

Muerte bacteriana y heterorresistencia a los antimicrobianos

Luis Martínez-Martínez

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander. España.

La concentración inhibitoria mínima (CIM) es el parámetro microbiológico más frecuentemente empleado para evaluar la utilidad clínica de un antimicrobiano. Ello se debe, entre otras razones, a la facilidad para estudiar en la práctica diaria decenas de microorganismos (en especial gracias al uso de sistemas automatizados), a su estandarización y a su razonable buena correlación con la respuesta clínica. El uso alternativo de la técnica de difusión con discos, más barata, también remite en última instancia a la CIM. Este valor, sin embargo, sólo mide la capacidad para frenar el crecimiento bacteriano; otros muchos parámetros de actividad antimicrobiana (concentración bactericida mínima, sinergia determinada por curvas de muerte, efecto postantibiótico, etc.) rara vez se valoran en el laboratorio de microbiología clínica, por su complejidad metodológica y porque la trascendencia clínica de sus resultados es, en muchos casos, desconocida.

Aún sabemos demasiado poco de las causas concretas por las que los antimicrobianos producen la muerte de las bacterias. Recientemente se ha observado que varios grupos de antimicrobianos bactericidas (con independencia de su mecanismo bioquímico de interacción con la diana) estimulan la producción de radicales hidroxilo, responsables directos de la muerte bacteriana; esto no ocurre con los antimicrobianos bacteriostáticos¹. Sin embargo, algunos antimicrobianos que se comportan como bacteriostáticos para un microorganismo son bactericidas para otros, o incluso para diferentes cepas de una misma especie. En el fondo, la definición de bactericida tiene unos componentes de indefinición y, hasta cierto punto, de arbitrariedad, que son reflejo de las limitaciones conceptuales y técnicas existentes cuando se acuñó el término: se acepta que un antimicrobiano es bactericida cuando es capaz de matar al menos el 99,9% (99,99% para otros autores) del inóculo inicial². Muchos agentes tradicionalmente considerados bacteriostáticos matan (sobre todo en altas concentraciones) una parte significativa de la población bacteriana, aunque no se alcance la cifra de referencia del 99,9%. Así pues, se acepta implícitamente que cuando la población bacteriana se expone a un antimicrobiano (considerado) letal, al menos 1 de cada 1.000 microorganismos puede sobrevivir y, por tanto, que las poblaciones pueden contener individuos que responden de forma diferente a la acción letal del compuesto. Si se emplea un inóculo suficiente

mente alto, también lo será el número absoluto de bacterias que teóricamente puedan sobrevivir: para 10^7 ufc/ml, un compuesto bactericida permitiría que siguieran viables 10^4 bacterias, etc., y para 10^9 ufc/ml esta cifra alcanzaría los 10^6 microorganismos (¡más del inóculo habitual en las pruebas estandarizadas para calcular la CIM!). Para mayor complejidad, el recuento de bacterias supervivientes suele realizarse a las 24-48 h, pero se sabe que algunas de las bacterias que no han crecido en ese tiempo pueden acabar haciéndolo si la incubación se prolonga varios días más³. Otras variables como el uso de inóculos en fase estacionaria, el empleo de medios pobres en nutrientes, las variaciones de pH y de temperatura, etc., también pueden influir en la capacidad bactericida de los antimicrobianos. Hay muy pocos estudios sistemáticos en los que se haya evaluado la importancia de estos factores, y hasta qué punto deberían considerarse a la hora de establecer el carácter bactericida de un antimicrobiano.

Todos estos hechos remiten, de alguna forma, al fenómeno de la heterorresistencia. Aunque para este término no existe una definición precisa que pueda aplicarse globalmente a todos los microorganismos, habitualmente se emplea para referirse a las poblaciones que contienen una mayoría de bacterias inhibidas en concentraciones por debajo del punto de corte de sensibilidad, junto con otro pequeño número de microorganismos (en torno a uno por cada 10^3 - 10^7) que son resistentes^{4,5}. Un aspecto relevante en esta definición es que las variaciones al establecer el punto de corte de sensibilidad podrían influir en la definición de una cepa como heterorresistente.

