

PSEUDOMONAS AERUGINOSA : RÉSISTANCE ET OPTIONS THÉRAPEUTIQUES À L'AUBE DU DEUXIÈME MILLÉNAIRE ¹

N. MESAROS¹,
P. NORDMANN², P. PLÉSIAT³, M. ROUSSEL-DELVALLEZ⁴,
J. VAN ELDERE⁵, Y. GLUPCZYNSKI⁶, Y. VAN LAETHEM⁷, F. JACOBS⁸,
P. LEBECQUE⁹, A. MALFROOT¹⁰, P.M. TULKENS¹, F. VAN BAMBEKE¹

Correspondance :

Paul M. Tulkens

Unité de pharmacologie cellulaire
et moléculaire,

UCL7370 avenue Mounier 73

1200 Bruxelles

tél. 02-764.73.71

Fax: 02-764.73.73

Email: tulkens@facm.ucl.ac.be

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is a major cause of nosocomial infections. Due to its genetic plasticity, it can adapt to a wide variety of environments, causing infections in almost all body sites (with however a predilection for the respiratory tract, especially in cystic fibrosis patients). It also shows a remarkable capacity to resist to antibiotics, either intrinsically (through constitutive expression of β -lactamases and efflux pumps, or low permeability of the outer membrane), or upon exposure to antibiotics through acquisition of resistance genes (coding for antibiotic-degrading enzymes inactivating or target modifications), overexpression of efflux pumps, decreased expression of porins, or target mutations. Worryingly also, these mechanisms are often present simultaneously, conferring multiresistant phenotypes. Susceptibility testing is therefore crucial in clinical practice. Empiric treatment is usually initiated using a bitherapy, selected based on local epidemiology (β -lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone). However, it should be streamlined as soon as possible, based on susceptibility data and patient's evolution. Alternative drugs (colistin, e.g.) have proven useful for multiresistant strains. Innovative therapeutic options for the future remain scarce, while attempts to develop vaccines have been so far unsuccessful. Among broad-spectrum antibiotics in development, ceftobiprole, sitafloxacin and doripenem show interesting *in vitro* activity. The two first molecules, however, are evaluated in the clinics towards Gram-positive only. Pump inhibitors are under study but proved much more difficult to develop than originally anticipated. Therefore, selecting appropriate antibiotics and optimizing their use based on pharmacodynamic concepts remains the only way to cope with pseudomonal infections.

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

² Hôpital de Bicêtre & Université de Paris XI, Paris, France

³ Centre hospitalo-universitaire Jean Minjoz, & Université de Franche-Comté, Besançon, France

⁴ Centre hospitalier régional universitaire (Hôpital Calmette) & Université de Lille 2, Lille, France

⁵ Universitair Ziekenhuis Gasthuisberg & Katholieke Universiteit Leuven, Louvain, Belgique

⁶ Cliniques universitaires de Mont-Godinne, Yvoir & Université catholique de Louvain, Bruxelles; Belgique

⁷ Centre hospitalo-universitaire St-Pierre & Université libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique

⁸ Hôpital Erasme & Université libre de Bruxelles, Brussels, Belgique

⁹ Cliniques universitaires Saint-Luc & Université catholique de Louvain, Bruxelles, Belgique

¹⁰ Academisch Ziekenhuis & Vrije Universiteit Brussel AZ-VUB, Bruxelles, Belgique



Pseudomonas aeruginosa est responsable d'un grand nombre d'infections nosocomiales. Capable de s'adapter à des environnements très divers en raison de sa très grande plasticité génétique, il est capable d'infecter presque tous les sites anatomiques (avec, néanmoins, une prédilection pour le tractus respiratoire en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose). Il montre également une remarquable capacité de résister aux antibiotiques, soit de façon native (par l'expression constitutive de β -lactamases et/ou de pompes à efflux, ou en raison d'une faible perméabilité de la membrane externe), soit suite à l'exposition aux antibiotiques (acquisition de gènes codant pour des enzymes détruisant les antibiotiques, surexpression de pompes à efflux associées ou non à une diminution de l'expression des porines, mutation de cibles...). Ces mécanismes peuvent souvent être présents simultanément, conférant un phénotype de multirésistance. Une évaluation de la susceptibilité des isolats est donc essentielle en pratique clinique. Le traitement empirique initial sera le plus souvent une bithérapie choisie sur base de l'épidémiologie locale (β -lactame plus aminoglycoside ou fluoroquinolone). Cependant, ce traitement devra être réajusté le plus rapidement possible en se laissant guider par les données de susceptibilité et l'évolution clinique. Des médications de dernière ligne (la colistine, par exemple) se sont révélées utiles vis-à-vis de souches multirésistantes. Les innovations thérapeutiques demeurent rares et les essais de vaccination se sont révélés décevants. Parmi les nouveaux antibiotiques, le ceftobiprole, la sitafloxacin and le doripenem montrent une activité intéressante *in vitro*. Les deux premières molécules, cependant, ne sont développées que pour les infections à germes Gram-positif. Des inhibiteurs de pompes à efflux sont à l'étude mais celles-ci s'avèrent très difficiles. Aujourd'hui, la seule manière de lutter contre les infections à *P. aeruginosa* repose sur le choix approprié de l'antibiotique et l'optimisation de son usage sur des bases pharmacodynamiques.

¹ Préparé sur base des données présentées à un Symposium «Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options» tenu à l'Université catholique de Louvain le 29 mars 2006 (voir <http://www.facm.ucl.ac.be/symposia/Pseudomonas/>) et d'un article de revue paru dans «Clinical Microbiology and Infection» (1).

INTRODUCTION

Considéré longtemps comme un organisme largement opportuniste, *P. aeruginosa* est aujourd'hui clairement reconnu comme un pathogène nosocomial majeur chez les patients immunocompromis ou affaiblis, ainsi que dans le cadre de la mucoviscidose (2). *P. aeruginosa* toujours été considéré comme une cible difficile en chimiothérapie anti-infectieuse. La séquence complète de son génome (3) a permis de rationaliser cette observation car (i) 0.3 % des gènes sont directement impliqués dans les mécanismes de résistance; (ii) il est capable d'acquérir des grands éléments mobiles (intégrons) codant pour des mécanismes de résistance provenant d'autres bactéries (4,5). En outre, son maintien dans de nombreux habitats aquatiques potentiellement contaminés par des antibiotiques

(d'origine naturelle ou artificielle) contribue à la formation de réservoirs de gènes de résistance.

