, como las fluoroquinolonas, penetran más fácil en comparación con los aminoglucósidos, pues éstos se unen a polímeros como el alginato,⁵⁹ además de considerar interacciones muy importantes, como la de los aminoglucósidos como inductores de la formación de biopelículas en cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli*, lo que exacerba la resistencia.⁶⁰

Conclusiones

La resistencia a los antibióticos es una causa importante de la prolongación de la estancia hospitalaria, al fracasar la terapia inicial antimicrobiana, lo que eleva el costo de hospitalización. El conocimiento de los mecanismos de resistencia permitirá una terapia antimicrobiana racional y dirigida, además de ayudar al diseño de nuevos fármacos. La resistencia no sólo es intrínseca, sino también adaptativa, situación que hay que tomar en cuenta para establecer regímenes adecuados de tratamiento.

Bibliografía

1. French GL. "What's new and not so new on the antimicrobial horizon?" *Clin Microbiol Infect* 2008; (14)6: 19-29.
2. Rammelkamp CH, Maxon T. "Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin". *Proc Royal Soc Exper* 1942; *Biol. Med* 51: 386-389.
3. Jevons MP. "Celbenin-resistant *staphylococci*". *Br Med J* 1961; (1): 124-125.
4. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. "A new class of genetic element, *staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*". *Antimicrob Agents Chemother* 2000; (44): 1549-1555.
5. Lowy FD. "Antimicrobial resistance: The example of *Staphylococcus aureus*". *J Clin Inv* 2003; 111(5): 1265-1273.
6. Kirst HA, Thompson DG, Nicas T. "Historical yearly usage of vancomycin". *Antimicrob Agents Chemother* 1998; (42): 1303-1304.
7. "*Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin". Estados Unidos. *MMWR* 2002; (51): 565-567.
8. Calbo E, Romani V, Xercavins M, Gomez L, Vidal CG, Quintana S, Vila J, Garau J. "Risk factors for community-onset urinary tract infections due to *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum beta-lactamases". *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(4): 780-783.
9. Bagattini M, Crivaro V, Di Popolo A, Zarilli R. "Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit". *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(5): 979-982.
10. Dubois *et al.* "Beta-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres)". *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(2): 316-323.
11. Cohn DL, Bustreo F, Raviglione MC. "Drug resistant tuberculosis: Review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD global surveillance project". *Clin Infect Dis* 1997; 24: S121-S130.
12. Vila J, Martínez JL. "Clinical impact of the over-expression of efflux pump in nonfermentative Gram-negative bacilli, development of efflux pump inhibitors". *Curr Drug Targets* 2008; (9): 797-807.
13. Poole K. "Efflux mediated multi-resistance in Gram-negative bacteria". *Clin Microbiol Infect* 2004; (10): 12-26.
14. Poole K. "Efflux mediated antimicrobial resistance". *J Antimicrob Chemother* 2005; (56): 20-51.
15. Poole K, Srikumar R. "Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: Components, mechanisms, and clinical significance". *Curr Top Med Chem* 2001; 1: 59-71.
16. Zihra-Zarifi I, Llanes C, Köhler T, Pechère J-C, Plésiat P. "In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM". *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 287-291.
17. Oh H, Stenhoff J, Jalal S, Wretling B. "Role of efflux pumps and mutations in genes for topoisomerases II and IV in fluoroquinolone-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains". *Microb Drug Resist* 2003; 9: 323-328.
18. Hocquet D, Bertand X, Kohler T, Talon D, Plésiat P. "Genetic and phenotypic variations of a resistant *Pseudomonas aeruginosa* epidemic clone". *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1887-1894.
19. Rosenberg EY, Ma D, Nikaido H. "AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump". *J Bacteriol* 2000; 182: 1754-1756.
20. Bavro VN *et al.* "Assembly and channel opening in a bacterial drug efflux machine". *Mol Cell* 2008; 11 30(1): 114-121.
21. Nishino K, Yamaguchi A. "Analysis of the complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*". *J Bacteriol* 2001; 183: 5803-5812.
22. Mazzariol A, Tokue Y, Kanegawa TM, Cornaglia G, Nikaido H. "High level fluoroquinolone resistant clinical isolates of *Escherichia coli* over produce multidrug efflux protein AcrA". *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3441-3443.
23. Oethinger M, Kern WV, Jellen-Ritter AS, McMurry LM, Levy SB. "Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump". *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 10-13.
24. Webber MA, Piddock LJV. "Absence of mutations in marAB or soxRS in acrB-overexpressing fluoroquinolone-resistant clinical and veterinary isolates of *Escherichia coli*". *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1550-1552.
25. Baucheron S *et al.* "AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104". *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3729-3735.
26. Giraud E, Cloeckert A, Kerboeuf D, Chaslus-Dancla E. "Evidence for active efflux as the primary mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1223-1228.
27. Piddock LJV, White DG, Gensberg K, Pumbwe L, Griggs DJ. "Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium". *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3118-3121.
28. Veal WL, Nicholas RA, Shafer WM. "Overexpression of the MtrC-MtrD-MtrE efflux pump due to an mtrR mutation is required for chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*". *J Bacteriol* 2002; 184: 5619-5624.
29. Neyfakh AA. "The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein". *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 484-485.
30. DeMarco CE *et al.* "Efflux-related resistance to norfloxacin, dyes, and biocides in bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*". *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(9): 3235-3239.
31. Horii T, Suzuki Y, Takeshita A, Maekawa M. "Molecular characterization of 8-methoxyfluoroquinolone resistance in a clinical isolate of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*". *Chemotherapy* 2007; 53(2): 104-109.
32. Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA. "Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*". *Antimi-*

