

STATE-OF-THE-ART

ACTIEVE ANTIBIOTICA-EFFLUX EN BACTERIËLE RESISTENTIE:
ACTUALISATIE EN IMPLICATIES

N. MESAROS¹, F. VAN BAMBEKE¹, L. AVRAIN¹, G. GLUPCZYNSKI²,
R. VANHOOF³, P. TULKENS^{1,4}

Inleiding

Men is er zich terdege van bewust dat bacteriën de mogelijkheden hebben om op een efficiënte manier resistentiemechanismen te ontwikkelen. In toenemende mate is het een belangrijke oorzaak van therapeutisch falen (1).

Daarenboven wordt de behandelend arts verplicht nieuwere antibiotica voor te schrijven, die op hun beurt ook aanleiding kunnen geven tot het ontwikkelen van andere resistentiemechanismen (2). Verder kan het nodig zijn de dosis te verhogen (3-5) of antibiotica van verschillende klassen te combineren (6). Door resistente bacteriën veroorzaakte infecties zijn in het algemeen moeilijker te behandelen. Uitzonderlijk is een bacterie resistent tegen al de beschikbare antibiotica, zodat men moet terugvallen op een therapie met een verhoogde toxiciteit (7, 8).

Men moet twee belangrijke situaties onderscheiden: de *natuurlijke* (of intrinsieke) *resistentie* en de *verworven resistentie*. De natuurlijke resistentie is aanwezig bij alle stammen van een welbepaald species nog vooraleer men gebruik heeft gemaakt van de antibiotica. Ze vormt dus een kenmerk dat eigen is aan de species en bepaalt in feite het werkingsspectrum van de antibiotica. In dergelijk geval spreekt men van

Samenvatting

Antibiotica-efflux is een resistentiemechanisme dat vandaag sterk verspreid blijkt te zijn. De efflux van potentieel toxische substanties behoort tot het verdedigingsmechanisme van elke cel en antibiotica zijn slechts opportunistische substraten. Voor vier medisch belangrijke bacteriën (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* en *Pseudomonas aeruginosa*) beschrijven we de belangrijkste transportsystemen die verantwoordelijk zijn voor deze vorm van resistentie.

Omdat efflux vaak verantwoordelijk is voor een laag resistentieniveau, zou men kunnen veronderstellen dat het slechts een geringe invloed uitoefent op de gevoeligheid van de kiem. Nochtans kan efflux samenwerken met andere resistentiemechanismen en dus bijdragen tot een hogere graad van resistentie, de selectie van mutanten vergemakkelijken en verantwoordelijk zijn voor een uitgebreide resistentie van bacteriën.

Vele transportsystemen zijn inderdaad niet specifiek voor een bepaalde chemische structuur maar wel voor moleculenfamilies op basis van biofysische eigenschappen (amfifilie). Bovendien worden transportsystemen dikwijls gecodeerd door mobiele genetische elementen (wat bijdraagt tot de snelle disseminatie van de oorzakelijke genen) en zijn ze vaak induceerbaar. Het is dus belangrijk dat dit resistentiemechanisme opgespoord wordt in klinische laboratoria.

Bij de therapiekeuze moet rekening gehouden worden met deze transportsystemen en dit niet alleen in het belang van de individuele patiënt maar ook van een rationele antibioticapolitiek.

¹ Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire, Université catholique de Louvain, Bruxelles.

² Laboratoire de microbiologie, Cliniques universitaires de l'UCL à Mont-Godinne, Yvoir.

³ Eenheid voor antibiotica-onderzoek, Instituut Pasteur, Brussel.

⁴ Correspondentieadres: dr. P.M. Tulkens, Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire, Université catholique de Louvain, UCL 7370, avenue E. Mounier 73, 1200 Bruxelles; e-mail: tulkens@facm.ucl.ac.be

