

Gezondheidsraad

Resistentie door desinfectantia

Achtergronddocument bij Zorgvuldig omgaan met desinfectantia



Gezondheidsraad

Resistentie door desinfectantia

Achtergronddocument bij het advies *Zorgvuldig omgaan met desinfectantia*

Resistentie door desinfectantia

Achtergronddocument bij Zorgvuldig omgaan met desinfectantia

aan:

de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport

de staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu

Nr. A16/03, Den Haag, 21 december 2016

De Gezondheidsraad, ingesteld in 1902, is een adviesorgaan met als taak de regering en het parlement ‘voor te lichten over de stand der wetenschap ten aanzien van vraagstukken op het gebied van de volksgezondheid en het gezondheids-(zorg)onderzoek’ (art. 22 Gezondheidswet).

De Gezondheidsraad ontvangt de meeste adviesvragen van de bewindslieden van Volksgezondheid, Welzijn en Sport; Infrastructuur en Milieu; Sociale Zaken en Werkgelegenheid en Economische Zaken. De raad kan ook op eigen initiatief adviezen uitbrengen, en ontwikkelingen of trends signaleren die van belang zijn voor het overheidsbeleid.

De adviezen van de Gezondheidsraad zijn openbaar en worden als regel opgesteld door multidisciplinaire commissies van – op persoonlijke titel benoemde – Nederlandse en soms buitenlandse deskundigen.



De Gezondheidsraad is lid van het European Science Advisory Network for Health (EuSANH), een Europees netwerk van wetenschappelijke adviesorganen.

U kunt het advies downloaden van www.gr.nl.

Deze publicatie kan als volgt worden aangehaald:
Gezondheidsraad. Resistentie door desinfectantia, achtergronddocument bij Zorgvuldig omgaan met desinfectantia. Den Haag: Gezondheidsraad, 2016; publicatienr. A16/03.

auteursrecht voorbehouden

ISBN: 978-94-6281-113-3

Inhoud

1	Inleiding	9
2	Triclosan	11
2.1	Basis gegevens	11
2.2	De werking van triclosan als biocide	13
2.3	Is er sprake van intrinsieke resistentie tegen triclosan?	14
2.4	Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke resistentie?	14
2.5	Is er sprake van verworven resistentie?	15
2.6	Welke mechanismen spelen een rol bij het ontstaan van triclosan resistentie?	16
2.7	Is triclosan resistentie ook overdraagbaar?	17
2.8	Is coresistentie en/of kruisresistentie tegen antibiotica of andere desinfectantia waargenomen?	17
2.9	Heeft resistentie tegen triclosan klinische betekenis gehad?	19
2.10	Heeft coresistentie en of kruisresistentie van triclosan met antibiotica klinische betekenis?	19
3	Quaternaire ammoniumverbindingen	21
3.1	Basis gegevens	21
3.2	Chemie en werking als biocide	21
3.3	Is er sprake van intrinsieke resistentie tegen QACs?	23
3.4	Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke resistentie?	23
3.5	Is er sprake van verworven resistentie?	24

- 3.6 Welke mechanismen spelen rol bij het ontstaan van QAC resistentie? 25
 - 3.7 Is resistentie ook overdraagbaar? 27
 - 3.8 Is coresistentie met resistentie tegen antibiotica waargenomen? 28
 - 3.9 Is kruisresistentie met andere desinfectantia waargenomen? 30
 - 3.10 Is kruisresistentie met bepaalde antibiotica waargenomen? 30
 - 3.11 Heeft resistentie tegen QACs klinische betekenis gehad? 31
 - 3.12 Heeft coresistentie met antibiotica klinische betekenis? 32
 - 3.13 Heeft kruisresistentie van QACs met antibiotica praktische gevolgen? 33
-

- 4 Chloorhexidine 35
 - 4.1 Basisgegevens 35
 - 4.2 Chemie en werking als biocide 35
 - 4.3 Is er sprake van intrinsieke resistentie tegen chloorhexidine? 37
 - 4.4 Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke resistentie? 37
 - 4.5 Is er sprake van verworven resistentie? 37
 - 4.6 Welke mechanismen spelen een rol bij verworven resistentie? 38
 - 4.7 Is verworven resistentie ook overdraagbaar? 39
 - 4.8 Is coresistentie met resistentie tegen antibiotica waargenomen? 39
 - 4.9 Is kruisresistentie met andere desinfectantia waargenomen? 40
 - 4.10 Is kruisresistentie met bepaalde antibiotica waargenomen? 41
 - 4.11 Heeft resistentie tegen chloorhexidine klinische betekenis gehad? 41
 - 4.12 Heeft coresistentie met antibiotica klinische betekenis? 42
 - 4.13 Heeft kruisresistentie van chloorhexidine met antibiotica praktische gevolgen? 42
-

- 5 Zilver 43
 - 5.1 Basis gegevens 43
 - 5.2 Chemie en werking als biocide 44
 - 5.3 Is er sprake van intrinsieke resistentie tegen zilver? 45
 - 5.4 Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke resistentie? 45
 - 5.5 Is er sprake van verworven resistentie? 46
 - 5.6 Welke mechanismen spelen een rol bij verworven resistentie? 46
 - 5.7 Is verworven resistentie ook overdraagbaar? 47
 - 5.8 Is coresistentie met resistentie tegen antibiotica waargenomen? 48
 - 5.9 Is kruisresistentie met andere desinfectantia waargenomen? 49
 - 5.10 Is kruisresistentie met bepaalde antibiotica waargenomen? 50
 - 5.11 Heeft resistentie klinische betekenis gehad? 50
 - 5.12 Hebben kruis- en coresistentie met antibiotica klinische betekenis? 52
-

6	Chloor en reactieve chloorverbindingen	53
6.1	Basis gegevens	53
6.2	Chemie en werking als biocide	55
6.3	Is er sprake van intrinsieke of adaptieve resistentie tegen chloor?	56
6.4	Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke en adaptieve resistentie?	57
6.5	Is er sprake van verworven resistentie?	62
6.6	Welke mechanismen spelen een rol bij verworven resistentie?	63
6.7	Is verworven resistentie ook overdraagbaar?	63
6.8	Is coresistentie en/of kruisresistentie tegen andere desinfectantia of tegen antibiotica waargenomen?	63
6.9	Heeft resistentie klinische betekenis gehad?	65

	Literatuur	67
--	------------	----

Inleiding

De minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) en de staatsecretaris van Infrastructuur en Milieu (IenM) hebben op 4 februari 2015 de Gezondheidsraad om advies gevraagd over desinfectantia. Ze willen onder meer weten of er aanwijzingen zijn voor een toename van de microbiële resistentie tegen desinfectantia door een stijgend gebruik van deze stoffen en of daar gezondheidsschade uit kan voortvloeien. Ook vragen ze of de resistentie tegen antibiotica toeneemt door het (toegenomen) gebruik van desinfectantia.

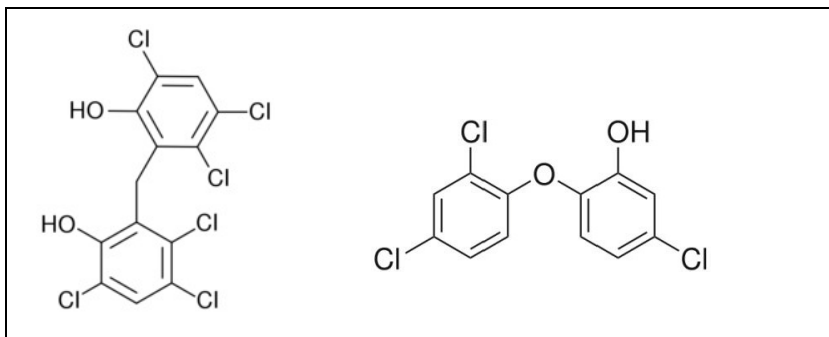
Om de hoeveelheid te bestuderen literatuur te beperken, heeft de ad-hoccommissie die met de beantwoording van de vragen is belast zich hoofdzakelijk gebaseerd op een nadere analyse van de resistentieontwikkeling bij vijf (groepen van) desinfectantia: triclosan, quaternaire ammoniumverbindingen, chloorhexidine, zilververbindingen en reactieve chloorverbindingen. Deze ‘*case studies*’ zijn opgenomen in dit achtergronddocument dat hoort bij het door de commissie opgestelde advies *Zorgvuldig omgaan met desinfectantia*. Samen vormen de genoemde middelen een goede afspiegeling van de grote verscheidenheid aan chemische verbindingen die voor desinfectie worden gebruikt. Tevens doet deze selectie recht aan de omvang van het gebruik in belangrijke maatschappelijke sectoren. Tot slot is over de genoemde groepen relatief veel informatie beschikbaar in de wetenschappelijke literatuur. Door deze inperking wordt volgens de commissie dan ook geen afbreuk gedaan aan de mogelijkheid om de vragen van de bewindspersonen te beantwoorden.

Triclosan

2.1 Basis gegevens

Triclosan behoort tot de groep van fenolen, die als bestanddelen van steenkoolteer vrijkomen bij de destillatie van steenkool. Het zijn geen in de natuur vrij voorkomende stoffen. Fenol is het basisproduct in de groep, dat water oplosbaar is en door de chirurg Lister in 1865 werd geïntroduceerd als desinfecterende vernevelvloeistof tijdens de operaties. Naarmate koolteerfenolen (zoals cresol, xylenol) hogere kookpunten hebben, worden ze meer toxisch voor micro-organismen (maar ook voor gastheerweefsels) en neemt hun wateroplosbaarheid sterk af. Tegenwoordig worden de meeste fenolen synthetisch bereid. Triclosan en hexachlorofeen behoren tot de groep bisfenolen die door Ehrlich al in 1906 op hun antimicrobiële eigenschappen werden onderzocht (figuur 1).

Bisfenolen zijn slecht oplosbaar in water, wat hun toepasbaarheid beperkt. Ze zijn wel goed oplosbaar in organische oplosmiddelen zoals ethanol.¹ Hexachlorofeen werd in 1948 en Triclosan in 1964 op de markt gebracht. Hexachlorofeen werd in 1972 weer van de markt gehaald vanwege levensbedreigende neurotoxische bijwerkingen (40 Franse baby's stierven na behandeling van de huid met talkpoeder waaraan 6% hexachlorofeen was toegevoegd). De stoffen zijn chemisch zeer stabiel; ze worden in het milieu maar langzaam afgebroken. Triclosan wordt als 'antimicrobieel' middel of als conserveermiddel veel gebruikt, o.a. in pesticiden, in zepen, in was- en afwasmiddelen, allerlei papieren, plastics en in bouwmaterialen, in tandpasta en mondwaters, deodoranten en andere cosmetica,



Figuur 1 De structuurformules van hexachlorofeen (l) en triclosan (r).

beddengoed, ondergoed en sokken, sponzen en in medisch implantaten.² In hoeverre deze producten de consumenten in de praktijk beschermen tegen schade door micro-organismen is veelal niet onderzocht. In proefopstellingen blijkt triclosan-houdende hand zeep bijvoorbeeld geen betere desinfecterend resultaat op te leveren dan zeep zonder triclosan.^{3,4} Waarschijnlijk vanwege het veelvuldig gebruik en de beperkte afbreekbaarheid wordt triclosan in de natuur in oppervlaktewateren en sedimenten aangetroffen. Naar schatting worden in de VS jaarlijks enkele honderden tonnen triclosan via waterzuiveringsbedrijven in het milieu geloosd.⁵ In Duitsland werden in effluënten van waterzuiveringsinstallaties 0,01-0,6 microgram/L gemeten.⁶ In waterzuiveringsinstallaties en oppervlaktewateren wordt triclosan deels omgevormd tot andere chloorhoudende derivaten, die nog minder afbreekbaar zijn en mogelijke meer toxisch (zoals polychlorodibenzo-dioxine). Aan het wateroppervlak en in aarde heeft triclosan een halfwaardetijd van enkele weken, onder anaerobe condities echter veel langer. De kans dat in de VS een willekeurige rivier detecteerbare hoeveelheden triclosan bevat wordt op 60-80% geschat.⁷ Ook in andere landen zoals Engeland, Duitsland, Roemenië, en Zuid Korea werd triclosan in oppervlaktewateren teruggevonden (gemiddeld [range] niveau: 50 [<0.1 -2300] ng/L).⁸ In sedimenten worden hogere triclosan concentraties aangetroffen, mede als gevolg van het lipofiele karakter en de beperkte wateroplosbaarheid van triclosan. Vooral in de buurt van steden treft men triclosan in de natuur aan. In een nationaal representatief bevolkingsonderzoek uitgevoerd in 2003-2004 trof men bij 75% van de Amerikaanse bevolking triclosan aan in de urine.⁹ De concentraties van triclosan in de urine waren gecorreleerd met het gebruik van mondwaters en zonnebrandcrèmes waaraan het desinfectans is toegevoegd.¹⁰ Ook moedermelk² en menselijk neusslijm¹¹ bevatten vaak triclosan. Er zijn aanwijzingen dat triclosan bijwerkingen heeft, waaronder allergische reacties en verstoringen van de

(schildklier)hormoonhuishouding (zie Hoofdstuk 4 van het advies over andere schadelijke bijwerkingen van desinfectantia). Daarom heeft de Europese Commissie in 2016 besloten om, in het kader van de nieuwe Biocideverordening, triclosan geen toelating (meer) te verlenen als desinfectans in klasse PT01.¹²

2.2 De werking van triclosan als biocide

Triclosan heeft een breed werkingsspectrum: het omvat zowel Grampositieve als Gramnegatieve bacteriën en sommige soorten mycobacteriën en fungi. Ook virussen met envelop, *Plasmodium* spp. en *Toxoplasma gondii* zijn gevoelig, maar *Pseudomonas aeruginosa* en bacteriesporen zijn ongevoelig voor triclosan. Ook *Serratia marcescens* en *Morganella morganii* zijn inherent weinig gevoelig voor triclosan.¹³ Opmerkelijk is dat chlorocresol de besmettelijkheid van prionen teniet doet.¹⁴ Voor triclosan is dat echter niet onderzocht en in de praktijk worden fenolen niet gebruikt voor de desinfectie van met prionen besmette oppervlakken of weefsels.

Recent werden ecologische MIC/MBC afkapwaarden voor triclosan gepubliceerd voor een beperkt aantal veelvoorkomende humane pathogene soorten micro-organismen (zie tabel 1).¹⁵

Een opmerkelijke bevinding van dit populatieonderzoek was dat er binnen de soorten *Escherichia coli*, *Enterobacter* en *Staphylococcus aureus* verminderd gevoelige subpopulaties konden worden onderscheiden die duiden op de ontwikkeling van resistentie tegen triclosan.

Fenolen werken bactericide doordat zij zich aan aminozuren binden en watermoleculen verdrijven. Daardoor denatureren eiwitten in celmembranen en in het cytoplasma. De werking is concentratieafhankelijk; bij lage concentraties

Tabel 1 Ecologische afkapwaarden voor triclosan.

Soort micro-organisme	Triclosan
	Ecologische afkapwaarde (mg/L)
	MIC _{ecol}
<i>Salmonella</i> spp.	8
<i>Escherichia coli</i>	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
<i>Enterobacter</i> spp.	1
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,5
<i>Enterococcus faecium</i>	32
<i>Enterococcus faecalis</i>	16
<i>Candida albicans</i>	16

triclosan treedt specifieke remming op van het enzym enoyl reductase, dat een rol speelt bij de bacteriële vetzuursynthese, en werkt triclosan voornamelijk bacteriostatisch. Bij hogere triclosan concentraties worden allerlei eiwitten gedenaatureerd en is triclosan bactericide. Er zijn onder prokaryoten vier isotypen enoyl reductasen beschreven die bij verschillende micro-organismen te vinden zijn. Ze worden gecodeerd door de genen *fabI*, *fabK*, *fabL* en *fabV*. Sommige bacteriesoorten zoals *Pseudomonas aeruginosa* en *E. faecalis* bezitten twee typen reductases (*fabI* en *fabK*). Triclosan remt alleen *fabI* gecodeerde enoyl reductase dat onder meer in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* en *Haemophilus influenzae* voorkomt, maar ook in *Mycobacterium tuberculosis* gevonden wordt, een bevinding die inmiddels geleid heeft tot onderzoek naar triclosanderivaten als een nieuwe klasse tuberculostatica.¹⁶

2.3 Is er sprake van intrinsieke resistentie tegen triclosan?

Antwoord: ja.

Triclosan is van nature minder werkzaam tegen virussen zonder envelop, terwijl mycobacteriën weliswaar in hun groei geremd maar niet gedood worden door triclosan. Bacteriesporen zijn geheel resistent tegen triclosan. Sommige soorten bacteriën zijn intrinsiek vrijwel resistent tegen triclosan, in het bijzonder *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* en *Morganella morganii*.¹⁷

2.4 Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke resistentie?

Intrinsieke resistentie berust veelal op verminderde interactie van de celwand van deze micro-organismen met triclosan en/of een verminderde doorlaatbaarheid van de celwand of de aanwezigheid van diverse efflux pompen.¹⁸ De gelaagde structuur van de wand van bacteriesporen maakt ze resistent tegen veel desinfectantia, inclusief triclosan. Ook de aanwezigheid van een triclosan-ongevoelig enoyl reductase enzym (*fabL*-, *fabK*- of *fabV*-gecodeerd) gaat gepaard met verminderde gevoeligheid voor, c.q. resistentie tegen triclosan, bijvoorbeeld in *Pseudomonas aeruginosa*^{19, 20} en in *Aeromonas salmonicida*²¹.

Ten slotte zijn bij uit het milieu geïsoleerde stammen van *Pseudomonas putida* en *Achromobacter xylosoxidans subspecies denitrificans* enzymen gevonden die triclosan kunnen afbreken.²²

2.5 Is er sprake van verworven resistentie?

Antwoord: ja.

Het blijkt vrij gemakkelijk om voor sommige soorten bacteriën in het laboratorium triclosan stabiel resistente stammen te selecteren door toevoeging van triclosan aan het medium.¹⁸ Dit fenomeen is waargenomen bij *Escherichia coli*²³, *Klebsiella oxytoca*²⁴, *Staphylococcus aureus*^{25,26}, *Salmonella enterica*²⁷, *Proteus mirabilis*¹⁷ en *Pseudomonas aeruginosa*²⁸. Toevoeging van triclosan aan nagebootste rivierbeddingen blijkt te leiden tot toename van triclosan-resistente bacteriën in deze kunstmatige rivierbodems; in werkelijkheid geldt dat, naarmate sprake is van meer triclosan vervuiling van rivieren, de fractie van triclosan-resistente bacteriën in het sediment hoger is.^{5,29}

Resistentie tegen triclosan is in de dagelijkse praktijk tot nu toe beperkt waargenomen³, maar de gevoeligheid van micro-organismen voor triclosan wordt niet systematisch gemonitord. In een internationaal onderzoek van ruim tien jaar geleden bleken 68 van 1388 onderzochte klinische isolaten van *Staphylococcus aureus* verminderd gevoelig te zijn.³⁰ Dat komt goed overeen met de 5% minder gevoelige MRSA isolaten die in de Verenigde Staten is gevonden.³¹ *Klebsiella pneumoniae* isolaten uit het pre-antibiotische tijdperk, dat wil zeggen van vóór 1949 (de zogenoemde Murray collectie), blijken significant gevoeliger te zijn voor triclosan (ook voor chloorhexidine en Qac's) dan een gelijkaardige collectie *Klebsiella*'s van tegenwoordig. De mediane triclosan MIC toentertijd was 0,06 mg/L en die is nu 0,5 mg/L. De oorzaak van de triclosan MIC 'creep' werd niet onderzocht. In de oude stammen werden geen *qac*-genen gevonden, maar ook slechts een minderheid van de moderne *Klebsiella* isolaten bleken *qac*-genen aan boord te hebben.³² Deens onderzoek heeft aangetoond dat isolaten van *Staphylococcus epidermidis* uit 2010 en 2011 frequent verminderd gevoelig zijn voor triclosan, dit in tegenstelling tot die uit 1965 en 1966. Dat blijkt onder meer samen te hangen met het vóórkomen van een mutatie in het *fabI*-gen dat codeert voor het enoyl reductase bij deze soort.³³ In de Verenigde Staten is bij 22% van de onderzochte klinische isolaten een verminderde gevoeligheid geconstateerd.³¹ Bij *Salmonella* (16 van 428 isolaten van mensen en dieren³⁴), *Acinetobacter baumannii* (20 van 732 klinische isolaten³⁵) en *Enterococcus faecalis* en *E. faecium* (5 van 272 isolaten³⁶) werden eveneens verminderd gevoelige isolaten aangetroffen. Bij andere bacteriesoorten is sporadisch een verminderde gevoeligheid voor triclosan vastgesteld.³ Resistentie is waargenomen in *Enterobacter gergoviae*, een soort die regelmatig wordt aangetroffen in gecontamineerde cosmetica.

Daarbij spelen fenotypische verandering in de buitenmembraan en een versterkte capaciteit om biofilms te vormen een rol.³⁷

Cookson e.a. vonden een genetisch overdraagbare vorm van triclosan resistentie onder MRSA isolaten van patiënten die zich dagelijks met triclosan-houdende zeep wasten.³⁸ Resistentie tegen triclosan was gekoppeld aan resistentie tegen het antibioticum mupirocine en bleek plasmidaal gecodeerd.

2.6 Welke mechanismen spelen een rol bij het ontstaan van triclosan resistentie?

Resistentie is het gevolg van adaptatie, genmutatie of de acquisitie van resistentiegenen door middel van horizontale genoverdracht. Vaak zijn meerdere mechanisme gelijktijdig betrokken bij resistentieontwikkeling tegen triclosan, wat duidelijk wordt bij analyses van genomen, transcriptomen en proteomen.^{39,40} Bij de bovengenoemde in vitro selectie van verminderd gevoelige *Salmonella enterica* mutanten bleek resistentie te berusten op verhoogde expressie van efflux pomp AcrAB-TolC, in combinatie met sterk verminderde expressie van buitenmembraaneiwitten en een verkorting van de LPS ketens.⁴¹ Andere auteurs vonden dat *FabI* mutatie in combinatie met mutaties in Sigma factoren *rpoS* of *rpoD* hoge resistentie tegen triclosan gaven. Dergelijke stammen waren ook verminderd gevoelig voor cotrimoxazol en fluoroquinolonen.⁴² Triclosan behoort tot de categorie substraten die door multidrug efflux pompen van vele soorten bacteriën kunnen worden getransporteerd. Een verhoogde expressie van dergelijke efflux pompen na expositie aan triclosan werd ook beschreven voor *Escherichia coli*⁴³, *Pseudomonas aeruginosa*^{28,44}, *S. maltophilia*⁴⁵ en *A. baumannii*⁴⁶. Bij *S. maltophilia* werd aangetoond dat de verhoogde expressie van de multidrug efflux pomp SmeDEF het gevolg was van binding van triclosan aan het repressoreiwit SmeT waarna *SmeDEF* tot verhoogde expressie komt.⁴⁷ In een collectie van 31 klinische *Staphylococcus aureus* isolaten bleek dat alle zeven triclosanresistente stammen een verhoogde expressie van *FabI*-gecodeerd enoyl reductase lieten zien en dat de zes stammen met de hoogste MICs daarnaast ook nog een mutatie in *FabI* hadden die bijdroeg aan de mate van resistentieontwikkeling tegen triclosan.⁴⁸ De verhoogde expressie van *FabI* zelf is waarschijnlijk het gevolg van mutaties in de promotoregio van het *FabI*-gen.⁴⁹ Mutaties in *Fab*-genen zijn ook gevonden bij triclosanresistente *Escherichia coli*⁵⁰ en bij *A. baumannii*³⁵.

In een andere vorm van adaptatie bleek expositie aan sub-MIC triclosan te leiden tot verhoogde biofilmproductie⁵¹ waardoor de gevoeligheid voor triclosan sterk afneemt, een fenomeen dat ook bij andere groepen desinfectantia en antibiotica is waargenomen. Ook de inductie door triclosan bij *Staphylococcus aureus*

van zogenoemde *small colony variants* leidt tot fenotypische resistentie tegen triclosan én tegen penicillines en aminoglycosiden.⁵²

2.7 Is triclosan resistentie ook overdraagbaar?

Antwoord: ja.