La heterorresistencia se ha descrito en *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus coagulasa negativa* (en particular en cepas resistentes a meticilina, en cepas intermedias y resistentes a glucopéptidos y más recientemente en relación con daptomicina)⁶⁻¹⁰, *Enterococcus faecium* (glucopéptidos¹¹), *Streptococcus pneumoniae* (penicilina¹²), *Acinetobacter baumannii* (carbapenemes, polimixinas, etc.¹³⁻¹⁶), *Helicobacter pylori* (metronidazol, claritromicina, etc.^{17,18}), *Mycobacterium tuberculosis* (etambutol¹⁹) e incluso en el hongo *Cryptococcus neoformans* (fluconazol²⁰).

No existe un método estandarizado para la detección de heterorresistencia en el laboratorio y hay muy poca información sobre las variables técnicas que influyen en dicha detección. Se han empleado tanto métodos complejos y laboriosos (como el análisis del perfil de la población, *population analysis profile*, PAP²¹) como métodos de fácil realización, en particular la observación de colonias en los halos de inhibición con discos o –más caro– con tiras de E-test. En este número de EIMC, Fernández-Cuenca et al²² utilizan precisamente esta última opción para definir cepas de *A. baumannii* heterorresistentes a carbapenemes, y para evaluar el impacto de este fenómeno en la de-

Correspondencia: Luis Martínez-Martínez.
Servicio de Microbiología.
Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
Avda. Marqués de Valdecilla, s/n. 39008 Santander. España.
Correo electrónico: lmartinez@humv.es

Manuscrito recibido el 20-6-2008; aceptado el 27-6-2008.

finición de CIM por E-test o por microdilución estandarizada o comercial.

En *S. aureus* la heterorresistencia a meticilina/oxacilina puede detectarse mediante difusión con disco, empleando una temperatura de incubación de 30 °C y medios hipertónicos²³, por lo que se ha recomendado el uso de agar Mueller-Hinton suplementado con cloruro sódico (v. indicaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]). La fase de crecimiento y otros factores externos (pH, luz, anaerobiosis, agentes quelantes, metales, etc.) también afectan a la expresión de la heterorresistencia. En esta misma especie, la detección de heterorresistencia a glucopéptidos se ha basado, entre otras técnicas, en la detección de colonias en placas con 6 mg/l de vancomicina usando inóculos elevados (10^6 - 10^8 ufc/ml), o comprobando sinergia entre aztreonam y vancomicina en placas de BHI suplementado con este último compuesto²⁴. En *S. pneumoniae* se detectó heterorresistencia a penicilina al comprobar la aparición de una zona interna de hemólisis sin crecimiento microbiano visible en los halos de inhibición con tiras de E-test¹². También se han evaluado otras técnicas convencionales, como la microdilución de referencia o el uso de sistemas automáticos comerciales de antibiograma, aunque en relación con esta última opción se ha publicado que la detección de heterorresistencia a polimixina B en *Enterobacter cloacae* no es fiable cuando se emplea el sistema VITEK 2²⁵. El trabajo de Fernández-Cuenca et al²² también sugiere que la microdilución (estandarizada o comercial) no detecta adecuadamente la presencia de poblaciones heterorresistentes en *A. baumannii*.

¿Cuál es la causa por la que unas pocas bacterias de toda una población sobreviven en presencia de un antimicrobiano? Una explicación sencilla, intuitiva, es que la población contenga un pequeño número de mutantes resistentes, con mecanismos específicos codificados por uno o más genes: el antimicrobiano actuaría como agente de selección eliminando la población más sensible y permitiendo la supervivencia de la fracción mutante. Uno de los ejemplos clásicos de esta posibilidad es la selección *in vitro* o durante el tratamiento de mutantes desreprimidas de bacterias gramnegativas (algunas enterobacterias, *Pseudomonas aeruginosa*, etc.) que contienen AmpC cromosómica²⁶. Cuando los mutantes resistentes estables se subcultivan en ausencia de antimicrobiano generan una nueva población con mayor grado de resistencia que la original. En el caso de las fluoroquinolonas y de algunos otros antimicrobianos se ha descrito la selección de mutantes resistentes en un rango de concentraciones (ventana de selección de mutantes) que oscila entre la CIM y la denominada concentración preventiva de mutantes (CPM). En la CPM ya no ocurre selección porque toda la población es eliminada por el antimicrobiano²⁷. Se desconoce si este modelo de la CPM es aplicable al resto de los antimicrobianos de uso habitual.