Resistentiestrategie

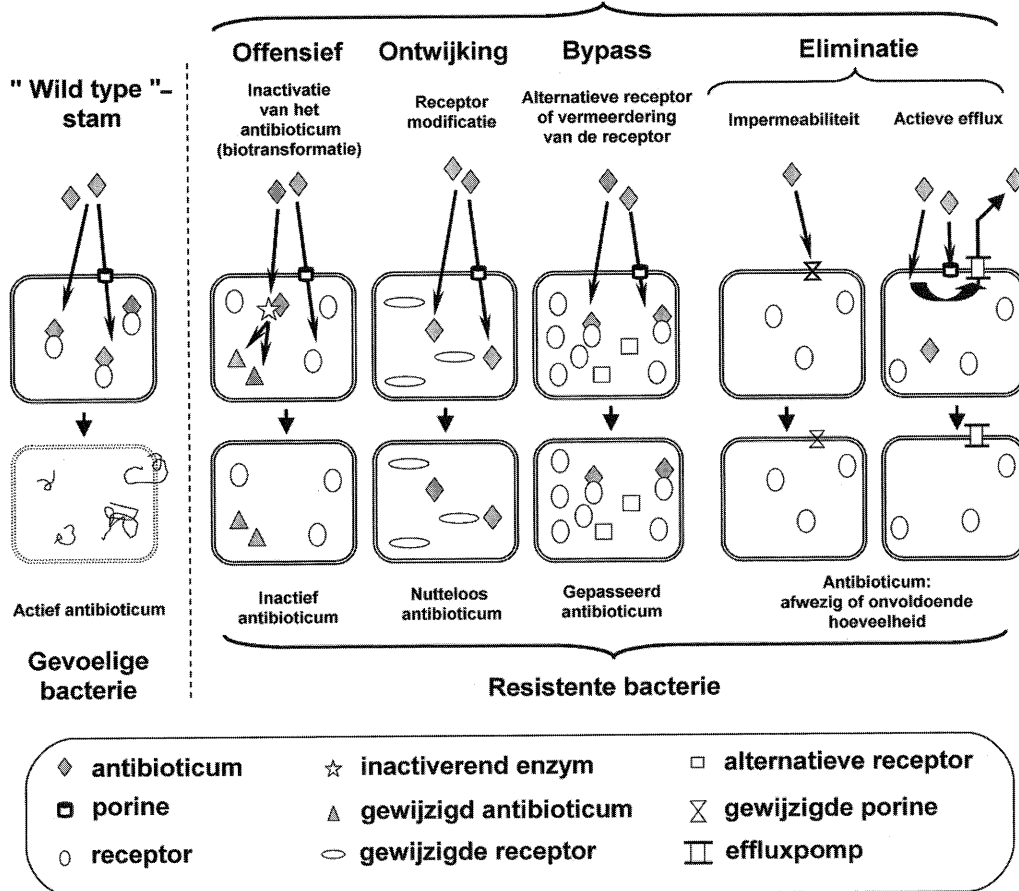


Fig. 1: Belangrijkste bacteriële resistentiemechanismen. Eenzelfde bacterie kan gelijktijdig verschillende van deze mechanismen toepassen, die ook gevonden kunnen worden in meerdere species van verschillende genera.

een ongevoelige species. De verworven resistentie ontstaat als gevolg van het gebruik van antibiotica en wordt gevonden bij een bepaald aantal stammen, die zich aldus binnen een gegeven species onderscheiden van de zogenaamde „wild type”-stammen. (Indien de resistentie van een laag niveau is, spreekt men van stammen met een verminderde gevoeligheid.)

De mechanismen van de verworven resistentie zijn op figuur 1 aangetoond. Het is het minder gekende maar ongetwijfeld belangrijke mechanisme van actieve efflux dat het onderwerp is van dit artikel. We concentreren ons op vier bacteriën van onbetwistbaar medisch belang: *Staphylococcus aureus*, verantwoordelijk voor een groot aantal

infecties van de huid en de weke weefsels, en in Europa verantwoordelijk voor bijna 30% van de infecties bij patiënten op de intensievezorgafdeling (9); *Streptococcus pneumoniae*, de voornaamste verwekker van pneumonie opgelopen buiten het ziekenhuis en van luchtweginfecties in het algemeen, maar ook verantwoordelijk voor ernstige infecties, zoals meningitis, *Escherichia coli*, verantwoordelijk voor de meeste urineweginfecties buiten het ziekenhuis en verwekker van een groot aantal intestinale infecties; en ten slotte *Pseudomonas aeruginosa*, een omgevingsbacterie die ernstige infecties veroorzaakt bij personen met een verminderde immuniteit, en verantwoordelijk is voor meer dan 10% van de ziekenhuisinfecties.

Ontdekking van de mechanismen van antibioticaresistentie door efflux

Het onderzoek van Levy en McMurry naar de mechanismen van tetracyclineresistentie toonde voor de eerste maal aan dat *E. coli* over de mogelijkheid beschikte om deze antibiotica naar buiten te pompen (10). In dezelfde periode ontdekte men een effluxmechanisme bij getransformeerde cellen die resistent waren geworden tegen antracyclinen (11). Het belang van dit mechanisme werd al snel duidelijk, temeer daar het een verklaring kon geven voor het therapeutisch falen in de oncologie. Het bleek een invloed uit te oefenen op verschillende chemotherapeutica tegen kanker zonder structurele verwantschap (12). Behoudens een invloed op geneesmiddelen heeft efflux ook vaak een werking op andere substanties die een potentiële cellulaire toxiciteit vertonen, zoals de mogelijkheid om celmembranen te passeren. Een belangrijke doorbraak kwam er toen men inzag dat efflux in feite een zeer sterk verspreid mechanisme is dat instaat voor het verwijderen van componenten die schadelijk zijn voor het overleven van de cel en aldus bijdaagt tot cellulaire homeostase. Deze functie blijkt zeer belangrijk te zijn, genoomanalyse toont inderdaad aan dat bijna 10% van de cellulaire eiwitten de eigenschap heeft om als transportmoleculen te functioneren.