Ciusa e.a. vonden bij klinische *Staphylococcus aureus FabI*-genen die origineel afkomstig zijn uit *S. haemolyticus*.³⁰ Cookson e.a. isoleerden MRSA met verminderde gevoeligheid voor triclosan bij patiënten die gedurende 2 weken met triclosan-houdende zeep waren behandeld in verband met MRSA dragerschap.³⁸ Zij konden in mengcultures en op membraanfilters de triclosanresistentie overdragen naar triclosan gevoelige *Staphylococcus aureus*, passend bij een plasmidaal gelokaliseerd gen dat voor triclosanresistentie codeerde.

2.8 Is coresistentie en/of kruisresistentie tegen antibiotica of andere desinfectantia waargenomen?

Antwoord: ja.

Resistentie tegen triclosan samen met resistentie tegen een of meer klassen antibiotica is geregeld waargenomen, maar vaak is niet onderzocht of er dan sprake was van coïncidentie zonder enig onderling verband of van coresistentie (gelijktijdig aanwezigheid én overdraagbaarheid van verschillende resistentiemechanismen), dan wel van kruisresistentie op basis van hetzelfde resistentiemechanisme. Interessant in dit verband is de waarneming dat bij *Escherichia coli* en *Klebsiella pneumoniae* triclosanresistentie geselecteerd kan worden niet alleen door expositie aan triclosan, maar ook door expositie aan benzalkoniumchloride of aan ciprofloxacine.⁵³ Verhoogde expressie van efflux pompen ligt hieraan ten grondslag, terwijl deze expressie gereguleerd wordt door zogenoemde global regulators (bijv. MarA, RamA, SoxR) die ook de expressie van buitenmembraan-eiwitten regelen en daarmee ook de doorlaatbaarheid van de buitenmembraan in deze soorten beïnvloeden. Bovengenoemde resistentie tegen triclosan onder klinische isolaten van *A. baumannii* bleek geassocieerd met verhoogde MICs voor imipenem, levofloxacin, amikacine en teracycline.³⁵ De reden voor deze associatie werd echter niet onderzocht. In een in vitro geselecteerde triclosanresistente *A. baumannii* stam – MIC 256 mg/L – bleek de gevoeligheid voor diverse beta-lactam antibiotica, fluoroquinolonen en doxycycline een factor 4-8 lager te zijn geworden door een verhoogde expressie van een multidrug efflux pomp uit de

RND klasse.⁴⁶ Bij *S. maltophilia* is aangetoond dat de verhoogde expressie van efflux pomp SmeDEF het gevolg is van binding door triclosan aan het repressor-eiwit SmeT dat de aflezing van het *SmeD* gen voorkomt; door de binding wordt de repressie opgeheven en komt de efflux pomp tot expressie met als gevolg verminderde gevoeligheid voor triclosan én voor antibiotica uit de quinolonklasse.⁴⁷

In een verzameling van 400 *Salmonella enterica* isolaten van mens en dier kwam triclosanresistentie bij 4% voor en was deze resistentie in 56% geassocieerd met multipole resistentie tegen diverse andere antibiotica (bij triclosan-gevoelige stammen kwam dit significant minder voor). Alleen verhoogde expressie van efflux pompen werd onder deze groep resistente stammen als verklaring hiervoor gezien.³⁴ Expositie van *L. monocytogenes* in vitro aan subletale concentraties triclosan bleek in een studie de MIC's voor gentamicine en andere aminoglycosiden sterk te verhogen zonder resistentie tegen triclosan te selecteren.⁵⁴ Het moleculaire mechanisme van dit fenomeen werd niet gevonden; er waren geen mutaties in het *16S rRNA* gen. Een analoge bevinding was de selectie van zogenoemde 'pin point colonies' van *Listeria monocytogenes* door expositie aan triclosan, een gevolg van een mutatie in een haem eiwit gen. Een bijkomend gevolg was resistentie tegen aminoglycosiden. De onderzoekers vermoedden dat er geen actief transport van aminoglycosiden meer optrad.⁵⁵

Triclosanresistente coliforme bacteriën aanwezig in de effluenten van een waterzuiveringsinstallatie in New Jersey in de VS bleken in 90% van de gevallen – alle *Citrobacter freundii* – resistent tegen vier klassen van antibiotica. In dezelfde studie bleek op een andere plaats het effluent vrijwel steeds triclosanresistente coliforme bacteriën te bevatten, waarbij de triclosanresistentie gecorreleerd bleek te zijn met resistentie tegen ten minste drie antibioticaklassen, waaronder chlooramfenicol en nitrofurantoïne. Het mechanisme van kruis- of coresistentie werd echter niet bepaald.⁵⁶ Onder paragraaf 1.6 is al gemeld dat inductie van *small colony variants* van *Staphylococcus aureus* door triclosan ook de gevoeligheid voor aminoglycosiden en voor penicillines vermindert. In andere onderzoeken werd echter geen verband aangetoond tussen triclosanresistentie en antibioticaresistentie bij stafylokokken.^{57, 58} Uit epidemiologisch onderzoek blijkt ook geen aanwijzing dat triclosangebruik resistentie tegen meticilline en ander antibiotica onder *Staphylococcus aureus* heeft veroorzaakt.⁵⁹ Er is wel een associatie gevonden tussen meticillineresistentie en triclosanresistentie bij coagulase-negatieve stafylokokken.³¹ Daarnaast is gepubliceerd dat membraanveranderingen in *Staphylococcus aureus* zowel tot ciprofloxacine- als triclosanresistentie kunnen leiden.⁶⁰

In een internationale, gerandomiseerde multicenter studie werd geen relatie gevonden tussen gebruik van triclosan- (en andere biocide) houdende producten

in het huishouden en de aanwezigheid van antibioticaresistentie bij de mens en in de omgeving van die huishoudens.⁶¹

2.9 Heeft resistentie tegen triclosan klinische betekenis gehad?

Antwoord: ja.

Besmette triclosanoplossingen hebben in de kliniek diverse uitbraken opgeleverd. Een recente uitbraak van een levensbedreigende *Pseudomonas aeruginosa* infectie onder hemato-oncologische patiënten werd teruggevoerd op het gebruik van een besmet triclosan-houdend handdesinfectans. De stam was hoog resistent tegen triclosan (MIC: 2,1 g/L versus 0,5 g/L voor wild-type stammen) met kruisresistentie tegen zes antibiotica die typisch door effluxpompen worden herkend. Remmers van efflux pompen bleken de kruisresistentie te kunnen opheffen.⁶² Een eerdere uitbraak van conjunctivitis bij pasgeborenen met een triclosanresistente *Serratia marcescens* werd veroorzaakt door een bij de fabricage (intrinsiek) besmette zeepoplossing waaraan 0,5% triclosan was toegevoegd.⁶³

2.10 Heeft coresistentie en of kruisresistentie van triclosan met antibiotica klinische betekenis?

Antwoord: onbekend.

Het is niet bekend of specifiek door triclosangebruik geïnduceerde kruisresistentie met antibiotica in de praktijk klinische betekenis heeft gehad. Wel wordt algemeen aangenomen dat verminderde gevoeligheid voor antibiotica door verhoogde expressie van efflux pompen al dan niet in combinatie met een verminderde doorlaatbaarheid van de celwand van pathogene bacteriesoorten klinisch van betekenis is.⁶⁴⁻⁶⁸ Het gebruik van efflux pomp remmers in combinatie met antibiotica wordt daarbij als een van de nieuwe behandelstrategieën genoemd.⁶⁹

Quaternaire ammoniumverbindingen

3.1 Basis gegevens

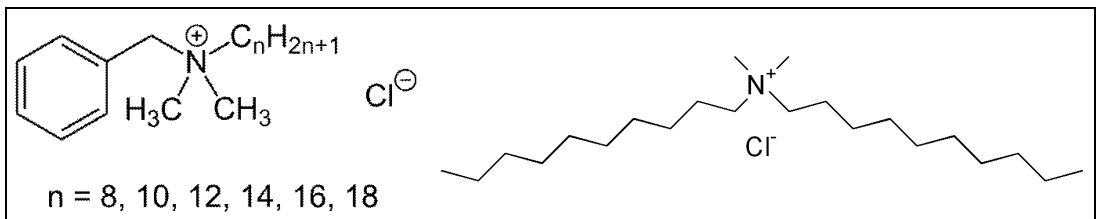
Hoewel de stoffen eerder gesynthetiseerd en beschreven zijn, zijn de desinfecterende eigenschappen van bepaalde quaternaire ammoniumverbindingen (QACs) vooral door een publicatie van Gerhard Domagk in 1935 onder de aandacht gebracht⁷⁰ en sindsdien in de gezondheidszorg en later daarbuiten geëxploiteerd. Vooral de kationische QACs bleken een sterk bactericide werking te bezitten. De lijst van kationische QACs is lang en er worden mengsels van QACs gebruikt (bijv. benzalkoniumchloride, cetrimide). Ook buiten de zorg werden en worden QACs veelvuldig toegepast, soms in combinatie met ander desinfectantia zoals chloorhexidine. Mede vanwege hun oppervlakte-actieve werking worden QACs op vele plaatsen in de samenleving toegepast als microbicide detergens (schoonmaak én desinfectie) en, in lagere concentraties, als conserveermiddelen. Veelgebruikte QAC desinfectantia zijn benzalkoniumchloride (een mengsel van alkylbenzyltrimethylammoniumchloriden), cetrimide (een mengsel van diverse tri-methylammoniumbromideverbindingen), didecyldimethylammoniumchloride en cetylpyridinium chloride.

3.2 Chemie en werking als biocide

Kationische QAC desinfectantia zijn organisch gesubstitueerde ammoniumverbindingen waarbij een stikstofatoom verbonden is met 4 koolstof zij-ketens

waarvan de lengtes variëren. Het totaal aantal koolstof atomen is > 10 en ten minste één zijketen heeft een lengte in het bereik van C_8 tot C_{18} (zie figuur 2). De ketenlengte is bepalend voor de werkzaamheid. Benzalkonium met een ketenlengte C_{12} is bijvoorbeeld actiever dan benzalkoniumvarianten met andere ketenlengtes.⁷¹ Benzalkonium met ketenlengtes van C_{12} - C_{14} zijn het meest werkzaam tegen Grampositieve bacteriën terwijl Gramnegatieve bacteriën het gevoeligst zijn voor ketenlengtes van C_{14} - C_{16} .⁷² In de praktijk worden daarom mengsels van QACs met diverse ketenlengtes gebruikt. Chloor- of broomanionen staan tegenover de kationische ammoniumgroep. Dergelijke QAC's zijn amfipatisch met hydrofobe en hydrofiele eigenschappen. QACs verlagen de oppervlaktespanning en boven bepaalde concentraties, de kritische micellen concentratie (die voor elke QAC-oplossing anders is), vormen QACs micellen, die bijdragen aan hun werking als detergens.

De biocide werking van kationische QACs omvat een breed scala aan micro-organismen, namelijk Grampositieve en Gramnegatieve bacteriën, fungi en sommige virussen. QACs zijn niet werkzaam tegen sporen. Ook hydrofiele virussen (zonder envelop) zijn weinig gevoelig voor QACs. De minimaal remmende concentratie (MIC) van benzalkoniumchloride voor Grampositieve bacteriën en gistsoorten ligt op 4-16 mg/L, voor Gramnegatieve bacteriën liggen de minimaal remmende concentraties hoger (32-128 mg/L), terwijl de minimaal dodende concentraties (MBC) op 16-32 mg/L respectievelijk 32- >128 mg/L liggen.¹⁵ *Salmonella* en *Pseudomonas* soorten zijn soms bestand tegen concentraties van 1.000 mg/L. Voor snelle biocidie (> 5 log reductie in kolonievormende eenheden (KVE) binnen 5 minuten) in vitro zijn nog hogere concentraties vereist. De gebruikersconcentratie van de QAC-oplossing is derhalve van belang. Deze varieert in de praktijk tussen 0.04% (0,4 g/L) en 8% (80 g/L). De hoge concentratie in de gebruiksooplossing is echter niet dezelfde als de uiteindelijke concentratie op de plek van werking, daar is hij lager door verdunning en door binding van het desinfectans aan allerlei (organische) materialen in het toepassingsgebied.



Figuur 2 Chemische structuur van benzalkoniumchloride (l) en didecyltrimethylammoniumchloride (r).

De biocidewerking van QACs berust op interactie van het product met de cytoplasmamembranen (bij Gramnegatieve bacteriën ook met de buitenmembraan) waardoor de opbouw en integriteit van de membraan verstoord raakt en er lekkage optreedt. Na opname in de cel veroorzaken QACs daarnaast denaturatie van eiwitten in het cytoplasma. QACs binden ook DNA.¹ De oppervlakte-actieve werking van QACs, uitgedrukt in thermodynamische grootheden, correleert goed met hun antibacteriële eigenschappen. Een lage zuurgraad (pH) in het milieu en de aanwezigheid van anionen (o.a. hard water, zepen, carbonaten), katoen, talkpoeder, fosfolipiden (serum) en ander organisch materiaal verminderen de werkzaamheid van QACs.

3.3 Is er sprake van intrinsieke resistentie tegen QACs?

Antwoord: ja.

QACs zijn van nature minder werkzaam tegen virussen zonder envelop, terwijl mycobacteriën weliswaar in hun groei geremd maar niet gedood worden door QACs. Bacteriesporen en prionen zijn geheel resistent tegen QACs.¹ Ook sporen van schimmels en parasitaire cysten (m.u.v. *Giardia* cysten) zijn minder gevoelig voor QACs. Sommige soorten Gramnegatieve bacteriën zijn intrinsiek minder gevoelig, c.q. hebben hogere MICs (>100 mg/L), zoals *Salmonella* spp en in het bijzonder *Pseudomonas aeruginosa*.

3.4 Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke resistentie?

Intrinsieke resistentie berust veelal op verminderde interactie van de celwand van deze micro-organismen met QACs en/of een verminderde doorlaatbaarheid van de celwand. Vooral Gramnegatieve bacteriesoorten kunnen de doorlaatbaarheid van hun celwand reguleren bijvoorbeeld door het aantal en de samenstelling van hun porines te variëren. De samenstelling en elektrische lading van de celwand kan ook anders zijn dan gebruikelijk, bijvoorbeeld lipide-rijke celwanden bij mycobacteriën (mycoylacylarabinogalactan) of dichter en minder negatief geladen LPS in de buitenmembranen bij *Pseudomonas aeruginosa*. Het ontbreken van een lipidehoudende envelop rond bepaalde virussen levert geen bindingsplaatsen op voor QACs. Prionen zijn eiwitten waaraan QACs niet binden. De meerledige structuur van de wand van bacteriesporen maakt ze ook resistent tegen QACs.

De van nature veel voorkomende efflux pompen van bacteriën spelen een rol bij de mate van intrinsieke gevoeligheid voor QACs. Er zijn 5 klassen van

efflux systemen bij bacteriën bekend die een rol spelen in de bacteriële huishouding.^{73,74} Zij kunnen allerlei stoffen, waaronder bepaalde antibiotica en desinfectantia, uit het cytoplasma of uit de periplasmatische ruimte (bij Gramnegatieve bacteriën) verwijderen. Er is één groep van ATP afhankelijk transportsystemen (ABC-klasse efflux pompen) en 4 groepen van proton pomp antiporters (MF-, SMR-, MATE- en RND-klasse efflux pompen). De antiporters maken gebruik van de elektrochemische gradiënt over de celmembraan (proton motive force), het uit te scheiden product wordt ingewisseld voor de influx van positief geladen waterstof- of natriumionen. Vooral de antiporter efflux pompen spelen een rol bij de gevoeligheid voor QACs. Genen die coderen voor deze efflux pompen, waaronder een serie *qac*-genen, zijn aanwezig in Gramnegatieve en Grampositieve bacteriesoorten en kunnen als onderdeel van een integron gevonden worden op (conjugatief overdraagbare) plasmiden. Verschillende efflux pompen kunnen gelijktijdig aanwezig zijn in een bacterie. De gevoeligheid van *Klebsiella pneumoniae* voor QACs neemt bijvoorbeeld af naarmate de bacterie meer genen voor efflux pompen bezit.⁷⁵ Datzelfde geldt voor *Staphylococcus aureus*.⁷⁶

Overigens blijken *Pseudomonas aeruginosa* en *Pseudomonas putida*, maar ook *Stenotrophomonas* spp. en *Achromobacter* spp. onder aerobe condities QACs enzymatisch te kunnen afbreken, wat mogelijk bijdraagt aan hun natuurlijke resistentie tegen QACs.⁷⁷ Dergelijke stammen worden tegenwoordig ingezet bij de bioremediatie van afvalwater.⁷⁸

3.5 Is er sprake van verworven resistentie?

Antwoord: ja.

Vanaf de introductie van QACs op de markt na 1950 zijn er berichten van de ontwikkeling van resistentie tegen QACs. Zo veroorzaakten benzalkoniumchloride resistente varianten van *Pseudomonas* (MIC \pm 1.000 mg/L) in de eerste decaden van gebruik al besmettingen van desinfectansoplossingen en infecties in ziekenhuizen.⁷⁹ Blootstelling aan QACs in vitro blijkt verminderd gevoelige varianten op te kunnen leveren, een fenomeen dat is gevonden bij *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* Typhimurium en *Serratia marcescens*.⁸⁰⁻⁸⁵

In de dagelijkse praktijk van de voedingsindustrie bleken *Serratia marcescens* stammen uit voetbaden met desinfectans te kunnen worden geïsoleerd die niet meer afdoende gedood werden (<5 log reductie in 5 minuten) bij blootstelling aan gebruiksklare concentraties (2.000 mg/L) van benzalkoniumchloride.⁸⁶ Dergelijke, tegen benzalkonium hoog-resistente stammen van *Serratia marces-*

cens werden eveneens gevonden tijdens een uitbraak van septische artritis gerelateerd aan het gebruik van een besmette desinfectansoplossing in een medische praktijk.⁸⁷ In de voedingsindustrie duiken met enige regelmaat stammen van *Listeria monocytogenes* op met verminderde gevoeligheid voor QACs.⁸⁸ Sommige resistente *L. monocytogenes* kloons persisteren landurig en verspreiden zich door de voedingsketen.⁸⁹ Ook in de veterinaire praktijk duiken voor QACs verminderd gevoelige stammen op, bijvoorbeeld van *Staphylococcus* soorten.⁹⁰

Bij *Staphylococcus aureus* in de humane geneeskunde lijkt er sprake van een zogenaemde *MIC creep*, dat wil zeggen dat de gemiddelde MIC voor QACs bij deze bacteriesoort, althans onder de klinische isolaten ervan, langzaam maar zeker aan het toenemen is, van < 8 mg/L naar > 16 mg/L.^{59,91} Zo vond Zmantar recent in een klinische collectie van stafylokokken dat 20% van de stammen een MIC voor benzalkoniumchloride had van 16-32 mg/L⁹², maar dat percentage lag lager (9%) in een studie in andere delen van de wereld.⁹³

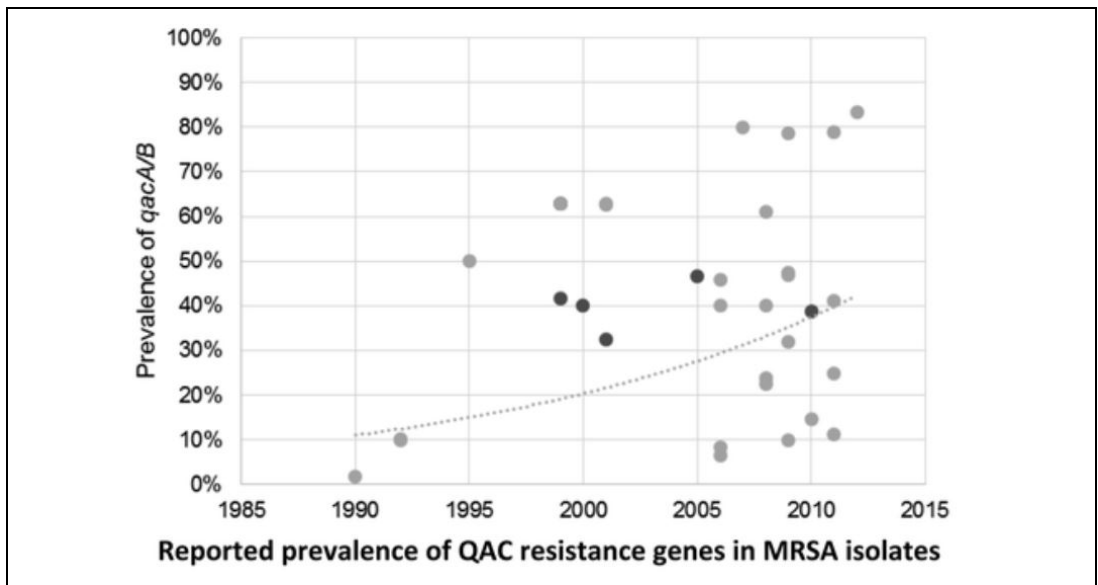
Ook bij QACs geldt echter dat het nog niet goed voorspelbaar is of en wanneer mutanten ontstaan in in vitro experimenten en wanneer zij opduiken in de dagelijkse praktijk. Er is geen systematische monitoring van QAC resistentie onder relevante bacteriesoorten.

3.6 Welke mechanismen spelen rol bij het ontstaan van QAC resistentie?

Resistentie is het gevolg van adaptatie, genmutatie of de acquisitie van resistentiegenen door middel van horizontale genoverdracht. Blootstelling aan QACs kan bijvoorbeeld leiden tot verhoogde biofilmproductie waardoor de gevoeligheid voor QACs sterk afneemt⁹⁴, een fenomeen dat ook bij andere groepen desinfectantia en antibiotica is waargenomen. Biofilms bestaande uit meerdere bacteriesoorten blijken extra resistent tegen QACs.⁹⁵ Adaptatie aan QACs kan zich ook manifesteren als veranderingen in de celmembraan, de buitenmembraan bij Gramnegatieve bacteriesoorten, de dichtheid en structuur van porines of een verhoogde expressie van efflux pompen. Blootstelling aan subletale concentraties van QACs levert stress en een SOS response van de blootgestelde micro-organismen op, waardoor de mutatiefrequentie en de kans op genoverdracht toenemen.⁹⁶ Een schematisch overzicht van de mogelijke reacties van micro-organismen bij blootstelling aan subletale concentraties van QACs is te vinden in de publicatie van Tezel en Pavlostathis.⁷⁷

Verskillende mutaties leiden tot verandering in de samenstelling van de celmembraan waardoor de permeabiliteit voor QACs afneemt.⁹⁷ *Pseudomonas aeruginosa* en *Campylobacter jejuni* verlagen de permeabiliteit door het aantal

porines en de eiwitsamenstelling van hun buitenmembraan te veranderen.^{98,99} Verhoogde expressie en de horizontale overdracht en verspreiding van genen die coderen voor efflux pompen uit de SMR klasse zijn waarschijnlijk de belangrijkste verklaring voor de verworven resistentie tegen QACs. Met name *EmrE*, *SugE*, *qacE*, *qacEΔ1*, *qacG*, *qacH*, *qacI*, *qacJ*, *qacZ* en *smr* genen coderen voor efflux pompen die QACs verwijderen uit de cel. *EmrE*, *smr* en *SugE* zijn niet-QAC-specifieke multidrug efflux pompen, terwijl de andere efflux systemen meer specifiek zijn voor QACs. Deze genen worden vooral gevonden op mobiele genetische elementen zoals transposons, plasmiden, en integratieve-conjugatieve elementen (ICE) op chromosomen. Zo zijn *qacE* en *qacEΔ1*, veelal gelokaliseerd op klasse-1 integronen, via plasmiden wijd verspreid onder Gramnegatieve en *qacEΔ1* ook onder Grampositieve bacteriën.¹⁰⁰ SMR-klasse genen zijn echter ook gevonden op chromosomen, bijvoorbeeld bij *Enterobacter cloacae*.¹⁰¹ De aanwezigheid van *qacEΔ1* bij voedselpathogenen als *Salmonella* bleek sterk gecorreleerd met hoge MICs (≥ 512 mg/L) tegen QACs.¹⁰² Onder Gramnegatieve bacteriesoorten als *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia pseudomallei* en *Acinetobacter baumannii* zijn ook RND-klasse efflux pompen (AcrB, AcrF, sdeAB, AdeABC) van belang voor verminderde gevoeligheid voor QACs.^{73,82,84} Bij



Figuur 3 Gerapporteerde prevalentie van QAC resistentiegenen in MRSA isolaten (met toestemming overgenomen uit Jennings e.a.¹⁰³ Copyright 2015 American Chemical Society).