Por otra parte, las colonias que aparecen en los halos de inhibición con las técnicas de difusión con disco o de difusión en gradiente, o tras sembrar en medio sólido un cultivo bacteriano sometido a una concentración por encima de la CIM, no siempre son verdaderas mutantes, en el sentido que hemos definido previamente. Ya en la década de 1940 se comprobó que una pequeña proporción de una población de *S. aureus* (aproximadamente 1 de cada millón de bacterias) podía sobrevivir a la exposición prolongada a

penicilina, y que eso se relacionaba con la recurrencia del cuadro infeccioso. Sorprendentemente, los microorganismos aislados de nuevo eran tan sensibles como los de la infección original y, por ello, fueron denominados "persistentes" (*persisters*), que supuestamente representaban células durmientes insensibles a la acción del antimicrobiano. El fenómeno de la persistencia (diferenciado del de la selección de mutantes con resistencia estable) se observó posteriormente en diversos estudios en los que se comprobó que en el interior de los halos de inhibición de los antibiogramas por difusión aparecían colonias incapaces de mantener un grado de resistencia estable, pero que sí perpetúan ese mismo fenotipo. También se ha descrito la aparición de persistentes en biocapas bacterianas. En 1997, Pascual et al¹³, en un estudio sobre evaluación de métodos de antibiograma para estudiar la actividad de carbapenemes frente a *A. baumannii*, observaron al usar tiras de E-test que en 24 de 50 aislados aparecían colonias en el interior de los halos de inhibición, y que cuando se volvía a determinar la CIM de estas colonias internas (incluso en medio suplementado con 0,25 × CIM de imipenem), la CIM volvía a ser la misma que en la población original, y de nuevo aparecían colonias en la elipse de inhibición. Con posterioridad, otros autores han realizado observaciones similares en esta misma especie¹⁴. La heterorresistencia de *S. pneumoniae* a penicilina y la de *C. neoformans* a fluconazol tampoco parece ser un fenómeno estable; además, en el caso de *S. pneumoniae* no guarda relación con alteraciones en las proteínas fijadoras de penicilina (que sí se observa cuando se seleccionan mutantes estables a este antimicrobiano).

Es posible que en una misma especie la selección de mutantes estables o de persistentes tenga que ver tanto con la cepa concreta como con el antimicrobiano considerados: en el estudio ya citado, Fernández-Cuenca et al²² comprueban que (al menos para una de las cepas heterorresistentes) el subcultivo previo en medio con carbapenemes acaba seleccionando mutantes con la CIM superior a la de la población original (lo que no sucede cuando el subcultivo repetido se realiza en medio sin carbapenemes), y que en cepas pertenecientes al mismo patrón clonal unas veces presentan la heterorresistencia descrita por los autores y otras no. En *E. cloacae* las colonias del halo de inhibición de polimixina B son completamente resistentes a este antimicrobiano cuando no se hace un subcultivo previo en medio sin antimicrobiano, pero ocasiona un fenómeno similar al descrito para *A. baumannii*¹³ cuando las colonias se subcultivan previamente en agar sangre²⁵. También en *A. baumannii* se ha demostrado recientemente la selección de mutantes con resistencia estable a colistina (CIM de 8 mg/l)²⁸.