MANIFESTATIONS CLINIQUES

P. aeruginosa est invasif et toxigène, en raison de la production de facteurs de virulence de surface (qui lui permettent de s'attacher, de coloniser, et d'envahir les tissus), et sécrétés (qui endommagent les tissus et déclenchent des processus inflammatoires). Il est souvent difficile de distinguer entre colonisation et invasion pathogène en l'absence d'outil diagnostique adéquat. *P. aeruginosa* infecte rarement les tissus sains, mais envahit aisément tous les tissus où les défenses sont compromises, ce qui explique le caractère essentiellement nosocomial des infections qu'il provoque. Le tableau I montre les principales

TABLEAU I
PRINCIPALES PATHOLOGIES CAUSÉES PAR *P. AERUGINOSA* ET CLASSÉES SELON LE SITE D'INFECTION (ADAPTÉ DE (2))

Site d'infection	Pathologie spécifique	Fréquence (dans une population à risque)
tractus respiratoire	– pneumonie aiguë – infections chroniques de l'arbre bronchique	fréquent (hôpital; soins intensifs) mucoviscidose
sang	– bactériémie and septicémie	fréquent
tractus urinaire	– infections aiguës – infections chroniques	relativement fréquent (complications suite à la présence de corps étrangers)
oreille	– otite externe (« oreille du nageur ») – otite externe maligne – otite moyenne chronique suppurative	fréquent
peau et tissus mous	– dermatite – infections de plaie – infections de brûlures	relativement fréquent (traumatismes)
	– <i>ecthyma gangrenosa</i> – pyodermite – folliculite – <i>acne vulgaris</i> résistant	patients neutropéniques
œil	– kératite (ulcère cornéen) – enophtalmie – ophtalmie néonatale	rare (traumatisme)
système nerveux central	– méningite – abcès cérébral	rare (secondaire à une neurochirurgie ou à un traumatisme)
cœur	– endocardite	rare (abus de drogues intraveineuses)
os et articulations	– pyoarthrose sténoarticulaire – ostéomyélite vertébrale – infection de la symphyse pubienne – ostéochondrite du pied – ostéomyélite	rare
tractus gastro-intestinal	– entérocolite nécrosante – infections périrectales	rare

infections causées par *P. aeruginosa*. Les mortalités les plus élevées sont observées en cas de bactériémie chez les patients neutropéniques (30-50 % (6)), en cas de pneumonie nosocomiale (45-70 %) pour laquelle il est l'agent principal en cas de ventilation assistée (7), et en cas d'infection pulmonaire chez des sujets atteints de mucoviscidose (8). Il est aussi un colonisateur fréquent des voies aériennes chez les patients souffrant de bronchectasies et de broncho-pneumopathie obstructive (9). Les infections à *P. aeruginosa* sont une complication classique chez les patients soumis à une chimiothérapie anticancéreuse et présentant une neutropénie (10). Des bactériémies et des septicémies s'observent aussi chez les patients en état d'immunodéficience en relation avec une infection par le virus HIV, chez les diabétiques, ou chez brûlés (11). *P. aeruginosa* est la troisième cause d'infections urinaires acquises à l'hôpital (12 %) (12), le plus souvent consécutives à des cathétérisations, des instrumentations ou une chirurgie. *P. aeruginosa* est l'agent causal prédominant dans les «otites du nageur» (une forme particulière d'otite externe) (13) et les otites malignes des patients diabétiques. Quoique moins fréquent que d'autres organismes, *P. aeruginosa* peut causer des infections ophtalmiques dévastatrices (kératites bactériennes des porteurs de lentilles de contact par exemple; ophtalmies néonatales), des méningites et des abcès cérébraux (se propageant depuis des structures voisines ou consécutifs à des traumatismes ou des procédures diagnostiques invasives, et des endocardites (chez les utilisateurs de drogues intraveineuses, par ex.). Les infections cutanées et osseuses sont rares mais peuvent survenir après blessures pénétrantes (2). *P. aeruginosa* cause rarement de vraies infections du système digestif (quoique des infections périrectales, des gastroentérites typiques, et des entérocolites nécrosantes aient été rapportées), mais, en règle générale, la colonisation par *P. aeruginosa* favorise le développement d'infections invasives chez le sujet à risque.

RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

Une infection par des souches résistantes ne doit pas être prise à la légère car elle entraîne une augmentation de 3 fois de la mortalité, de 9 fois du risque de bactériémie secondaire, de 2 fois de la durée d'hospitalisation et une inflation des coûts (14). Les principaux mécanismes de résistance observés en clinique sont montrés au tableau II. Ils sont souvent présent simultanément (15).