Staphylococcus aureus is de aanwezigheid van *qacA* en *qacB* genen uit de MFS-klasse efflux pompen eveneens van belang voor hun gevoeligheid voor QACs.^{73,103} Volgens Jennings lijkt de prevalentie van deze laatste genen onder MRSA toe te nemen (zie figuur 3).¹⁰³

Ook werd *smr* vaker aangetroffen onder klinische isolaten van *Staphylococcus aureus* naarmate patiënten in het verleden vaker stafylokokken huidinfecties hadden doorgemaakt.¹⁰⁴ Blootstelling van MRSA aan QAC induceert de expressie van *qacA/B* genen in vitro. In een recente studie werden bij 70% van de geïsoleerde MRSA *qacA/B* genen gevonden, terwijl slechts 2% van de meticiline gevoelige *Staphylococcus aureus* isolaten dergelijke genen bezaten.¹⁰⁵ Klinische *Staphylococcus aureus* isolaten met *qac* genen bleken gemiddeld een vier maal hogere MIC voor QACs te hebben.

In een multicenter studie in Azië bleken meer dan 50% van de MRSA isolaten uit 1998/1999 al *qacA/B* of *smr* positief.⁹¹ In Denemarken werden in het tijdperk voorafgaand aan de introductie van chloorhexidine géén *S. epidermidis* stammen uit bloed geïsoleerd die *qac* genen bevatten, terwijl heden ten dagen meer dan de helft van de *S. epidermidis* bloedisolaten in dat land *qac* genen dragen.¹⁰⁶ Gebruik van chloorhexidine in de ziekenhuispraktijk sinds de jaren zestig is gepaard gegaan met selectie en verspreiding van *qac*-genen binnen deze soort.¹⁰⁷ Overigens blijken wereldwijd grote, onverklaarde verschillen te bestaan in het voorkomen van *qac*-genen in klinische isolaten van *Staphylococcus aureus*.¹⁰⁸

Er zijn mogelijk ook andere resistentiemechanismen in het spel. QAC-resistentie bij *L. monocytogenes* bleek niet te correleren met de aanwezigheid van bepaalde efflux pompen, maar met een veranderde celwandsamenstelling waardoor de stammen ook niet meer gevoelig waren voor bacteriofagen.⁸⁸ Ook bij stafylokokken blijkt dat niet alle QAC-resistente isolaten beschikken over een of meer van de bekende *qac*-genen.⁹² In vitro geselecteerde mutanten van *Escherichia coli* met verminderde gevoeligheid voor benzalkoniumchloride bleken stabiel meer RND-klasse efflux pompen van het type AcrAB te bezitten, maar daarbij de samenstelling van de porines in hun buitenmembraan te hebben veranderd.⁸¹

3.7 Is resistentie ook overdraagbaar?

Antwoord: ja.

Het eerste gen dat codeert voor een SMR-klasse efflux pomp, *smr*, werd gevonden op zowel niet-conjugatieve als conjugatieve plasmiden in klinische isolaten van *Staphylococcus aureus* en andere stafylokokken.¹⁰⁰ Resistentie tegen QACs

bij *Staphylococcus aureus* is in het laboratorium ook met behulp van recombinant plasmiden overgedragen naar *Escherichia coli* en via transformatie naar *Streptococcus sanguis*.^{109,110} *Qac*-genen in klinische isolaten van diverse andere bacteriesoorten (o.a. *Escherichia coli*, *Listeria* spp. en *Pseudomonas aeruginosa*) zijn eveneens aanwezig gebleken op diverse overdraagbare genetische elementen, zoals plasmiden waarop overigens ook genen voorkomen die coderen voor resistentie tegen antibiotica.¹¹¹ Er zijn ook direct observaties die wijzen op plasmide-gemedieerde overdracht van resistentie tegen QACs in de praktijk.^{112, 113}

3.8 Is coresistentie met resistentie tegen antibiotica waargenomen?

Antwoord: ja.

Zoals boven gesteld, komen de genen die coderen voor de belangrijkste QAC efflux pompen voor op mobiele genetische elementen. Dergelijke elementen bevatten vaak, maar niet altijd, ook genen die coderen voor diverse klassen van antimicrobiële middelen. Veel artikelen wijzen op het bestaan van gecombineerde resistentie tegen QACs en antibiotica. Recent vonden:

- Sidhu e.a.¹¹² in een *S. epidermidis* stam – geïsoleerd in de voedingsindustrie – een plasmide (pST6) met het *qacB* gen naast een, weliswaar incompleet, β -lactamase genen houdend transposon Tn552. In een vervolgstudie vonden zij in 19 van de 78 (24%) benzalkoniumresistente *Staphylococcus* isolaten plasmiden die hybridiseerden met zowel *qacA/B* als met *blaZ* probes¹¹¹
- Jeong e.a.¹¹⁴ in een carbapenemase producerende *Pseudomonas aeruginosa* isolaat een klasse 1 integron dat *qacF* bevatte naast *bla_{VIM-2}* en *bla_{OXA-3}*, *aacA4* en *aadAI* (aminoglycoside R-genen) en *catB3* (chlooramfenicol resistentie). Het integron lag op een plasmide en kon worden overgedragen aan *Escherichia coli*
- Johnson e.a.¹¹⁵ in een vogel-pathogene *Escherichia coli* stam een klasse 1 integron op een plasmide met daarin resistentiegenen voor QACs, zilver, tetracycline, aminoglycosiden, trimethoprim en β -lactam antibiotica. Het plasmide kon door conjugatie worden overgedragen aan diverse *Escherichia coli* stammen en aan *Salmonella enterica*
- Pal e.a.¹¹⁶ in een review van alle openbare, volledige bacteriële genomesequenties dat *qacEAI* op plasmiden vaak voorkomt samen met antibioticaresistentiegenen en, in het algemeen, dat bacteriën met biocideresistentiegenen vaker antibioticaresistentiegenen dragen dan bacteriën zonder biocideresistentiegenen. Hoewel onder isolaten uit het milieu de combinatie van biocideresistentie- en antibioticaresistentiegenen op plasmiden maar zelden (< 0,7%)

voorkwam, was dat bij isolaten van mens en dier wel geregeld het geval (5-7%). Plasmiden met gecombineerde resistenties bleken bovendien vaker conjugatief te zijn

- Sun e.a.¹¹⁷ megaplasmiden bij een *Pseudomonas aeruginosa* (282-kb) en bij een *Pseudomonas putida* (409-kb) stam met daarop meerdere transposons met integronen met daarin genen die coderen voor resistentie tegen QACs, kwik, β -lactam antibiotica, quinolonen, aminoglycosiden, chlooramfenicol, sulfonamide en trimethoprim en enkele andere klassen antibiotica
- Buffet-Bataillon e.a.¹¹⁸ een epidemiologisch verband tussen een verminderde gevoeligheid voor QACs en voor cotrimoxazol onder 153 bacteriëmie isolaten van *Escherichia coli*
- He¹¹⁹ dat clonering van een SMR-klasse efflux pomp (*emmdR*-gen) van *E. cloacae* naar *Escherichia coli* de acceptor stam niet alleen verminderd gevoelig maakte voor benzalkoniumchloride maar ook voor quinolonen en trimethoprim
- Soumet e.a.⁸⁰ dat *Escherichia coli* stammen na adaptatie aan sub-MIC QACs niet alleen verminderd gevoelig waren geworden voor QACs, maar ook voor β -lactams, chlooramfenicol en quinolonen
- Maseda e.a.⁸² dat een in vitro geselecteerde, QAC-resistente mutant van *Serratia marcescens* ook verminderd gevoelig was voor fluoroquinolonen, tetracyclines en chlooramfenicol.

In een verzameling van ruim 1.600 klinische *Staphylococcus aureus* stammen zijn statistisch significante correlaties gevonden tussen hun MICs voor benzalkoniumchloride enerzijds en voor meerdere soorten quinolonen en voor het glycopeptide antibioticum vancomycine anderzijds.⁵⁸ De aanwezigheid van *qac* genen werd in deze studie niet onderzocht.

Ten slotte blijkt fenotypische adaptatie als biofilmvorming steeds te leiden tot een verminderde gevoeligheid van de in de biofilm ingekapselde bacteriën tegen zowel biociden als tegen antibiotica, een reeds lang bekend fenomeen.^{77, 120} Biofilms bestaande uit meerdere bacteriesoorten zijn vaak extra resistent tegen biociden inclusief QACs.¹²¹ Ook verminderde doorlaatbaarheid van de celwand kan zowel de effectiviteit van biociden als van antibiotica verminderen.¹²²

3.9 Is kruisresistentie met andere desinfectantia waargenomen?

Antwoord: ja.

Kruisresistentie tussen QACs en ander groepen desinfectantia komt voor bij diverse mechanismen van biocideresistentie. Verminderde permeabiliteit van de celwand, hetzij intrinsiek, hetzij verworven, maakt de bacterie minder gevoelig voor meerdere klassen desinfectantia.^{123,124} Resistentie als gevolg van acquisitie en/of verhoogde expressie van efflux pompen zal een dergelijk effect hebben, omdat efflux pompen vaak niet erg specifiek zijn.^{82,125,126} *Pseudomonas aeruginosa* stammen die door blootstelling in vitro resistent zijn gemaakt tegen QACs, blijken ook minder gevoelig voor chloorhexidine.¹²⁷ Ook in grotere populatiestudies blijkt de gevoeligheid voor QACs als benzalkoniumchloride goed te correleren met de gevoeligheid voor chloorhexidine.⁵⁸

3.10 Is kruisresistentie met bepaalde antibiotica waargenomen?

Antwoord: ja.

Zoals vermeld in paragraaf 3.6 vormen efflux pompen een van de belangrijkste mechanismen voor resistentie tegen QACs. De SMR-klasse efflux pompen hebben deels een beperkt substraatprofiel; zij zijn relatief specifiek voor QACs. Andere leden van dezelfde klasse en andere klassen efflux pompen hebben echter een breder substraatprofiel dan alleen de QACs. De meeste efflux pompen zijn ook in staat diverse groepen antibiotica naar buiten te transporteren en worden multidrug efflux pompen genoemd (zie tabel 2⁷⁷). De genen die coderen voor deze multidrug efflux pompen zijn meestal chromosomaal gebonden, terwijl de meer specifieke efflux pompen gecodeerd worden door genen (bijv. *qac* genen) die op extra-chromosomale mobiele elementen liggen.¹²⁸ Met name, aminoglycoside antibiotica, tetracyclines (plasmide gebonden *Tet*-genen coderend voor teracycline-specifieke efflux pompen uit de MFS klasse) en chlooramfenicol blijken door efflux pompen uit de cel verwijderd te kunnen worden. Ook macrolide antibiotica en verwante groepen als lincosamines en ketolides worden door bepaalde efflux pompen verwijderd. De chromosomaal gecodeerde multidrug efflux pompen NorA uit de MFS-klasse kunnen ook QACs exporteren uit de cel.

Tabel 2 Efflux pompen die resistentie verlenen tegen QACs.⁷⁷

Pompfamilie	Efflux eiwitten die QACs uitdrijven	Typische antibiotica substraten
Resistance Nodulation Division (RND)	YhiUV-TolC, AcrAB-TolC, MexAB-OprM, CmeABC, CmeDEF, SdeXY, OqxAB	Aminoglycosiden, β -lactams, Chloramphenicol, Erythromycine, Fluoroquinolonen, Novobiocine, Rifampine, Tetracyclines, Trimethoprim
Major Facilitator Superfamily (MFS)	QacA, QacB, NorA, NorB, MdeA, EmeA, MdfA	Aminoglycosiden, Chloramphenicol, Erythromycine, Fluoroquinolonen, Lincosamiden, Novobiocine, Rifampine, Tetracyclines
Multidrug And Toxic Compound Extrusion (MATE)	MepA, NorM, PmpM	Aminoglycosiden, Fluoroquinolonen
Small Multidrug Resistance (SMR)	QacE, QacE Δ 1, QacF, QacG, QacH, QacI, QacJ, smr, EmrE, SugE	Aminoglycosiden, Chloramphenicol, Erythromycine, Tetracyclines

Dat geldt ook voor de RND-klasse multidrug efflux pomp AcrAB, en voor de MATE-klasse NorM en MepA pompen. Dat betekent dat er sprake is van kruisresistentie met antibiotica indien dergelijke efflux systemen tot verhoogde expressie komen of zich via horizontale gen transmissie verspreiden onder eerder gevoelige bacteriesoorten.¹²⁸ Bij *Staphylococcus aureus* is kruisresistentie vastgesteld tussen quaternaire ammoniumverbindingen en quinolonen.^{129,130}

3.11 Heeft resistentie tegen QACs klinische betekenis gehad?

Antwoord: ja.

Met enige regelmaat vinden (pseudo-)uitbraken plaats veroorzaakt door gecontamineerde QAC-oplossingen, waarbij meestal sprake is van externe contaminatie van gebruikso oplossingen. De meeste contaminaties vinden plaats met mycobacteriën, met *Serratia marcescens* en met vertegenwoordigers uit de groep van zogenaamde glucose-niet-fermenterende Gramnegatieve staven, zoals verschillende soorten *Pseudomonas* en *Burkholderia*. Kenmerkend voor deze soorten zijn hun natuurlijke habitatten in de vrije natuur – vooral in waterrijke niches –, hun sessiele groeiwijze (in biofilms) op voedingsarme plaatsen, hun intrinsieke resistentie tegen diverse klassen antibiotica en hun relatieve resistentie tegen desinfectantia.¹³¹ De laatste uitbraak met QAC-resistente micro-organismen in de gezondheidszorg werd in 2003 gerapporteerd. Maar ook buiten de zorgsector kan QAC-resistentie in verband worden gebracht met ziekte. Zo werd in 1998-1999 een uitbraak van listeriose in de USA – met 108 ziektegevallen, 14 sterfgevallen en 4 gevallen van abortus – veroorzaakt door een *L. monocytogenes* type 4b die resistent was tegen benzalkoniumchloride. De stam bezat een plasmide met resis-

tenticassette *bcrABC* in een transposon en werd terug getraceerd naar een fabriek waar hotdogs werden gemaakt.¹³² Sindsdien zijn er nog ten minste negen uitbraken met dit type gerapporteerd.¹³³ Dergelijke QAC-resistente stammen worden in de voedingsindustrie regelmatig gevonden, maar onderzoek naar de associatie met het gebruik van QAC-verbindingen in deze industrietak is beperkt voorhanden. In een Spaanse worstenfabriek waar QACs als oppervlaktedesinfectans werden gebruikt, isoleerde men over een periode van twee jaar veertien stammen van *L. monocytogenes* behorend tot vijf verschillende PFGE kloons. Alle waren benzalkoniumchloride-resistent. Twee van deze kloons waren eerder aangetroffen in een slachthuis van dezelfde firma en vier kloons waren van het MLST 121, een ST type dat persistent voorkomt in diverse landen.⁸⁹

3.12 Heeft coresistentie met antibiotica klinische betekenis?

Antwoord: ja.

Infecties en uitbraken met bacteriën die multiresistent zijn tegen diverse klassen antibiotica treden in toenemende mate op. Veelal worden de gevoeligheden van dergelijke stammen voor QACs niet bepaald (noch voor andere desinfectantia). Incidentele waarnemingen, zoals boven gemeld, laten zien dat gecombineerde toepassingen van antibiotica en van QACs in de humane en veterinaire sectoren aan de orde van de dag zijn en dat er dus sprake is van selectiedruk door beide groepen antibacteriële middelen in die sectoren. De relatieve bijdragen van resistentie tegen beide groepen middelen aan het ontstaan of bestrijden van een klinisch probleem is (nog) niet vast te stellen. In een recente Nederlandse studie naar de genoomsamenstelling van 96 *L. monocytogenes* isolaten van patiënten met meningitis bleek sterfte het sterkst gecorreleerd te zijn met de aanwezigheid van een *qacH* gen op een nieuw plasmide, dat ongeveer twintig jaar geleden in de *Listeria* populatie moet zijn binnengekomen. Het risico op sterfte of blijvende restverschijnselen is sindsdien sterk toegenomen (van 27% naar 62%). De aanwezigheid van dit *qacH* gen was sterk geassocieerd met resistentie tegen benzalkoniumchloride en met hogere MICs van de stammen tegen amoxicilline en gentamicine.¹³⁴

3.13 Heeft kruisresistentie van QACs met antibiotica praktische gevolgen?

Antwoord: onbekend.

Veelal wordt nog gesteld dat kruisresistentie van QACs met antibiotica nog geen praktische gevolgen heeft gehad. Het is niet wetenschappelijk vastgesteld of en, zo ja, in welke mate het gebruik van desinfectantia heeft bijgedragen aan de sterke opkomst van resistentie tegen antibiotica over de laatste decaden. Ook is niet bekend of en, zo ja, in welke mate het gebruik van antibiotica heeft geleid tot verminderde gevoeligheid van pathogene bacteriesoorten voor QACs. Om vast te stellen of coresistentie berust op één mechanisme, c.q. er sprake is van kruisresistentie, en hoe de samenhang is tussen de waargenomen resistenties dienen in voorkomende gevallen de mechanismen van resistentie tegen beide klassen antimicrobiële middelen te worden vastgesteld, alsmede de evolutionaire achtergronden van de daarbij betrokken genen.

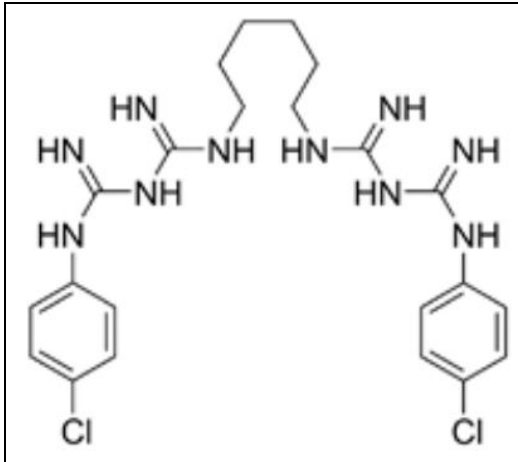
Chloorhexidine

4.1 Basisgegevens

Chloorhexidine is in 1950 ontwikkeld in Engeland door ICI, is sinds 1954 op de markt, en is in de patiëntenzorg zeer populair geworden, vooral de laatste twintig jaar. Chloorhexidine al dan niet in combinatie met cetrimide, in waterige oplossing of als tinctuur in 70% alcohol, is nu een van de meest gebruikte desinfectantia voor huid en slijmvliezen van patiënten en zorgverleners. Ook buiten de zorg wordt chloorhexidine toegepast, bijvoorbeeld in de vorm van gels voor handdesinfectie, in mondwaters, en andere consumentenproducten. In hoeverre chloorhexidine als desinfectans wordt toegepast in de landbouw en in de veterinaire sectoren is onbekend.

4.2 Chemie en werking als biocide

Chloorhexidine is een biguanide (zie figuur 4). Bij een neutrale pH is het een bivalent kation, dat als gluconaat vrij oplosbaar is in water.



Figuur 4 De chemische structuur van chloorhexidine.

De biocide werking van chloorhexidine omvat een breed scala aan micro-organismen, zowel Grampositieve (MICs [na 24 uur expositie] zijn meestal ± 1 mg/L) en Gramnegatieve bacteriën (MICs meestal ± 2 mg/L), fungi en virussen. Voor snelle biocidie (> 5 log reductie in KVE binnen 5 minuten) in vitro zijn hogere concentraties vereist (> 10 mg/L). De gebruikersconcentratie van een chloorhexidine-oplossing is derhalve van belang. Deze varieert in de praktijk tussen 0.1% (1.000 mg/L) en 4% (40.000 mg/l). De hoge concentratie in de gebruiksooplossing is echter niet dezelfde als de uiteindelijke concentratie op de plek van werking. Daar is hij lager door verdunning en door binding van chloorhexidine aan allerlei (organische) materialen in het toepassingsgebied. In een studie vond men, direct na applicatie van 2% chloorhexidine op de huid, minder dan 0,01% (100 mg/L) werkzame stof ter plekke terug.¹³⁵

De biocide werkzaamheid van chloorhexidine berust op binding van het product aan de negatief geladen cytoplasmamembranen (bij Gramnegatieve bacteriën ook aan de buitenmembraan) en opname in de cel.¹ Bij lage concentraties remt chloorhexidine enzymen in de membranen en bevordert het de doorlaatbaarheid van die membranen, waardoor groeiremming optreedt. Bij hogere concentraties coaguleert chloorhexidine cytoplasmawitten, wordt de membraanpotentiaal (*proton motive force*) opgeheven en valt het membraangebonden enzym *ATPase* stil, waardoor de cel dood gaat en biocidie optreedt. Een lage zuurgraad in het milieu en de aanwezigheid van anionen (onder meer hard water, zepen, carbonaten) en/of fosfolipiden (serum) verminderen de werkzaamheid van chloorhexidine.

4.3 Is er sprake van intrinsieke resistentie tegen chloorhexidine?

Antwoord: ja.

Chloorhexidine is van nature minder werkzaam tegen gisten en schimmels dan tegen bacteriën, terwijl mycobacteriën wel in hun groei worden geremd maar niet worden gedood door chloorhexidine en bacteriesporen er geheel resistent tegen zijn.¹

Sommige soorten Gramnegatieve bacteriën zijn intrinsiek minder gevoelig, c.q. hebben hogere MICs (10-100 mg/L), zoals *Proteus* spp, *Providencia* spp, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas* spp en ander glucose-niet-fermenterende staven, zoals *Acinetobacter baumannii*.¹³⁶

4.4 Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke resistentie?

Intrinsieke resistentie berust veelal op verminderde binding aan en doorlaatbaarheid van de celwand van deze micro-organismen voor chloorhexidine. De samenstelling en elektrische lading van de celwand is dan anders dan gebruikelijk, bijvoorbeeld lipide-rijke celwanden bij mycobacteriën, dichter en minder negatief geladen LPS in de buitenmembranen bij *Pseudomonas aeruginosa*.

Ook efflux pompen blijken bij te dragen aan de intrinsieke resistentie tegen chloorhexidine, bijvoorbeeld bij *Acinetobacter baumannii* en *Staphylococcus aureus*.

Groeiwijze in de vorm van biofilms leidt tot sterk verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine, een fenomeen dat is waargenomen bij *Serratia marcescens*, *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*, *Proteus*, *Klebsiella* en *Escherichia coli*. Biofilms met dergelijke multiresistente stammen zijn in het algemeen moeilijk te verwijderen van oppervlakken.¹³⁷

4.5 Is er sprake van verworven resistentie?

Antwoord: ja.

Expositie aan chloorhexidine in vitro blijkt voor chloorhexidine verminderd gevoelige varianten op te kunnen leveren, een fenomeen dat is gevonden bij *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* en *Serratia marcescens*.^{138,139}

Expositie van *Salmonella typhimurium* aan gebruiksklare, chloorhexidinehoudende consumentenproducten leverde ook varianten op met verminderde gevoeligheid (zij het reversibel) voor het desinfectans. Herhaalde expositie van *Porphyromonas gingivalis* aan sub-MIC chloorhexidine leverde eveneens stammen op met verminderde gevoeligheid voor het desinfectans.¹⁴⁰ Stapsgewijze expositie van *Campylobacter jejuni* en *Campylobacter coli* aan toenemende concentraties chloorhexidine leverde ook een verminderde gevoeligheid op die stabiel bleek, gepaard ging met veranderingen in de membraan en met activatie van efflux pompen.⁹⁹ Het is echter nog niet goed voorspelbaar of en wanneer mutanten ontstaan in dergelijke experimenten. Ook onder klinische omstandigheden blijken chloorhexidine verminderd gevoelige stammen soms wel en soms niet op te duiken.