Classificatie van de transportmoleculen en de effluxmechanismen

In eerste instantie herkennen de transportmoleculen fysiologische substraten zoals nutriënten en afbraakproducten (13), terwijl de efflux van geneesmiddelen eerder een opportunistische eigenschap is. Als we ons beperken tot

de transporteiwitten die in staat zijn de belangrijkste antibiotica naar buiten te pompen (14), kan men ze onderverdelen in 4 families (tabel 1). Terwijl bepaalde transportmoleculen slechts een of twee klassen van antibiotica herkennen, zijn andere in staat antibiotica van zeer diverse klassen naar buiten te pompen. Bepaalde effluxpompen vindt men zowel bij prokaryote als bij eukaryote cellen terug, wat laat veronderstellen dat deze eiwitten gecodeerd worden door zeer oude genen die doorheen de evolutie bewaard zijn gebleven. Men veronderstelt bijgevolg dat ze een zeer belangrijke rol hebben gespeeld in het overleven van de cel. In figuur 2 illustreren we tegelijk het spectrum van de antibiotica herkend door de effluxpompen en hun verdeling over Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën enerzijds en over prokaryote en eukaryote cellen anderzijds. Bepaalde transportmoleculen vindt men uitsluitend terug bij een groep van bacteriën (b.v. Gram-negatief in geval van „resistance-nodulation-cell devision”(RND)) omdat ze zijn aangepast aan de algemene structuur van deze kiemen (fig. 3). Men stelt ook vast dat bepaalde transporteiwitten een smal spectrum hebben, terwijl andere in staat zijn antibiotica van verschillende klassen te transporteren (14).

De lokalisatie van de transportmoleculen doorheen de celwand is geïllustreerd in figuur 3. De effluxpompen van Gram-positieve bacteriën bestaan slechts uit een enkele proteïne „cytoplasmic membrane protein”(CMP) die instaat voor de efflux naar de ruimte gelegen onder de peptidoglycaanwand vanwaar de moleculen gemakkelijk naar buiten kunnen diffunderen. De effluxpompen van de Gram-negatieve bacteriën zijn veel complexer omdat deze organismen over twee membranen beschikken. De ene (interne) membraan scheidt het cytoplasma

TABEL 1

Voornaamste klassen effluxpompen voor antibiotica. Elke klasse bevat een groot aantal verschillende transporteiwitten waarvan de eigenschappen en de distributie in de bacteriële wereld aanzienlijk kunnen verschillen.

Familie (benaming ^a)	Acroniem	Energiebron
<i>ATP-Binding Cassette</i>	ABC	ATP
<i>Resistance-Nodulation-cell Division</i>	RND	} Ionengradiënt
<i>Small Multidrug Resistance</i>	SMR	

^a De benamingen zijn deze die gegeven werden bij de ontdekking van de transportmoleculen; ze verwijzen vaak naar feiten die verband houden met deze ontdekkingen. Dit verklaart waarom deze benamingen niet altijd overeenstemmen met de functies beschreven op basis van later onderzoekswerk.

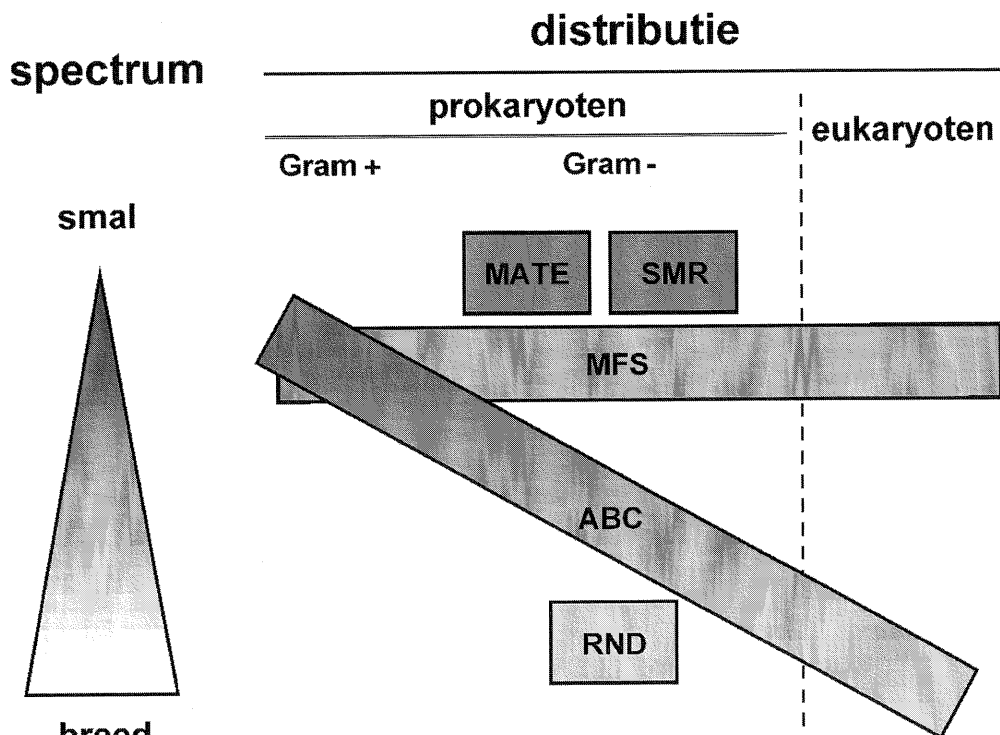


Fig. 2: Distributie (horizontale coördinaat) en werkingsspectrum (verticale coördinaat) van de belangrijkste antibioticatransporteiwitten vermeld in tabellen 1, 2 en 3.

ABC: ATP-binding cassette, MFS: major facilitator superfamily; RND: resistance nodulation-cell division; SMR: small multidrug resistance.

af van de ruimte onder het peptidoglycaan, terwijl de tweede (externe) membraan de peptidoglycaan omvat die de grens vormt met het externe milieu en een intermembranair compartiment afdijnt, namelijk de periplasmatische ruimte. De CMP, die instaat voor de efflux, is dus geassocieerd met twee andere proteïnen waarvan de eerste „outer membrane proteïne”(OMP) gelegen is in de externe membraan, terwijl de tweede „membrane fusion proteïne”(MFP) de verbinding tussen de CMP en de OMP verzekert. Deze drie proteïnen werken op een gecoördineerde manier en laten het transport doorheen de twee membranen toe.

