

มัลติดรัก อีฟลักซ์ ซิสเตมส์ (Multidrug Efflux Systems; MES): กลไกการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันของแบคทีเรีย

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น¹ Herbert P. Schweizer²

Abstract

Rungtip Chuanchuen¹ Herbert P. Schweizer²

MULTIDRUG EFFLUX SYSTEMS (MES): A MECHANISM OF RESISTANCE TO MULTIDRUG IN BACTERIA

Bacterial antibiotic resistance is a growing problem with a global dimension. While the mechanisms of resistance vary from agent to agent, most of them are agent specific, providing resistance to a single or a class of antimicrobials. Multidrug efflux systems have currently emerged as a predominant cause of antimicrobial resistance across a broad spectrum of structurally - unrelated antimicrobials. Efflux-mediated resistance is promoted by the exclusion of agents from the systems, resulting in reduced intracellular concentration of drugs. MES occur in many Gram-positive and Gram-negative bacteria, including medically important pathogens, therefore they are of significant concern. Expression of the systems is governed by genes located on either a chromosome or a plasmid. Imprudent and often overuse of antibiotics has been demonstrated to potentiate the problem by selecting certain mutations and enriching the multidrug resistant, bacterial population. Even though MES have been intensively studied over the past 10 years, several characteristics including molecular architecture, natural function and the regulation of expression, remain largely unclear. Novel agents that are not substrates of these systems and Efflux Pump Inhibitors (EPI) are the chosen approaches for new drug development, as they improve the therapeutic performance of many antimicrobials and benefit the medical community at large. Prudent use of antimicrobials is seriously advised.

Keywords : antimicrobials, multidrug resistance, multidrug efflux systems

¹Department of Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok, 10330

²Department of Microbiology, Immunology and Pathology, College of Veterinary Medicine, Colorado State University, Fort Collins, CO 80523 -1682, USA

*Corresponding author

¹ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

²ภาควิชาจุลชีววิทยา วิทยาภูมิคุ้มกัน และพยาธิวิทยา วิทยาลัยสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยโคโลราโด สหรัฐอเมริกา

*ผู้รับผิดชอบบทความ

บทคัดย่อ

รุ่งทิพย์ ชวนชื่น¹ Herbert P. Schweizer²

มัลติดรัก อีฟลักซ์ ซิสเต็มส์ (Multidrug Efflux Systems; MES): กลไกการดื้อยาหลายชนิดพร้อมกันของแบคทีเรีย

แบคทีเรียมีกลไกการดื้อยาแตกต่างกันตามชนิดของยา ส่วนมากกลไกหนึ่งๆ จะทำให้เกิดการดื้อต่อยา 1 ชนิดหรือ 1 กลุ่ม อย่างไรก็ตามแบคทีเรียได้พัฒนาระบบ MES ขึ้น ทำให้สามารถดื้อต่อยาหลายชนิดพร้อมกัน โดยยาเหล่านี้ไม่มีความสัมพันธ์ใดๆ ทางโครงสร้าง การดื้อยาแบบนี้เกิดขึ้นจากการที่ระบบสามารถขับยาออกจากเซลล์ทำให้ลดความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ลง ระบบนี้สามารถพบได้ทั้งในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค จึงเป็นปัญหาที่สำคัญด้านสาธารณสุขจากการใช้ยาปฏิชีวนะอย่างขาดความระมัดระวังเป็นเวลานานส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutations) ของยีนที่ควบคุมการแสดงออกของระบบ ซึ่งอยู่บนโครโมโซมและพลาสมิดของแบคทีเรีย และเป็นสาเหตุสำคัญของการพัฒนาการดื้อยาด้วยระบบ MES แม้จะมีการศึกษาเกี่ยวกับระบบเหล่านี้อย่างกว้างขวางในช่วง 10 ปีที่ผ่านมา แต่ก็ยังมีลักษณะบางประการของระบบที่ยังไม่เป็นที่เข้าใจได้แก่ องค์ประกอบทางโมเลกุล หน้าที่โดยธรรมชาติ การควบคุมการทำงาน เป็นต้น เพื่อแก้ไขปัญหาการดื้อยาที่เกิดจากระบบดังกล่าวจึงได้มีการพัฒนายาที่ไม่เป็นตัวยูบิลิซึม (substrates) ของระบบและพัฒนายาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของระบบ (Efflux Pump Inhibitors, EPI) ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาของยา รวมทั้งควรต้องมีมาตรการควบคุมการใช้ยาที่เคร่งครัดอีกด้วย

คำสำคัญ: ยาปฏิชีวนะ การดื้อยาหลายชนิดพร้อมกัน มัลติดรัก อีฟลักซ์ ซิสเต็มส์ (MES)

บทนำ

แม้ว่าโรคที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียในคนและสัตว์เป็นสิ่งที่สามารถป้องกันได้ แต่ถ้ามมีการระบาดจะทำให้เกิดผลเสียทั้งด้านสาธารณสุขและเศรษฐกิจ และจำเป็นต้องใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาการติดเชื้อ อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียที่ก่อโรคจะสามารถปรับตัวและพัฒนาการดื้อยาได้ (Walsh, 2003) ส่งผลให้ยาปฏิชีวนะหลายชนิดไม่สามารถใช้รักษาการติดเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้แบคทีเรียหลายชนิดสามารถดื้อต่อยามากกว่า 1 ชนิดหรือกลุ่ม (multidrug resistance, MDR) สร้างปัญหาที่ซับซ้อนมากขึ้น เช่น Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) ดื้อต่อยาไอโซไนอะไซด์ (isoniazid) ไรแฟมพิน (rifampin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) และกานามัยซิน (kanamycin) (Munsiff et al., 2002) *Pseudomonas aeruginosa* ดื้อต่อยาฟลูออโรควิโนโลน (fluoroquinolone) เตตราไซคลิน (tetracycline) เจนตามัยซิน (gentamicin) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenicol) และ