In Taiwan nam in de periode 1990 tot 1995 het percentage *Staphylococcus aureus* stammen (allemaal MRSA) met verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine (MIC ≥ 4 mg/L) toe van <5% tot >40%, waarna het stabiel op dat niveau is gebleven tot het einde van de observatieperiode in 2005. *qacA/B* genen werden gevonden bij 55% van de stammen met verminderde chloorhexidine gevoeligheid, eerst bij één MRSA kloon, maar later bij zeven verschillende klonen.¹⁴¹ In een Schots centrum werd na introductie van washandjes met chloorhexidine op de IC géén verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine aangetoond en bleven alle MRSA's vrij van *qac* genen.¹⁴² In een recente casus werd daarentegen tijdens het gebruik van chloorhexidine bij een patiënt selectie vastgesteld van een voor chloorhexidine verminderd gevoelige variant van MRSA (een USA300 type), gebaseerd op het verwerven van een plasmide waarop het *qacA* gen aanwezig was.¹⁴³ Hetzelfde werd recent gerapporteerd voor een *Klebsiella oxytoca* stam bij een patient met diabetische voetinfectie behandeld met topicale chloorhexidine compressen.¹⁴⁴

In een Zweedse studie bleek de intensiteit van het gebruik van chloorhexidine per ziekenhuisafdeling geassocieerd met verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine.¹⁴⁵

4.6 Welke mechanismen spelen een rol bij verworven resistentie?

Genen die coderen voor effluxpompen blijken geselecteerd te worden met de jaren van gebruik van desinfectantia, vooral *qac* genen (*A/B* en *smr*) die coderen voor efflux pompen.⁹¹ Ook werd *smr* vaker aangetroffen onder klinische isolaten van *Staphylococcus aureus* naarmate patiënten in het verleden vaker stafylokokken huidinfecties hadden doorgemaakt.¹⁰⁴ Expositie van MRSA aan chloorhexidine induceert de expressie van *qacA/B* genen in vitro. Klinische MRSA isolaten

met *qac* genen hebben gemiddeld hogere MICs voor chloorhexidine. Bij *Pseudomonas* zijn ook veranderingen in de eiwitsamenstelling van de buitenmembraan gevonden als grondslag voor de verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine.¹³⁸

In een multicenter studie in Azië bleken meer dan 50% van de MRSA isolaten uit 1998/1999 al *qacA/B* of *smr* positief.⁹¹ In Zweden bleken een verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine en *qac* genen meer voor te komen onder *S. epidermidis* stammen die een nosocomiale infectie hadden veroorzaakt dan onder isolaten uit de commensale huidflora.¹⁴⁶ In Denemarken werden in het tijdperk voorafgaand aan de introductie van chloorhexidine géén *S. epidermidis* stammen uit bloed geïsoleerd die *qac* genen bevatten, terwijl heden ten dage meer dan de helft van de *S. epidermidis* bloedisolaten in dat land *qac* genen dragen.¹⁰⁶ Gebruik van chloorhexidine in de ziekenhuispraktijk sinds de jaren zestig is gepaard gegaan met selectie en verspreiding van *qac*-genen binnen deze soort.¹⁰⁷ Overigens blijken wereldwijd grote, onverklaarde verschillen te bestaan in het voorkomen van *qac*-genen in klinische isolaten van *Staphylococcus aureus*.

4.7 Is verworven resistentie ook overdraagbaar?

Antwoord: ja.

Resistentie tegen chloorhexidine bij *Staphylococcus aureus* is in het laboratorium met behulp van recombinant plasmiden overgedragen naar *Escherichia coli* en via transformatie naar *Streptococcus sanguis*.^{109,110} *Qac*-genen zijn in klinische isolaten eveneens aanwezig gebleken op diverse overdraagbare plasmiden, waarop ook resistentie tegen antibiotica voorkomt. Er zijn ook direct klinische observaties die wijzen op plasmide-gemedieerde overdracht van resistentie tegen chloorhexidine in de ziekenhuispraktijk.¹⁴³

4.8 Is coresistentie met resistentie tegen antibiotica waargenomen?

Antwoord: ja.

Stammen van *Pseudomonas*, *Proteus* en *Providencia* met verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine blijken meestal ook resistent tegen aminoglycoside, polymyxine en andere antibiotica.^{147,148}

Andersom zijn MRSA vaker minder gevoelig voor chloorhexidine dan MSSA. MRSA hebben vaker plasmide gecodeerde *qacA/B* genen dan contempo-

raïne MSSA stammen, die gevoeliger zijn voor chloorhexidine.^{105,149,150} Multiresistente *Enterococcus* spp. blijken vrijwel allemaal te beschikken over efflux pompen die ook biociden naar buiten transporteren.¹⁵¹

In een verzameling van ruim 1600 klinische *Staphylococcus aureus* stammen zijn significante correlaties gevonden tussen hun MICs voor chloorhexidine en die voor benzalkoniumchloride, quinolonen en, in mindere mate, voor β -lactam en macrolide antibiotica.⁵⁸ In een kleine (n=52) collectie *Pseudomonas* stammen (verschillende soorten) geïsoleerd uit slachthuizen werd echter geen significante correlatie tussen MICs voor chloorhexidine en die voor antibiotica gevonden.¹⁵² In een collectie van 53 *Staphylococcus aureus* stammen die resistent waren tegen meticilline in combinatie met hoge resistentie tegen mupirocine bleek de gevoeligheid voor chloorhexidine sterk verminderd (MIC₉₀=16mg/L) en geassocieerd met de aanwezigheid van efflux pompen (*qac* en *nor* gecodeerd). In aanwezigheid van serumalbumine was de MBC₅₀ zelfs 256 mg/L.¹⁵³

De chloorhexidine MICs van onafhankelijke isolaten van de wereldwijd succesvolle multiresistente *Klebsiella pneumoniae* kloon ST 258 zijn hoger dan die voor ander klonen van deze soort.¹⁵⁴ De verminderde gevoeligheid was niet geassocieerd met de expressie van *qac*-genen en moet derhalve op andere mechanismen berusten. In een andere studie blijken carbapenem-resistente *Klebsiella pneumoniae* wel vaak *qac* genen te bevatten en dragerschap van *qac* genen geassocieerd met verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine.¹⁵⁵

Een multiresistente stam van *Pseudomonas aeruginosa*, die een uitbraak van infecties veroorzaakte in een Japans ziekenhuis, was chloorhexidine resistent. De stam bleek een nieuw integron te bezitten met daarop resistentiegenen tegen β -lactams en aminoglycosiden. Het mechanisme van de resistentie tegen chloorhexidine werd helaas niet onderzocht.¹⁴⁸

Kort durende exposities van een *Burkholderia lata* stam aan chloorhexidine in vitro leidde tot verhoogde expressie van buitenmembraan eiwitten waaronder ABC transporter eiwit, hetgeen gepaard ging met een verminderde gevoeligheid voor bepaalde antibiotica.¹⁵⁶

4.9 Is kruisresistentie met andere desinfectantia waargenomen?

Antwoord: ja.

Pseudomonas aeruginosa stammen die resistent zijn gemaakt tegen QACs door expositie in vitro blijken ook minder gevoelig voor chloorhexidine.¹²⁷ Expositie van een *Acinetobacter baylyi* stam aan sub-MBC concentraties van chloorhexidine leidde tot verminderde gevoeligheid voor chloorhexidine zelf en tot vermin-

derde gevoeligheid voor zuurstof radicalen, passend bij een response van de bacterie tijdens oxidatieve stress.¹⁵⁷ Daarbij komt dat in grotere populatie studies blijkt dat de gevoeligheid voor chloorhexidine goed correleert met de gevoeligheid voor quaternaire ammonium verbindingen, in het bijzonder benzalkonium-chloride.⁵⁸

4.10 Is kruisresistentie met bepaalde antibiotica waargenomen?

Antwoord: ja.

Bij *E. faecalis* stammen die resistent zijn tegen verschillende antibiotica en tegen chloorhexidine blijkt remming van efflux pomp EfrAB met EDTA de gevoeligheid voor antibiotica én die voor chloorhexidine sterk te verhogen.¹⁵¹ Kennelijk verlaagt EfrAB onder normale omstandigheden de intracellulaire concentratie van beide soorten stoffen. Klinische stammen die resistent zijn tegen meerdere antibiotica zijn vaak ook verminderd gevoelig voor biociden. Deze combinatie van resistentie tegen biociden en antibiotica wordt buiten een klinische setting zelden of niet gevonden.

4.11 Heeft resistentie tegen chloorhexidine klinische betekenis gehad?

Antwoord: ja.

Gebruik van chloorhexidine bij de bestrijding van MRSA in een ICU werkte niet tegen een *qacA/B* positieve MRSA kloon (ST 239) die zich zelfs beter kon verspreiden na de introductie van dagelijkse chloorhexidine behandelingen van MRSA-positieve patiënten. Andere MRSA kloons, zonder *qacA/B* genen, werden wel succesvol bestreden. De MBC van de ST239 was driemaal hoger (78 mg/L) dan die van de andere stammen (26 mg/L).¹⁵⁸

Frequent gebruik van chloorhexidine voor desinfectie van het perineum leidde in een studie tot selectie van chloorhexidine-resistente *Providencia*, *Proteus* en *Pseudomonas*, en leidde vervolgens tot urineweginfecties met deze resistente stammen.¹⁵⁹ De stammen waren ook resistent tegen diverse antibiotica. Het probleem bleef beperkt tot de afdelingen waar deze vorm van desinfectie werd toegepast.

Met enige regelmaat vinden (pseudo-)uitbraken plaats veroorzaakt door gecontamineerd chloorhexidine oplossingen, waarbij meestal sprake is van externe contaminatie van gebruikoplossingen van chloorhexidine. De meeste contaminaties vinden plaats met bacteriën uit de groep van zogenaamde glucose-

niet-fermenterende Gramnegatieve staven, zoals verschillende soorten *Burkholderia*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Achromobacter* en *Stenotrophomonas*. Kenmerkend voor deze soorten zijn hun natuurlijke habitatten in de vrije natuur – vooral in waterrijke niches – hun sessiele groeiwijze (in biofilms) op voedingsarme plaatsen, hun intrinsieke resistentie tegen diverse klassen antibiotica en hun relatieve resistentie tegen desinfectantia.¹³¹ De laatste uitbraak werd in 2003 gerapporteerd. In een studie op Trinidad bleken 11/180 (6%) monsters van desinfectans oplossingen gecontamineerd met *Pseudomonas* spp.. Steeds ging het om chloorhexidine-houdende oplossingen.¹⁶⁰

4.12 Heeft coresistentie met antibiotica klinische betekenis?

Antwoord: ja.

Infecties en uitbraken met bacteriën die multiresistent zijn tegen diverse klassen antibiotica treden in toenemende mate op. Veelal worden de gevoeligheden van dergelijke stammen voor chloorhexidine niet bepaald (noch voor andere desinfectantia). Incidentele waarnemingen, zoals boven gemeld, laten zien dat gecombineerde toepassing van antibiotica en van chloorhexidine aan de orde van de dag is in de patiëntenzorg en dat er dus sprake is van selectiedruk van beide groepen antibacteriële middelen. De relatieve bijdragen van resistentie tegen beide groepen middelen aan het ontstaan of bestrijden van een klinisch probleem is niet vast te stellen. In één geval ging de bestrijding van MRSA op een ICU mank, omdat eradicatie van een voor chloorhexidine verminderd gevoelige MRSA kloon niet lukte.¹⁵⁸

4.13 Heeft kruisresistentie van chloorhexidine met antibiotica praktische gevolgen?

Antwoord: onbekend.

Om vast te stellen of coresistentie berust op hetzelfde mechanisme, c.q. sprake is van kruisresistentie, dienen in voorkomende gevallen de mechanismen van resistentie tegen beide klassen antimicrobiële middelen te worden vastgesteld.

PS. Er wordt al enige tijd gewaarschuwd voor het risico op resistentievorming als gevolg van het toenemend gebruik van chloorhexidine in de gezondheidszorg.¹⁶¹⁻¹⁶³

Zilver

5.1 Basis gegevens

Zilver is een (transitie)metaal dat van nature in mineralen en ertsen in de bodem voorkomt. De mens gebruikt het van oudsher voor een grote verscheidenheid aan toepassingen, zoals de vervaardiging van gebruiksvoorwerpen, sierraden en munten. Van recentere datum is het gebruik in de fotografie en in elektronica. De geschatte wereldwijde mijnbouwproductie bedroeg in 2012 24.000 ton.¹⁶⁴

Het metaal bezit goed gedocumenteerde antimicrobiële eigenschappen tegen een breed spectrum van micro-organismen.¹⁶⁴⁻¹⁶⁶ In die hoedanigheid werd de stof al toegepast door de oude Grieken voor de behandeling van zweren en wonden en bij de conservering van voedsel en water. Vóór de introductie van antibiotica in de jaren '40 van de vorige eeuw was het wellicht de belangrijkste antimicrobiële stof.¹⁶⁴ Nog steeds wordt ze gebruikt in een brede reeks van medische toepassingen vanwege zijn werkzaamheid bij lage concentraties en de relatief lage toxiciteit voor menselijke cellen. Er zijn veel verschillende formuleringen op de markt¹⁶⁶, onder meer zilvernitraatoplossingen en zilverhoudende zalf die vaak tevens andere antimicrobiële stoffen bevat, zoals sulfadiazine (een sulfonamide) of chloorhexidine. De behandeling van brandwonden en (met diabetes samenhangende) chronische wonden vormt hun belangrijkste toepassingsgebied.¹⁶⁴⁻¹⁶⁸ Voor hetzelfde doel zijn tegenwoordig ook (nano)zilverhoudende, antimicrobiële kompressen in gebruik. Daarnaast worden zilverpreparaten ingezet in de oogzorg ter voorkoming van infecties. Medische hulpmiddelen en implantaten, zoals katheters

en hardkleppen worden geregeld voorzien van een antimicrobiële coating op basis van zilver om de vorming van biofilms te voorkomen. Zilver wordt in ziekenhuizen en elders ook gebruikt voor de desinfectie van drink-, bad- en zwembadwater en bij de bestrijding van *Legionella* in warmwatervoorzieningen. In de tandheelkunde werden tot voor kort grote hoeveelheden zilver gebruikt in amalgaam, een legering die voor circa 35% uit zilver bestaat.¹⁶⁷ Deze toepassing staat echter los van de antimicrobiële eigenschappen van het metaal.

De laatste jaren heeft het gebruik van antimicrobieel zilver ook buiten de geneeskunde een grote vlucht genomen. Met verschillende doeleinden (voorkomen van infecties, conservering, geurbestrijding) wordt zilver toegevoegd aan uiteenlopende producten, zoals cosmetica, producten voor persoonlijke verzorging, textiel, keukengerei, huishoudelijke apparatuur, kinderspeelgoed, bouwmaterialen, etc.¹⁶⁶ Veelal is het zilver gebonden aan polymeren, vaak in de vorm van nanodeeltjes. Producten met ‘nanozilver’ vormen momenteel de grootste groep binnen de commerciële ‘nanoproducten’.¹⁶⁴ Vorderingen in de productietechnieken van nanodeeltjes, in impregnatietechnieken en polymeertechnologie stimuleren deze trend en dragen bij aan een hogere effectiviteit, een langere werkingsduur en lagere toxiciteit voor de mens van het antimicrobiële zilver.¹⁶⁶

5.2 Chemie en werking als biocide

Het antimicrobiële werkingsmechanisme van zilver is al tientallen jaren onderwerp van wetenschappelijk onderzoek. Het is echter nog niet volledig opgehelderd. Dat geldt in het bijzonder voor de werking van nanodeeltjes van zilver. De werking van zilver berust op de aanwezigheid van vrije Ag^+ -ionen.¹⁶⁴ Zij vervangen de waterstof in de SH-groepen van eiwitten aan het oppervlak van microorganismen onder de vorming van zilver-zwavelbanden. Hierdoor blokkeren het elektronentransport en de ademhaling. De membraanpotentialaal (*proton motive force*) stort in. Door de aantasting van de celmembraan dringen zilverionen door in het cytoplasma, waar ze verdere schade aanrichten door binding aan nucleïezuren en de inactivering van enzymen. Ook stimuleren ze de vorming van zeer schadelijke reactieve zuurstofradicalen (ROS). Het hele proces leidt uiteindelijk tot de dood van de microbiële cel.¹⁶⁴

De verhoogde activiteit van zilver in nanovorm is vermoedelijk toe te schrijven aan een hogere afgifte van zilverionen, effectiever aflevering van deze ionen aan kleine oppervlakken en een hogere productie van schadelijke, reactieve zuurstofradicalen.¹⁶⁶ Daarnaast speelt de aard van het ‘*capping agent*’ een rol, dat bij de productie van de nanodeeltjes gebruikt wordt om te voorkomen dat de deeltjes

te groot worden of gaan samenklonteren.¹⁶⁴ Toegevoegde polymeren kunnen de werking verder versterken.¹⁶⁶

De antimicrobiële werking hangt verder af van de omstandigheden, zoals de temperatuur, de zuurgraad, de aanwezigheid van halogeenionen (chlor, broom en jood) en bij nanodeeltjes ook van de aanwezigheid van divalente kationen. Zilverionen binden snel aan eiwitten en vormen complexen met vrije chloride-, fosfaat- en sulfaationen. Daarom is voor langdurige antimicrobiële werking een langzame maar gestage afgifte van zilverionen nodig.¹⁶⁸

De werkelijke bijdrage van zilverpreparaten en zilverhoudende kompressen aan de preventie van wondinfecties en het herstel van wonden is wetenschappelijk omstreden. Een gepubliceerde randomised controlled trial (RCT) en twee Cochrane reviews¹⁶⁹⁻¹⁷¹ concludeerden dat er onvoldoende bewijs is voor een dergelijke bijdrage. In reactie daarop is een internationaal consensus document gepubliceerd, waarin de positieve kanten van wondbehandeling met zilverhoudende kompressen worden benadrukt.^{172,173}

5.3 Is er sprake van intrinsieke resistentie tegen zilver?

Antwoord: ja.

Over intrinsieke resistentie tegen zilver is in de wetenschappelijke literatuur maar beperkt informatie te vinden. Zilver en nanozilver werken tegen een breed scala aan Gramnegatieve en Grampositieve bacteriën en virussen¹⁶⁴, maar zijn minder effectief tegen bacteriesporen, mycobacteriën en cysten van protozoën¹⁶⁶. Grampositieve bacteriën, zoals *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* en *Streptococcus* spp. blijken minder gevoelig te zijn dan Gramnegatieve bacteriën, als *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* en *Campylobacter* spp.¹⁷⁴⁻¹⁷⁸ Toevoeging van zilver aan bodems bevordert de abundantie van Grampositieve soorten en mycobacteriën.¹⁷⁹

5.4 Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke resistentie?

De intrinsieke ongevoeligheid van mycobacteriën en bacteriesporen voor zilver berust op geringe permeabiliteit van de celvelop. Dat geldt ook voor de verminderde gevoeligheid van de Grampositieve ten opzichte van de Gramnegatieve bacteriën. De eerstgenoemde heeft een celwand die bestaat uit een dikke laag van peptidoglycaan. Deze belet zilverionen en nanodeeltjes van zilver de cytoplasmamembraan te bereiken en in het cytoplasma door te dringen.^{176-178,180, 181} Daarnaast beschikken sommige bacteriën ook van nature over effluxpompen die

binnengedrongen zilverionen weer uit de cel kunnen verwijderen. Dat geldt bijvoorbeeld voor het wildtype van *Escherichia coli*.¹⁸² Sommige, uit mijnen afkomstige bacteriën, zoals *Pseudomonas stutzeri* stam AG259 en *Bacillus megaterium*, zijn zeer resistent tegen zilver. Ze kunnen extracellulair aanzienlijke hoeveelheden zilver accumuleren in de vorm van nanodeeltjes van metallisch zilver of zilver sulfide.^{183,184} Deze eigenschap hoopt men te kunnen gebruiken voor de industriële productie van nanodeeltjes van zilver.¹⁸⁴

5.5 Is er sprake van verworven resistentie?

Antwoord: ja.

Bacteriën die van nature gevoelig zijn voor zilver, kunnen zowel door mutaties als door HGT resistentiemechanismen verwerven.¹⁸⁵ Dat is vooral bekend van Gramnegatieve bacteriën.¹⁸⁶ De Grampositieve *Staphylococcus aureus* lijkt niet in staat om resistentiemechanismen te verwerven via mutaties of HGT.¹⁸⁷

5.6 Welke mechanismen spelen een rol bij verworven resistentie?

Verschillende onderzoekers zijn erin geslaagd om in het laboratorium *Escherichia coli* bacteriën resistent (MIC > 1024 ppm) te maken tegen zilvernitraat door hen stapsgewijs aan steeds hogere concentraties van het middel bloot te stellen. De resistente bacteriën bleken over chromosomaal gecodeerde effluxpompen te beschikken die door mutaties in regelgenen verhoogd tot expressie werden gebracht.^{182,186,188,189} De resistente bacteriën hadden tevens een verminderde membraanpermeabiliteit door het ontbreken van bepaalde porines in hun buitenste membraan.^{182,186} Dat zijn uit eiwitten bestaande, met water gevulde kanaaltjes, waardoor hydrofiele verbindingen, zoals zilverionen, naar binnen kunnen diffunderen. De resistentie berustte dus op een combinatie van een verminderde passieve instroom van zilverionen en een verhoogde, actieve uitstroom.

De effluxpomp in *Escherichia coli* blijkt genetisch gecodeerd te worden door een cluster van genen, het *cus*-systeem.^{74,186,188,190,191} Het omvat genen die coderen voor de onderdelen van de pomp en de bijbehorende regelgenen. Het systeem is voornamelijk betrokken bij de koperhuishouding, maar het kan ook zilverionen verwijderen. Het is ook in andere, klinisch belangrijke Gramnegatieve bacteriën aangetroffen (*Citrobacter freundii* en *Shigella sonnei*). Het lukte onderzoekers echter niet bij deze bacteriën zilverresistentie te induceren, ondanks hun bezit van het *cus*-systeem.¹⁸⁶

Vaker dan door mutaties lijken Gramnegatieve bacteriën hun resistentiegenen tegen zilver te verwerven via HGT. Althans, in veel gevallen blijken resistentiegenen te liggen op mobiele genetische elementen, zoals plasmiden en ICEs. Het eerst ontdekte voorbeeld betreft de bacterie *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. De brandwondenafdeling van een ziekenhuis in Boston moest in de jaren '70 worden gesloten, nadat enkele patiënten waren overleden als gevolg van een besmetting met deze bacterie.¹⁹² De bacterie bleek een bepaald type plasmide (pMG101) te bevatten met genen voor resistentie tegen zilver en tegen enkele antibiotica. De resistentie tegen zilver bleek toe te schrijven aan een cluster van genen, het zogenoemde *sil*-genencluster, dat veel overeenkomst vertoont met het chromosomale *cus*-cluster van de coli-bacterie.¹⁸⁶ Het bevat genen die coderen voor twee verschillende effluxpompen, een gen dat codeert voor een eiwit dat in de periplasmatische ruimte zilverionen kan binden en regelgenen die de aanwezigheid van zilver kunnen detecteren en de productie van de effluxpompen en het absorberende eiwit aansturen.^{166,167,186,193} Het eiwit fungeert mogelijk als een eerste verdedigingslinie in de periplasmatische ruimte, die zilverionen bindt vóór ze het cytoplasma kunnen binnendringen.^{164,167} Vermoedelijk kan het eiwit echter ook zilverionen naar een van de effluxpompen transporteren en zo de werking van de pomp versterken.¹⁸⁶

Plasmiden met *sil*-genen zijn ook gevonden in andere Gramnegatieve bacteriën, in het bijzonder in bacteriën van het *Enterobacter cloacae* complex^{186,194-196}, maar ook in *Klebsiella*¹⁹⁶, *Escherichia coli*¹⁹⁶ en *Pseudomonas aeruginosa*¹⁹⁷.