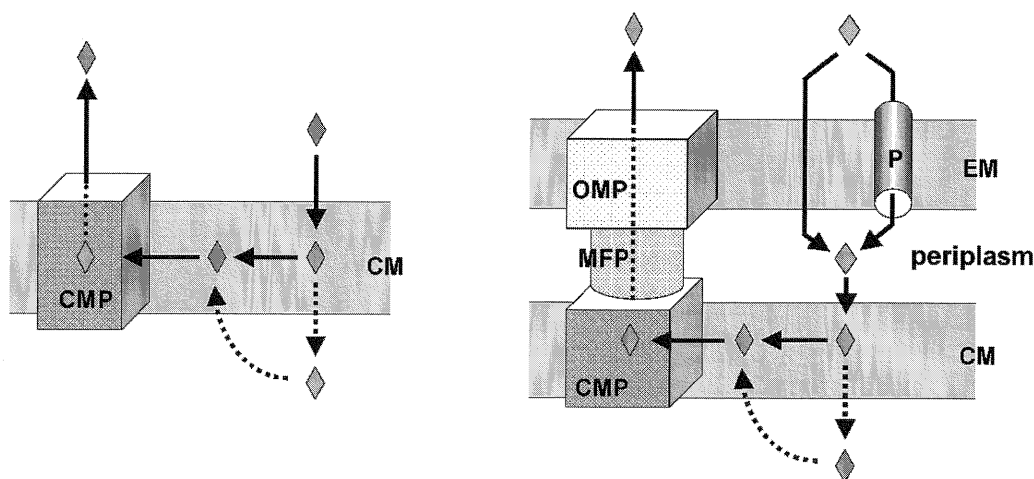
Uit figuur 3 blijkt ook dat de antibiotica bij voorkeur worden opgepikt vanaf de membraan zelf en niet vanuit het cytoplasma. Dit onverwachte fenomeen verklaart waarom de effluxpomp uitermate efficiënt zijn tegenover

amfifiele moleculen (d.i. in staat zijn zich gelijktijdig op te lossen in waterig milieu (hydrofilie) en in de membranen (lipofilie)). Men heeft hier te maken met een dilemma wat betreft de keuze en de ontwikkeling van nieuwe moleculen. Een amfifiel karakter immers is vaak onontbeerlijk om een goede biodisponibiliteit te bekomen, terwijl dit meteen ook inhoudt dat ze gemakkelijk opgevangen kunnen worden door de effluxpomp.

De belangrijkste effluxpomp bij *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *E. coli* en *P. aeruginosa*

De belangrijkste eigenschappen van deze effluxpomp zijn samengevat in de tabellen 2 en 3. Gemakkelijkheidshalve beperken we ons bewust tot de pomp voor antibiotica die bij de behandeling regelmatig worden gebruikt, maar

♦ antibioticum



CM: „cytoplasmic membrane”
EM: „external membrane”
P: porine

CMP: „cytoplasmic membrane protein”
MFP: „membrane fusion protein”
OMP: „outer membrane protein”

Fig. 3: Algemene organisatie (topologie) van de effluxpompen in Gram-positieve (links) en Gram-negatieve (rechts) bacteriën. De afkortingen zijn in het Engels weergegeven teneinde het opzoeken van informatie in de internationale literatuur te vergemakkelijken. De pijlen tonen de waarschijnlijke weg van de antibiotica die onderhevig zijn aan efflux. Men veronderstelt dat een belangrijke fractie wordt opgevangen tijdens de passage van de molecule doorheen het cytoplasmamembraan, maar een opname vanuit het cytoplasma is eveneens mogelijk.

er moet opgemerkt worden dat andere antibiotica (zoals chlooramfenicol, fusidinezuur, rifampicine) eveneens substraten zijn van effluxpompen (14, 15).

Staphylococcus aureus

De best gekende effluxpomp is NorA (16). Deze is verantwoordelijk voor de efflux van fluorochinolonen. Het genoom van *S. aureus* codeert voor minstens 10 andere proteïnen die een sequentiehomologie vertonen met NorA, en voor dewelke een transportfunctie waarschijnlijk is (17). Dit laat veronderstellen dat er nog andere niet geïdentificeerde effluxpompen aanwezig kunnen zijn. De MsrA-proteïne, behorende tot de ABC-familie, is verantwoordelijk voor de resistentie tegen macroliden. Deze werd

voor het eerst gevonden bij *S. epidermidis* (18) en is verantwoordelijk voor meer dan 10% van de macrolidenresistentie in methicillinegevoelige *S. aureus*-isolaten in Europa (19). MdeA is een effluxsysteem, recentelijk beschreven bij *S. aureus*, dat aminoglycosiden herkent (20). Onrustwekkend is de ontdekking van effluxpompen (QacA) die in staat zijn antiseptica, zoals quaternaire ammoniumzouten, naar buiten te pompen. Dit illustreert op treffende wijze het concept dat bacteriën in staat zijn zich te beschermen tegen een grote verscheidenheid van toxische stoffen (21).