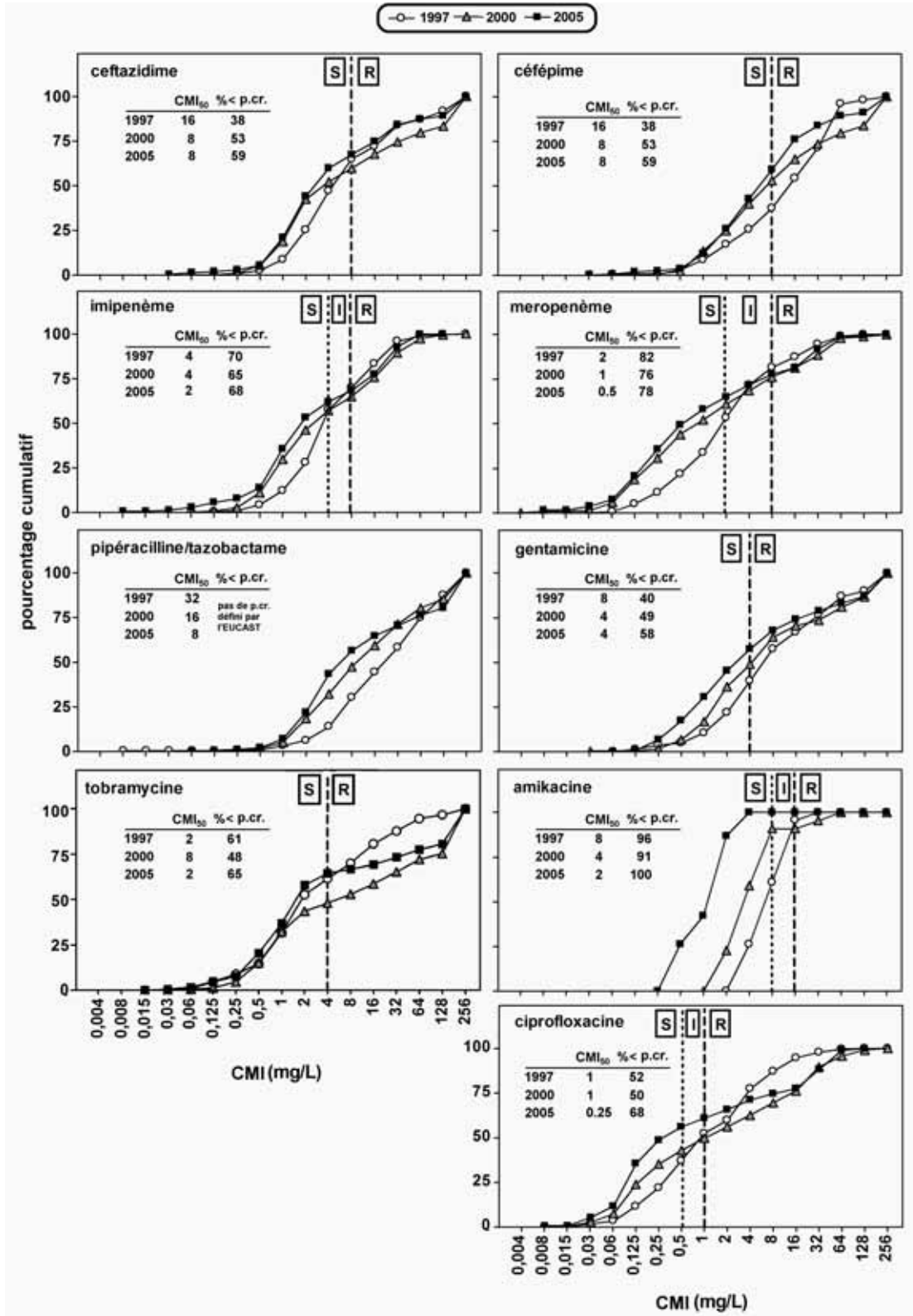
La diminution de l'accumulation peut résulter de la perte de la porine OprD (qui affecte l'importation principalement) (16) ou d'un efflux actif (résistance croisée à de nombreux antibiotiques de classes différentes) (17). Ce dernier mécanisme contribue à la faible sensibilité intrinsèque de *P. aeruginosa* à de nombreux antibiotiques et explique l'émergence de résistance vis-à-vis d'antibiotiques non-employés dans l'environnement immédiat. Un antibiotique d'une classe peut en effet sélectionner pour une résistance croisée avec tous les antibiotiques qui sont substrats de la même pompe inductible (18)². L'inactivation des antibiotiques concerne les β -lactames et les aminoglycosides. Les β -lactamases dites à spectre élargi (BLSE), qui confèrent une résistance à toutes les β -lactames antipseudomonale sauf les carbapénèmes, et les carbapénémases sont maintenant répandues (20,21). Les gènes codant pour ces enzymes, localisés sur des intégrons portant d'autres gènes de résistance, donnent un phénotype de co-résistance. Les enzymes inactivant les aminoglycosides sont présents dans près de 20 % des isolats en Europe (22), mais épargnent dans une large mesure l'amikacine. La mutation de la cible (essentiellement la DNA-gyrase) est le mécanisme de résistance le plus connu pour les fluoroquinolones, mais une modification par méthylation du RNA 16S ribosomal été récemment décrite (23).

La figure 1 montre l'évolution de la susceptibilité de *P. aeruginosa* vis-à-vis des sept antibiotiques principaux utilisés aujourd'hui en clinique. Si la situation est largement inchangée pour chaque antibiotique depuis dix ans, on note une augmentation de la fréquence de multirésistance (15) (définie comme une perte de susceptibilité vis-à-vis d'au moins trois classes d'agents principaux). Les infections par ces isolats sont souvent associés à des décours cliniques défavorables (24,25).

Limiter la dissémination de clones hautement résistants apparaît essentiel et implique l'isolement strict des patients infectés ou colonisés (26). Au laboratoire, la mesure quantitative des CMI et les recherches de clonalité doivent être réalisées régulièrement. Enfin, une gestion correcte de l'antibiothérapie est une stratégie efficace (27). Elle doit comprendre une réduction de l'usage global des antibiotiques, une restriction du nombre de principes actifs différents autorisés et une optimisation de leur usage fondée sur leurs proprié-

² L'efflux des antibiotiques a fait l'objet d'une mise au point antérieure parue dans *Louvain Médical* (19) à laquelle nous renvoyons le lecteur pour une discussion d'autres aspects importants des pompes à efflux particulièrement bien illustrées chez *P. aeruginosa*.

Figure 1 – Evolution temporelle des distributions cumulatives de concentrations minimales inhibitrices (CMI) de 9 antibiotiques vis-à-vis d'isolats cliniques de *Pseudomonas aeruginosa* de 1997 à 2005. Valeurs extraites de la base de données MYSTIC (<http://www.mystic-data.org/>) en ce qui concerne les pays de l'Union Européenne (en 2006) plus la Bulgarie, la Croatie, la Roumanie, la Russie, la Suisse, la Turquie et Israël). Les critères de susceptibilité (points critiques [p.cr.] S: sensible; I: intermédiaire; R: résistant) sont ceux proposés par l'European Committee for Antibiotic Susceptibility Testing (EUCAST; <http://www.eucastr.org>) et repris au Tableau 3; en 2006, l'EUCAST n'avait pas encore publié de point critique pour l'association pipéracilline/tazobactame). Les tables données en vignette dans chaque diagramme donnent les CMI₅₀ (valeur d'abscisse correspondant à 50 % des isolats analysés) et le pourcentage d'isolats pour lesquels la CMI est égale ou inférieure au point critique clinique tel que défini par l'EUCAST.



tés pharmacocinétiques et pharmacodynamiques (28) (tableau III).

DIAGNOSTIC

L'isolement et l'identification sont le plus souvent faciles par les techniques conventionnelles, mais le typage moléculaire (disponible dans des centres spécialisés) sera souvent pour déceler des épidémies nosocomiales et suivre les patients souffrant d'infections chroniques. L'isolement de *P. aeruginosa* n'est, cependant, pas une preuve de son implication dans un processus infectieux en cours, car il est souvent un simple colonisateur. En règle générale, des cultures quantitatives seront donc souvent nécessaires³. Des examens spécifiques impliquant l'imagerie seront aussi très utiles pour évaluer le niveau d'infection des organes profonds.