Ook andere bacteriën, zoals *Pseudomonas stutzeri* en *Acinetobacter baumannii* blijken niet nader gedefinieerde, op plasmiden gelokaliseerde zilverresistentiegenen te bezitten.¹⁹⁸⁻²⁰⁰

Onlangs zijn in een Amerikaans ziekenhuis twee extreem resistente stammen gevonden van *Enterobacter cloacae* complex en *Klebsiella pneumoniae*.¹⁹⁶ Microscopisch onderzoek onthulde dat blootstelling van deze stammen aan zilverpreparaten resulteerde in de aanwezigheid van metallisch zilver in de polymeerlaag buiten de cel. Dit doet vermoeden dat de bacteriën het vermogen hebben verworven om ionisch zilver te reduceren en neer te laten slaan.¹⁹⁶

5.7 Is verworven resistentie ook overdraagbaar?

Antwoord: ja.

De resistentie die door mutaties in het chromosomale DNA is verkregen, is alleen maar verticaal, dat wil zeggen op de nakomelingen, overdraagbaar. Resistentiegenen die op plasmiden liggen zijn daarentegen ook horizontaal overdraag-

baar. Uit experimenten in het laboratorium is inderdaad gebleken dat de eerder genoemde zilverresistente stam van *Salmonella enterica* serovar Typhimurium zijn zilverresistentie via conjugatie kon overdragen op zilveragevoelige stammen van *Salmonella* serovar Typhimurium en van *Escherichia coli*. Deze laatste bleek de verworven resistentie ook weer te kunnen doorgeven aan een andere *Escherichia coli*-stam.¹⁹² Daarbij moet wel worden aangetekend dat het betrokken plasmide (pMG101) tot een type behoort dat optimaal wordt doorgegeven bij temperaturen beneden de 25°C. Boven 37°C wordt de doorgifte geremd. Dat vermindert het risico op verspreiding binnen en tussen bacteriesoorten in een patiëntenpopulatie.¹⁹⁶ Daar staat tegenover dat resistentiegenen tegen zilver ook op tal van andere typen plasmiden liggen.^{196,200} Ook de plasmidegebonden zilverresistentie van een stam van *Acinetobacter baumannii* bleek in het laboratorium via conjugatie overdraagbaar op een zilveragevoelige stam van *Escherichia coli*.²⁰⁰ De ontvanger vertoonde daarna een effectievere zilvereffect.¹⁶⁶

In het verleden is wel gevonden dat verworven resistentie niet stabiel is en weer snel verloren gaat in afwezigheid van zilver^{200,201}, maar recent onderzoek duidt erop dat de resistentie door het plasmidegeboden *sil*-systeem vermoedelijk niet snel verloren gaat in afwezigheid van zilver. In resistente *Enterobacter cloacae* en *Klebsiella pneumoniae* bleek het bezit van dit systeem met minimale fitness kosten gepaard te gaan.¹⁸⁶ Een zilverresistente *Salmonella enterica* serovar Senftenberg bleek *sil*-genen constitutief tot expressie te brengen ongeacht de aan- of afwezigheid van zilver.²⁰² De stam was afkomstig van een legkippenstal waar naar verwachting hooguit sporen van zilver aanwezig zijn.

5.8 Is coresistentie met resistentie tegen antibiotica waargenomen?

Antwoord: ja.

Er zijn diverse voorbeelden van plasmiden die behalve genen voor resistentie tegen zilver tevens resistentiegenen tegen een of meerdere antibiotica bevatten. De zilverresistente *Salmonella enterica* serovar Typhimurium van de brandwondenafdeling van het ziekenhuis in Boston bevatte op zijn pMG101-plasmide resistentiegenen tegen zilver, tellutiet, kwik, ampicilline, chloramphenicol, tetracycline, streptomycine en sulphonamides. (McHughes 1975 en Gupta 1999). Het resistentieprofiel bleek in zijn geheel via conjugatie overdraagbaar op een colibacterie.

Recent Portugees onderzoek aan diverse klonen van een verwante serovar van *Salmonella enterica* bracht aan het licht dat *sil*-genen algemeen aanwezig zijn en bij sommige klonen samen met resistentiegenen tegen antibiotica op het

chromosoom liggen en bij andere klonen samen met resistentiegenen tegen antibiotica op niet-overdraagbare plasmiden liggen.^{203,204}

Bij het *Enterobacter cloacae* complex bleek de aan- of afwezigheid van een plasmide een belangrijk verschil te zijn tussen een avirulent stam afkomstig van een plant en een pathogene stam die bij drie patiënten bloedvergiftiging had veroorzaakt. Het plasmide bleek zowel functionele *sil*-genen te bevatten als resistentiegenen tegen diverse antibiotica.¹⁹⁵

Twee uit een met amalgaam gevulde kies geïsoleerde bacteriën van het *Enterobacter cloacae* complex bleken eveneens *sil*-genen te bevatten en resistent te zijn tegen ampicilline, erythromycine en clindamycine.¹⁹⁴ De *sil*-genen bleken op een plasmide te liggen, maar er werd niet onderzocht of de antibioticaresistentiegenen op hetzelfde plasmide lagen.

Bij een stam van *Acinetobacter baumannii* die zowel resistent was tegen tien antibiotica als tegen dertien metalen bleken de zilver resistentiedeterminanten en de antibioticaresistentiegenen vermoedelijk op verschillende plasmiden te liggen.²⁰⁰ Niettemin worden bij deze bacteriesoort resistentiegenen tegen metalen en antibiotica geregeld op hetzelfde plasmide aangetroffen.²⁰⁰

In Zweden vond enkele jaren terug een uitbraak van ziekenhuisinfecties plaats door een ESBL-producerende *Klebsiella pneumoniae*. De bacterie bleek een groot plasmide te bezitten dat naast resistentiegenen voor diverse groepen van antibiotica ook resistentiegenen bevatte tegen biociden (quaternaire ammoniumverbindingen) en zware metalen, waaronder zilver.²⁰⁵ Het plasmide kon overgedragen worden op *Escherichia coli*, maar bleek daarin niet stabiel aanwezig te blijven. Uit recent onderzoek in hetzelfde land bleek dat *sil*-genen relatief vaak aanwezig zijn in *Escherichia coli* bacteriën die ESBLs produceren.^{174,206,207}

Een in het laboratorium tegen zilver resistent gemaakte stam van *Mycobacterium smegmatidis* bleek een verhoogde resistentie te hebben tegen isoniazid. Het mechanisme van deze coresistentie werd echter niet opgehelderd.²⁰⁸

5.9 Is kruisresistentie met andere desinfectantia waargenomen?

Antwoord: ja.

Het chromosomale *cus*-systeem van *Escherichia coli* kan behalve zilverionen ook koperionen de cel uit pompen.⁷⁴

5.10 Is kruisresistentie met bepaalde antibiotica waargenomen?

Antwoord: ja.

Het chromosomale *cus*-effluxsysteem van *Escherichia coli* bezit een grote specificiteit voor zilver- en koperionen.^{74,209} Niettemin zijn er aanwijzingen gevonden dat het systeem mogelijk ook de antibiotica fosfomycine²¹⁰ en ethionamide, en de stoffen dinitrofenol en dinitrobenzeen²⁰⁹ uit de bacteriecel kan pompen.⁶⁶

In diverse onderzoeken is bij *Enterobacteriaceae* een verband gevonden tussen zilverresistentie en een verminderde gevoeligheid voor cephalosporines en/of carbapenems.^{174,182} Dit hangt vermoedelijk samen met een vermindering van de permeabiliteit van de buitenste membraan door een vermindering van het aantal porines (met water gevulde eiwitkanaaltjes), via welke zowel zilverionen als de hydrofiele antibiotica de bacteriecel kunnen binnendringen. Vermindering van het aantal porines in de buitenste membraan is een bekend resistentiemechanisme tegen hydrofiele cephalosporines en carbapenems, vooral bij ESBL-producerende enterobacteriën.²¹¹

5.11 Heeft resistentie klinische betekenis gehad?

Antwoord: ja.

Sinds de jaren '60 van de vorige eeuw is in de medisch wetenschappelijke literatuur geregeld melding gemaakt van de vondst van Gramnegatieve, zilverresistente bacteriën bij patiënten.^{192,194-197,201,212-220} Op de brandwonden-afdeling van een ziekenhuis in Boston, zijn in de jaren '70 van de vorige eeuw drie patiënten overleden door een *Salmonella* bacterie die zowel resistent was tegen zilver als tegen diverse antibiotica.¹⁹²

Ondanks deze meldingen is de klinische betekenis van de zilverresistentie omstreden. Sommige wetenschappers wijzen erop dat zilverresistentie een zeldzaam verschijnsel is, ondanks het feit dat zilverpreparaten als decennia worden gebruikt in de medische praktijk.²²¹⁻²²⁶ Een enkele onderzoeker wijst er bovendien op dat zilverresistentiegenen vooral worden aangetroffen in bacteriën uit het *Enterobacter cloacae* complex, die zelden als primaire pathogeen betrokken zijn bij chronische wonden.²²² Bovendien is de resistentie van een zodanig niveau dat zilverkompressen gewoon werkzaam blijven.^{222,224}

Andere wetenschappers vinden deze skepsis onterecht.^{164,167,227} In een Amerikaans onderzoek bleek dat tien van zeventig uit de darmen van patiënten in een

ziekenhuis geïsoleerde bacteriën resistentiegeen tegen zilver bevatten.¹⁶⁷ In een recent Duits onderzoek bleek 63% van de 164 klinische isolaten van *Enterobacter cloacae* complex in het bezit van resistentiegeen tegen zilver.¹⁹⁵ De aanwezigheid van een zilverresistentie dragend plasmide bleek een belangrijk verschil te zijn tussen een avirulente stam afkomstig van planten en een virulente stam die betrokken was bij een uitbraak van bloedvergiftiging in drie patiënten. Daarnaast bleken de genen vooral aanwezig te zijn in subspecies die frequent ziekenhuisinfecties veroorzaken.¹⁹⁵ Zeer recent meldden onderzoekers in de V.S. de vondst van twee stammen van *Enterobacter cloacae* complex en *Klebsiella pneumoniae* met extreem hoge zilverresistentie, die zich met veel commercieel verkrijgbare zilverkompresen niet laten bestrijden.¹⁹⁶

Onderzoek naar het vóórkomen van zilverresistentie bij bacteriën buiten het medisch domein is amper verricht. In het milieu zijn zilverresistente bacteriën aangetroffen in zilverbijproducten¹⁹⁸, effluent van zilververwerkende industrie³⁵⁵ en in kustwater³⁵⁶. In *Escherichia coli*-bacteriën afkomstig uit wilde vogels werden geen zilverresistentiegeen aangetroffen.²⁰⁶ Toevoeging gedurende zestig dagen van nanodeeltjes van zilver aan een membraanbioreactor met actief slib resulteerde in een sterk verhoogd vóórkomen van zilverresistentiegeen in de bioreactor.²²⁸ De activiteiten van de bacteriën in het slib en de waterkwaliteit van het effluent van de reactor veranderden echter niet. In een ander onderzoek met nagebootste micro-ecosystemen werd het vermogen van zilvernano-deeltjes getest om bij relevante blootstellingsniveaus de antibioticaresistentie van natuurlijke bacteriepopulaties in mariene sedimenten te verhogen.²²⁹ De uitkomst was negatief in tegenstelling tot de resultaten uit eerder laboratoriumonderzoek. Dit suggereert dat de invloed van zilvernano-deeltjes op natuurlijke bacteriepopulaties zich moeilijk laat voorspellen en voor elk milieu apart moet worden onderzocht.²³⁰ Sporadisch is zilverresistentie ook aangetroffen in de voedselketen.^{202,231}

Ondanks het verschil in zienswijze wat de klinische betekenis van de zilverresistentie betreft, is de breed gedragen opvatting onder deskundigen dat monitoring van de ontwikkeling van zilverresistentie noodzakelijk is.^{174,221-225} Dat geldt des te meer gezien het snel groeiende aantal producten met nanodeeltjes van zilver dat voor consumenten op de markt komt.

5.12 Hebben kruis- en coesistentie met antibiotica klinische betekenis?

Antwoord: mogelijk.

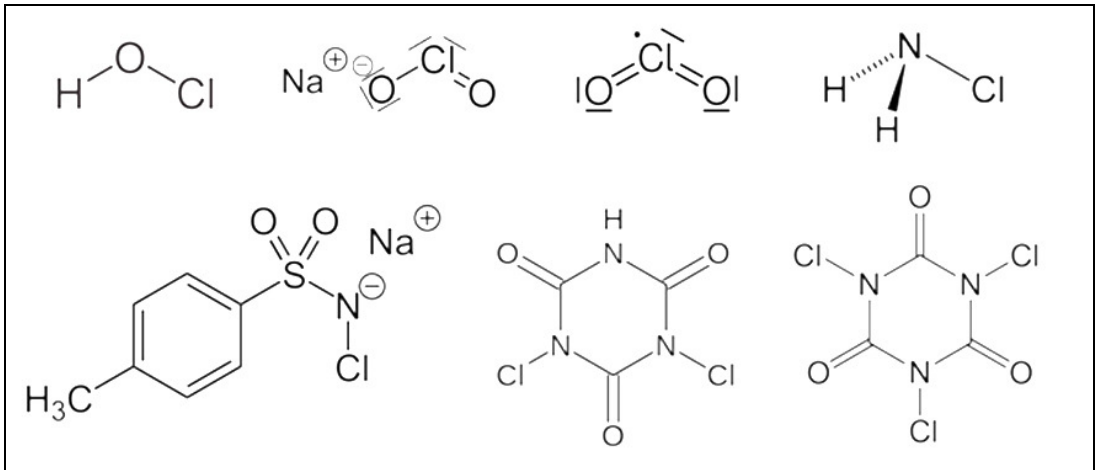
Kruisresistentie tussen zilver enerzijds en cephalosporines en carbapenems anderzijds door het verlies van porines in de buitenste membraan bij Gramnegatieve bacteriën vormt een punt van zorg.^{174,182} Tevens wordt geregeld coesistentie waargenomen tussen zilverresistentie en β -lactamaseproductie in Gramnegatieve bacteriën.^{174,206,207,232} Het gebruik van zilver, zowel in het ziekenhuis als elders, kan daarom resistentie tegen klinisch belangrijke antibiotica in de hand werken.²²⁵

Chloor en reactieve chloorverbindingen

6.1 Basis gegevens

Chloor werd in 1774 ontdekt door de Zweedse chemicus Carl Wilhelm Scheele. Hij dacht echter dat het om een zuurstofverbinding ging. Pas in 1810 ontdekte de Britse scheikundige Humphry Davy dat het om een nieuw chemisch element ging. De desinfecterende eigenschappen van chloor werden in Engeland en Frankrijk ontdekt rond 1800 en de eerste voorstellen voor chlorering van drinkwater stammen uit die tijd. Tijdens de Londense cholera-epidemie in 1852 gebruikt de arts John Snow chloor voor de desinfectie van drinkwater. Vanaf het eind van de negentiende eeuw werd chlorering van drinkwater in steeds meer landen ingevoerd.²³³ In de jaren '70 van de vorige eeuw bleek chlorering van drinkwater echter gevaarlijk te gaan met de vorming van voor de gezondheid schadelijke bijproducten, zoals chloroform, door de reactie van het chloor met van nature in het water aanwezige organische stoffen.²³⁴ De laatste jaren gaan drinkwaterbedrijven daarom steeds meer over op andere manieren van drinkwaterdesinfectie, onder meer met UV-straling of met ozon. Drinkwaterchlorering wordt inmiddels in Nederland niet meer toegepast.²³³

Tegenwoordig worden naast elementair chloor (Cl_2) diverse reactieve chloorverbindingen voor uiteenlopende desinfectiedoeleinden gebruikt (figuur 5). Onderscheid kan worden gemaakt tussen stoffen met een O-Cl verbinding en stoffen met een N-Cl verbinding. Tot de eerste behoren natriumhypochloriet (NaOCl , in water opgelost aangeduid als bleekwater, waarbij waterstofhypochlo-



Figuur 5 Structuurformules van reactieve chloorverbindingen; boven v.l.n.r.: waterstofhypochloriet, natriumchloriet, chloordioxide, monochlooramine; onder v.l.n.r.: chlooramine-T, dichloorisocyanuurzuur en trichloorisocyanuurzuur.

riet [onderchlorigzuur, HOCl] ontstaat), calciumhypochloriet ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$), aangezuurd natriumchloriet (ASC, NaOCl_2) en chloordioxide (ClO_2). Tot de tweede groep behoren de chlooramines (o.a. monochlooramine, NH_2Cl) en de chlooramides (di- en trichloorisocyanuurzuur [$\text{C}_3\text{Cl}_{2/3}\text{N}_3\text{O}_3$], Chlooramine-T [$\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNO}_2\text{SNa}$]). De verschillende verbindingen hebben elk hun eigen voor- en nadelen, waardoor het ene middel meer geschikt is voor de ene toepassing en het andere middel meer voor de andere. Zo is de werking van monochlooramine en chloordioxide minder pH-afhankelijk dan die van waterstofhypochloriet en worden ze ook minder snel gedeactiveerd door aanwezig organisch materiaal, waardoor ze bij drinkwaterchlorering minder schadelijke bijproducten vormen en bovendien beter in biofilms penetreren. Hun grotere fotostabiliteit maakt di- en trichloorisocyanuurzuur beter geschikt voor desinfectie van zwembadwater in de buitenlucht dan waterstofhypochloriet.

Chloor en reactieve chloorverbindingen behoren in Nederland en wereldwijd tot de meest gebruikte desinfectiemiddelen. In België, waar het gebruik van biociden sinds enige jaren wordt geregistreerd, was natriumhypochloriet met 1749 ton in 2011 het meest gebruikte desinfectiemiddel. Het gebruik van calciumhypochloriet bedroeg 30 ton, dat van tri- en dichloorisocyanuurzuur 207, respectievelijk 56 ton en dat van chloordioxide <2 ton.²³⁵ De middelen worden op grote schaal toegepast voor de desinfectie van drinkwater, zwembadwater, koelwater en afvalwater. Daarnaast worden ze zeer veel gebruikt voor de desinfectie van harde oppervlakken in de gezondheidszorg, de levensmiddelensector en de particuliere sector. Andere toepassingen betreffen de desinfectie van endoscopen, antibacteri-

eel mondwater, wortelkanaaldesinfectie²³⁶, de decontaminatie van pluimveekar- kassen, groente en fruit en de bestrijding van mastitis bij melkvee. Behalve als desinfectiemiddelen worden reactieve chloorverbindingen ook in grote hoeveel- heden gebruikt als schoonmaak- en als bleekmiddel in de (papier)industrie.

Micro-organismen komen niet alleen in aanraking met reactieve chloorver- bindingen doordat de mens ze doelbewust tegen hen inzet. De natuur bedient zich van dezelfde middelen. In het immuunsysteem van de mens vormen neutro- fiele granulocyten de eerste verdediging tegen bacteriële infecties. Deze witte bloedcellen nemen de binnengedrongen bacteriën in zich op via fagocytose en doden hen vervolgens met waterstofhypochloriet dat zij enzymatisch vormen uit waterstofperoxide en chloride-ionen.^{237,238} Ook in fruitvliegen en inktvissen blij- ken reactieve chloorverbindingen een belangrijke rol te spelen in pathogene en symbiontische interacties tussen bacteriën en hun gastheren. Men vermoedt dat de productie van waterstofhypochloriet een algemeen mechanisme is voor de beheersing van bacteriepopulaties op epitheliale oppervlakken van dieren.²³⁹ Het vermogen om enzymatisch waterstofhypochloriet te produceren is eveneens breed verspreid onder planten, schimmels en bacteriën, zowel in het terrestrische als het aquatische milieu. Waarschijnlijk kunnen bijna alle bacteriën in hun natuurlijke omgeving met reactieve chloorverbindingen in aanraking komen.²³⁹

6.2 Chemie en werking als biocide

Reactieve chloorverbindingen zijn werkzaam tegen Grampositieve en Gramne- gatieve bacteriën, virussen, schimmels, algen en protozoën. In hoge concentratie hebben ze tevens een sporicide werking. Het werkingsmechanisme is niet precies bekend, maar berust op de krachtige oxiderende werking van het chloor dat in al deze verbindingen niet volledig is gereduceerd. In water vormen chloor en diverse reactieve chloorverbindingen waterstofhypochloriet. Dit is een krachtig desinfectans, zelfs bij concentraties lager dan 0,1 mg/L.²⁴⁰ Tussen pH 4 en pH7 domineert het niet gedissocieerde zuur (HOCl), boven pH9 het hypochlorietion (OCl⁻).²⁴¹ Beide worden aangeduid als 'vrij chloor'. Het ongedissocieerde zuur heeft echter een veel sterker antibacterieel effect dan het hypochlorietion. In aan- gezuurd natriumchloriet, dat in water chloorigzuur vormt en in chloordioxide, dat als gas in water oplost, heeft chloor een hogere oxidatiegraad. Deze verbindingen zijn daardoor (nog) sterkere oxidatoren dan de hypochlorietvormende stoffen.

Net als alle desinfectantia doden reactieve chloorverbindingen micro-orga- nismen waarschijnlijk door de gelijktijdige beschadiging van meerdere cellulaire componenten. Het werkingsmechanisme is niet exact bekend, maar varieert ver- moedelijk met de het soort micro-organisme, het type chloorverbinding en de

blootstellingscondities.^{239,241} De meeste onderzoeksgegevens duiden op de celmembraan als punt waar letale schade optreedt bij vegetatieve cellen. De sulfidegroepen van zwavelhoudende verbindingen, zoals de aminozuren cysteïne en methionine, worden het snelst geoxideerd door waterstofhypochloriet. Ook de stikstofgroepen (amines) in eiwitten kunnen worden geoxideerd. De veranderingen leiden ertoe dat eiwitten hun ruimtelijke structuur verliezen, gaan samenklonteren en worden afgebroken. Daarnaast reageren waterstofhypochloriet en chloramines, zij het trager, ook met nucleïnezuren en lipiden waardoor breuken in het DNA en membraanlekage kunnen optreden.²³⁹

De effectiviteit van de desinfectie hangt af van het micro-organisme dat moet worden bestreden, van het type chloorverbinding dat wordt gebruikt (oxidatietoestand van het chloor, molecuulgrootte, lading, vetoplosbaarheid) en van de omstandigheden waaronder de stof haar werk moet doen, zoals de temperatuur, lichtsterkte, de pH en de aanwezigheid van organisch materiaal.²⁴²

6.3 Is er sprake van intrinsieke of adaptieve resistentie tegen chloor?

Antwoord: ja.