คาร์เบนนิซิลลิน (carbenicillin) (Saito et al., 1999) *Salmonella Typhimurium* DT104 R-type ACSSuT ดื้อต่อยาแอมพิซิลลิน (ampicillin) คลอแรมเฟนิคอล สเตรปโตมัยซิน ซัลโฟนาไมด์ (sulphonamide) และเตตราไซคลิน (Akkin et al., 1999) เป็นต้น ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับแล้วว่า สาเหตุสำคัญของการดื้อยาหลายชนิดในแบคทีเรียเกิดผ่านระบบที่เรียกว่า มัลติดรัก อีฟลักซ์ ซิสเต็มส์ (multidrug efflux systems, MES) (Schweizer, 2003; Putman et al., 2000) ซึ่งเป็นกลไกที่สามารถจับและส่งยาออกนอกเซลล์ได้ในขั้นตอนเดียว และเป็นกลไกการดื้อยาของแบคทีเรียที่มีความสำคัญเป็นลำดับที่ 2 รองจากเอนไซม์ดื้อยา (Walsh, 2003) ระบบ MES ในแบคทีเรียมีหลายวงศ์ตระกูล (family) และในแต่ละวงศ์ตระกูลมีหลายระบบ พบได้ในแบคทีเรียหลายชนิดทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีได้มากกว่า 1 ระบบ ระบบที่มีการศึกษาและทำให้เกิดความเข้าใจมากที่สุดขณะนี้คือ พี-ไกลโคโปรตีน (P-glycoprotein) ในคน

ซึ่งควบคุมโดยยีน *mdr1* และทำให้ดื้อยาจำพวกที่เป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic agents) รวมทั้งเป็นสาเหตุของการดื้อยารักษามาลาเรียจำพวกคลอโรควิน (chloroquine) ใน *Plasmodium falciparum* (Ouellette et al., 1994)

บทความนี้กล่าวถึงกลไกในการดื้อยาของแบคทีเรีย โดยนำเสนอข้อมูลพื้นฐานของกลไกทั่วไป และเน้นความสำคัญของระบบ MES รวมทั้งโครงสร้าง การทำงาน และการป้องกันแก้ไขการดื้อยาที่เกิดจากระบบนี้ เพื่อช่วยเสริมสร้างความรู้และความเข้าใจของระบบของการดื้อยาในแบคทีเรีย และความสำคัญของการใช้ยาอย่างระมัดระวังทั้งในคนและสัตว์

กลไกการดื้อยาในแบคทีเรีย

การดื้อยาในแบคทีเรียเป็นเรื่องที่มีการศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวาง และเป็นที่เข้าใจค่อนข้างดี กล่าวได้ว่ามนุษย์รู้จักกลไกในการดื้อยาก่อนที่จะมีการนำมาใช้ทางการแพทย์ โดยพบการดื้อยาครั้งแรกเกิดจากเอนไซม์ penicillinase (Abraham and Chain, 1988) และพบว่าแบคทีเรียจะมีกลไกการดื้อยาแตกต่างกันไปตามชนิดของยาที่ใช้ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงที่มาของปัจจัยต้นเหตุของการดื้อยาพบว่า การดื้อยาในแบคทีเรียจะแบ่งออกเป็น 2 แบบ (Russell, 2001) คือ

การดื้อยาที่เกิดจากปัจจัยภายในของแบคทีเรีย (Intrinsic resistance) เป็นการดื้อยาที่เกิดจากพันธุกรรมหรือโดยธรรมชาติของแบคทีเรีย ซึ่งจะควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมหรือเป็นคุณสมบัติทางกายภาพของเซลล์ เช่น ลักษณะโครงสร้างผนังเซลล์ของ *P. aeruginosa* และ *Stenotrophomonas maltophilia* ที่ยอมให้สารผ่านเข้าออกได้น้อย ทำให้แบคทีเรียมีโอกาสดื้อยาสูงขึ้น (Hancock and Worobec, 1998; Nikaido and Hancock, 1986) หรือ lipopolysaccharide ของ *Burkholderia cepacia* ที่มีจำนวนหมู่ฟอสเฟต (PO₄) น้อยทำให้ทนต่อยาเจนตามัยซิน (Moore and Hancock, 1986) เป็นต้น

การดื้อยาที่เกิดจากปัจจัยภายนอก (Acquired resistance) เป็นการดื้อยาที่เกิดขึ้นในแบคทีเรียที่ ตามปกติมีความไวต่อยาแต่เมื่อได้รับอิทธิพลหรือปัจจัยภายนอกทำให้เกิดการดื้อยาขึ้นได้ ปัจจัยเหล่านี้ ได้แก่ การกลายพันธุ์ การถ่ายทอดพลาสมิด (plasmid) การได้รับ transposon (Davies, 1994) เป็นต้น ตัวอย่างเช่น การดื้อยาซัลโฟนาไมด์ของ *Neisseria meningitidis* ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ในยีน *folP* ที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ dihydropteroate synthase (DHPS) ทำให้ยับยั้งกับ DHPS ได้น้อยลง (Russell and Chopra, 1996)

เป็นต้น

โดยทั่วไป ปัจจัยภายในเพียงอย่างเดียวคงไม่เพียงพอที่จะอธิบายการดื้อยาอย่างรุนแรงของแบคทีเรีย พบว่าอิทธิพลจากปัจจัยภายนอกมีส่วนสำคัญที่เสริมความรุนแรงนั้น การดื้อยาชนิดที่เกิดจากปัจจัยภายนอกมีหลายแบบ (Russell and Chopra, 1996) ที่พบบ่อย ได้แก่