La détermination de susceptibilité et l'identification des mécanismes de résistance se fonde encore trop souvent sur des méthodes telles que la diffusion (disques, E-tests) ou la dilution manuelle ou automatisée (32) qui manquent cruellement de standardisation⁴. Les résultats sont en outre très influencés par des facteurs purement expérimentaux. Enfin, les méthodes automatiques, fondées sur la mesure de la vitesse de croissance des bactéries, peuvent donner des résultats fort divergents des méthodes de dilution considérées comme intrinsèquement plus fiables (33-35). L'usage simultané de deux méthodes indépendantes est donc à recommander et la mesure des CMI nous paraît essentielle. L'antibiogramme interprétatif (tableau IV) est également très utile, mais son interprétation lecture est souvent difficile en cas de présence de plusieurs mécanismes de résistance. En outre, l'expression de la résistance peut varier entre isolats. Le développement de méthodes génotypiques (36,37), par exemple, constituerait donc un progrès certain.

³ dans le cadre de la pneumonie associée à la ventilation mécanique, un article canadien récent (29) suggère que des cultures non quantitatives d'aspirations endotrachéales sont suffisantes (par rapport aux cultures quantitatives de liquide de lavage bronchoalvéolaire recommandées par les auteurs français (30). Mais, comme le souligne un commentaire éditorial (31), cette étude avait exclu les patients colonisés par des SARM, *P. aeruginosa* et autres germes multirésistants, ce qui en diminue considérablement l'intérêt.

⁴ voir les divergences entre recommandations de divers pays (France: <http://www.sfm.asso.fr/> ; Royaume-Uni: <http://bsac.test.tmg.co.uk/> ; Etats-Unis: <http://www.clsi.org/>)

OPTIONS THÉRAPEUTIQUES ACTUELLES

CHIMIOTHÉRAPIE ANTIMICROBIENNE

Des recommandations thérapeutiques ont été proposées par l'*American Thoracic Society* (ATS) et l'*Infectious Diseases Society of America* (IDSA) pour les patients soumis à respiration assistée (38) en état de neutropénie (39). Les principes à la base de ces recommandations peuvent s'appliquer à d'autres infections (14,40) et conduisent à l'arbre décisionnel présenté la figure 2. Les points princi-

Figure 2 – Arbre décisionnel général pour la prise en charge des infections à *Pseudomonas aeruginosa* (adapté de (40))

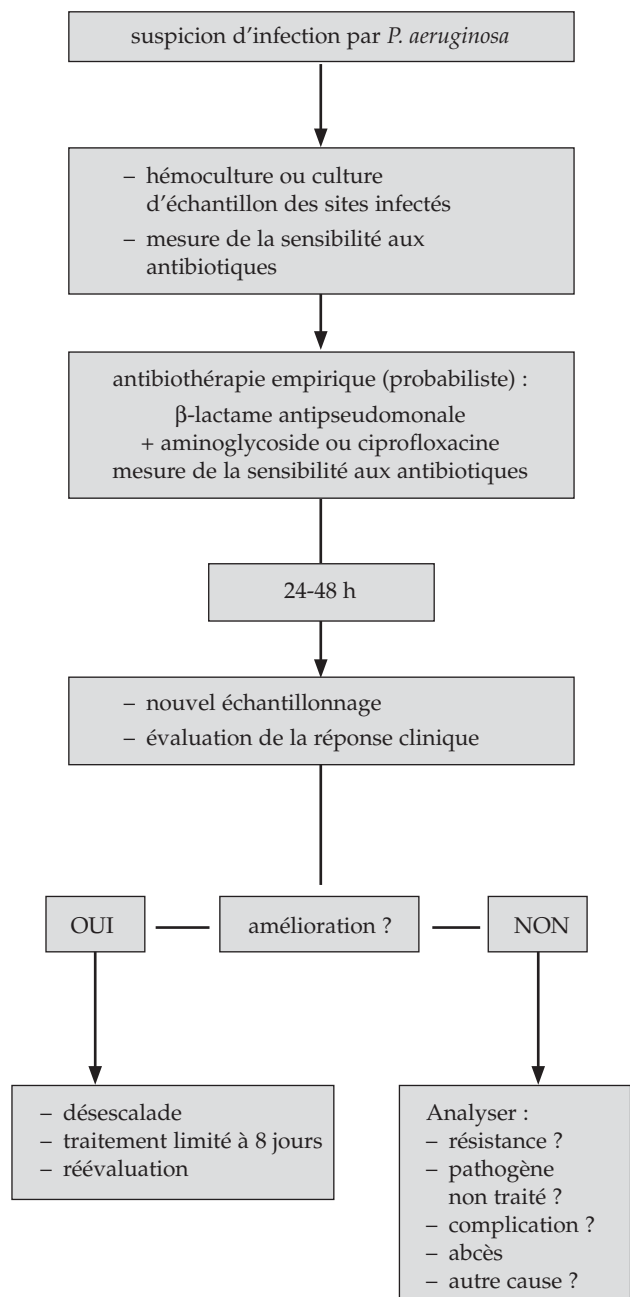


TABLEAU III – ANALYSE PHARMACOCINÉTIQUE/ PHARMACODYNAMIQUE DES ANTIBIOTIQUES RECOMMANDÉS DANS LES INFECTIONS PAR PSEUDOMONAS AERUGINOSA ET UTILISÉS AUX DOSES CONVENTIONNELLES ET POINTS CRITIQUES CORRESPONDANTS. COMPARAISON AVEC LES POINTS CRITIQUES RECOMMANDÉS PAR L'EUROPEAN COMMITTEE FOR ANTI-BIOTIC SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST); VOIR HTTP://WWW.EUCAST.ORG)					
Molécule	Analyse pharmacocinétique/pharmacodynamique				points critiques EUCAST (mg/L) ^a
	critère pharmacocinétique/ pharmacodynamique d'efficacité	Dosage usuel (infection sévère)	paramètre(s) pharmacocinétique(s) pertinent(s)	point critique (mg/L)	
β-lactames					
pipéracilline-tazobactame	$fT > CMI = 40\%$ (effet statique) to 100 % (efficacité maximale) [28]	4.5 g <i>qid</i> [40]	$C_{max} \sim 225$ mg/L, $t_{1/2} \sim 1$ h [74]	3.5	^b
ceftazidime		2 g <i>tid</i> [74]	$C_{max} \sim 170$ mg/L, $t_{1/2} \sim 2$ h [74]	10-40	8/8 ^d
céfépime		2 g <i>tid</i> [74]	$C_{max} \sim 160$ mg/L, $t_{1/2} \sim 2$ h [74]	10-40	8/8 ^d
imipénème	$fT > CMI = 22\%$ (static effect) to 100 % (max efficacy) [16]	1 g <i>qid</i> [74]	$C_{max} \sim 60$ mg/L, $t_{1/2} \sim 1$ h [74]	1-25	4/8 ^e
méropénème		1 g <i>tid</i> [74]	$C_{max} \sim 60$ mg/L, $t_{1/2} \sim 1$ h [74]	0.2-15	2/8
aminoglycosides					
gentamicine	$C_{max}/CMI = 8$ [75]	5 mg/kg ^c [74] 7 mg/kg ^c [40]	$C_{max} \sim 18$ mg/L [74] $C_{max} \sim 25$ mg/L	1.5 3	4/4 ^e
tobramycine		5 mg/kg ^c [74]	$C_{max} \sim 25$ mg/L	3	4/4 ^e
amikacine		15 mg/kg ^c [74] 20 mg/kg ^c [40]	$C_{max} = 77$ mg/L [74] $C_{max} \sim 100$ mg/L	9 12.5	8/16
fluoroquinolones					
ciprofloxacine	ASC/CMI > 100 [28,76]	400 mg <i>tid</i> [74]	ASC = 30 mgxh/L [74]	0.3	0.5/1
levofloxacine		500 mg <i>bid</i> (ref)	ASC = 90 mgxh/L (ref)	0.9	1/2