- croB* Agents Chemother 1993; 37: 1086-1094.
33. Ng EY, Truckis M, Hooper DC. "Quinolone resistance mediated by *norA*: Physiologic characterization and relationship to *flqB*, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus aureus* chromosome". *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1345-1355.
34. Jones ME, Boenink NM, Verhoef J, Kohrer K, Schmitz F-J. "Multiple mutations conferring ciprofloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* demonstrate the long term stability in an antibiotic free environment". *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 353-356.
35. Noguchi N, Okada H, Narui K, Sasatsu M. "Comparison of the nucleotide sequence and expression of *norA* genes and microbial susceptibility in 21 strains of *Staphylococcus aureus*". *Microb Drug Resist* 2004; .10: 197-203.
36. Gill MJ, Brenwald NP, Wise R. "Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*". *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 187-189.
37. Ambrose KD, Nisbet R, Stephens DS. "Macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae* is mediated by a dual efflux pump (*mel* and *mef*) and is erythromycin inducible". *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4203-4209.
38. McDermott W. "Microbial persistence". *Yale J Biol Med* 1958; 30: 257-291.
39. Paramasivan CN, Sulochana S, Kubendiran G, Venkatesan P, Mitchison DA. "Bactericidal action of gatifloxacin, rifampin, and isoniazid on logarithmic and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*". *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 627-631.
40. Herbert D *et al.* Bactericidal action of ofloxacin, sulbactam-ampicillin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*". *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2296-2299.
41. McCune RM, Tompsett R. "Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. 1. The persistence of drug-susceptible tubercle bacilli in the tissues despite prolonged antimicrobial therapy". *J Exp Med* 1956; 104: 737-762.
42. Toman K. "Bacterial persistence in leprosy". *Int J Lepr y Mycobact Dis* 1981; 49: 205-217.
43. Fitoussi F *et al.* "Molecular DNA analysis for differentiation of persistence or relapse from recurrence in treatment failure of *Streptococcus pyogenes* pharyngitis". *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997; 16: 233-237.
44. Clement S *et al.* "Evidence of an intracellular reservoir in the nasal mucosa of patients with recurrent *Staphylococcus aureus* rhinosinusitis". *J Infect Dis* 2005; 192: 1023-1028.
45. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. "Bacterial persistence as a phenotypic switch". *Science* 2004; 305: 1622-1625.
46. Barclay ML, Begg EJ, Chambers ST. "Adaptive resistance following single doses of gentamicin in a dynamic *in vitro* model". *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1951-1957.
47. Wiuff C *et al.* "Phenotypic tolerance: Antibiotic enrichment of non-inherited resistance in bacterial populations". *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 1483-1494.
48. Miller C *et al.* "SOS response induction by β -lactams and bacterial defense against antibiotic lethality". *Science* 2004; 305: 1629-1631.
49. Debbia EA, Roveta S, Schito AM, Gualco L, Marchese A. "Antibiotic persistence: The role of spontaneous DNA repair response". *Microb Drug Resist* 2001; 7: 335-342.
50. Callow JA, Callow ME. "Biofilms". *Prog Mol Subcell Biol* 2006; 42: 141-169.
51. Gilbert P, Allison DG, McBain AJ. "Biofilms *in vitro* and *in vivo*: Do singular mechanisms imply cross-resistance?" *J Appl Microbiol* 2002; 92: 98S-110S.
52. Stewart PS. "Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial bio-films". *Int J Med Microbiol* 2002; 292: 107-113.
53. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. "Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections". *Science* 1999; 284: 1318-1322.
54. Lewis K. "Riddle of biofilm resistance". *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 999-1007.
55. Anderl JN, Franklin MJ, Stewart PS. "Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin". *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1818-1824.
56. Anderl JN, Zahller J, Roe F, Stewart PS. "Role of nutrient limitation and stationary-phase existence in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin". *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1251-1256.
57. Gilbert P, Collier PJ, Brown MRW. "Influence of growth-rate on susceptibility to antimicrobial agents—biofilms, cell-cycle, dormancy, and stringent response". *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1865-1868.
58. Southey-Pillig CJ, Davies DG, Sauer K. "Characterization of temporal protein production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms". *J Bacteriol* 2005; 187: 8114-8126.
59. Walters MC III, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS. "Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin". *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 317-323.
60. Hoffman LF, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller S. "Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation". *Nature* 2005; 436: 1171-1175.