Target alteration เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงเป้าหมายที่ยาไปออกฤทธิ์ (drug targets) ทำให้ยาไม่สามารถทำลายเชื้อแบคทีเรียนั้นได้ ตัวอย่างเช่น การเพิ่มจำนวนเป้าหมายจนทำให้ความเข้มข้นของยาไม่เพียงพอต่อการทำลายเชื้อ หรือเป้าหมายของยามีการเปลี่ยนแปลงที่ทำให้ไม่ไวต่อยาอีกต่อไป แต่ตัวเป้าหมายยังสามารถที่จะทำหน้าที่ตามปกติได้ หรือเป้าหมายมีการคัดลอก (duplicate) ตัวเอง และทำหน้าที่ได้เช่นเดียวกับตัวต้นแบบ แต่มีความทนต่อยาสูง (McDonnell and Russell, 1999) ตัวอย่างเช่น การดื้อต่อยาแวนโคมัยซิน (vancomycin) ซึ่งออกฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ที่สายกรดอะมิโน D-alanine-D-alanine termini ของสาย UDP-N-acetylmuramyl pentapeptide ซึ่งเป็นสารตั้งต้น (precursor) ของการสร้าง peptidoglycan โปรตีนที่ผลิตโดยยีน *van* ทำให้มีการสร้างสายกรดอะมิโนที่ผิดปกติ โดยมี D-alanine-D-lactate หรือ D-alanine-D-serine แทน ทำให้แวนโคมัยซินไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (Cetinkaya et al., 2000)

Impermeability เกิดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังเซลล์ทำให้ลดปริมาณยาซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์ไม่เพียงพอจึงส่งผลให้เกิดการดื้อยาได้ ตัวอย่างเช่น การดื้อยาเตตราไซคลินของ *Escherichia coli* เกิดขึ้นเนื่องจากการกลายพันธุ์ทำให้การแสดงออกของยีน *ompF* ซึ่งเป็นโปรตีนที่ผนังชั้นนอกของเซลล์ลดลงทำให้ตัวยายซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลงด้วย (Russell and Chopra, 1996)

Drug inactivation แบคทีเรียเกิดการดื้อยาได้โดยมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อทำลายยาหรือทำให้หมดฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ เป็นกลไกการดื้อยาที่เกิดขึ้นได้เสมอ ตัวอย่างเช่น การดื้อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ (aminoglycosides) เนื่องจากแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ phosphotransferases adenyltransferases และ acetyltransferases การดื้อยาคลอแรมเฟนิคอล เนื่องจากเอนไซม์ chloramphenicol transferase (Davies, 1994) เป็นต้น

Active efflux แบคทีเรียเกิดการดื้อยาได้โดยการขับยาที่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ออกนอกเซลล์ด้วยโปรตีนที่อยู่บนผนัง

เซลล์ (transmembrane protein) ทำให้ความเข้มข้นของยาไม่เพียงพอที่จะทำลายเซลล์ได้ (Van Bambeke et al., 2000) ระบบ MES เป็นสาเหตุของการดื้อยาในรูปแบบนี้

ระบบ MES

โดยทั่วไป กลไกคือยาในแบคทีเรียทำให้เกิดการดื้อยาจำเพาะต่อชนิดหรือกลุ่ม แต่ระบบ MES ทำให้เกิดการดื้อยาหลายชนิดในเวลาเดียวกัน โดยมีกลไกการทำงานที่สามารถจับยาหลายชนิดภายในเซลล์ และส่งผ่านผนังเซลล์ออกไปสู่ภายนอกในขั้นตอนเดียวคล้ายกับปั๊มสูบน้ำ ระบบขนส่งหรือ efflux pumps เป็นที่รู้จักครั้งแรกเมื่อ McMurtry et al. (1980) พบพลาสมิดที่มียีน *tet* ใน *E. Coli* ผลิตโปรตีนขนส่งที่มีความจำเพาะต่อการจับยาเตตราไซคลินและทำให้เกิดการดื้อยาดังกล่าว (McMurtry et al., 1980) หลังจากนั้นได้มีการค้นพบระบบขนส่งหลายรูปแบบ โดยที่มีตัวขนส่ง MES แบ่งออกเป็น 5 วงศ์ตระกูล (Putman et al., 2000) ซึ่งระบบในวงศ์ตระกูลแรกใช้ ATP เป็นแหล่งพลังงาน ส่วนระบบในวงศ์ตระกูลที่ 2 - 4 ใช้พลังงานจากการแลกเปลี่ยนไฮโดรเจนไอออน (proton motive force, PMF) ได้แก่

i) ATP-binding (ABC) cassette superfamily แฟมิลีนี้มีสมาชิกมากกว่า 500 ระบบ แต่ประมาณ 40 ระบบเท่านั้นที่เป็นระบบขนส่งยา ส่วนมากพบในแบคทีเรียแกรมบวก (Fath and Kolter, 1993) ตัวอย่างเช่น OrrB1 และ DrrC เป็นระบบขับยาเดาโนรูบิซิน (daunorubicin) ของ *Mycobacterium leprae* (Saier et al., 1998) OleC5 ทำให้ดื้อต่อยาโอลินโดมัยซิน (Oleandomycin) ใน *Streptomyces antibioticus* เป็นต้น (Saier et al., 1998)

ii) Major facilitator superfamily (MFS) โดยมากพบในแบคทีเรียแกรมบวกและพบบ้างในแบคทีเรียแกรมลบ (Pao et al., 1998; Marger and Saier, 1993) ระบบที่มีการศึกษามากที่สุด คือ TetB ใน *E.coli* ตัวอย่างอื่นๆ ได้แก่ QacA ขนส่งยาจำพวกประจุบวก (organic cations) (Paulsen et al., 1996) และ NorA ขับยาอะคริฟลาวิน (acriflavin) คลอแรมเฟนิคอล และฟลูออโรควิโนโลน (Yoshida et al., 1990) ซึ่งทั้ง 2 ระบบพบได้ใน *S. aureus*

iii) Small multidrug resistance family (SMR) เป็นแฟมิลีที่มีจำนวนสมาชิกน้อยที่สุด พบเฉพาะในแบคทีเรียเท่านั้น ตัวอย่างเช่น ระบบ EmrE ใน *E.coli* ขับยาเตตราไซคลินและคริสตัล ไวโอเล็ต (crystal violet) ใน *E.coli*