Abréviations: $fT > CMI$: fraction du temps pendant lequel la concentration demeure supérieure à la CMI; ASC: aire sous la courbe (du diagramme concentration sérique versus temps) mesurée sur 24 h; C_{max} : concentration sérique maximale; $t_{1/2}$: temps de demi-élimination (communément appelé demi-vie); *bid*, *tid*, *qid*: dose (comme indiquée) administrée 2, 3 ou 3 fois par jour à intervalles de 12, 8 et 6 h, respectivement (*bis*-, *ter*-, *quater-in-die*)
^a les valeurs sont celles de CMI pour des isolats considérés comme cliniquement sensibles (valeur de CMI inférieure ou égale au premier chiffre) ou résistants (valeur de CMI supérieure au deuxième chiffre). Le terme de sensible doit être compris comme indiquant une haute probabilité de succès clinique tandis que celui de résistant indique une haute probabilité d'échec (avec les doses et schémas thérapeutiques recommandés). Un isolat est appelé «intermédiaire» (avec effet thérapeutique incertain) si sa CMI se situe entre les deux chiffres indiqués (catégorie utilisée rarement par l'EUCAST).
^b point critique non-encore publié (en 2006)
^c administration unique quotidienne
^d valeurs établies afin d'éviter de diviser la population d'isolats sauvages. Ces valeurs correspondent au dosage enregistré le plus élevé (6 g/24h).
^e la valeur de susceptibilité a été élevée de 2 à 4 pour éviter de diviser la population d'isolats sauvages.

TABLEAU IV – PROPOSITION D'ANTIBIOGRAMME STANDARD ET DE CRITÈRES INTERPRÉTATIFS POUR LA DÉTECTION DES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ^a

antibiotiques		Mécanismes de résistance														
		Altération de perméabilité				antibiotic inactivating enzymes								modification de la cible		
		Perte de OprD	MexAB-OPM	MexCD-OprJ	MexEF-OprN	MexXY-OprM	β-lactamases				enzymes modifiant les aminoglycosides				mutations	méthylation ribosomiale
					Surexpression de dephalosporinase	Penicillinasés à spectre étroit	Oxacillinasés à spectre é tendu	β-lactamases à spectre é tendu	Metallo-β-lactamases	AAC(3)-I	AAC(3)-II	AAC(6)-I	AAC(6)-II	ANT(2)-I		
ticarcilline	S	I/R	S	S	S	I/R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
ticarcilline-acide clavulanique	S	I/R	S	S	S	I/R	I/R	R	I/R	R	R	R	S	S	S	S
piperacilline	S	S	S	S	S	I/R	R	R	R	I/R	R	R	S	S	S	S
piperacilline-tazobactam	S	S	S	S	S	I/R	I/R	R	I/R	R	R	R	S	S	S	S
cefoperazone	S	I/R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
cefotaxime	S	I/R	S	S	S	R	I/R	R	R	R	R	R	S	S	S	S
ceftazidime	S	S	S	S	S	I/R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
cefepime	S	S	I	S	I	S/I	S	I/R	R	R	R	R	S	S	S	S
aztreonam	S	I/R	S	S	S	I/R	I	S/I/R	R	S/I	S	S	S	S	S	S
imipenem	I/R	S	S	I ^b	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
meropenem	S/I/R	I	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
gentamicine	S	S	S	S	I/R	S	S	S	S	R	R	S/I	R	R	S	R
tobramycine	S	S	S	S	I/R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R
amikacine	S	S	S	S	I/R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R
ciprofloxacine	S	S/I	S/I	S/I	S/I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
colistine	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

^a sur base des données de la *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC; voir <http://bsac.test.tmg.co.uk/> et 17,22,32,77-80). La limitation à 16 antibiotiques permet d'effectuer la détermination sur une seule plaque afin de faciliter l'implémentation en routine clinique par la plupart des laboratoires. Les antibiotiques ont été sélectionnés en fonction de leur intérêt clinique et/ou de leur utilité pour identifier des mécanismes de résistance spécifiques. Cette sélection doit être modifiée à la lumière de l'épidémiologie de résistance locale et en fonction de la disponibilité des molécules.

^b la résistance à l'imipenem dans les isolats surexprimant MexEF-OprN est médiée par une perte correspondante de l'expression de la porine OprD.

^c *P. aeruginosa* doit être considéré comme intrinsèquement peu sensible au céfotaxime (voir (81)) et n'est donc pas recommandé pour la thérapie des infections reprises dans cette revue; il n'est inclus dans ce tableau à titre d'antibiotique rapporteur.

paux à souligner sont (i) la nécessité d'une documentation bactériologique; (ii) l'initiation rapide de la thérapie (le plus souvent combinée); (iii) la désescalade et/ou l'ajustement de la thérapie dès que les données de laboratoire sont disponibles; (iv) l'évaluation régulière sur base de scores cliniques quantitatifs (7,41,42) afin de décider du maintien ou non de l'antibiothérapie.

Les posologies, fondées sur des critères d'efficacité pharmacodynamiques, sont reprises au tableau III. Pour les β -lactames, l'infusion continue pourrait représenter des avantages pharmacologiques et économiques, mais les données cliniques sont encore fragmentaires (43,44) et l'instabilité des carbapénèmes (45) peut poser problème. La nécessité de maintenir une antibiothérapie combinée au-delà des premiers jours, et la durée totale de l'antibiothérapie font encore l'objet de débats (46). Les études et métaanalyses récentes d'infections causées par des isolats non-multirésistants concluent à l'inutilité de combiner plusieurs antibiotiques (si le traitement est fondé sur des mesures de susceptibilité (47,48) et suggèrent de réduire le traitement à huit jours (49,50) (mais ceci pourrait être associé à une fréquence plus élevée de récurrence des infections pulmonaires).