Vergeleken met vegetatieve bacteriecellen zijn bacteriesporen verminderd gevoelig voor desinfectiemiddelen. Dat geldt ook voor reactieve chloorverbindingen.²⁴³ Mycobacteriën zijn relatief resistent tegen concentraties van reactieve chloorverbindingen die worden toegepast bij drinkwaterchlorering.²⁴⁴ Diverse *M. avium* stammen bleken 580-2.300 maal minder gevoelig voor chloor en 100-500 maal minder gevoelig voor chloordioxide te zijn dan een referentiestam van *Escherichia coli*.²⁴⁴ Dit verklaart de aanwezigheid van mycobacteriën in gechlloreerd drinkwater. *Mycobacterium chelonae*, *Bacillus subtilis* (vegetatieve cellen) en *Micrococcus luteus* zijn aangetroffen in endoscoopwassers ondanks dagelijkse desinfecties met chloordioxide.²⁴⁵⁻²⁴⁷ *Legionella pneumophila*²⁴⁸⁻²⁵⁰, *Methylobacterium*²⁵¹⁻²⁵³, *Helicobacter pylori*²⁵⁴ en Sphingomonas soorten²⁵⁵ zijn net als mycobacteriën in gechlloreerd drinkwater aan te treffen. De in Zuid-Oost Azië en Noord-Australië endemische pathogene bacterie *Burkholderia pseudomallei* is eveneens relatief ongevoelig voor chloor. Levensvatbare bacteriën van deze soort kunnen worden geïsoleerd uit water dat 1000 ppm vrij chloor bevat; dat is 1000 maal de concentratie waarmee in Australië drinkwater wordt gechlloreerd.²⁵⁶ Sommige stammen van *Pseudomonas aeruginosa* kunnen overleven in gechlloreerd zwemwater.²⁵⁷ Een verminderde gevoeligheid voor reactieve chloorverbindingen (vooral natriumhypochloriet) helpt bepaalde stammen van *Staphylococcus aureus*^{258,259} en *Salmonella*²⁶⁰ desinfecties te overleven in de

pluimveeverwerkende industrie. In een slachthuis is een *Arcobacter butzleri* stam aangetroffen die resistent is tegen gebruikconcentraties van natriumhypochloriet (200 mg/L actief chloor).²⁶¹ *Salmonella* Montevideo laat zich door twee minuten onderdompelen in een oplossing van natriumhypochloriet met 320 ppm chloor niet volledig van tomaten verwijderen.²⁶² Sommige onderzoekers vinden dat Gramnegatieve bacteriën gevoeliger zijn voor chloor dan Grampositieve.²⁶³,²⁶⁴ Andere melden dat het afhangt van de chloorverbinding die wordt gebruikt.²⁴²

Behandeling van drink- of afvalwater met reactieve chloorverbindingen blijkt verschuivingen in de bacteriële levensgemeenschap te veroorzaken in de richting van soorten met een verminderde gevoeligheid.²⁶⁵⁻²⁶⁹

6.4 Welke mechanismen spelen een rol bij intrinsieke en adaptieve resistentie?

Moeilijk doordringbare spore- en celwanden

De moeilijk doordringbare wand vormt de belangrijkste verklaring voor de relatief hoge resistentie van sporen tegen reactieve chloorverbindingen.²⁷⁰ Afscherming van het spore-DNA door kleine zuuroplosbare eiwitten en de dehydratie van de sporekern spelen waarschijnlijk ook een rol.²⁴³

Bij vegetatieve bacteriën is de structuur van de celwand eveneens medebepalend voor de resistentie tegen reactieve chloorverbindingen. Mycobacteriën danken hun relatief hoge resistentie aan hun dikke, wasachtige, mycolzuurbevattende celwand. Deze is bij chloorresistente stammen meer hydrofoob is dan bij chloorgevoelige.²⁷¹ De celwand van Gramnegatieve bacteriën bevat twee lipidehoudende membranen, die van Grampositieve bacteriën slechts één. Dat kan verklaren waarom de Gramnegatieve *Escherichia coli* gevoeliger is voor het lipofiele monochlooramine dan de Grampositieve *Staphylococcus aureus* en juist minder gevoelig voor het meer hydrofiele chlooramine-T.²⁴²

Trage groei en ruststadia

De beschikbaarheid van voedingsstoffen in het leefomgeving is van grote invloed op de gevoeligheid van bacteriën voor reactieve chloorverbindingen. Bacteriën die opgekweekt zijn of leven in een voedselarme omgeving zijn resistentier dan soortgenoten uit voedselrijke milieus. *Mycobacterium avium*, bijvoorbeeld, bleek circa tien maal resistentier voor chloor te zijn, wanneer hij in water was gekweekt in plaats van in een voedingsmedium.^{244,271} Dit hangt vermoedelijk samen met de veel lagere groeisnelheid in water. *Enterococcus faecalis* bleek

in de stationaire fase (de normale fase in water) tot 900 maal minder gevoelig voor natriumhypochloriet dan in de fase van exponentiële groei.²⁴⁰ Soortgelijke bevindingen zijn gedaan bij *Escherichia coli*²⁷², *Klebsiella pneumoniae*^{273,274} en *Legionella pneumophila*²⁷⁵. Dit is bijzonder relevant, omdat drinkwater en zwemwater voedselarm zijn. Bacteriën zijn daarom onder natuurlijke omstandigheden resistenter dan in kweekmedia in het laboratorium.^{272,275}

Stressvolle omstandigheden, zoals een tekort aan nutriënten of blootstelling aan hitte, hoge zoutconcentraties of desinfectiemiddelen, kunnen er toe leiden dat bacteriën overgaan in een rusttoestand met een lage stofwisseling. Deze wordt aangeduid als 'levensvatbare, maar niet kweekbare staat' (*viable but non-culturable state*, VBNC-staat), omdat de bacteriën in die gesteldheid niet langer kweekbaar zijn op gangbare kweekmedia, maar wel gedurende lange tijd het vermogen behouden om onder gunstige omstandigheden opnieuw tot leven te komen.²⁷⁶⁻²⁷⁹ *Legionella pneumophila* kan onder invloed van blootstelling aan reactieve chloorverbindingen deze toestand aannemen wat resulteert in een verdere vermindering van de gevoeligheid voor deze middelen.²⁸⁰⁻²⁸³ Ook andere bacteriesoorten, zoals *Burkholderia pseudomallei*²⁵⁶ en *Helicobacter pylori*^{284, 285} kunnen in deze toestand in gechlloreerd drinkwater overleven.

Sessiele levenswijze, biofilmvorming en aggregatie

Lage concentraties chloor (<1mg/L), zoals die in gechlloreerd zwem- en drinkwater aanwezig zijn, bevorderen dat planktonische bacteriën zich gaan vasthechten op een ondergrond. Hogere concentraties remmen dat proces juist.²⁸⁶ Een sessiele in plaats van een planktonische leefwijze kan bacteriën aanzienlijk minder gevoelig maken voor reactieve chloorverbindingen. Zo bleek uit onderzoek naar de gevoeligheid van *Escherichia coli* voor chloordioxide dat voor een 5-log reductie van het aantal bacteriën een ruim tien maal langere inwerktijd nodig was als de bacteriën niet gesuspenderd waren in water, maar gehecht waren op een stalen ondergrond. Op een ondergrond van ruw en poreus PVC bleek een 5-log reductie niet haalbaar.²⁸⁷ Bij *Klebsiella pneumoniae* bleek hechting op een glasoppervlak de gevoeligheid voor chloor met een factor 150 te verminderen.²⁸⁸ De afname in gevoeligheid kan voortvloeien uit een verminderd contact tussen desinfectiemiddel en bacteriecellen. Deze zijn immers niet meer aan alle kanten door vloeistof omgeven.

Een andere strategie waarmee bacteriën hun blootstelling aan schadelijke stoffen kunnen terugdringen, is door zich te omhullen met een moeilijk door-dringbare slijm laag van exopolymeren. In *Bacillus subtilis* wordt dat gestimuleerd door blootstelling aan subletale concentraties chloordioxide. De genen die

betrokken zijn bij de vorming van de benodigde exopolymeren, worden verhoogd actief onder invloed van een membraangebonden kinase dat reageert op aantasting van de membraanpotentialaal door chloordioxide.²⁸⁹ Twee uit een endoscoopwatter geïsoleerde bacteriën, een *Bacillus subtilis* en een *Micrococcus luteus*, die resistent waren tegen gebruikconcentraties van chloordioxide, kenmerken zich door een dikke laag van exopolymeren.^{246,247}

Pseudomonas aeruginosa wordt eveneens door lage concentraties chloordioxide aangezet tot de productie van exopolymeren.²⁸⁹ Terwijl gangbare chloorconcentraties (0,1-05 mg/L) in zwemwater zeer effectief zijn tegen 'gewone' stammen van deze bacterie, kunnen slijmvormende stammen in gechloreerd zwem- of drinkwater overleven.^{257,290-292} Dat opent de mogelijkheid dat chlorering van zwemwater selectiedruk oplevert die de verspreiding bevordert van slijmproducerende stammen met een verminderde chloorgevoeligheid.²⁹² Ook bij sommige stammen van *Escherichia coli*²⁹³ en *Staphylococcus aureus*²⁵⁹ blijkt de productie van een extracellulaire slijmlaag gepaard te gaan met een verminderde gevoeligheid voor reactieve chloorverbindingen.

Het combineren van een sessiele levenswijze en de uitscheiding van exopolymeren leidt tot de vorming van biofilms. Het is algemeen bekend dat bacteriën die in biofilms groeien (het wordt steeds meer beschouwd als de natuurlijke leefwijze van bacteriën in het milieu), zich aanzienlijk moeilijker met desinfectiemiddelen laten bestrijden. *Pseudomonas aeruginosa* is een goede biofilmvormer op elk type oppervlak, ook in zwembaden. Daar kan hij in biofilms groeien in aanwezigheid van 1-3 mg/L chloor en zijn shockbehandelingen met 10 mg/L chloor nodig voor een sterke reductie van het aantal bacteriën in de biofilm.²⁹⁴ Andere onderzoekers melden dat na zeven dagen blootstelling aan 15 mg/L nog steeds levende bacteriën worden aangetroffen.²⁹⁵ Uit laboratoriumtests blijkt dat in biofilms levende *Pseudomonas aeruginosa* bacteriën tot 10.000 maal minder gevoelig zijn voor chloor dan planktonisch levende cellen.²⁹⁶ Bij reiniging van zwemwater met een shock behandeling worden mogelijk alleen de planktonisch levende bacteriën gedood. De min of meer intact blijvende biofilm kan dan als reservoir voor de bacterie fungeren, van waaruit tussen de shockbehandelingen door telkens rekolonisatie van de waterkolom kan plaatsvinden.²⁹² De waarnemingen suggereren dat het huidige zwemwaterbeheer niet adequaat is voor de bestrijding van biofilms van *Pseudomonas aeruginosa*.²⁹²

Pseudomonas-soorten kunnen ook biofilms vormen in drinkwaterleidingen. Douterelo e.a. vonden dat ze vooral betrokken zijn bij de initiële hechtingsfase aan de wand en dat in een later stadium andere bacteriesoorten gaan domineren.²⁹⁷ In een laboratoriumonderzoek bleken drinkwaterbacteriën in een biofilm 1,6-40 maal minder gevoelig voor chloor dan in vrij levende vorm.²⁹⁸ Bacteriën

kunnen ook beschutting vinden in biofilms die (mede) door andere bacteriën zijn gevormd.²⁹⁹⁻³⁰³ Multispecies biofilms blijken nog resistenter te zijn tegen reactieve chloorverbindingen dan single-species biofilms.^{121,298,304}

De *Legionella*-bacterie vormt eveneens biofilms in distributiesystemen van leidingwater.³⁰⁵ Om de bacteriën in de biofilm te inactiveren zijn 4 tot 10 maal hogere concentraties nodig dan om planktonische bacteriën te inactiveren.²⁴⁸ Bij dezelfde concentratie is een langere inwerktijd nodig. Dit hangt samen met de moeite die het desinfectans heeft om in de biofilm door te dringen. Monochlooramine en chloordioxide kunnen dat beter dan chloor.³⁰⁶ Gematigde concentraties reactieve chloorverbindingen kunnen de *Legionella*-bacteriën in de biofilm in de VBNC-toestand doen overgaan.^{282,307} De biofilms kunnen worden begraasd door amoeben. De amoeben nemen daarbij de *Legionella*-bacteriën op. In de amoeben of de cysten van amoeben laten de bacteriën zich nog lastiger bestrijden. Bovendien worden de geïnfecteerde amoeben zelf ook resistenter tegen de chloorverbindingen.²⁸¹ Dit alles zorgt ervoor dat de *Legionella*-bacterie niet volledig effectief met reactieve chloorverbindingen (of met andere desinfectiemethoden) te bestrijden is.^{249,250,308} Na elke shockbehandeling met hoge concentraties reactieve chloorverbindingen vindt na enige tijd rekolonisatie plaats van het waterleidingennet vanuit achtergebleven resten biofilm, VBNC-cellen of geïnfecteerde amoeben. Sommige onderzoekers zien aanwijzingen dat het frequent gebruik van reactieve chloorverbindingen resulteert in de selectie van minder gevoelige *Legionella* stammen³⁰⁹, andere echter niet.^{249,306,307} Ook in het koelwater van kerncentrales laat *Legionella* zich niet definitief verwijderen.³¹⁰ De bacterie *Burkholderia pseudomallei* bedient zich van dezelfde strategieën als *Legionella* om drinkwaterchlorering te overleven. In aanwezigheid van amoeben is honderd maal meer monochlooramine nodig voor een even effectieve desinfectie dan zonder deze protozoën.^{256,311}

Subletale concentraties van het in de levensmiddelenbranche veel gebruikte natriumhypochloriet blijken bij *Escherichia coli* veranderingen in de celvorm en de hydrofobiciteit van het celoppervlak te induceren en de bacterie aan te zetten tot de vorming van biofilms.³¹² Van *Salmonella*-bacteriën is aangetoond dat ze biofilms kunnen vormen op voedselcontactmaterialen, zoals plastic, en dan verminderd gevoelig zijn voor hypochloriet.³¹³

Hypochloriet wordt in de Verenigde Staten ook gebruikt voor decontaminatie van groenten en kiemgroenten, onder meer ter bestrijding van *Salmonella*. Hoge concentraties van >320 ppm chloor zijn echter onvoldoende om tomaten geheel van *Salmonella* te ontdoen.³¹⁴ Bij alfalfa zaad kan zelfs de aanbevolen behandeling met 20.000 ppm chloor gedurende 15 minuten het risico op infectie niet helemaal wegnemen.³¹⁵⁻³¹⁷ Dat wordt vooral toegeschreven aan het feit dat de

bacterie zich schuilhoudt tussen plantenweefsel waar geen letale concentraties kunnen doordringen. De kiemplanten zijn bovendien bedekt met biofilms die mogelijk beschutting bieden aan de ziekteverwekker.³¹⁸ Uitbraken van salmonellose door besmette (kiem)groenten komen dan ook geregeld voor ondanks de desinfectie met hypochloriet.^{315,316,319}

Een verwante strategie die eveneens berust op de vorming van exopolymeren is het samenklonteren van bacteriën in aggregaten. Ook dat leidt tot een afname van de gevoeligheid voor reactieve chloorverbindingen. Isolaten van *Staphylococcus aureus* afkomstig van net geslachte kalkoenen in een pluimvee verwerkend bedrijf bleken 100 maal gevoeliger voor 1 mg/L vrij chloor dan 'endemische' isolaten die verderop in de verwerkingsketen de fabrieksapparatuur hadden gekoloniseerd.²⁵⁸ Sommige van de endemische isolaten bleken ook bestand tegen 2 mg/L vrij chloor. De hogere resistentie van de endemische isolaten bleek samen te hangen met de vorming van een extracellulaire slijmlaag en hun vermogen om samen te klonteren.²⁵⁹ In een ander onderzoek bleek dat endemische stammen slechts een gering aandeel hadden in isolaten die afkomstig waren van de inkomende vogels. Onder isolaten afkomstig van de karkassen ná de pluk vormden ze echter de meerderheid. Dit duidt erop dat chloorresistente, samenklonterende stammen worden uitgeselecteerd in de verwerkingsketen.³²⁰ Het samenklonterend fenotype bleek gecorreleerd te zijn met de aanwezigheid van een bepaald plasmide.

Klebsiella pneumoniae bacteriën die onder voedselarme omstandigheden (zoals in drinkwater) werden gekweekt, vormden kleinere cellen dan bacteriën die onder voedselrijke condities groeiden.³²¹ De kleinere cellen klonterden bovendien samen tot aggregaten van 10 tot >10.000 cellen (gemiddeld 90) wat gepaard ging met de vorming van exopolymeren. De kleinere cellen hadden ook een afwijkende lipidensamenstelling van hun membranen. Na blootstelling aan monochlooramine bleek 33% van de SH-groepen geoxideerd te zijn in de voedselarm opgroeide cellen en 80% in de cellen die onder rijke omstandigheden waren gekweekt.³²¹ In een onderzoek aan de verwante *Klebsiella oxytoca* werd eveneens gevonden dat aggregaatvorming gepaard ging met een verminderde gevoeligheid voor chloor.³²² Datzelfde geldt voor *Salmonella*.

Intracellulaire fysiologische mechanismen

Bacteriën hebben per definitie geen verweer tegen letale doses biociden. De hierboven geschetste overlevingsvormen kunnen de blootstelling aan chloor echter deels van zijn dodelijke uitwerking ontdoen. Bovendien staan bacteriën nog andere verdedigingsmechanismen ter beschikking tegen reactieve chloorverbin-

dingen.²³⁹ Bacteriën beschikken over sensoren die beginnende schade kunnen detecteren en in reactie daarop herstelmechanismen in gang zetten.^{239,323,324} De belangrijkste mechanismen om oxidatieve stress tegen te gaan, zijn (een verhoogde) productie van catalases en peroxidases als ook van methionine sulfoxide reductases die geoxideerde SH-groepen weer kunnen reduceren. Andere belangrijke mechanismen zijn de verhoogde productie van chaperones en proteases die samenklontering en ophoping van beschadigde, niet meer herstelbare eiwitten voorkomen. Een derde groep mechanismen is gericht op de instandhouding van de voorraden van zwavel en zwavelhoudende aminozuren in de cel. Of ook DNA-reparatiemechanismen versterkt worden ingezet is niet duidelijk. DNA-schade lijkt bij reactieve chloorverbindingen van ondergeschikt belang. Waarschijnlijk is het reguliere mechanisme van DNA-herstel afdoende.²³⁹

Combinatie van verdedigingsstrategieën

Bacteriën kunnen zich gelijktijdig bedienen van meerdere verdedigingsstrategieën. De resistentie van een *Bacillus subtilis* isolaat uit een endoscoopwasser tegen gebruikconcentraties van chloordioxide liet zich niet volledig verklaren door de productie van exopolymeren, aggregaatvorming en de verhoogde productie van catalase. De onderzoekers vermoedden dat nog onbekende aanvullende intracellulaire mechanismen een rol spelen.²⁴⁷ Sommige wijzen erop dat de totale resistentie van een bacterie gelijk is aan het product van de resistentie-invloeden van de afzonderlijke mechanismen.²⁸⁸

6.5 Is er sprake van verworven resistentie?

Antwoord: niet aangetoond.

Het *Panel on Biological Hazards* van de EFSA heeft in 2008 vastgesteld dat er geen gepubliceerde gegevens zijn die erop duiden dat de (juiste) toepassing van vier stoffen voor de microbiële decontaminatie van pluimveekarkassen, waaronder chloordioxide en aangezuurd natriumchloriet, zal leiden tot het optreden van verworven resistentie tegen deze middelen.³²⁵ Een verminderde gevoeligheid van bepaalde stammen van *Methylobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa* en *Escherichia coli* voor hypochloriet of dichloorisocyanuurzuur kon evenmin worden gerelateerd aan de aanwezigheid van plasmiden of het optreden van mutaties in het chromosomale DNA.^{251,291,326} Mogelijk spelen vooral veranderingen in de expressie van bestaande genen een rol bij de omgang van bacteriën met stress door reactieve chloorverbindingen.³²⁶

6.6 Welke mechanismen spelen een rol bij verworven resistentie?

Verworven resistentie is niet aangetoond.

6.7 Is verworven resistentie ook overdraagbaar?

Antwoord: niet aangetoond.

Verworven resistentie is niet aangetoond.

6.8 Is coresistentie en/of kruisresistentie tegen andere desinfectantia of tegen antibiotica waargenomen?

Antwoord: ja.

Kruisresistentie tussen chloordioxide, waterstofperoxide en perazijnzuur is waargenomen in een isolaat van *Bacillus subtilis* dat afkomstig was uit een endoscoopwasser waarin chloordioxide als desinfectiemiddel werd gebruikt.²⁴⁶ De genoemde middelen hebben alledrie een sterk oxiderende werking. De mechanismen die aan de kruisresistentie ten grondslag liggen zijn echter niet precies bekend.²⁴⁷ Kruisresistentie tegen de in de levensmiddelenindustrie veel gebruikte biociden natriumhypochloriet en natriumnitriet is waargenomen in *Escherichia coli*³²⁷ en tussen ASC en trinatriumfosfaat, citroenzuur en perazijnzuur in *Listeria monocytogenes* en *Salmonella enterica*³²⁸. Effluxpompen en veranderingen in de hydrofobiciteit van het celoppervlak vormen de vermoedelijk de onderliggende verklaring.

In 2008 constateerde het *Biohazard Panel* van de EFSA dat er geen aanwijzingen waren dat de toepassing van vier middelen voor de microbiële decontaminatie van pluimveekarkassen, waaronder chloordioxide en ASC, bijdraagt aan de resistentie tegen antibiotica.³²⁵ Recent onderzoek heeft aangetoond dat ten minste in het laboratorium (herhaalde) blootstelling aan (toenemende) subletale concentraties chloor, ASC, hypochloriet of chloordioxide kan resulteren in een verminderde gevoeligheid van *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. en *Listeria monocytogenes* voor diverse antibiotica.^{312,329-331} Experimenten met kippenpoten hebben bevestigd dat toepassing van microbiële decontaminanten, waaronder ASC, de resistentie van op het vlees aanwezige *Escherichia coli* bacteriën voor bepaalde antibiotica kan verhogen.³³² De inductie of activering van effluxpom-

pen en veranderingen in de celwandpermeabiliteit worden als verklaringen genoemd.^{312,329}

Er zijn aanwijzingen dat drinkwaterchlorering eveneens kan bijdragen aan de resistentie tegen antibiotica.³³³ Sommige onderzoekers menen dat vooral (co)selectie daarbij een belangrijke rol speelt. Chlorering van drinkwater brengt verschuivingen teweeg in de aanwezige bacterieflora ten gunste van chloorresistente soorten. Deze bevatten tevens relatief vaak resistentiegenen tegen (bepaalde) antibiotica, zoals genen die coderen voor RND-effluxpompen.^{291,334-338} Daarnaast kunnen reactieve chloorverbindingen mogelijk ook antibioticaresistentie induceren. In een onderzoek aan *Acinetobacter baumannii* bleek blootstelling aan chloor te leiden tot een verhoogde expressie van antibiotica-resistentiegenen, waaronder genen voor effluxpompen.³³⁹ Verder zijn er aanwijzingen dat mutagene bijproducten van drinkwaterchlorering veranderingen in bacterieel DNA kunnen bewerkstelligen die de ontwikkeling van antibioticaresistentie in de hand werken.³⁴⁰⁻³⁴²

In zwemwater lijkt eveneens sprake te zijn van coselectie van antibiotica- en chloorresistentie. In een onderzoek naar de aanwezigheid van *Pseudomonas aeruginosa* op zwemhulpmiddelen van vinyl en schuim in Nederlandse openbare zwembaden (met gechloreerd zwemwater) werd de bacterie gedetecteerd in 19 van de 24 zwembaden op 47 van de 175 onderzochte objecten. Van de isolaten bleek 21% van de isolaten (intermediair) resistent te zijn tegen één of meer van twaalf geteste, klinisch relevante antibiotica, vooral imipenem en aztreonam.³⁴³

Decennialang onderzoek naar de effectiviteit van reactieve chloorverbindingen met betrekking tot de verwijdering van antibioticaresistente bacteriën uit afvalwater heeft wisselende bevindingen opgeleverd.^{344,345} Sommige onderzoekers melden dat chlorering het aandeel antibioticaresistente bacteriën in de overblijvende bacteriepopulatie aanzienlijk laten stijgen.^{346,347} Onduidelijk is of dit het gevolg is van inductie van resistentie of van selectie.³⁴⁶ Andere hebben gevonden dat slechts zes van de 125 onderzochte resistentiegenen relatief in aantal toenemen, dat de absolute aantallen aanzienlijk dalen en dat chlorering dus voornamelijk een reducerend effect heeft op de aanwezigheid van antibioticaresistentiegenen in afvalwater.³⁴⁸ Diverse onderzoekers melden de aanwezigheid van chloorresistente *Bacillus* soorten in met chloor behandeld afvalwater van varkenshouderijen. De bacteriën waren tevens resistent tegen een of meerdere van de onderzochte antibiotica.^{349,350} Onlangs vonden onderzoekers dat lage concentraties chloor in *Escherichia coli* de overdracht van antibioticaresistentiegenen via HGT kunnen bevorderen.³⁵¹ In aanwezigheid van ammonium werd chlooramine gevormd dat verantwoordelijk werd gehouden voor het stimulerend effect. Hoge concentraties chloor hadden juist een remmend effect. Andere

onderzoekers vonden in afwezigheid van ammonium een remmend effect van chloor op de HGT.³⁵²

6.9 Heeft resistentie klinische betekenis gehad?

Antwoord: ja.