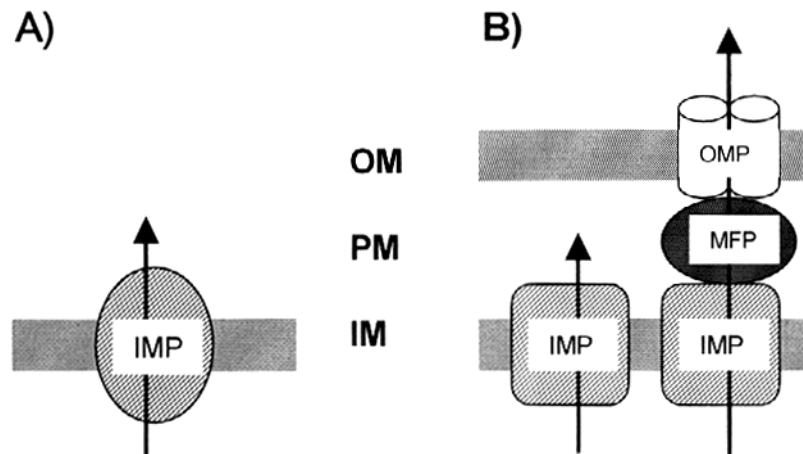
iv) Resistance-nodulation division (RND) family พบเฉพาะในแบคทีเรียเท่านั้น โดยพบในแบคทีเรียแกรมลบมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ตัวอย่างเช่น MexCD-OprJ ขับยาฟลูออโรควิโนโลน เตตราไซคลิน ไตรเมทโทพริม (trimethoprim) ใน *P. aeruginosa* (Poole and Srikumar, 2001) MtrCDE ขับยาจำพวกที่ไม่สามารถรวมตัวกับน้ำ (hydrophobic agents) ใน *N. gonorrhoeae* (Hagman et al., 1995) เป็นต้น

v) Multidrug and Toxic Compound Extrusion family (MATE) ได้แก่ NorM ซึ่งสามารถขนส่งยาในกลุ่มอะมิโนกลัยโคไซด์และฟลูออโรควิโนโลน ใน *Vibrio parahaemolyticus* (Morita et al., 1998)

การแสดงออกของโปรตีนของระบบ MES อยู่ภายใต้การควบคุมของยีนหรือชุดของยีน (operon) ที่อยู่บนโครโมโซมหรือพลาสมิด จึงเป็นการดื้อยาที่เกิดจากพันธุกรรมของแบคทีเรียเองหรือได้รับอิทธิพลจากภายนอก และสามารถถ่ายทอดไปยังแบคทีเรียตัวอื่นได้ (Poole, 2002) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน MES ในแบคทีเรีย คือ การใช้ยาปฏิชีวนะเกินความจำเป็นอย่างต่อเนื่องและอย่างขาดความระมัดระวัง (Moellering, 1998; Neyfakh, 1997) โดยการสัมผัสกับสารในระดับที่ไม่ทำให้เซลล์ตาย (sublethal level) เป็นเวลานาน จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์และมีการถ่ายทอดพลาสมิดได้ (Mazel and Davies, 1999) ปัญหาการดื้อยาเนื่องจากระบบ MES ไม่ใช่เรื่องใหม่ แต่เป็นเรื่องที่ยังมีคำถามที่หาคำตอบที่แท้จริงไม่ได้ คำถามที่สำคัญรวมถึง ระบบสามารถขนส่งยาออกนอกเซลล์ได้อย่างไร กลไกในการควบคุมการแสดงออกของยีนเป็นอย่างไร หน้าที่โดยธรรมชาติของระบบ MES คืออะไร และเราจะยับยั้งการทำงานของระบบนี้ได้อย่างไร

กลไกในการทำงานของระบบ MES

ระบบ MES ในแบคทีเรียมีโครงสร้างหลักที่คล้ายคลึงกัน (รูปที่ 1) กลไกในการขับยายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่จากความรู้ที่มีอยู่ในปัจจุบันช่วยให้จำลองภาพการทำงานโดยย่อได้ ระบบในแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยตัวขนส่งที่ผนังเซลล์ชั้นใน (inner membrane transporters, IMP) เพราะมีผนังเซลล์ชั้นเดียว เมื่อยาผ่านเข้าไปในเซลล์ จะจับกับ IMP ที่ตำแหน่งจำเพาะต่อการจับยา (drug-binding domain) จากนั้นจึงถูกส่งออกไปนอกเซลล์โดยผ่าน IMP (Marshall and Piddock, 1997) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ชั้นนอกและชั้นในแยกกันด้วยช่องว่างระหว่างผนังเซลล์ (Nakae, 1997;



รูปที่ 1 แบบจำลองโครงสร้างของ multidrug efflux systems ใน A) แบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย IMP และใน B) แบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งบางระบบจะมีเฉพาะ IMP และขับยาออกสู่ periplasm (ซ้าย) ในขณะที่บางระบบจะมีทั้ง IMP MFP และ OMP สามารถขับยาออกสู่ภายนอก (ขวา) ลูกศรสีดำแสดงทิศทางการขนส่งยา คำย่อ: IMP, inner membrane transporter, MFP, membrane fusion protein; OMP, outer membrane protein, IM, inner membrane; PM, periplasmic space; OM, outer membrane