Streptococcus pneumoniae

De PmrA-effluxpomp, geïdentificeerd in 1999, is een homoloog van de NorA-effluxpomp

TABEL 2
Effluxproteïnen voor antibiotica bij *S. aureus* en *S. pneumoniae*

Micro-organisme	Familie ¹	Efflux-systeem	Lokalisatie van het gen ²	Antibioticum							Antiseptica
				β -lactams	aminoglycosiden	fluorochinolonen	macroliden	tetracyclinen	trimetoprim	sulfamiden	
<i>S. aureus</i>	ABC	MsrA	C				+				+ ³
		QacA	P								
	MFS	MdeA			+						
		NorA	C			+					
		Tet K-L	P					+			
<i>S. pneumoniae</i>	MFS	MefA	T				+				
		MefE	T				+				
		PmrA				+					
		Tet K-L	P					+			

¹ ABC: *ATP-binding cassette superfamily*; MFS: *major facilitator superfamily*

² C: chromosoom, P: plasmide, T: transposon, geen vermelding bij ongekende lokalisatie

³ quaternaire ammoniumzouten: chloorhexidine, ceftrimoniumbromide, benzalkoniumchloride

van *S. aureus* (24% gelijkheid op niveau van het genoom) die eveneens in staat is fluorochinolonen te transporteren (22). Het MefA-effluxsysteem, gevonden in 1996 bij *S. pyogenes* (23), en diens homoloog MefE (95% gelijkheid op niveau van het genoom) dat vervolgens bij *S. pneumoniae* werd ontdekt (24), zijn geassocieerd met een resistentie tegen macroliden met 14 en 15 atomen in hun macrocyclische lactonring. Ze zijn sterk verspreid in Noord-Amerika, terwijl hun prevalentie sterk varieert in de Europese landen (25).

Escherichia coli

De analyse van het genoom van *E. coli* toont aan dat er genen zijn die coderen voor minstens 37 gekarakteriseerde of potentiële effluxpompen (26). De best gekende en de meest bestudeerde is het AcrAB-TolC eiwit, behorende tot de RND-familie en voor het eerst beschreven in 1978 (27). Het is in staat om antibiotica van minstens vijf belangrijke klassen te transporteren. Deze geringe specificiteit betekent voor de bacterie een voordeel omdat dit haar in staat stelt het hoofd te bieden aan zeer diverse situaties. AcrAB-TolC is in feite een transportmolecule voor galzouten. De constitutieve expressie van dit eiwit is onontbeerlijk voor

E. coli en laat de kiem toe te overleven in het intestinale milieu. Dit toont wederom aan dat de antibiotica slechts toevallige substraten zijn van transportsystemen die noodzakelijk zijn voor het overleven van de bacterie in hun natuurlijke omgeving. AcrAB-TolC is ook verantwoordelijk voor de natuurlijke resistentie van *E. coli* tegen verschillende antibiotica, bv. erytromycine. Zijn uitschakeling verhoogt de gevoeligheid voor chinolonen. Een tweede reeks van belangrijke transporteiwitten bij *E. coli* zijn de Tet A-E proteïnen die verantwoordelijk zijn voor de efflux van tetracyclinen vanuit het cytosol naar het periplasma (28). Bij Gram-negatieve bacteriën vormen deze Tet-proteïnen een van de belangrijkste resistentiemechanismen tegen tetracyclinen (15).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa is een bacterie met een natuurlijke resistentie tegen een groot aantal antibiotica. Lange tijd heeft men gedacht dat deze veroorzaakt werd door de ondoordringbaarheid van de membraan voor deze antibiotica. Maar de ontdekking van de eerste constitutieve effluxpomp bij *P. aeruginosa* (MexAB-OprM) heeft dit concept volledig gewijzigd (29). Men heeft inderdaad kunnen aantonen dat de natuurlijke

TABEL 3
Effluxproteïnen voor antibiotica bij *E. coli* en *P. aeruginosa*

Micro-organisme	Familie ¹	Efflux-systeem	Lokalisatie van het gen ²	Antibioticum							Antiseptica ³
				β -lactams	aminoglycosiden	fluorchinolonen	macroliden	tetracyclinen	trimetoprim	sulfamiden	
<i>E. coli</i>	ABC	MacAB TolC	C				+				
	MATE	YdhE				+			+		
	MFS	Bcr						+			
		Dep						+			
		ErmAB-TolC				+		+			
		Fsr							+		
		MdfA	C					+			
		SetA			+						
		Tet A-E	P					+			
		YceI				+					
		YebQ							+		
	RND	AcrAB-TolC		+		+	+	+	+		
		AcrAD-TolC	C		+						
		AcrEF-TolC		+		+	+	+	+		
<i>P. aeruginosa</i>	MFS	YegN				+					
		ErmE					+	+		+	+
		SugE									+
	RND	Tet A, C, E	P					+			
		MexAB-OprM	C	+		+	+	+	+	+	
		MexCD-OprJ		+		+		+	+		
		MexEF-OprN				+			+		
		MexJK-OprM					+	+			
		MexYX-OprM	C		+		+	+			

¹ ABC: *ATP-binding cassette superfamily*; MFS: *major facilitator superfamily*; MATE: *multidrug and toxic compound extrusion family*; SMR: *small multidrug resistance family*; RND: *resistance-nodulation-cell division family*