Een verminderde gevoeligheid van bacteriën voor reactieve chloorverbindingen heeft ongetwijfeld bijgedragen aan uitbraken van infecties met pathogene bacteriën. Op het gebied van voedselveiligheid kunnen uitbraken worden genoemd van salmonellose door besmette (kiem)groente en fruit.³¹⁴⁻³¹⁶ De ongevoeligheid van biofilmvormende stammen van *Pseudomonas aeruginosa* voor chloor draagt bij aan ziektelast onder zwemmers door zwemmersoor (otitis externa) en folliculitis.^{292,343} Ook de ziektelast door desinfectansresistente en biofilmvormende bacteriën in drinkwater, zoals *Legionella*, *Mycobacterium avium* en *Pseudomonas aeruginosa* is aanzienlijk.^{353,354}

Literatuur

-
- 1 Al-Adham I, Haddadin R, Collier P. Types of microbicidal and microbistatic agents. In: Fraiese AP, Maillard JY and Sattar SA. Russell, Hugo & Ayliffe's Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization 5th edition. 5-70. Chichester: Wiley-Blackwell, 2013.
 - 2 APUA. Triclosan - White paper. Boston MA: Alliance for the Prudent Use of Antibiotics, 2011.
 - 3 Giuliano CA, Rybak MJ. Efficacy of triclosan as an antimicrobial hand soap and its potential impact on antimicrobial resistance: a focused review. *Pharmacotherapy* 2015; 35(3): 328-36.
 - 4 Gnatta JR, Pinto FM, Bruna CQ, Souza RQ, Graziano KU, Silva MJ. Comparison of hand hygiene antimicrobial efficacy: Melaleuca alternifolia essential oil versus triclosan. *Rev Lat Am Enfermagem* 2013; 21(6): 1212-9.
 - 5 Carey DE, McNamara PJ. The impact of triclosan on the spread of antibiotic resistance in the environment. *Front Microbiol* 2015; 5: 780.
 - 6 Bester K. Fate of triclosan and triclosan-methyl in sewage treatment plants and surface waters. *Arch Environ Contam Toxicol* 2005; 49(1): 9-17.
 - 7 Anger CT, Sueper C, Blumentritt DJ, McNeill K, Engstrom DR, Arnold WA. Quantification of triclosan, chlorinated triclosan derivatives, and their dioxin photoproducts in lacustrine sediment cores. *Environ Sci Technol* 2013; 47(4): 1833-43.
 - 8 Brausch JM, Rand GM. A review of personal care products in the aquatic environment: environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* 2011; 82(11): 1518-32.
 - 9 Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL. Urinary concentrations of triclosan in the U.S. population: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 2008; 116(3): 303-7.
-

- 10 Ferguson KK, Colacino JA, Lewis RC, Meeker JD. Personal care product use among adults in NHANES: associations between urinary phthalate metabolites and phenols and use of mouthwash and sunscreen. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2016; May 11.
- 11 Syed AK, Ghosh S, Love NG, Boles BR. Triclosan promotes *Staphylococcus aureus* nasal colonization. *MBio* 2014; 5(2): e01015.
- 12 Juncker JC. Uitvoeringsbesluit (EU) 2016/110 van de Commissie van 27 januari 2016 tot niet-goedkeuring van triclosan als bestaande werkzame stof voor gebruik in biociden voor productsoort 1. *Publicatieblad van de Europese Unie* 2016; L21: 86-7.
- 13 Jones GL, Muller CT, O'Reilly M, Stickler DJ. Effect of triclosan on the development of bacterial biofilms by urinary tract pathogens on urinary catheters. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57(2): 266-72.
- 14 Riemer C, Bamme T, Mok SW, Baier M. 3-Methyl-4-chlorophenol for prion decontamination of medical devices. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27(7): 778-80.
- 15 Morrissey I, Oggioni MR, Knight D, Curiao T, Coque T, Kalkanci A, e.a. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant subpopulations are uncommon in natural isolates of clinically-relevant microorganisms. *PLoS One* 2014; 9(1): e86669.
- 16 Holas O, Ondrejcek P, Dolezal M. Mycobacterium tuberculosis enoyl-acyl carrier protein reductase inhibitors as potential antitubercotics: development in the past decade. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2015; 30(4): 629-48.
- 17 Stickler DJ, Jones GL. Reduced Susceptibility of *Proteus mirabilis* to triclosan. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(3): 991-4.
- 18 Russell AD. Whither triclosan? *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(5): 693-5.
- 19 Heath RJ, White SW, Rock CO. Lipid biosynthesis as a target for antibacterial agents. *Prog Lipid Res* 2001; 40(6): 467-97.
- 20 Zhu L, Lin J, Ma J, Cronan JE, Wang H. Triclosan resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 is due to FabV, a triclosan-resistant enoyl-acyl carrier protein reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(2): 689-98.
- 21 Khan R, Lee MH, Joo HJ, Jung YH, Ahmad S, Choi JH, e.a. Triclosan Resistance in a Bacterial Fish Pathogen, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, is Mediated by an Enoyl Reductase, FabV. *J Microbiol Biotechnol* 2015; 25(4): 511-20.
- 22 Meade MJ, Waddell RL, Callahan TM. Soil bacteria *Pseudomonas putida* and *Alcaligenes xylooxidans* subsp. *denitrificans* inactivate triclosan in liquid and solid substrates. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 204(1): 45-8.
- 23 McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 1998; 394(6693): 531-2.
- 24 Ledder RG, Gilbert P, Willis C, McBain AJ. Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 ex-situ environmental and human isolates. *J Appl Microbiol* 2006; 100(5): 1132-40.
- 25 Suller MT, Russell AD. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(1): 11-8.
-

- 26 Fraise AP. Susceptibility of antibiotic-resistant cocci to biocides. *J Appl Microbiol* 2002; 92 Suppl: 158S-62S.
- 27 Karatzas KA, Webber MA, Jorgensen F, Woodward MJ, Piddock LJ, Humphrey TJ. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(5): 947-55.
- 28 Mima T, Joshi S, Gomez-Escalada M, Schweizer HP. Identification and characterization of TriABC-OpmH, a triclosan efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requiring two membrane fusion proteins. *J Bacteriol* 2007; 189(21): 7600-9.
- 29 Drury B, Scott J, Rosi-Marshall EJ, Kelly JJ. Triclosan exposure increases triclosan resistance and influences taxonomic composition of benthic bacterial communities. *Environ Sci Technol* 2013; 47(15): 8923-30.
- 30 Ciusa ML, Furi L, Knight D, Decorosi F, Fondi M, Raggi C, e.a. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40(3): 210-20.
- 31 Schmid MB, Kaplan N. Reduced triclosan susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(4): 1397-9.
- 32 Wand ME, Baker KS, Benthall G, McGregor H, McCowen JW, DeHeer-Graham A, e.a. Characterization of pre-antibiotic era *Klebsiella pneumoniae* isolates with respect to antibiotic/disinfectant susceptibility and virulence in *Galleria mellonella*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(7): 3966-72.
- 33 Skovgaard S, Nielsen LN, Larsen MH, Skov RL, Ingmer H, Westh H. *Staphylococcus epidermidis* isolated in 1965 are more susceptible to triclosan than current isolates. *PLoS One* 2013; 8(4): e62197.
- 34 Copitch JL, Whitehead RN, Webber MA. Prevalence of decreased susceptibility to triclosan in *Salmonella enterica* isolates from animals and humans and association with multiple drug resistance. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(3): 247-51.
- 35 Chen Y, Pi B, Zhou H, Yu Y, Li L. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Med Microbiol* 2009; 58(Pt 8): 1086-91.
- 36 Valenzuela AS, Benomar N, Abriouel H, Canamero MM, Lopez RL, Galvez A. Biocide and copper tolerance in enterococci from different sources. *J Food Prot* 2013; 76(10): 1806-9.
- 37 Pérlamé M, Philippe N, Condell O, Fanning S, Pagès J-M, Davin-Regli A. Phenotypic changes contributing to *Enterobacter gergoviae* biocide resistance. *Lett Appl Microbiol* 2015; 61: 121-9.
- 38 Cookson BD, Farrelly H, Stapleton P, Garvey RP, Price MR. Transferable resistance to triclosan in MRSA. *Lancet* 1991; 337(8756): 1548-9.
- 39 Lenahan M, Sheridan A, Morris D, Duffy G, Fanning S, Burgess CM. Transcriptomic analysis of triclosan-susceptible and -tolerant *Escherichia coli* O157:H19 in response to triclosan exposure. *Microb Drug Resist* 2014; 20(2): 91-103.
-

- 40 Sheridan A, Lenahan M, Condell O, Bonilla-Santiago R, Sergeant K, Renaut J, e.a. Proteomic and phenotypic analysis of triclosan tolerant verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H19. *J Proteomics* 2013; 80: 78-90.
- 41 Karatzas KA, Randall LP, Webber M, Piddock LJ, Humphrey TJ, Woodward MJ, e.a. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(5): 1508-16.
- 42 Gantzhorn MR, Olsen JE, Thomsen LE. Importance of sigma factor mutations in increased triclosan resistance in *Salmonella* Typhimurium. *BMC Microbiol* 2015; 15: 105.
- 43 McMurry LM, Oethinger M, Levy SB. Overexpression of *marA*, *soxS*, or *acrAB* produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 166(2): 305-9.
- 44 Chuanchuen R, Beinlich K, Hoang TT, Becher A, Karkhoff-Schweizer RR, Schweizer HP. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects *nfxB* mutants overexpressing *MexCD-OprJ*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(2): 428-32.
- 45 Sanchez P, Moreno E, Martinez JL. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the *SmeDEF* multidrug efflux pump. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(2): 781-2.
- 46 Fernando DM, Xu W, Loewen PC, Zhanel GG, Kumar A. Triclosan can select for an *AdeIJK*-overexpressing mutant of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 that displays reduced susceptibility to multiple antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(11): 6424-31.
- 47 Hernandez A, Ruiz FM, Romero A, Martinez JL. The binding of triclosan to *SmeT*, the repressor of the multidrug efflux pump *SmeDEF*, induces antibiotic resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*. *PLoS Pathog* 2011; 7(6): e1002103.
- 48 Fan F, Yan K, Wallis NG, Reed S, Moore TD, Rittenhouse SF, e.a. Defining and combating the mechanisms of triclosan resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(11): 3343-7.
- 49 Grandgirard D, Furi L, Ciusa ML, Baldassarri L, Knight DR, Morrissey I, e.a. Mutations upstream of *fabI* in triclosan resistant *Staphylococcus aureus* strains are associated with elevated *fabI* gene expression. *BMC Genomics* 2015; 16: 345.
- 50 Sivaraman S, Zwahlen J, Bell AF, Hedstrom L, Tonge PJ. Structure-activity studies of the inhibition of *FabI*, the enoyl reductase from *Escherichia coli*, by triclosan: kinetic analysis of mutant *FabIs*. *Biochemistry* 2003; 42(15): 4406-13.
- 51 Bedran TB, Grignon L, Spolidorio DP, Grenier D. Subinhibitory concentrations of triclosan promote *Streptococcus mutans* biofilm formation and adherence to oral epithelial cells. *PLoS One* 2014; 9(2): e89059.
- 52 Seaman PF, Ochs D, Day MJ. Small-colony variants: a novel mechanism for triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(1): 43-50.
-

- 53 Curiao T, Marchi E, Viti C, Oggioni MR, Baquero F, Martinez JL, e.a. Polymorphic Variation in Susceptibility and Metabolism of Triclosan-Resistant Mutants of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Obtained after Exposure to Biocides and Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(6): 3413-23.
- 54 Christensen EG, Gram L, Kastbjerg VG. Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(9): 4064-71.
- 55 Kastbjerg VG, Hein-Kristensen L, Gram L. Triclosan-induced aminoglycoside-tolerant *Listeria monocytogenes* isolates can appear as small-colony variants. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(6): 3124-32.
- 56 Middleton JH, Salierno JD. Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA). *Ecotoxicol Environ Saf* 2013; 88: 79-88.
- 57 Cottell A, Denyer SP, Hanlon GW, Ochs D, Maillard JY. Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *J Hosp Infect* 2009; 72(1): 71-6.
- 58 Oggioni MR, Coelho JR, Furi L, Knight DR, Viti C, Orefici G, e.a. Significant Differences Characterise the Correlation Coefficients between Biocide and Antibiotic Susceptibility Profiles in *Staphylococcus aureus*. *Curr Pharm Des* 2015; 21(16): 2054-7.
- 59 Lambert RJ. Comparative analysis of antibiotic and antimicrobial biocide susceptibility data in clinical isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* between 1989 and 2000. *J Appl Microbiol* 2004; 97(4): 699-711.
- 60 Tkachenko O, Shepard J, Aris VM, Joy A, Bello A, Londono I, e.a. A triclosan-ciprofloxacin cross-resistant mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes. *Res Microbiol* 2007; 158(8-9): 651-8.
- 61 Cole EC, Addison RM, Rubino JR, Leese KE, Dulaney PD, Newell MS, e.a. Investigation of antibiotic and antibacterial agent cross-resistance in target bacteria from homes of antibacterial product users and nonusers. *J Appl Microbiol* 2003; 95(4): 664-76.
- 62 D'Arezzo S, Lanini S, Puro V, Ippolito G, Visca P. High-level tolerance to triclosan may play a role in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in immunocompromised hosts: evidence from outbreak investigation. *BMC Res Notes* 2012; 5: 43.
- 63 McNaughton M, Mazinke N, Thomas E. Newborn conjunctivitis associated with triclosan 0.5% antiseptic intrinsically contaminated with *Serratia marcescens*. *Can J Infect Control* 1995; 10(1): 7-8.
- 64 Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57(10): 1486-513.
- 65 Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1354: 12-31.
- 66 Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M. The ins and outs of RND efflux pumps in *Escherichia coli*. *Front Microbiol* 2015; 6: 587.
-

- 67 Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12(10): 1221-36.
- 68 Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(4): 582-610.
- 69 Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28(2): 337-418.
- 70 Domagk G. Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *Dtsch med Wochenschr* 1935; 61(21): 829-32.
- 71 Jono K, Takayama T, Kuno M, Higashide E. Effect of alkyl chain length of benzalkonium chloride on the bactericidal activity and binding to organic materials. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1986; 34(10): 4215-24.
- 72 Daoud NN, Dickinson NA, Gilbert P. Antimicrobial activity and physico-chemical properties of some alkyldimethylbenzylammonium chlorides. *Microbios* 1983; 37(148): 73-85.
- 73 Hassan KA, Baltzer SA, Paulsen IT, Brown M. Pumping out biocides - cause for concern? *Microbiology Australia* 2010; 31(4): 178-81.
- 74 Delmar JA, Yu EW. Bacterial multidrug efflux transporters. *Ann Rev Biophys* 2014; 43: 93-117.
- 75 Abuzaid A, Hamouda A, Amyes SG. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacDeltaE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. *J Hosp Infect* 2012; 81(2): 87-91.
- 76 Behr H, Reverdy ME, Mabilat C, Freney J, Fleurette J. [Relationship between the level of minimal inhibitory concentrations of five antiseptics and the presence of *qacA* gene in *Staphylococcus aureus*]. *Pathol Biol (Paris)* 1994; 42(5): 438-44.
- 77 Tezel U, Pavlostathis SG. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Curr Opin Biotechnol* 2015; 33: 296-304.
- 78 Bergero MF, Lucchesi GI. Immobilization of *Pseudomonas putida* (ATCC 12633): a promising tool for effective degradation of quaternary ammonium compounds in industrial effluents. *Int Biodeterioration Biodegradation* 2015; 100: 38-43.
- 79 Adair FW, Geftic SG, Gelzer J. Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds. II. Cross-resistance characteristics of a mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol* 1971; 21(6): 1058-63.
- 80 Soumet C, Fourreau E, Legrandois P, Maris P. Resistance to phenicol compounds following adaptation to quaternary ammonium compounds in *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* 2012; 158(1-2): 147-52.
- 81 Moen B, Rudi K, Bore E, Langsrud S. Subminimal inhibitory concentrations of the disinfectant benzalkonium chloride select for a tolerant subpopulation of *Escherichia coli* with inheritable characteristics. *Int J Mol Sci* 2012; 13(4): 4101-23.
- 82 Maseda H, Hashida Y, Konaka R, Shirai A, Kourai H. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, *SdeAB*, upon exposure to a biocide,
-

- cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 5230-5.
- 83 Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR, Russell AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *J Hosp Infect* 1999; 42(3): 219-29.
- 84 Guo W, Cui S, Xu X, Wang H. Resistant mechanism study of benzalkonium chloride selected *Salmonella Typhimurium* mutants. *Microb Drug Resist* 2014; 20(1): 11-6.
- 85 Akimitsu N, Hamamoto H, Inoue R, Shoji M, Akamine A, Takemori K, e.a. Increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to beta-lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(12): 3042-3.
- 86 Langsrud S, Moretro T, Sundheim G. Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *J Appl Microbiol* 2003; 95(1): 186-95.
- 87 Nakashima AK, Highsmith AK, Martone WJ. Survival of *Serratia marcescens* in benzalkonium chloride and in multiple-dose medication vials: relationship to epidemic septic arthritis. *J Clin Microbiol* 1987; 25(6): 1019-21.
- 88 Mereghetti L, Quentin R, Marquet-van der Mee N, Audurier A. Low sensitivity of *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium compounds. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(11): 5083-6.
- 89 Ortiz S, Lopez-Alonso V, Rodriguez P, Martinez-Suarez JV. The Connection between Persistent, Disinfectant-Resistant *Listeria monocytogenes* Strains from Two Geographically Separate Iberian Pork Processing Plants: Evidence from Comparative Genome Analysis. *Appl Environ Microbiol* 2015; 82(1): 308-17.
- 90 Bjorland J, Steinum T, Sunde M, Waage S, Heir E. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(10): 3046-52.
- 91 Noguchi N, Suwa J, Narui K, Sasatsu M, Ito T, Hiramatsu K, e.a. Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *J Med Microbiol* 2005; 54(Pt 6): 557-65.
- 92 Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Bakhrouf A. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res Notes* 2011; 4: 453.
- 93 Hasanvand A, Ghafourian S, Taherikalani M, Jalilian FA, Sadeghifard N, Pakzad I. Antiseptic Resistance in Methicillin Sensitive and Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Some Major Hospitals, Iran. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2015; 10(2): 105-12.
- 94 Nakamura H, Takakura K, Sone Y, Itano Y, Nishikawa Y. Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J Food Prot* 2013; 76(7): 1179-86.
-

- 95 Giaouris E, Chorianopoulos N, Doulgeraki A, Nychas GJ. Co-culture with *Listeria monocytogenes* within a dual-species biofilm community strongly increases resistance of *Pseudomonas putida* to benzalkonium chloride. *PLoS One* 2013; 8(10): e77276.
- 96 Ceragioli M, Mols M, Moezelaar R, Ghelardi E, Senesi S, Abee T. Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(10): 3352-60.
- 97 Fox EM, Leonard N, Jordan K. Physiological and transcriptional characterization of persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(18): 6559-69.
- 98 Machado I, Coquet L, Jouenne T, Pereira MO. Proteomic approach to *Pseudomonas aeruginosa* adaptive resistance to benzalkonium chloride. *J Proteomics* 2013; 89: 273-9.
- 99 Mavri A, Smole MS. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. *Int J Food Microbiol* 2013; 160(3): 304-12.
- 100 Putman M, van Veen HW, Konings WN. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(4): 672-93.
- 101 He GX, Zhang C, Crow RR, Thorpe C, Chen H, Kumar S, e.a. SugE, a new member of the SMR family of transporters, contributes to antimicrobial resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(8): 3954-7.
- 102 Wu G, Yang Q, Long M, Guo L, Li B, Meng Y, e.a. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility. *J Antibiot (Tokyo)* 2015; 68(11): 661-5.
- 103 Jennings MC, Minbiole KP, Wuest WM. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect Dis* 2015; 1(7): 288-303.
- 104 McNeil JC, Hulten KG, Kaplan SL, Mason EO. Decreased susceptibilities to Retapamulin, Mupirocin, and Chlorhexidine among *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections in otherwise healthy children. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(5): 2878-83.
- 105 Ghasemzadeh-Moghaddam H, van Belkum A, Hamat RA, van Wamel W, Neela V. Methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* with high-level antiseptic and low-level mupirocin resistance in Malaysia. *Microb Drug Resist* 2014; 20(5): 472-7.
- 106 Skovgaard S, Larsen MH, Nielsen LN, Skov RL, Wong C, Westh H, e.a. Recently introduced *qacA/B* genes in *Staphylococcus epidermidis* do not increase chlorhexidine MIC/MBC. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68(10): 2226-33.
- 107 Lepointeur M, Royer G, Bourrel AS, Romain O, Duport C, Doucet-Populaire F, e.a. Prevalence of resistance to antiseptics and mupirocin among invasive coagulase-negative staphylococci from very preterm neonates in NICU: the creeping threat? *J Hosp Infect* 2013; 83(4): 333-6.
- 108 Fritz SA, Hogan PG, Camins BC, Ainsworth AJ, Patrick C, Martin MS, e.a. Mupirocin and chlorhexidine resistance in *Staphylococcus aureus* in patients with community-onset skin and soft tissue infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(1): 559-68.
-

- 109 Yamamoto T, Tamura Y, Yokota T. Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32(6): 932-5.
- 110 Westergren G, Emilson CG. In vitro development of chlorhexidine resistance in *Streptococcus sanguis* and its transmissibility by genetic transformation. *Scand J Dent Res* 1980; 88(3): 236-43.
- 111 Sidhu MS, Heir E, Leegaard T, Wiger K, Holck A. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(9): 2797-803.
- 112 Sidhu MS, Heir E, Sorum H, Holck A. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and beta-lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. *Microb Drug Resist* 2001; 7(4): 363-71.
- 113 Lemaitre JP, Echchannaoui H, Michaut G, Divies C, Rousset A. Plasmid-mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. *J Food Prot* 1998; 61(11): 1459-64.
- 114 Jeong JH, Shin KS, Lee JW, Park EJ, Son SY. Analysis of a novel class 1 integron containing metallo-beta-lactamase gene VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol* 2009; 47(6): 753-9.
- 115 Johnson TJ, Siek KE, Johnson SJ, Nolan LK. DNA sequence and comparative genomics of pAPEC-O2-R, an avian pathogenic *Escherichia coli* transmissible R plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(11): 4681-8.
- 116 Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DG. Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 2015; 16(1): 964.
- 117 Sun F, Zhou D, Wang Q, Feng J, Feng W, Luo W, e.a. The first report of detecting the blaSIM-2 gene and determining the complete sequence of the SIM-encoding plasmid. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22(4): 347-51.
- 118 Buffet-Bataillon S, Branger B, Cormier M, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. Effect of higher minimum inhibitory concentrations of quaternary ammonium compounds in clinical *E. coli* isolates on antibiotic susceptibilities and clinical outcomes. *J Hosp Infect* 2011; 79(2): 141-6.
- 119 He GX, Thorpe C, Walsh D, Crow R, Chen H, Kumar S, e.a. EmmdR, a new member of the MATE family of multidrug transporters, extrudes quinolones from *Enterobacter cloacae*. *Arch Microbiol* 2011; 193(10): 759-65.
- 120 Foley I, Gilbert P. Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling* 1996; 10(4): 331-46.
- 121 Sanchez-Vizuete P, Orgaz B, Aymerich S, Le CD, Briandet R. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front Microbiol* 2015; 6: 705.
- 122 Lambert PA. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *J Appl Microbiol* 2002; 92 Suppl: 46S-54S.
- 123 Denyer SP, Maillard JY. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol* 2002; 92 Suppl: 35S-45S.
- 124 Cloete TE. Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int Biodeterioration Biodegradation* 2003; 51: 277-82.
-