Nikaido, 1994) ดังนั้นโครงสร้างของระบบจึงมีความซับซ้อนมากขึ้นเพราะต้องส่งยาข้ามผนังเซลล์ถึง 2 ชั้น นอกจาก IMP แล้ว บางระบบของแบคทีเรียแกรมลบจะมีโปรตีนที่ผนังเซลล์ชั้นนอก (outer membrane protein, OMP) เพื่อเป็นทางออกสู่ภายนอกของยา และมี lipoprotein ในชั้น periplasm เรียกว่า membrane fusion protein, MFP ซึ่งเชื่อว่าเป็นสะพานเชื่อมระหว่าง IMP และ OMP (Putman et al., 2000) หลังจากที่ IMP จับยาแล้ว MFP จะดึง IMP และ OMP ให้มาอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมและยาจะถูกส่งผ่าน IMP ไปยัง OMP เพื่อออกนอกเซลล์ (Poole, 2001b) อย่างไรก็ตาม บางระบบในแบคทีเรียแกรมลบมีลักษณะคล้ายคลึงกับระบบในแบคทีเรียแกรมบวก โดยจะขับยาเข้าสู่ periplasm แทน

ผลกระทบที่เกิดจากระบบ MES

ผลกระทบโดยตรงที่เกิดจากระบบเหล่านี้ คือ ตัวถูกเปลี่ยนของระบบเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรคติดเชื้อ ส่งผลให้ยาหลายชนิดไม่มีประสิทธิภาพในการรักษา มีความยากในการเลือกใช้ยามากขึ้นและอาจทำให้การรักษาล้มเหลว ในที่สุด ผลเสียหายจากการดื้อยาจะทวีความรุนแรงมากขึ้นถ้ามีการแสดงออกของระบบ MES มากกว่า 1 ระบบพร้อมกันหรือร่วมกับกลไกดื้อยาอื่นๆ (Schweizer, 2001) จากสถิติที่ผ่านมาพบว่า อุบัติการณ์การดื้อยาเนื่องจากระบบเหล่านี้มีมากขึ้นและเป็นการดื้อยาชนิดใหม่ด้วย สร้างความวิตกกังวลถึงความเป็น

ไปได้ว่าแบคทีเรียที่ก่อโรคจะดื้อยาปฏิชีวนะทุกชนิดที่มีอยู่ในปัจจุบัน (Nikaido, 1994) ตัวอย่างของระบบ MES ที่พบในแบคทีเรียที่ก่อโรคและมีผลกระทบต่อการรักษาได้แก่ระบบ AcrAB-TolC ใน *E. coli* เป็นระบบที่รู้จักดีที่สุดระบบหนึ่งสามารถขับยาปฏิชีวนะได้หลายชนิด เช่น เบต้า-แลคแตม (β-lactams) โนวาไบโอซิน (novobiocin) รัยแฟมพิน คลอแรมเฟนิคอล เตตราไซคลิน ฟลูออโรควิโนโลน และฟลูซิติกแอซิด (fusidic acid) (Okusu et al., 1996) ระบบ AcrAB-TolC นี้พบได้ใน *S. Typhimurium* แต่มีความจำเพาะต่อยาในกลุ่มฟลูออโรควิโนโลน (Baucheron et al., 2002) *P. aeruginosa* มีระบบที่เรียกว่า The Mex systems ซึ่งเป็นต้นเหตุสำคัญที่ทำให้การรักษาล้มเหลว เช่น อาการติดเชื้อที่ปอดของผู้ป่วย Cystic Fibrosis (CF) (Lyczak et al., 2002) และในหูของสุนัขที่เป็น Otitis Externa (Beinlich et al., 2001) ใน *S. aureus* ระบบที่รู้จักดีที่สุด คือ NorA ซึ่งสามารถขับยาฟลูออโรควิโนโลน และคลอแรมเฟนิคอล (Kaatz et al., 1993) นอกจากนี้ยังมีระบบ MsrA สามารถขับยาสเตรปโตแกรมิน บี (streptogramin B) และอีริโทรไมซิน (erythromycin) รวมทั้ง QacA ที่ทำให้ดื้อต่อยาฆ่าเชื้อประเภทกรดอินทรีย์ ส่วน *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* และ *S. agalactiae* ดื้อต่อยาอีริโทรไมซินด้วยระบบ PmrA MefA และ MreA ตามลำดับ (Saier et al., 1998) สำหรับ *M. tuberculosis* จะมีระบบ Tap ที่เป็นสาเหตุของการดื้อยาเตตราไซคลินและอีริโทรไมซิน

(Ainsa et al., 1998) ส่วนระบบ P55 พบได้ทั้งใน *M. tuberculosis* และ *M. bovis* ซึ่งสามารถยับยาศัตรูเซลล์และอะมิโนกลัยโคไซด์ (Silva et al., 2001)

หน้าที่โดยธรรมชาติของระบบ MES

ถึงแม้ว่าในทศวรรษที่ผ่านมา การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับระบบ MES จะเป็นไปอย่างกว้างขวาง แต่ก็ยังไม่สามารถอธิบายวิวัฒนาการของระบบเหล่านี้ได้อย่างชัดเจน ถ้าทุกระบบมีวิวัฒนาการที่เนื่องมาจากการใช้ยาในการรักษาอาการติดเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคนั้นจะมีจำนวนของระบบมากกว่าแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค (Neyfakh, 1997) จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดต่างก็มี MES บนโครโมโซมเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน (Neyfakh, 1997) ดังนั้นหน้าที่เบื้องต้นของระบบนี้จึงไม่อาจจะเกี่ยวข้องกับการขนส่งยาที่ทราบแน่นอนก็ถือเป็นระบบป้องกันตัวเองอย่างหนึ่งของแบคทีเรีย (Kohler et al., 1999; Lewis, 1994) ตัวอย่างที่ชัดเจนของข้อสรุปนี้ได้แก่ AcrAB-TolC ใน *E. coli* สามารถขับน้ำดีและกรดไขมันในลำไส้ช่วยให้เชื้อสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ (Thanassi et al., 1997) จึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการขนส่งยาอาจเป็นผลพลอยได้จากการที่ยามีลักษณะโครงสร้างของโมเลกุลคล้ายกับสารพิษ หรือกรดไขมันในธรรมชาติ Poole และคณะ (1993) พบว่า การแสดงออกของยีน *mexAB-oprM* ใน *P. aeruginosa* จะเพิ่มขึ้นในสถานะที่มีธาตุเหล็กต่ำ เพื่อที่จะส่ง siderophore ออกไปจับธาตุเหล็กกลับเข้ามาในเซลล์ (Poole et al., 1993) ซึ่งสนับสนุนว่าหน้าที่พื้นฐานของระบบอาจเกี่ยวข้องกับการนำเข้าสู่สารอาหารเข้าสู่เซลล์สิ่งหนึ่งที่ไม่ควรมองข้ามก็คือ ระบบเหล่านี้อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่กำหนดความรุนแรงของเชื้อ (virulence factors) ก็ได้ (Evans et al., 1998)