Les infections causées par des isolats multirésistants rend la situation nettement plus complexe, nécessitant des associations (51) et aussi l'usage de la colistine (52).

Chez les patients atteints de mucoviscidose, *P. aeruginosa* est aujourd'hui le principal pathogène et pose des problèmes tout à fait spécifiques. Sa prévalence augmente avec l'âge. Initialement, les germes présents ont des caractéristiques qui les rendent plus accessibles à une intervention thérapeutique: ils sont peu nombreux, habituellement sensibles à la plupart des antibiotiques appropriés et ne présentent pas de morphotype mucoïde (53). Après quelques mois si l'on n'intervient pas, la colonisation devient chronique et irréversible. Elle est alors statistiquement associée à un déclin accéléré de la fonction respiratoire (54), une amputation de 30 % de l'espérance médiane de vie (55), un traitement plus lourd et trois fois plus coûteux (56). Pour ces raisons, la prévenir ou la postposer est considéré comme un objectif essentiel par les cliniciens concernés. Les moyens disponibles incluent nécessairement un suivi bactériologique régulier et systématique, la mise en place des mesures de prévention des infections croisées, une intervention médicamenteuse précoce (57-59). Les modalités optimales de celles-ci restent discutées, à base habituellement d'antibiothérapie inhalée (colistine ou aminoglycosides)

et/ou de ciprofloxacine par voie orale. Leur taux d'échec reste non négligeable, aux alentours de 20 %, ce que pourrait circonvenir une approche plus prophylactique (60,61). Chez le patient colonisé chroniquement, l'intérêt de l'antibiothérapie inhalée et de l'azithromycine par voie orale (62) a été démontré en termes notamment de diminution de la fréquence des exacerbations. En cas d'exacerbation, une antibiothérapie intraveineuse est indiquée, associant en principe une β -lactame et un aminoglycoside. En raison d'une pharmacocinétique propre à ces patients (V_d et clairance augmentés par rapport à la population normale (63), des doses d'antibiotiques élevées sont souvent nécessaires. Certains auteurs préconisent la répétition trimestrielle de ces traitements intraveineux chez les patients colonisés chroniquement quand d'autres les réservent aux détériorations aiguës (64). Dans certaines circonstances plus électives et sous un encadrement attentif, leur administration à domicile peut constituer une alternative plus respectueuse de la qualité de vie que l'hospitalisation prolongée.

CHIRURGIE

Un traitement chirurgical des infections est parfois nécessaire afin de permettre de réduire rapidement des collections bactériennes importantes peu accessibles aux antibiotiques et enlever les tissus endommagés. Ceci concerne le plus souvent les abcès cérébraux et les infections oculaires, de l'oreille moyenne, de l'os, des articulations et du cœur, ainsi que les plaies étendues ou profondes ou les brûlures.

LE FUTUR DE LA THÉRAPIE ANTIPSEUDOMONALE

MOLÉCULES EN DÉVELOPPEMENT

L'essentiel des activités de développement de l'Industrie pharmaceutique s'est concentré ces dernières années sur les molécules actives vis-à-vis des bactéries Gram-positif (essentiellement, les staphylocoques dorés résistants à la méthicilline [SARM], et les pneumocoques multirésistants), alors même que les β -lactames les plus récentes (céfépime, ceftiprome) n'ont qu'une activité antipseudomonale relativement faible ou même insuffisante (ertapénème). Quoique les infections à *P. aeruginosa* multirésistants représentent donc clairement un «besoin médical non-rencontré» (65), les projets de développement sont rares et ne concernent guère que des molécules de classes pharmacologiques existantes (ceftobiprole (66) et

doripenème (67) dans celle des β -lactames; sitafloxacin (68) dans celle des fluoroquinolones). Mais ces molécules n'ont pas été conçues et ne sont pas spécifiquement étudiées pour leur activité antipseudomonale. Les inhibiteurs de pompes à efflux pourraient constituer une véritable innovation thérapeutique (69) mais leur développement se heurte à des problèmes de toxicité mal contrôlés.

IMMUNISATION ET THÉRAPIE GÉNIQUE

En dépit des efforts (70), les résultats cliniques ces vaccinations sont décevants surtout en présence de souches hétérologues (71). Néanmoins, la vaccination contre les autres infections respiratoires (virus, pneumocoques) peut diminuer le nombre d'épisodes infectieux et dès lors la nécessité de recourir à des antibiothérapies (72).

CONCLUSIONS

Au début de ce deuxième millénaire, les infections à *P. aeruginosa* représentent clairement un défi microbiologique, pharmacologique et médical. L'évolution des résistances, en ce compris l'apparition incessante de mécanismes nouveaux et la complexité des phénotypes de multirésistance, exige la mise au point rapide de nouveaux outils diagnostiques. Le développement de nouvelles stratégies, et la découverte de cibles nouvelles est une nécessité évidente (4). L'implémentation de mesures sensibles de réduire les risques d'acquisition d'infections nosocomiales (73) et la conduite des traitements sur des bases microbiologiques et pharmacologiques plus solides (28) doivent constituer des priorités.

REMERCIEMENTS

N.M. a été titulaire d'une bourse doctorale de la Région de Bruxelles-Capitale accordée dans le cadre du programme «*Prospective Research in Brussels*». FVB est Maître de Recherches du Fonds National de la Recherche Scientifique. AstraZeneca-Belgium a mis à notre disposition un crédit (sans restriction ni obligation) permettant l'organisation du symposium franco-belge à partir duquel l'article de revue cet article de revue original (1) a pu être préparé. Le contenu de l'article est entièrement et exclusivement le fruit du travail des auteurs.