Las bases biológicas de la persistencia no se conocen adecuadamente. Durante la década de 1980, Moyed et al²⁹, estudiando mutantes de *E. coli* que en comparación con su correspondiente cepa parental presentaban, en presencia de ampicilina, un incremento de unas 1.000 veces en la tasa de aparición de persistentes, demostraron la importancia del *locus hip*³⁰, un operón con los genes *hipA* e *hipB* relacionado con los sistemas toxina-antitoxina. Estos sistemas están implicados en la estabilidad de ciertos plásmidos, y también se han descubierto posteriormente en el cromosoma de múltiples bacterias³¹. Otros estudios han relacionado la persistencia con la respuesta al estrés generada en ausencia de aminoácidos (*stringent response*),

en la que tiene un papel clave la “alarmona” (p)ppGpp³². En muchos estudios en los que se ha analizado la aparición de subpoblaciones heteroresistentes se han empleado inóculos iniciales elevados, pero se desconoce la posible relación entre heteroresistencia y el fenómeno de regulación por *quorum sensing*³³.

Tampoco se ha aclarado suficientemente, por el momento, si existe una relación entre la persistencia y la tolerancia (proporción > 16-32 entre los valores de concentración bactericida mínima y CIM de antimicrobianos habitualmente bactericidas) o el efecto paradójico (un incremento en la concentración de un antimicrobiano más allá de un cierto valor ocasiona una disminución en la tasa de mortalidad de la bacteria, de modo que ésta ocurre sólo en un rango relativamente estrecho de concentraciones).

La reciente comunicación de Fernández-Cuénca et al³⁴ en la que se relaciona la heteroresistencia de *A. baumannii* con la presencia de la oxacilinasa OXA-58 y con ISAb3 (pero no con la enzima cromosómica intrínseca OXA-51), arroja nuevos datos para analizar el fenómeno. OXA-58 está codificada por un gen plasmídico, por lo que podría especularse que la heteroresistencia esté asociada no a la propia betalactamasa o a la secuencia de inserción, sino a algún otro elemento (¿un sistema toxina-antitoxina?) codificado por el correspondiente plásmido.

Más allá del interés biológico de la heteroresistencia, y desde un punto de vista más práctico, cabe preguntarse si merecería la pena evaluar este problema en el laboratorio clínico. La respuesta sería afirmativa si existiese información fiable sobre la importancia de la heteroresistencia en la respuesta terapéutica de la infección o en su historia natural, pero ambas cuestiones, en la mayoría de los casos no están resueltas por el momento.

Hay pocas dudas de que en *S. aureus* la heteroresistencia a oxacilina/metilicilina es clínicamente relevante, hasta el punto de que su demostración desaconseja completamente el uso de betalactámicos (con algunas excepciones de compuestos como ceftobiprol) para el tratamiento de las infecciones causadas por estas cepas. También se han publicado varios estudios (frecuentemente retrospectivos y con pocos pacientes) sobre la importancia clínica de las cepas de *S. aureus* heteroresistentes a glucopéptidos: en algunos de ellos se comprueba que estas cepas se asocian con fracaso terapéutico, pero la importancia real de esta observación es de difícil evaluación, tanto por la falta de estandarización de los métodos microbiológicos para definir este fenotipo, como por el hecho de que en otros estudios⁷ no se llega a la misma conclusión.

Tal vez la heteroresistencia represente una vía de escape natural hacia la resistencia estable a los antimicrobianos, pues, conceptualmente, permite a una población crecer en presencia del antimicrobiano antes de que la mayoría de sus componentes se hayan hecho resistentes en el sentido que habitualmente damos a este último término. De hecho, algunos estudios sugieren que el uso de antimicrobianos *in vivo* puede seleccionar mutantes heteroresistentes que posteriormente permiten la selección de una población establemente resistente capaz de causar un fracaso terapéutico. En Japón se ha descrito la aparición de una cepa de *S. aureus* con resistencia homogénea a vancomicina a partir de una cepa con heteroresistencia a este compuesto³⁵. También se ha descrito un fenómeno similar en otra cepa de *E. faecium* heteroresistente a van-