² C: chromosoom, P: plasmide, geen vermelding bij onbekende lokalisatie

³ Quaternaire ammoniumzouten: chloorhexidine, ceftrimoniumbromide, benzalkoniumchloride

resistentie bij *P. aeruginosa* voor een groot deel te maken heeft met de expressie van constitutief aanwezige effluxsystemen, want de uitschakeling van de overeenkomstige genen maakt de wildtype stammen van *P. aeruginosa* gevoelig voor het merendeel van de courante antibiotica (30). Op analoge wijze heeft men kunnen aantonen dat de verworven resistentie tegen aminoglycosiden bij *P. aeruginosa* (selectie van een bepaalde subpopulatie met een niet stabiele resistentie) het gevolg kan zijn van een voorbijgaande overexpressie van de MexXY-effluxpomp (31).

Impact van efflux op de klinische resistentie tegen antibiotica

Oorspronkelijk was het klinisch belang van antibioticaresistentie door efflux omstreden, want de eerste studies toonden slechts een lichte toename van de „minimal inhibitory concentration”(MIC)-waarden aan (30). Op het antibiogram waren meestal geen belangrijke verschuivingen voor de belangrijkste klinisch gebruikte antibiotica en de meeste stammen werden verder als gevoelig gecatalogeerd.

Nochtans zijn de volgende bedenkingen belangrijk genoeg om in overweging te nemen bij het opstellen van een rationele antibioticapolitiek:

1. Veel effluxpompen zijn induceerbaar. Dit fenomeen van inductie is niet gemakkelijk op te sporen met de in-vitro gevoeligheidstests, want de inductie gaat in het algemeen slechts gepaard met een geringe verhoging van de MIC-waarden. Dit kan aanleiding geven tot een reële onderschatting van de resistentiegraad. Indien een breedspectrumeffluxpomp geïnduceerd wordt, kan dit aanleiding geven tot een uitgebreide resistentie tegen verschillende klassen van antibiotica die dikwijls niet eens verwant zijn aan het inducerend antibioticum (bv. de blootstelling van *P. aeruginosa* aan ciprofloxacin kan aanleiding geven tot een overexpressie van MexAB-OprM, resulterend in een efflux en een verminderde gevoeligheid voor de meerderheid van de meest actieve β -lactamantibiotica, zoals meropenem, of cefalosporinen van de derde en vierde generatie (32)). De clinicus kan volkomen verrast worden door het verschijnen van deze onverwachte resistenties. Dit fenomeen kan vooral aan belang winnen bij blootstelling aan subtherapeutische dosissen van antibiotica. Deze situatie, waarin bacteriën onder stress komen te staan maar niet gedood worden, bevordert een snellere aanpassing aan de nieuwe omgeving ⁵.
2. De combinatie van effluxmechanismen met andere resistentiemechanismen kan resulteren in een hoge resistentiegraad. Resistentie tegen β -lactamantibiotica bij *P. aeruginosa* is meestal het gevolg van een combinatie van een verminderde permeabiliteit en de aanwezigheid (en overexpressie) van MexAB-OprM, en de productie van een β -lactamase van het AmpC-type (33).
3. De gelijktijdige werking van verschillende pompen die eenzelfde antibioticum herkennen, kan aanleiding geven tot een resistentie van hoog niveau (34). Tevens kan de gelijktijdige expressie van de verschillende pompen leiden tot uitgebreide resistentie (35).
4. De activiteit van effluxpompen verhoogt het risico van de selectie van resistente mutanten.

⁵ Een zeer eenvoudige en efficiënte manier om effluxpompen in vitro te activeren, bestaat erin bacteriën te kweken bij een antibioticumconcentratie die een derde tot de helft van de MIC bedraagt.

Inderdaad, de verlaagde intrabacteriële concentratie verhoogt de overlevingskans van stammen met een verminderde gevoeligheid, wat op middellange termijn kan leiden tot een algemene verhoging van de MIC-waarden. Dit kan de verhoging van resistente bacteriële populaties verklaren wanneer antibiotica in een te lage dosering gebruikt worden. Anderzijds heeft men ook kunnen aantonen dat het inactiveren van effluxpompen bij *P. aeruginosa* niet alleen de gevoeligheid voor bepaalde antibiotica verhoogt (bv. levofloxacin), maar ook de frequentie van de selectie van resistente mutanten vermindert (30).

5. Ten slotte mag men niet uit het oog verliezen dat de genen coderend voor de effluxpompen, dikwijls gelegen zijn op mobiele en uitwisselbare genetische elementen, zoals plasmiden en transposons. Deze elementen kunnen gemakkelijk van een resistente op een gevoelige bacterie worden overgedragen, wat aanleiding geeft tot een disseminatie van de resistentie niet alleen binnen een bepaalde species maar ook tussen verschillende species van diverse bacteriën en genera.

Men moet hierbij opmerken dat niet alle antibiotica die behoren tot eenzelfde klasse even vlot door de effluxpompen naar buiten worden getransporteerd. Zo zijn de ketoliden (telitromycine), de lipofiele fluorochinolonen (met moxifloxacin als belangrijkste component), evenals imipenem duidelijk minder onderhevig aan efflux dan andere moleculen die tot hun respectievelijke farmacologische klassen behoren (bv. de macroliden met 14 of 15 atomen, de hydrofiele fluorochinolonen (ciprofloxacin, norfloxacin, levofloxacin) of meropenem).