RÉFÉRENCES

- Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Malfroot A, Tulkens PM and Van Bambeke F. Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin.Microbiol.Infect.* In press, (2007).
- Pier G and Ramphal R. Pseudomonas aeruginosa. In: *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell G, Bennett J and Dolin R eds) pp 2587-2615, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA, 2005.
- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS et al.: Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PA01, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000; **406**: 959-964.
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J: Targeting mechanisms of Pseudomonas aeruginosa pathogenesis. *Med Mal Infect.* 2006; **36**: 78-91.
- Woods DE: Comparative genomic analysis of Pseudomonas aeruginosa virulence. *Trends Microbiol.* 2004; **12**: 437-439.
- Maschmeyer G, Braveny I: Review of the incidence and prognosis of Pseudomonas aeruginosa infections in cancer patients in the 1990s. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000; **19**: 915-925.
- Chastre J, Fagon JY: Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; **165**: 867-903.
- Ratjen F: Diagnosing and managing infection in CF. *Paediatr Respir Rev.* 2006; **7 Suppl 1**: S151-S153.
- Nicotra MB, Rivera M, Dale AM, Shepherd R, Carter R: Clinical, pathophysiologic, and microbiologic characterization of bronchiectasis in an aging cohort. *Chest.* 1995; **108**: 955-961.
- Krcmery V, Koprnova J, Gogova M, Grey E, Korcova J: Pseudomonas aeruginosa bacteraemia in cancer patients. *J Infect.* 2006; **52**: 461-463.
- Sligl W, Taylor G, Brindley PG: Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis.* 2006 ; **10**: 320-325.
- Obritsch MD, Fish DN, MacLaren R, Jung R: Nosocomial infections due to multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa: epidemiology and treatment options. *Pharmacotherapy.* 2005; **25**: 1353-1364.
- Wang MC, Liu CY, Shiao AS, Wang T: Ear problems in swimmers. *J Chin Med Assoc.* 2005; **68**: 347-352.
- Giamarellou H: Prescribing guidelines for severe Pseudomonas infections. *J Antimicrob Chemother.* 2002; **49**: 229-233.
- McGowan JE, Jr: Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med.* 2006; **119**: S29-S36.
- Dalhoff A, Janjic N, Echols R: Redefining penems. *Biochem Pharmacol.* 2006; **71**: 1085-1095.
- Poole K: Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2004; **10**: 12-26.
- Kohler T, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Kahr AL, Pechere JC: Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; **41**: 2540-2543.
- Mesaros N, Van Bambeke F, Glupczynski Y, Vanhoof R, Tulkens PM : L'efflux actif des antibiotiques et la résistance bactérienne: état de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain Med.* 2005; **124**: 308-320.
- Masterton RG, Turner PJ: Trends in antimicrobial susceptibility in UK centres: the MYSTIC Programme (1997-2002). *Int J Antimicrob Agents.* 2006 ; **27**: 69-72.
- Aubron C, Poirel L, Fortneau N, Nicolas P, Collet L, Nordmann P: Nosocomial spread of Pseudomonas aeruginosa isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microb Drug Resist.* 2005; **11**: 254-259.
- Poole K: Aminoglycoside resistance in Pseudomonas aeruginosa. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; **49**: 479-487.
- Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K et al.: Acquisition of 16S rRNA methylase gene in Pseudomonas aeruginosa. *Lancet.* 2003; **362**: 1888-1893.
- Wang CY, Jerng JS, Cheng KY, Lee LN, Yu CJ, Hsueh PR et al.: Pandrug-resistant Pseudomonas aeruginosa among hospital-