เหตุใดระบบ MES จึงขนส่งยาได้หลายชนิด

ปัจจุบันได้มีการพัฒนาแบบจำลองขึ้นหลายแบบเพื่อใช้อธิบายความสามารถของระบบ MES ในการขนส่งตัวถูกเปลี่ยนหลายชนิด แต่ก็ยังไม่มีแบบจำลองใดที่ให้ข้อสรุปที่ชัดเจนและสามารถใช้อธิบายการขนส่งยาได้ทุกประเภท Putman และคณะ (2000) ได้เสนอว่า ตัวถูกเปลี่ยนของแต่ละระบบมีลักษณะบางประการร่วมกันได้แก่ มีประจุ ไม่สามารถรวมตัวกับน้ำได้ หรือมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งแบบมีขั้วและไม่ขั้ว (amphiphilicity) เป็นต้น คุณสมบัติเหล่านี้เองเป็นตัวกำหนดว่ายาชนิดใดเป็นตัวถูกเปลี่ยนของระบบใด นอกจากนี้ยังเสนอว่าตัวถูกเปลี่ยนส่วนใหญ่จะมีประจุบวกจึงอาจเกี่ยวข้องกับการ

อะมิโนที่มีประจุลบของ IMP (Putman et al., 2000) แต่สมมติฐานนี้ไม่สามารถใช้อธิบายการขับออกยาที่มีประจุลบได้ นอกจากนี้ บางระบบในแบคทีเรียแกรมลบมีองค์ประกอบถึง 3 ส่วน แต่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าองค์ประกอบทั้งหมดนี้หรือเฉพาะบางส่วนเกี่ยวข้องกับการกำหนดความจำเพาะของตัวถูกเปลี่ยน (Poole and Srikumar, 2001)

การป้องกันและแก้ไขปัญหาคือยาเนื่องจากระบบ MES

การป้องกันปัญหาคือยาในเชื้อแบคทีเรียไม่ว่าจะเนื่องจากระบบ MES หรือกลไกใดๆ ก็ตาม มีหลักสำคัญ คือการลดอัตราการเกิดการกลายพันธุ์ที่นำไปสู่การดื้อยา ซึ่งทำได้โดยการลดโอกาสในการสัมผัสยาปฏิชีวนะและใช้ยาปฏิชีวนะอย่างรอบคอบ เช่น ใช้ยาสำหรับรักษาการติดเชื้อในขนาดและระยะเวลาที่ถูกต้อง ใช้ยาเมื่อมีความจำเป็นเท่านั้น ลดการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ เป็นต้น (Schweizer, 2003)

ในปัจจุบันได้มีการพัฒนายาที่มีกลไกในการออกฤทธิ์แตกต่างไปจากกลไกเดิมที่มีการดื้อเกิดขึ้นแล้ว รวมทั้งการพัฒนาที่ยับยั้งกลไกในการดื้อยา เพื่อให้ยาปฏิชีวนะสามารถออกฤทธิ์ได้ (Poole, 2001a) แต่ก็มียาชนิดใหม่หลายชนิดที่สูญเสียประสิทธิภาพในการรักษา เนื่องจากการดื้อยาของแบคทีเรียในเวลาต่อมา เช่น เซฟาโลทิน (cefalotin) อิมิปีเนม (imipenem) เลโวฟลอกซาซิน (levofloxacin) เป็นต้น (Van Bambeke et al., 2003) ในขณะนี้ได้มีการสังเคราะห์ยาหลายชนิดที่ไม่เป็นตัวถูกเปลี่ยนของระบบ MES เช่น ไกลซิลัยคลิน (glycylcycline) เจมิฟลอกซาซิน (gemifloxacin) การ์โนฟลอกซาซิน (garenofloxacin) เป็นต้น (Ryan et al., 2001; Lomovskaya and Watkins, 2001b) แต่ก็ไม่าจะยืนยันได้ว่าในอนาคตเหล่านี้จะไม่กลายเป็นตัวถูกเปลี่ยนของระบบใหม่หรือแบคทีเรียจะไม่พัฒนากลไกอื่นๆ ที่ทำให้ดื้อต่อยาเหล่านี้ บริษัท Macrocide แห่งประเทศสหรัฐอเมริกาได้ทำการค้นคว้าเกี่ยวกับสารยับยั้งการทำงานของระบบ MES (efflux pump inhibitors, EPI) พบว่า การใช้ EPI ร่วมกับยาปฏิชีวนะจะยับยั้งการทำงานของระบบและ ทำให้ความเข้มข้นของยาภายในเซลล์สูงขึ้น โดย EPI ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นในขณะนี้ มีเป้าหมายเพื่อใช้ยับยั้ง RND pumps ในผู้ป่วยที่ติดเชื้อ *P. aeruginosa* และยังคงมีการศึกษาเพิ่มเติมอีก (Lomovskaya and Watkins, 2001a; Renau et al., 1999) นอกจากนี้สารจากธรรมชาติและสารสกัดจากพืชบางชนิดสามารถยับยั้งการทำงานของระบบ MES ได้ เช่น เรสเซอพิน (reserpine) (Lomovskaya and