Gevolgen voor het laboratorium, de clinicus en de autoriteiten van volksgezondheid

De klinische gevolgen en implicaties van de resistentie door efflux zijn nog niet goed gekend, maar zijn wellicht belangrijk. Nauwkeurige en diepgaande studies op dit vlak zijn derhalve noodzakelijk. De resistentie van laag niveau door overexpressie van effluxpompen wordt heel vaak miskend. Het is overigens zeer waarschijnlijk dat bij bepaalde species (zoals *P. aeruginosa*) een niet te verwaarlozen aantal stammen met de conventionele methoden als gevoelig worden bestempeld, terwijl het in realiteit

stammen zijn bezig met de opbouw van een resistentie van hoog niveau (36).

In het algemeen zou het wenselijk zijn dat de voorschrijver van antibiotica op de hoogte is van de MIC-distributies van de bacteriën die vaak infecties veroorzaken. De kwalitatieve opdeling van de resultaten van het antibiogram in *gevoelig / intermediair / resistent* is niet meer voldoende, omdat ze niet toelaat het onderscheid te maken tussen een „zeer gevoelige” en een „minder gevoelige” pathogeen. Deze laatste wordt echter volgens het klassieke antibiogram eveneens als gevoelig gerapporteerd. Dit klassieke antibiogram laat dus niet toe een optimale therapeutische houding uit te bouwen. Het is eveneens belangrijk dat de aandacht van de voorschrijver wordt gevestigd op de verschillen in gevoeligheid voor efflux van diverse moleculen binnen een welbepaalde farmacologische klasse. Anderzijds moet zijn aandacht gevestigd worden op de moleculen waarbij een kruisresistentie kan worden verwacht (zowel binnen als buiten de betrokken klasse van antibiotica). Het lijkt ons dus noodzakelijk dat de laboratoria technieken gaan gebruiken die de aanwezigheid van de effluxpompen kunnen opsporen. Dit kan men al deels bereiken door een meer systematische bepaling van de MIC-waarden of door het uitvoeren van een zogenaamd *geïnterpreteerd antibiogram* (waarbij men systematisch de gevoeligheid van belangrijke kiemen bepaalt voor antibiotica die gekend zijn als bevoorrechte substraten van de effluxpompen, zelfs als deze antibiotica niet in het ziekenhuis worden gebruikt). Het fenotypisch en genotypisch aantonen van de effluxmechanismen door gebruik te maken van remmers van de pompen of van moleculaire technieken die het niveau van de genexpressie kwantificeren (QC-RT-PCR (quantitative Competitive – reverse transcription – polymerase-chain-reaction) of real-time-PCR), zou in de toekomst eveneens nuttig kunnen blijken.

Voor de volksgezondheid zou het nuttig zijn dat in de referentielaboratoria een aantal procedures worden geïmplementeerd die een systematische surveillance van de frequentie en het impact van effluxpompen zouden toelaten, vooral voor bij risicopatiënten geïsoleerde kiemen. Dit zou niet alleen een betere inschatting van de draagwijdte van het fenomeen toelaten, maar ook de mogelijkheid bieden om te anticiperen op de mogelijke therapeutische gevolgen (keuze en dosis van een antibioticum). Samen

met andere maatregelen waarover de autoriteiten van volksgezondheid beschikken om het voorschrijfgedrag te verbeteren, laat deze optie wellicht toe een echte rationele antibioticapolitiek uit te bouwen. Hierdoor zullen de risico's voor verdere toename van de resistentie verminderen.

Tot slot willen we opmerken dat de toename van effluxresistentie voor antiseptica in het ziekenhuismilieu voor ons een zeer beangstigend fenomeen is (21). Deze evolutie, die rechtstreeks voortspuit uit de mogelijkheid van bacteriën om zich aan te passen aan verschillende omgevingen, moet in de toekomst zonder enige twijfel het onderwerp uitmaken van een verhoogde waakzaamheid.

Dankbetuiging

N. Mesaros en L. Avrain zijn postdoctorale onderzoekers, gesteund door het Brussels Gewest („Prospective Research” and „Research in Brussels” programma's). F. Van Bambeke is „*Chercheur Qualifié*” van de „*Fonds National de la Recherche Scientifique*”.

Abstract

Active antibiotic efflux and bacterial resistance: state-of-the-art and implications

The steady increase of resistance to antibiotics renders an empiric treatment of bacterial infections increasingly difficult. Efflux appears, today, as an ubiquitous and clinically-relevant mechanism. It is, indeed, a generalized protection mechanism in every cell, antibiotics being only opportunistic substrates.

We describe the most important antibiotic transporters observed so far in 4 bacteria of medical importance (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*). While efflux mediated by these transporters causes only a low level of resistance per se, it can (a) cooperate with other mechanisms and, thereby, confer a high level resistance; (b) facilitate the process of selection of resistant mutants; (c) cause the appearance of multiresistant phenotypes. The latter phenomenon results from the fact that most transporters are not specific of a given chemical structure, but recognise entire families of molecules based on their biophysical properties (amphiphilicity).