comicina¹¹. Las cepas de *A. baumannii* heteroresistentes a colistina llegan a tener CIM (estables) de este compuesto que superan los 8-16 mg/l; estas cepas se pueden seleccionar *in vitro* y se ha especulado que también se puedan seleccionar en pacientes tratados con colistina²⁸. La preincubación de cepas de *A. baumannii* en concentraciones crecientes de colistina enriquece la subpoblación heteroresistente, que en ocasiones acaba transformándose en una población con resistencia homogénea y estable; aunque el posterior subcultivo en medio sin antimicrobiano reduce nuevamente el tamaño de la población heteroresistente, ésta sigue siendo mayor que la que contenía la cepa parental de partida; como las concentraciones de colistina que se alcanzan en suero son inferiores a las que eliminan la subpoblación resistente, la exposición a estas concentraciones podría representar un factor de riesgo para el enriquecimiento *in vivo* de la población resistente, y eso a su vez, quizás se relacione con el fracaso terapéutico¹⁵. Los aislados de *A. baumannii* de pacientes que han sido tratados previamente con colistina presentan un mayor grado de heteroresistencia.

También es posible que la heteroresistencia a un antimicrobiano pueda favorecer la resistencia o incluso la heteroresistencia a otro: la aparición de heteroresistencia a vancomicina en cepas de *S. aureus* de varios pacientes tratados con este antimicrobiano se acompañaba de la aparición de heteroresistencia a daptomicina⁸.

No se conoce con claridad la relación entre virulencia y heteroresistencia, aunque hay algún ejemplo al respecto: la cepa heteroresistente a glucopéptidos A5940 de *S. aureus* ha perdido la expresión de hemolisina delta (en comparación con una cepa clonalmente relacionada y sensible a glucopéptidos A5937). Se cree que ese hecho se relaciona con una mutación en el regulador *agr* que ocasiona una proteína AgrA truncada. La pérdida de la función de esta proteína podría estar relacionada con la tolerancia a vancomicina y con el fracaso terapéutico de este compuesto y, en pacientes con una infección crónica, con el posterior desarrollo de mutaciones que generen un fenotipo de resistencia intermedia a glucopéptidos³⁶.

Es posible que los estudios publicados sobre heteroresistencia traten en el fondo de (al menos) dos fenómenos biológicos diferentes, cuya interrelación por el momento nos resulta desconocida y cuyas implicaciones clínicas podrían ser diferentes. El interés biológico y las consecuencias clínicas de la heteroresistencia hacen necesario continuar los estudios sobre este tema.

Bibliografía

1. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*. 2007;130:797-810.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents; approved guideline. NCCLS document M26-A NCCLS. Wayne; 1999.
3. Piddock LJ, Walters RN. Bactericidal activities of five quinolones for *Escherichia coli* strains with mutations in genes encoding the SOS response or cell division. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:819-25.
4. Schwaber MJ, Wright SB, Carmeli Y, Venkataraman L, DeGirolami PC, Gramatikova A, et al. Clinical implications of varying degrees of vancomycin susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:657-64.
5. Rinder H. Hetero-resistance: an under-recognised confounder in diagnosis and therapy? *J Med Microbiol*. 2001;50:1018-20.

6. Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1986; 29:85-92.
7. Ryffel C, Strässle A, Kayser FH, Berger-Bächi B. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38:724-8.
8. Liu C, Chambers HF. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47:3040-5.
9. Sakoulas G, Alder J, Thauvin-Eliopoulos C, Moellering RC, Eliopoulos GM. Induction of daptomycin heterogeneous susceptibility in *Staphylococcus aureus* by exposure to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50: 1581-5.
10. Nunes AP, Teixeira LM, Bastos CC, Silva MG, Ferreira RB, Fonseca LS, Santos KR. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterization of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:307-15.
11. Alam MR, Donabedian S, Brown W, Gordon J, Chow JW, Zervos MJ, Hershberger E. Heteroresistance to vancomycin in *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3379-81.
12. Morand B, Muhlemann K. Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:14098-103.
13. Pascual A, Martínez-Martínez L, Clavijo MJ, García-Perea MD, Perea EJ. Comparison of three methods of determining the in-vitro susceptibilities of *Acinetobacter baumannii* isolates to imipenem. *J Antimicrob Chemother*. 1997;40:742-3.
14. Pournaras S, Ikonomidou A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55:1055-6.
15. Li J, Rayner CR, Nation RL, Owen RJ, Spelman D, Tan KE, Liolios L. Heteroresistance to colistin in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:2946-50.
16. Tan CH, Li J, Nation RL. Activity of colistin against heteroresistant *Acinetobacter baumannii* and emergence of resistance in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51: 3413-5.
17. Matteo MJ, Pérez CV, Domingo MR, Olmos M, Sánchez C, Catalano M. DNA sequence analysis of *rdxA* and *frxA* from paired metronidazole-sensitive and -resistant *Helicobacter pylori* isolates obtained from patients with heteroresistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27:152-8.
18. Kim JJ, Kim JG, Kwon DH. Mixed-infection of antibiotic susceptible and resistant *Helicobacter pylori* isolates in a single patient and underestimation of antimicrobial susceptibility testing. *Helicobacter*. 2003;3:202-6.
19. Rinder H, Mieskes KT, Löscher T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2001;5:339-45.
20. Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, Houston AK, Boyken L, Hollis RJ, et al. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol*. 2003;41:267-72.
21. Woottton X, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennet PM, MacGowan AP. A modified population analysis method (PAP) to detect heteroresistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in UK hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:399-403.
22. Fernández-Cuenca F, Egea P, López Cerero L, Díaz-De Alba P, Vila J, Pascual A. Comparación de tres métodos para determinar la sensibilidad a imipenem y meropenem en *Acinetobacter baumannii* con fenotipo heteroresistente a carbapenemes. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2008;26:485-8.
23. Sutherland R, Rolinson GN. Characteristics of methicillin-resistant staphylococci. *J Bacteriol*. 1964;87:887-99.
24. Aritaka N, Hanaki H, Cui L, Hiramatsu K. Combination effect of vancomycin and beta-lactams against a *Staphylococcus aureus* strain, Mu3, with heterogeneous resistance to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1292-4.
25. Lo-Ten-Foe JR, De Smet AM, Diederen BM, Kluytmans JA, Van Keulen PH. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51: 3726-30.
26. Juan C, Moyá B, Pérez JL, Oliver A. Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level beta-lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:1780-7.
27. Drlica K, Zhao X. Mutant selection window hypothesis updated. *Clin Infect Dis*. 2007;44:681-8.
28. Hawley JS, Murray CK, Jorgensen JH. Colistin heteroresistance in *Acinetobacter* and its association with previous colistin therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:351-2.
29. Moyed HS, Bertrand KP. *hipA*, a newly recognized gene of *Escherichia coli* K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. *J Bacteriol*. 1983;155:768-75.
30. Wolfson JS, Hooper DC, McHugh GL, Bozza MA, Swartz MN. Mutants of *Escherichia coli* K-12 exhibiting reduced killing by both quinolone and beta-lactam antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34: 1938-43.
31. Buts L, Lah J, Dao-Thi MH, Wyns L, Loris R. Toxin-antitoxin modules as bacterial metabolic stress managers. *Trends Biochem Sci*. 2005;30:672-9.
32. Braeken K, Moris M, Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends Microbiol*. 2006;14: 45-54.
33. González JE, Keshavan ND. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006;70:859-75.
34. Fernández F, Gómez M, Egea P, Vila J, Pascual A. Asociación entre heteroresistencia a carbapenemes en *acinetobacter baumannii*, producción de beta-lactamasas (AmpC y oxacilinasas) y secuencias de inserción tipo ISAba. Resúmenes del XIII Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC), 2008, N.º 12, p. 6.
35. Neoh HM, Cui L, Yuzawa H, Takeuchi F, Matsuo M, Hiramatsu K. Mutated response regulator *graR* is responsible for phenotypic conversion of *Staphylococcus aureus* from heterogeneous vancomycin-intermediate resistance to vancomycin-intermediate resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:45-53.
36. Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Wennersten C, Venkataraman L, Novick RP, Gold HS. Accessory gene regulator (*agr*) locus in geographically diverse *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46:1492-502.