Watkins, 2001a) เบอเบอรีน (berberine) (Tegos et al., 2002) ซาโปนิน (saponin) (Lewis, 2001) อย่างไรก็ตามสารเหล่านี้เป็นพิษต่อคนและสัตว์ จึงไม่อาจนำไปใช้ในการรักษาได้โดยตรง ดังนั้นการศึกษาลักษณะโครงสร้างและกลไกการทำงานของสารเหล่านี้จะช่วยในการผลิต EPI ที่ไม่เป็นอันตรายได้นอกจากนี้ เป้าหมายอื่นๆ ที่ได้รับความสนใจเพื่อการผลิตยา ก็คือ การขัดขวางการใช้พลังงานของระบบและการยับยั้งการจับของยากับตำแหน่งจับยา (drug-binding sites)

ในการผลิตสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของระบบ MES ยังต้องทำการศึกษาและวิจัยอีกมาก เพราะยังขาดข้อมูลสำคัญทั้งในเรื่องกลไกในการออกฤทธิ์ ความปลอดภัย วิธีการและขนาดในการนำมาใช้ แต่เป็นความหวังของวงการแพทย์และสัตวแพทย์ที่จะสามารถใช้ยาปฏิชีวนะได้อย่างมีประสิทธิภาพอีกครั้ง ในอนาคตจะได้มีการพัฒนาสารที่ออกฤทธิ์อย่างกว้างขวางต่อระบบในวงศ์ตระกูลต่างๆ และแบคทีเรียหลายชนิดต่อไป

สรุป

ปัญหาการดื้อยาในแบคทีเรียพบได้มากขึ้นและมีแนวโน้มที่จะทวีความรุนแรงทั้งในวงการแพทย์และสัตวแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง แบคทีเรียที่ก่อโรคอาจมีความดื้อต่อยาชนิดหนึ่งโดยพันธุกรรมอยู่แล้วและยังสามารถพัฒนาการดื้อยาชนิดอื่นได้อีกในระหว่างการรักษา ถึงแม้ระบบ MES ทำให้ปัญหาการดื้อยาในแบคทีเรียมีความซับซ้อนขึ้น แต่เป็นปัญหาที่ป้องกันได้ การดื้อยาจากระบบนี้ถือเป็นบทเรียนที่เตือนให้เห็นถึงความสำคัญของการใช้ยาอย่างรอบคอบและระมัดระวังการผลิตยาชนิดใหม่เพื่อทดแทนยาที่สูญเสีย ประสิทธิภาพและ EPI ถือเป็นการแก้ไขปัญหาก็ที่ปลายเหตุ เนื่องจากมนุษย์ไม่สามารถทราบได้ทั้งหมดว่ามีการเปลี่ยนแปลงอะไรเกิดขึ้นบ้างบนสายดีเอ็นเอ (DNA) ที่ยวณับล้านคู่เบสของแบคทีเรีย และเป็นการยากที่จะคาดเดาว่าแบคทีเรียจะพัฒนากลไกการดื้อยาชนิดใดขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะวางมาตรการควบคุมการใช้ยาอย่างจริงจังและเผยแพร่ความรู้เกี่ยวกับการใช้ยาอย่างถูกต้อง รวมทั้งมีการพัฒนางานวิจัยเพื่อเตรียมพร้อมต่อปัญหาการดื้อยาที่อาจเกิดขึ้นและวางแนวทางในการป้องกันแก้ไขปัญหายาอย่างถูกต้องเหมาะสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Abraham, E.P. and Chain, E. 1988. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Rev. Infect. Dis.* 10: 677-678.
- Ainsa, J.A., Blokpoel, M.C., Ota, I., Young, D.B., De Smet, K.A. and Martin, C. 1998. Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 180: 5836-5843.
- Akkina, J.E., Hogue, A.T., Angulo, F.J., Johnson, R., Petersen, K.E., Saini, P.K., Fedorka-Cray, P.J. and Schlosser, W.D. 1999. Epidemiologic aspects, control, and importance of multiple-drug resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 214: 790-798.
- Baucheron, S., Imberechts, H., Chaslus-Dancla, E. and Cloeckaert, A. 2002. The AcrB multidrug transporter plays a major role in high-level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT204. *Microb. Drug Resist.* 8: 281-289.
- Beinlich, K.L., Chuanchuen, R. and Schweizer, H.P. 2001. Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 198: 129-134.
- Cetinkaya, Y., Falk, P. and Mayhall, C.G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 686-707.
- Davies, J. 1994. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375-382.
- Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J. and Poole, K. 1998. Influence of the MexAB-OprM efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 180.
- Fath, M.J. and Kolter, R. 1993. ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol. Rev.* 57: 995-1017.