In addition, transporters are often encoded by mobile genetic elements (which allows a fast dissemination of the corresponding genes), and are also frequently inducible. The presence of transporters will need to be taken into account for a correct choice among potential

antibiotics. Clinical microbiology laboratories should now detect this mechanism of resistance, since this may become critical, not only for the individual patient but also for setting up rational antibiotic policies in the hospital and the community.

LITERATUUR

1. LONKS JR. What is the clinical impact of macrolide resistance? *Curr Infect Dis Rep* 2004; 6: 7-12.
2. UNAL S, MASTERTON R, GOOSSENS H. Bacteraemia in Europe – Antimicrobial susceptibility data from the MYSTIC surveillance programme. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 155-163.
3. PIGLANSKY L, LEIBOVITZ E, RAIZ S, et al. Bacteriologic and clinical efficacy of high dose amoxicillin for therapy of acute otitis media in children. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 405-413.
4. JACOBS MR. Building in efficacy: developing solutions to combat drug-resistant *S. pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 Suppl 2: 18-27.
5. ARRIETA A, SINGH J. Management of recurrent and persistent acute otitis media: new options with familiar antibiotics. *Pediatr Infect Dis J* 2004; 23 Suppl 2: S115-S124.
6. FELDMAN C. Clinical relevance of antimicrobial resistance in the management of pneumococcal community-acquired pneumonia. *J Lab Clin Med* 2004; 143: 269-283.
7. LINDEN PK, KUSNE S, COLEY K, FONTES P, KRAMER DJ, PATERSON D. Use of parenteral colistin for the treatment of serious infection due to antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis* 2003; 37: 154-160.
8. YOON J, URBAN C, TERZIAN C, MARIANO N, RAHAL JJ. In vitro double and triple synergistic activities of polymyxin B, imipenem, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 753-757.
9. VINCENT JL, BIHARI DJ, SUTER PM, et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995; 274: 639-644.
10. LEVY SB, MCMURRY L. Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. *Nature* 1978; 276: 90-92.
11. INABA M, KOBAYASHI H, SAKURAI Y, JOHNSON RK. Active efflux of daunorubicin and adriamycin in sensitive and resistant sublines of P388 leukemia. *Cancer Res* 1979; 39: 2200-2203.
12. GERLACH JH, KARTNER N, BELL DR, LING V. Multidrug resistance. *Cancer Surv* 1986; 5: 25-46.
13. PAULSEN IT, PARK JH, CHOI PS, SAIER MH Jr. A family of Gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 1997; 156: 1-8.
14. VAN BAMBEKE F, BALZI E, TULKENS PM. Antibiotic efflux pumps. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 457-470.
15. LI XZ, NIKAIIDO H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004; 64: 159-204.
16. YOSHIDA H, BOGAKI M, NAKAMURA S, UBUKATA K, KONNO M. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* NorA gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 1990; 172: 6942-6949.
17. KAATZ GW, SEO S M, O'BRIEN L, WAHIDUZZAMAN M, FOSTER TJ. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1404-1406.
18. ROSS JI, EADY EA, COVE JH, CUNLIFFE WJ, BAUMBERG S, WOOTTON JC. Inducible erythromycin resistance in *Staphylococci* is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol Microbiol* 1990; 4: 1207-1214.
19. SCHMITZ FJ, SADURSKI R, KRAY A, et al. Prevalence of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* isolates from 24 European University Hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 891-894.
20. HUANG J, O'TOOLE PW, SHEN W, et al. Novel chromosomally encoded multidrug efflux transporter MdeA in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 909-917.
21. RUSSELL AD. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2002; 31: 121S-135S.
22. 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.
23. CLANCY J, PETITPAS J, DIB-HAJJ F, et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *MefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 1996; 22: 867-879.
24. TAIT-KAMRADT A, CLANCY J, CRONAN M, et al. *MefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 2251-2255.
25. FARRELL DJ, MORRISSEY I, BAKKER S, MORRIS L, BUCKRIDGE S and FELMINGHAM D. Molecular epidemiology of multiresistant *Streptococcus pneumoniae* with both *Erm(B)*- and *Mef(A)*-mediated macrolide resistance. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 764-768.
26. NISHINO K, YAMAGUCHI A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2001; 183: 5803-5812.
27. NAKAMURA H, HACHIYA N, TOJO T. Second acriflavine sensitivity mutation, *AcrB*, in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1978; 134: 1184-1187.
28. THANASSI DG, SUH GS, NIKAIIDO H. Role of outer membrane barrier in efflux-mediated tetracycline resistance of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1995; 177: 998-1007.

29. NIKAIIDO H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 1994; 264: 382-388.
30. LOMOVSKAYA O, LEE A, HOSHINO K, et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1340-1346.
31. HOCQUET D, VOGNE C, EL GARCH F, et al. MexXY-OprM efflux pump is necessary for an adaptive resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1371-1375.
32. LE THOMAS, I, COUETDIE G, CLERMONT O, BRAHIMI N, PLESAT P, BINGEN E. In vivo selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 553-555.
33. OKAMOTO K, GOTOH N, NISHINO T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1964-1971.
34. LEE A, MAO W, WARREN MS, et al. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J Bacteriol* 2000; 182: 3142-3150.
35. LLANES C, HOCQUET D, VOGNE C, BENALI-BAITICH D, NEUWIRTH C, PLESAT P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1797-1802.
36. BAQUERO F. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. *Drug Resist Updat* 2001; 4: 93-105.