- ised patients: clinical features, risk-factors and outcomes. *Clin Microbiol Infect.* 2006; **12**: 63-68.
25. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y: Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; **50**: 43-48.
 26. Weldhagen GF, Poirel L, Nordmann P: Ambler class A extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*: novel developments and clinical impact. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; **47**: 2385-2392.
 27. Rossolini GM, Mantengoli E: Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2005; **11 Suppl 4**: 17-32.
 28. Burgess DS: Use of pharmacokinetics and pharmacodynamics to optimize antimicrobial treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Infect Dis.* 2005; **40 Suppl 2**: S99-104.
 29. Heyland D, Dodek P, Muscedere J, Day A: A randomized trial of diagnostic techniques for ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med.* 2006; **355**: 2619-2630.
 30. Fagon JY, Chastre J, Wolff M, Gervais C, Parer-Aubas S, Stephan Fr *et al.*: Invasive and Noninvasive Strategies for Management of Suspected Ventilator-Associated Pneumonia. A Randomized Trial. *Ann Intern Med.* 2000; **132**: 621-630.
 31. Kollef MH: Diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med.* 2006; **355**: 2691-2693.
 32. Pfaller MA, Segreti J: Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis.* 2006; **42 Suppl 4**: S153-S163.
 33. Sader HS, Fritsche TR, Jones RN: Accuracy of three automated systems (MicroScan WalkAway, VITEK, and VITEK 2) for susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* against five broad-spectrum beta-lactam agents. *J Clin Microbiol* **44**: 1101-1104, 2006.
 34. Joyanes P, del Carmen CM, Martinez-Martinez L, Perea EJ: Evaluation of the VITEK 2 system for the identification and susceptibility testing of three species of nonfermenting gram-negative rods frequently isolated from clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2001; **39**: 3247-3253.
 35. Saegeman V, Huynen P, Colaert J, Melin P, Verhaegen J: Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* by the Vitek 2 system: a comparison with Etest results. *Acta Clin Belg.* 2005 ; **60**: 3-9.
 36. Dumas JL, Van Delden C, Perron K, Kohler T: Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2006; **254**: 217-225.
 37. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ, Chang FY, Ko WC, Wu JJ: Characterization of acquired {beta}-lactamases and their genetic support in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Taiwan: the prevalence of unusual integrons. *J Antimicrob Chemother.* 2006; **58**: 530-536.
 38. American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America - Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005; **171**: 388-416.
 39. Hughes WT, Armstrong D, Bodey GP, Brown AE, Edwards JE, Feld R *et al.*: 1997 guidelines for the use of antimicrobial agents in neutropenic patients with unexplained fever. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 1997; **25**: 551-573.
 40. Craven DE, Palladino R, McQuillen DP: Healthcare-associated pneumonia in adults: management principles to improve outcomes. *Infect Dis Clin North Am.* 2004; **18**: 939-962.
 41. Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM: Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "blind" bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis.* 1991; **143**: 1121-1129.
 42. Singh N, Rogers P, Atwood CW, Wagener MM, Yu VL: Short-course empiric antibiotic therapy for patients with pulmonary infiltrates in the intensive care unit. A proposed solution for indiscriminate antibiotic prescription. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000; **162**: 505-511.
 43. Benko AS, Cappelle DM, Kruse JA, Rybak MJ: Continuous infusion versus intermittent administration of ceftazidime in critically ill patients with suspected gram-negative infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; **40**: 691-695.
 44. Tam VH, Louie A, Lomaestro BM, Drusano GL: Integration of population pharmacokinetics, a pharmacodynamic target, and microbiologic surveillance data to generate a rational empiric dosing strategy for cefepime against *Pseudomonas aeruginosa*. *Pharmacotherapy.* 2003; **23**: 291-295.
 45. Viaene E, Chanteux H, Servais H, Mingeot-Leclercq MP, Tulkens PM: Comparative stability studies of antipseudomonal beta-lactams for potential administration through portable elastomeric pumps (home therapy for cystic fibrosis patients) and motor-operated syringes (intensive care units). *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; **46**: 2327-2332.
 46. Mehta RM, Niederman MS: Nosocomial pneumonia in the intensive care unit: controversies and dilemmas. *J Intensive Care Med.* 2003; **18**: 175-188.
 47. Paul M, Benuri-Silbiger I, Soares-Weiser K, Leibovici L: Beta lactam monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside combination therapy for sepsis in immunocompetent patients: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *BMJ.* 2004; **328**: 668.
 48. Cunha BA: Ventilator-associated pneumonia: monotherapy is optimal if chosen wisely. *Crit Care.* 2006; **10**: 141.
 49. Chastre J, Wolff M, Fagon JY, Chevret S, Thomas F, Wermert D *et al.*: Comparison of 8 vs 15 days of antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized trial. *JAMA.* 2003; **290**: 2588-2598.
 50. Rello J, Diaz E, Rodriguez A: Advances in the management of pneumonia in the intensive care unit: review of current thinking. *Clin Microbiol Infect.* 2005; **11 Suppl 5**: 30-38.
 51. Eggimann P, Revelly JP: Should antibiotic combinations be used to treat ventilator-associated pneumonia? *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine.* 2006; **27**: 68-81.
 52. Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR *et al.*: Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 2006 ; **6**: 589-601.
 53. Starner TD, McCray PB, Jr: Pathogenesis of early lung disease in cystic fibrosis: a window of opportunity to eradicate bacteria. *Ann Intern Med.* 2005; **143**: 816-822.
 54. Kosorok MR, Zeng L, West SE, Rock MJ, Splaingard ML, Laxova A *et al.*: Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol.* 2001; **32**: 277-287.
 55. (1997) *Patient Registry 1996 Annual Data Report*. Bethesda, Maryland.
 56. Baumann U, Stocklossa C, Greiner W, der Schulenburg JM, von der HH: Cost of care and clinical condition in paediatric cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros.* 2003; **2**: 84-90.
 57. Doring G, Hoiby N: Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros.* 2004; **3**: 67-91.
 58. Frederiksen B, Koch C, Hoiby N: Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 1997; **23**: 330-335.
 59. Hoiby N, Frederiksen B, Pressler T: Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros.* 2005; **4 Suppl 2**: 49-54.
 60. Heinzl B, Eber E, Oberwaldner B, Haas G, Zach MS: Effects of inhaled gentamicin prophylaxis on acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: a pilot study. *Pediatr Pulmonol.* 2002;**33**: 32-37.
 61. Lebecque P, Leal T, Zylberberg K, Reyckler G, Bossuyt X, Godding V: Towards zero prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.* 2006; **5**, 237-244.
 62. Clement A, Tamalet A, Leroux E, Ravilly S, Fauroux B, Jais JP: Long term effects of azithromycin in patients with cystic fibrosis: A double blind, placebo controlled trial. *Thorax.* 2006; **61**: 895-902.
 63. de Groot R, Smith AL: Antibiotic pharmacokinetics in cystic fibrosis. Differences and clinical significance. *Clin Pharmacokinet.* 1987; **13**: 228-253.
 64. Doring G, Conway SP, Heijerman HG, Hodson ME, Hoiby N, Smyth A *et al.*: Antibiotic therapy against *Pseudomonas*

- aeruginosa in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*. 2000 ; **16**: 749-767.
65. Rice LB: Unmet medical needs in antibacterial therapy. *Biochem Pharmacol*. 2006; **71**: 991-995.
66. Livermore DM: Can beta-lactams be re-engineered to beat MRSA? *Clin Microbiol Infect*. 2006; **12 Suppl 2**: 11-16.
67. Traczewski MM, Brown SD: In vitro activity of doripenem against *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* isolates from both cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; **50**: 819-821.
68. Feldman C, White H, O'Grady J, Flitcroft A, Briggs A, Richards G: An open, randomised, multi-centre study comparing the safety and efficacy of sitafloxacin and imipenem/cilastatin in the intravenous treatment of hospitalised patients with pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. 2001 ; **17**: 177-188.
69. Van Bambeke F, Pages J, Lee VJ: Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Rec Patents Antiinfect Drug Discov*. 2006; **1**: 157-175.
70. Holder IA: *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. *Vaccine*. 2004 ;**22**: 831-839.
71. Sedlak-Weinstein E, Cripps AW, Kyd JM, Foxwell AR: *Pseudomonas aeruginosa*: the potential to immunise against infection. *Expert Opin Biol Ther*. 2005; **5**: 967-982.
72. Malfroot A, Adam G, Ciofu O, Doring G, Knoop C, Lang AB *et al.*: Immunisation in the current management of cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. 2005; **4**: 77-87.
73. Craven DE: Preventing ventilator-associated pneumonia in adults: sowing seeds of change. *Chest*. 2006; **130**: 251-260.
74. Amsden G (2005) Tables of antimicrobial agents pharmacology, in *Principles and Practice of Infectious Diseases* (Mandell G, Bennett J and Dolin R eds) pp 634-700, Elsevier Churchill Livingstone, Philadelphia, PA.
75. Moore RD, Smith CR, Lietman PS: Association of aminoglycoside plasma levels with therapeutic outcome in gram-negative pneumonia. *Am J Med*. 1984; **77**: 657-662.
76. Thomas JK, Forrest A, Bhavnani SM, Hyatt JM, Cheng A, Ballou CH *et al.*: Pharmacodynamic evaluation of factors associated with the development of bacterial resistance in acutely ill patients during therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; **42**: 521-527.
77. Livermore DM: beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; **8**: 557-584.
78. Vedel G: Simple method to determine [beta]-lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa* using the disc agar diffusion test. *J Antimicrob Chemother*. 2005; **56**: 657-664.
79. Masuda N, Sakagawa E, Ohya S, Gotoh N, Tsujimoto H, Nishino T: Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; **44**: 3322-3327.
80. Maseda H, Yoneyama H, Nakae T: Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; **44**: 658-664.
81. Jones RN, Thornsberry C: Cefotaxime: a review of in vitro antimicrobial properties and spectrum of activity. *Rev Infect Dis*. 1982; **4 Suppl**: S300-S315.