- Hagman, K.E., Pan, W., Spratt, B.G., Balthazar, J.T., Judd, R.C. and Shafer, W.M. 1995. Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the *mtrRCDE* efflux system. *Microbiol.* 141: 611-622.
- Hancock, R.E. and Worobec, E.A. 1998. Outer membrane proteins. In: *Pseudomonas Biotechnology Handbook*. Vol. 10. London: Plenum, 139-167.
- Kaatz, G.W., Seo, S.M. and Ruble, C.A. 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 1086-1094.
- Kohler, T., Pechere, J.C. and Plesiat, P. 1999. Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance. *Cell Mol. Life Sci.* 56: 771-778.
- Lewis, K. 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends Biochem. Sci.* 19: 119-123.
- Lewis, K. 2001. In search of natural substrates and inhibitors of MDR pumps. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 247-254.
- Lomovskaya, O. and Watkins, W. 2001a. Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 3: 225-236.
- Lomovskaya, O. and Watkins, W.J. 2001b. Efflux pumps: their role in antibacterial drug discovery. *Curr. Med. Chem.* 8: 1699-1711.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L. and Pier, G.B. 2002. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 194-222.
- Marger, M.D. and Saier, M.H., Jr. 1993. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.* 18: 13-20.
- Marshall, N.J. and Piddock, L.J. 1997. Antibacterial efflux systems. *Microbiologia* 13: 285-300.
- Mazel, D. and Davies, J. 1999. Antibiotic resistance in microbes. *Cell Mol. Life Sci.* 56: 742-754.
- McDonnell, G. and Russell, A.D. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 12: 147-179.
- McMurry, L., Petrucci Jr., R.E. and Levy, S.B. 1980. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 3974-3977.
- Moellering, R.C., Jr. 1998. Antibiotic resistance: lessons for the future. *Clin. Infect. Dis., Suppl.* 1: S135-S140.
- Moore, R.A. and Hancock, R.E. 1986. Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 923-926.
- Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. 1998. NorM, a putative multidrug efflux protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and its homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1778-1782.
- Munsiff, S.S., Bassoff, T., Nivin, B., Li, J., Sharma, A., Bifani, P., Mathema, B., Driscoll, J. and Kreiswirth, B.N. 2002. Molecular epidemiology of multidrug-resistant tuberculosis, New York City, 1995-1997. *Emerg. Infect. Dis.* 8: 1230-1238.
- Nakae, T. 1997. Multiantibiotic resistance caused by active drug extrusion in *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Microbiologia.* 13: 273-284.
- Neyfakh, A.A. 1997. Natural functions of bacterial multidrug transporters. *Trends Microbiol.* 5: 309-313.
- Nikaido, H. and Hancock, R.E. 1986. Outer membrane permeability of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *The bacteria: A treatise on structure and function*. Sokatch, J.R. (ed.). London: Academic Press, 145-193.
- Nikaido, H. 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382-388.
- Okusu, H., Ma, D. and Nikaido, H. 1996. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance

- phenotype of *Escherichia coli* multiple antibiotic-resistant (Mar) mutants. J. Bacteriol. 178: 306-308.
- Ouellette, M., Legare, D. and Papadopoulou, B. 1994. Microbial multidrug-resistance ABC transporters. Trends Microbiol. 2: 407-411.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T. and Saier Jr., M.H. 1998. Major facilitator superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 1-34.
- Paulsen, I.T., Brown, M.H., Littlejohn, T.G., Mitchell, B.A. and Skurray, R.A. 1996. Multidrug resistance proteins QacA and QacB from *Staphylococcus aureus*: membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 93: 3630-3635.
- Poole, K., Heinrichs, D.E. and Neshat, S. 1993. Cloning and sequence analysis of an EnvCD homologue in *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by iron and possible involvement in the secretion of the siderophore pyoverdine. Mol. Microbiol. 10: 529-544.
- Poole, K. 2001a. Overcoming antimicrobial resistance by targeting resistance mechanisms. J. Pharmacy Pharmacol. 53: 283-294.
- Poole, K. 2001b. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 3: 255-264.
- Poole, K. and Srikumar, R. 2001. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. Curr. Topics Med. Chem. 1: 59-71.
- Poole, K. 2002. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. J. Appl. Microbiol. 92: 55S-64S.
- Putman, M., Van Ween, H.W. and Konings, W.N. 2000. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 672-693.
- Renau, T.E., Leger, R., Flamme, E.M., Sangalang, J., She, M.W., Yen, R., Gannon, C.L., Griffith, D., Chamberland, S., Lomovskaya, O., Hecker, S.J., Lee, V.J., Ohta, T. and Nakayama, K. 1999. Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin. J. Med. Chem. 42: 4928-4931.
- Russell, A.D. and Chopra, I. 1996. Understanding antibacterial action and resistance. 2nd ed. New York: Ellis Horwood. xv, 292.
- Russell, A.D. 2001. Mechanisms of bacterial insusceptibility to biocides. Am. J. Infect. Control 29: 259-261.
- Ryan, B.M., Dougherty, T.J., Beaulieu, D., Chunag, J., Dougherty, B.A. and Barrett, J.F. 2001. Efflux in bacteria: what do we really know about it? Expert Opin. Investig. Drugs 10: 1409-1422.
- Saier, M.H., Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Pao, S.S., Skurray, R.A. and Nikaido, H. 1998. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. FASEB J. 12: 265-274.
- Saito, K., Yoneyama, H. and Nakae, T. 1999. *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. FEMS Microbiol. Lett. 179: 67-72.
- Schweizer, H.P. 2001. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. FEMS Microbiol. Lett. 202: 1-7.
- Schweizer, H.P. 2003. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. Genet. Mol. Res. 2: 48-62.
- Silva, P.E., Bigi, F., de la Paz Santangelo, M., Romano, M.I., Martin, C., Cataldi, A. and Ainsa, J.A. 2001. Characterization of P55, a multidrug efflux pump in *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 800-804.
- Tegos, G., Stermitz, F.R., Lomovskaya, O. and Lewis, K. 2002. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemother. 46: 3133-3141.

- Thanassi, D.G., Cheng, L.W. and Nikaido, H. 1997. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 179: 2512-2518.
- Van Bambeke, F., Balzi, E. and Tulkens, P.M. 2000. Antibiotic efflux pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60: 457-470.
- Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Plesiat, P., Pechere, J.C. and Tulkens, P.M. 2003. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J. Antimicrob. Chemother.* 51: 1055-1065.
- Walsh, C. 2003. Antibiotic resistance. In: *Antibiotics: Action, origins, resistance*. Washington, D.C.: ASM Press, 89-155.
- Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K. and Konno, M. 1990. Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* *norA* gene, which confers resistance to quinolones. *J. Bacteriol.* 172: 6942-6949.