- 125 Daniels C, Ramos JL. Adaptive drug resistance mediated by root-nodulation-cell division efflux pumps. *Clin Microbiol Infect* 2009; 15 Suppl 1: 32-6.
- 126 Piddock LJ. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006; 4(8): 629-36.
- 127 Levy SB. Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 2002; 92 Suppl: 65S-71S.
- 128 Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med* 2007; 39(3): 162-76.
- 129 Noguchi N, Tamura M, Narui K, Wakasugi K, Sasatsu M. Frequency and genetic characterization of multidrug-resistant mutants of *Staphylococcus aureus* after selection with individual antiseptics and fluoroquinolones. *Biol Pharm Bull* 2002; 25(9): 1129-32.
- 130 Santos Costa S, Viveiros M, Rosato AE, Melo-Cristino J, Couto I. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 2015; 15: 232.
- 131 Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(12): 4217-24.
- 132 Elhanafi D, Dutta V, Kathariou S. Genetic characterization of plasmid-associated benzalkonium chloride resistance determinants in a *Listeria monocytogenes* strain from the 1998-1999 outbreak. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(24): 8231-8.
- 133 Cartwright EJ, Jackson KA, Johnson SD, Graves LM, Silk BJ, Mahon BE. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008. *Emerg Infect Dis* 2013; 19(1): 1-9; quiz 184.
- 134 Kremer P, Lees J, Ferwerda B, van der Ende A, Brouwer M, Bentley D, e.a. Genome-wide analysis identifies benzalkonium resistance genes to be associated with outcome in *Listeria monocytogenes* meningitis. In: The 26th European Conference of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; Amsterdam: 9-12 april 2016; O623.
- 135 Popovich KJ, Lyles R, Hayes R, Hota B, Trick W, Weinstein RA, e.a. Relationship between chlorhexidine gluconate skin concentration and microbial density on the skin of critically ill patients bathed daily with chlorhexidine gluconate. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012; 33(9): 889-96.
- 136 Russell AD. Chlorhexidine: antibacterial action and bacterial resistance. *Infection* 1986; 14(5): 212-5.
- 137 Vickery K, Deva A, Jacombs A, Allan J, Valente P, Gosbell IB. Presence of biofilm containing viable multiresistant organisms despite terminal cleaning on clinical surfaces in an intensive care unit. *J Hosp Infect* 2012; 80(1): 52-5.
- 138 Tattawasart U, Maillard JY, Furr JR, Russell AD. Outer membrane changes in *Pseudomonas stutzeri* resistant to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16(3): 233-8.
- 139 Thomas L, Maillard JY, Lambert RJ, Russell AD. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a "residual" concentration. *J Hosp Infect* 2000; 46(4): 297-303.
- 140 Kulik EM, Waltimo T, Weiger R, Schweizer I, Lenkeit K, Filipuzzi-Jenny E, e.a. Development of resistance of mutants streptococci and *Porphyromonas gingivalis* to chlorhexidine digluconate and
-

- amine fluoride/stannous fluoride-containing mouthrinses, in vitro. *Clin Oral Investig* 2015; 19(6): 1547-53.
- 141 Wang JT, Sheng WH, Wang JL, Chen D, Chen ML, Chen YC, e.a. Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(3): 514-7.
- 142 Sangal V, Girvan EK, Jadhav S, Lawes T, Robb A, Vali L, e.a. Impacts of a long-term programme of active surveillance and chlorhexidine baths on the clinical and molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in an Intensive Care Unit in Scotland. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40(4): 323-31.
- 143 Johnson RC, Schlett CD, Crawford K, Lanier JB, Merrell DS, Ellis MW. Recurrent Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Cutaneous Abscesses and Selection of Reduced Chlorhexidine Susceptibility during Chlorhexidine Use. *J Clin Microbiol* 2015; 53(11): 3677-82.
- 144 Vali L, Dashti AA, El-Shazly S, Jadaon MM. *Klebsiella oxytoca* with reduced sensitivity to chlorhexidine isolated from a diabetic foot ulcer. *Int J Infect Dis* 2015; 34: 112-6.
- 145 Block C, Furman M. Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *J Hosp Infect* 2002; 51(3): 201-6.
- 146 Prag G, Falk-Brynhildsen K, Jacobsson S, Hellmark B, Unemo M, Soderquist B. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *APMIS* 2014; 122(10): 961-7.
- 147 Lambert RJ, Joynson J, Forbes B. The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *J Appl Microbiol* 2001; 91(6): 972-84.
- 148 Sekiguchi J, Asagi T, Miyoshi-Akiyama T, Fujino T, Kobayashi I, Morita K, e.a. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain that caused an outbreak in a neurosurgery ward and its *aac(6)-Iae* gene cassette encoding a novel aminoglycoside acetyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(9): 3734-42.
- 149 Li T, Song Y, Zhu Y, Du X, Li M. Current status of *Staphylococcus aureus* infection in a central teaching hospital in Shanghai, China. *BMC Microbiol* 2013; 13: 153.
- 150 Smith K, Gemmell CG, Hunter IS. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(1): 78-84.
- 151 Lavilla Lerma L, Benomar N, Valenzuela AS, Casado Munoz M del C, Galvez A, Abriouel H. Role of EfrAB efflux pump in biocide tolerance and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from traditional fermented foods and the effect of EDTA as EfrAB inhibitor. *Food Microbiol* 2014; 44: 249-57.
- 152 Lavilla Lerma L, Benomar N, Casado Munoz M del C, Galvez A, Abriouel H. Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Food Microbiol* 2015; 51: 33-44.
-

- 153 Liu Q, Zhao H, Han L, Shu W, Wu Q, Ni Y. Frequency of biocide-resistant genes and susceptibility to chlorhexidine in high-level mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MuH MRSA). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 82(4): 278-83.
- 154 Naparstek L, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Banin E, Navon-Venezia S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* 2012; 81(1): 15-9.
- 155 Guo W, Shan K, Xu B, Li J. Determining the resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* to common disinfectants and elucidating the underlying resistance mechanisms. *Pathog Glob Health* 2015; 109(4): 184-92.
- 156 Knapp L, Rushton L, Stapleton H, Sass A, Stewart S, Amezcua A, e.a. The effect of cationic microbicide exposure against *Burkholderia cepacia* complex (Bcc); the use of *Burkholderia lata* strain 383 as a model bacterium. *J Appl Microbiol* 2013; 115(5): 1117-26.
- 157 Fuangthong M, Julotok M, Chintana W, Kuhn K, Rittiroongrad S, Vattanaviboon P, e.a. Exposure of *Acinetobacter baylyi* ADP1 to the biocide chlorhexidine leads to acquired resistance to the biocide itself and to oxidants. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66(2): 319-22.
- 158 Batra R, Cooper BS, Whiteley C, Patel AK, Wyncoll D, Edgeworth JD. Efficacy and limitation of a chlorhexidine-based decolonization strategy in preventing transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Clin Infect Dis* 2010; 50(2): 210-7.
- 159 Stickler DJ. Susceptibility of antibiotic-resistant Gram-negative bacteria to biocides: a perspective from the study of catheter biofilms. *J Appl Microbiol* 2002; 92 Suppl: 163S-70S.
- 160 Gajadhar T, Lara A, Sealy P, Adesiyun AA. Microbial contamination of disinfectants and antiseptics in four major hospitals in Trinidad. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 14(3): 193-200.
- 161 Edgeworth JD. Has decolonization played a central role in the decline in UK methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* transmission? A focus on evidence from intensive care. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66 Suppl 2: 1141-7.
- 162 Meyer B, Cookson B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? *J Hosp Infect* 2010; 76(3): 200-5.
- 163 Horner C, Mawer D, Wilcox M. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(11): 2547-59.
- 164 Mijndendonckx K, Leys N, Mahillon J, Silver S, Van Houdt R. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals* 2013; 26(4): 609-21.
- 165 Silvestry-Rodriguez N, Sicairos-Ruelas EE, Gerba CP, Bright KR. Silver as a disinfectant. *Rev Environ Contam Toxicol* 2007; 191: 23-45.
- 166 Maillard JY, Hartemann P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit Rev Microbiol* 2013; 39(4): 373-83.
- 167 Silver S. Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 27(2-3): 341-53.
- 168 Edwards-Jones V. The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49(2): 147-52.
-

- 169 Michaels JA, Campbell B, King B, Palfreyman SJ, Shackley P, Stevenson M. Randomized controlled trial and cost-effectiveness analysis of silver-donating antimicrobial dressings for venous leg ulcers (VULCAN trial). *Br J Surg* 2009; 96(10): 1147-56.
- 170 Storm-Versloot MN, Vos CG, Ubbink DT, Vermeulen H. Topical silver for preventing wound infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (3): CD006478.
- 171 Vermeulen H, van Hattem JM, Storm-Versloot MN, Ubbink DT. Topical silver for treating infected wounds. *Cochrane Database Syst Rev* 2007; (1): CD005486.
- 172 Leaper D. Appropriate use of silver dressings in wounds: international consensus document. *Int Wound J* 2012; 9(5): 461-4.
- 173 Ayello EA, Fletcher J, Keast D, Leaper D, Lindholm C, Martínez JLL, e.a. International consensus document. Appropriate use of silver dressings in wounds. An expert working group consensus. London: Wounds International. 2012.
- 174 Sutterlin S, Tano E, Bergsten A, Tallberg AB, Melhus A. Effects of silver-based wound dressings on the bacterial flora in chronic leg ulcers and its susceptibility in vitro to silver. *Acta Derm Venereol* 2012; 92(1): 34-9.
- 175 Spacciapoli P, Buxton D, Rothstein D, Friden P. Antimicrobial activity of silver nitrate against periodontal pathogens. *J Periodontol Res* 2001; 36(2): 108-13.
- 176 Shrivastava S, Bera T, Roy A, Singh G, Ramachandrarao P, Dash D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2007; 18: 225103-12.
- 177 Tamboli DP, Lee DS. Mechanistic antimicrobial approach of extracellularly synthesized silver nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria. *J Hazard Mater* 2013; 260: 878-84.
- 178 Yun H, Kim JD, Choi HC, Lee CW. Antibacterial activity of CNT-Ag and GO-Ag nanocomposites against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Bull Korean Chem Soc* 2013; 34(11): 3261-4.
- 179 Vasileiadis S, Puglisi E, Trevisan M, Scheckel KG, Langdon KA, McLaughlin MJ, e.a. Changes in soil bacterial communities and diversity in response to long-term silver exposure. *FEMS Microbiol Ecol* 2015; 91(10).
- 180 Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 2000; 52(4): 662-8.
- 181 Jung WK, Koo HC, Kim KW, Shin S, Kim SH, Park YH. Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(7): 2171-8.
- 182 Li XZ, Nikaïdo H, Williams KE. Silver-resistant mutants of *Escherichia coli* display active efflux of Ag⁺ and are deficient in porins. *J Bacteriol* 1997; 179(19): 6127-32.
- 183 Klaus T, Joerger R, Olsson E, Granqvist CG. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(24): 13611-4.
- 184 Karkaj OS, Salouti M, Zanjani RS, Derakhshan FK. Extracellular deposition of silver nanoparticles by *Bacillus megaterium*. Synthesis and reactivity in organic metal-organic and nano-metal chemistry 2013; 43(7): 903-6.
-

- 185 Lansdown ABG. Silver as an antibiotic: problems of resistance. In: Lansdown ABG. Silver in
healthcare: Its antimicrobial efficacy and safety in use. Issues in Toxicology 6. 72-91. London: Royal
Society of Chemistry; 2010.
- 186 Randall CP, Gupta A, Jackson N, Busse D, O'Neill AJ. Silver resistance in Gram-negative bacteria: a
dissection of endogenous and exogenous mechanisms. J Antimicrob Chemother 2015; 70(4): 1037-46.
- 187 Randall CP, Oyama LB, Bostock JM, Chopra I, O'Neill AJ. The silver cation (Ag⁺):
antistaphylococcal activity, mode of action and resistance studies. J Antimicrob Chemother 2013;
68(1): 131-8.
- 188 Lok CN, Ho CM, Chen R, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Proteomic identification of the Cus system as
a major determinant of constitutive Escherichia coli silver resistance of chromosomal origin. J
Proteome Res 2008; 7(6): 2351-6.
- 189 Graves JL, Jr., Tajkarimi M, Cunningham Q, Campbell A, Nonga H, Harrison SH, e.a. Rapid
evolution of silver nanoparticle resistance in Escherichia coli. Front Genet 2015; 6: 42.
- 190 Delmar JA, Su CC, Yu EW. Heavy metal transport by the CusCFBA efflux system. Protein Sci 2015;
24(11): 1720-36.
- 191 Delmar JA, Su CC, Yu EW. Structural mechanisms of heavy-metal extrusion by the Cus efflux
system. Biometals 2013; 26(4): 593-607.
- 192 McHugh GL, Moellering RC, Hopkins CC, Swartz MN. Salmonella typhimurium resistant to silver
nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. Lancet 1975; 1(7901): 235-40.
- 193 Gupta A, Matsui K, Lo JF, Silver S. Molecular basis for resistance to silver cations in Salmonella.
Nat Med 1999; 5(2): 183-8.
- 194 Davis IJ, Richards H, Mullany P. Isolation of silver- and antibiotic-resistant Enterobacter cloacae
from teeth. Oral Microbiol Immunol 2005; 20(3): 191-4.
- 195 Kremer AN, Hoffmann H. Subtractive hybridization yields a silver resistance determinant unique to
nosocomial pathogens in the Enterobacter cloacae complex. J Clin Microbiol 2012; 50(10): 3249-57.
- 196 Finley PJ, Norton R, Austin C, Mitchell A, Zank S, Durham P. Unprecedented Silver Resistance in
Clinically Isolated Enterobacteriaceae: Major Implications for Burn and Wound Management.
Antimicrob Agents Chemother 2015; 59(8): 4734-41.
- 197 Hosseini F, Mirzaei M, Salehi M. The study of cross-resistance between silver and antibiotics in
isolated bacterial strains from a burns unit. Adv Environ Biol 2011; 5(10): 3164-72.
- 198 Haefeli C, Franklin C, Hardy K. Plasmid-determined silver resistance in Pseudomonas stutzeri
isolated from a silver mine. J Bacteriol 1984; 158(1): 389-92.
- 199 Slawson RM, van Dyke MI, Lee H, Trevors JT. Germanium and silver resistance, accumulation, and
toxicity in microorganisms. Plasmid 1992; 27(1): 72-9.
- 200 Deshpande LM, Chopade BA. Plasmid mediated silver resistance in Acinetobacter baumannii.
Biometals 1994; 7(1): 49-56.
- 201 Annear DI, Mee BJ, Bailey M. Instability and linkage of silver resistance, lactose fermentation, and
colony structure in Enterobacter cloacae from burn wounds. J Clin Pathol 1976; 29(5): 441-3.
-

- 202 Losasso C, Belluco S, Cibin V, Zavagnin P, Micetic I, Gallochio F, e.a. Antibacterial activity of
silver nanoparticles: sensitivity of different Salmonella serovars. *Front Microbiol* 2014; 5: 227.
- 203 Mourao J, Novais C, Machado J, Peixe L, Antunes P. Metal tolerance in emerging clinically relevant
multidrug-resistant Salmonella enterica serotype 4,[5],12:i:- clones circulating in Europe. *Int J*
Antimicrob Agents 2015; 45(6): 610-6.
- 204 Wales AD, Davies RH. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its
relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics* 2015; 4: 567-604.
- 205 Sandegren L, Linkevicius M, Lytsy B, Melhus A, Andersson DI. Transfer of an Escherichia coli
ST131 multiresistance cassette has created a Klebsiella pneumoniae-specific plasmid associated with
a major nosocomial outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(1): 74-83.
- 206 Sutterlin S, Edquist P, Sandegren L, Adler M, Tangden T, Drobni M, e.a. Silver resistance genes are
overrepresented among Escherichia coli isolates with CTX-M production. *Appl Environ Microbiol*
2014; 80(22): 6863-9.
- 207 Ip M, Lui SL, Chau SS, Lung I, Burd A. The prevalence of resistance to silver in a burns unit. *J Hosp*
Infect 2006; 63(3): 342-4.
- 208 Larimer C, Islam MS, Ojha A, Nettleship I. Mutation of environmental mycobacteria to resist silver
nanoparticles also confers resistance to a common antibiotic. *Biometals* 2014; 27(4): 695-702.
- 209 Conroy O, Kim EH, McEvoy MM, Rensing C. Differing ability to transport nonmetal substrates by
two RND-type metal exporters. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 308(2): 115-22.
- 210 Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in
Escherichia coli. *J Bacteriol* 2001; 183(20): 5803-12.
- 211 Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin*
Microbiol Infect 2008; 14 Suppl 1: 82-9.
- 212 Cason JS, Jackson DM, Lowbury EJ, Ricketts CR. Antiseptic and aseptic prophylaxis for burns: use
of silver nitrate and of isolators. *Br Med J* 1966; 2(5525): 1288-94.
- 213 Jelenko C, III. Silver nitrate resistant E. coli: report of case. *Ann Surg* 1969; 170(2): 296-9.
- 214 Carr HS, Rosenkranz HS. R factor in Enterobacter cloacae resistant to silver sulfadiazine.
Chemotherapy 1975; 21(1): 41-4.
- 215 Wenzel RP, Hunting KJ, Osterman CA, Sande MA. Providencia stuartii, a hospital pathogen:
potential factors for its emergence and transmission. *Am J Epidemiol* 1976; 104(2): 170-80.
- 216 Gayle WE, Mayhall CG, Lamb VA, Apollo E, Haynes BW, Jr. Resistant Enterobacter cloacae in a
burn center: the ineffectiveness of silver sulfadiazine. *J Trauma* 1978; 18(5): 317-23.
- 217 Bridges K, Kidson A, Lowbury EJ, Wilkins MD. Gentamicin- and silver-resistant pseudomonas in a
burns unit. *Br Med J* 1979; 1(6161): 446-9.
- 218 Hendry AT, Stewart IO. Silver-resistant Enterobacteriaceae from hospital patients. *Can J Microbiol*
1979; 25(8): 915-21.
- 219 Markowitz SM, Smith SM, Williams DS. Retrospective analysis of plasmid patterns in a study of
burn unit outbreaks of infection due to Enterobacter cloacae. *J Infect Dis* 1983; 148(1): 18-23.
-

- 220 Pirnay JP, De VD, Cochez C, Bilocq F, Pirson J, Struelens M, e.a. Molecular epidemiology of
Pseudomonas aeruginosa colonization in a burn unit: persistence of a multidrug-resistant clone and a
silver sulfadiazine-resistant clone. *J Clin Microbiol* 2003; 41(3): 1192-202.
- 221 Percival SL, Woods E, Nutekpor M, Bowler P, Radford A, Cochrane C. Prevalence of silver
resistance in bacteria isolated from diabetic foot ulcers and efficacy of silver-containing wound
dressings. *Ostomy Wound Manage* 2008; 54(3): 30-40.
- 222 Woods EJ, Cochrane CA, Percival SL. Prevalence of silver resistance genes in bacteria isolated from
human and horse wounds. *Vet Microbiol* 2009; 138(3-4): 325-9.
- 223 Jakobsen L, Andersen AS, Friis-Moller A, Jorgensen B, Krogfelt KA, Frimodt-Moller N. Silver
resistance: an alarming public health concern? *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38(5): 454-5.
- 224 Finley PJ, Peterson A, Huckfeldt RE. The prevalence of phenotypic silver resistance in clinical
isolates. *Wounds* 2013; 25(4): 84-8.
- 225 Schafer B, Brocke JV, Epp A, Gotz M, Herzberg F, Kneuer C, e.a. State of the art in human risk
assessment of silver compounds in consumer products: a conference report on silver and nanosilver
held at the BfR in 2012. *Arch Toxicol* 2013; 87(12): 2249-62.
- 226 Marx DE, Barillo DJ. Silver in medicine: the basic science. *Burns* 2014; 40 Suppl 1: S9-S18.
- 227 Gupta A, Silver S. Silver as a biocide: will resistance become a problem? *Nat Biotechnol* 1998;
16(10): 888.
- 228 Zhang C, Liang Z, Hu Z. Bacterial response to a continuous long-term exposure of silver
nanoparticles at sub-ppm silver concentrations in a membrane bioreactor activated sludge system.
Water Res 2014; 50: 350-8.
- 229 Muhling M, Bradford A, Readman JW, Somerfield PJ, Handy RD. An investigation into the effects of
silver nanoparticles on antibiotic resistance of naturally occurring bacteria in an estuarine sediment.
Mar Environ Res 2009; 68(5): 278-83.
- 230 Sweet MJ, Singleton I. Silver nanoparticles: a microbial perspective. *Adv Appl Microbiol* 2011; 77:
115-33.
- 231 Grewal JS, Tiwari RP. Resistance to metal ions and antibiotics in *Escherichia coli* isolated from
foodstuffs. *J Med Microbiol* 1990; 32(4): 223-6.
- 232 Deshpande LM, Kapadnis BP, Chopade BA. Metal resistance in *Acinetobacter* and its relation to
beta-lactamase production. *Biometals* 1993; 6(1): 55-9.
- 233 Kleijnen RG, Knobens BGM, Hoofwijk BL, Pol DGJ, Heintges GHL, De Visser JF. The chlorine
dilemma. Final report. Eindhoven: Eindhoven TU, 12/16/2011.
- 234 Sedlak DL, von Gunten U. Chemistry. The chlorine dilemma. *Science* 2011; 331(6013): 42-3.
- 235 Biociden Dienst. De biocidenmarkt in België - Volgens de gegevens in het bezit van de FOD - 2011.
Brussel: Federale Overheidsdienst Volksgezondheid Veiligheid van de Voedselketen en Leefmilieu
Directoraat-Generaal Leefmilieu, 3/2012.
- 236 Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008; 58(6): 329-
41.
-

- 237 Rosen H, Klebanoff SJ, Wang Y, Brot N, Heinecke JW, Fu X. Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(44): 18686-91.
- 238 Klebanoff SJ, Kettle AJ, Rosen H, Winterbourn CC, Nauseef WM. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. *J Leukoc Biol* 2013; 93(2): 185-98.
- 239 Gray MJ, Wholey WY, Jakob U. Bacterial responses to reactive chlorine species. *Annu Rev Microbiol* 2013; 67: 141-60.
- 240 Laplace JM, Thuault M, Hartke A, Boutibonnes P, Auffray Y. Sodium hypochlorite stress in *Enterococcus faecalis*: influence of antecedent growth conditions and induced proteins. *Curr Microbiol* 1997; 34(5): 284-9.
- 241 McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(1): 147-79.
- 242 Arnitz R, Nagl M, Gottardi W. Microbicidal activity of monochloramine and chloramine T compared. *J Hosp Infect* 2009; 73(2): 164-70.
- 243 Sabli MZH, Setlow P, Waites WM. The effect of hypochlorite on spores of *Bacillus subtilis* lacking small acid-soluble proteins. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22: 405-7.
- 244 Taylor RH, Falkinham JO, III, Norton CD, LeChevallier MW. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(4): 1702-5.
- 245 Parnell P, Wilcox MH. *Mycobacterium chelonae* and *Acremonium* species isolated from endoscope autodisinfectant rinse water despite daily treatment with chlorine dioxide. *J Hosp Infect* 2001; 48(2): 152-4.
- 246 Martin DJ, Denyer SP, McDonnell G, Maillard JY. Resistance and cross-resistance to oxidising agents of bacterial isolates from endoscope washer disinfectors. *J Hosp Infect* 2008; 69(4): 377-83.
- 247 Martin DJ, Wesgate RL, Denyer SP, McDonnell G, Maillard JY. *Bacillus subtilis* vegetative isolate surviving chlorine dioxide exposure: an elusive mechanism of resistance. *J Appl Microbiol* 2015; 119(6): 1541-51.
- 248 Kim BR, Anderson JE, Mueller SA, Gaines WA, Kendall AM. Literature review - efficacy of various disinfectants against *Legionella* in water systems. *Water Res* 2002; 36(18): 4433-44.
- 249 Garcia MT, Baladron B, Gil V, Tarancon ML, Vilasau A, Ibanez A, e.a. Persistence of chlorine-sensitive *Legionella pneumophila* in hyperchlorinated installations. *J Appl Microbiol* 2008; 105(3): 837-47.
- 250 Berjeaud JM, Chevalier S, Schlüsselhuber M, Portier E, Loiseau C, Aucher W, e.a. *Legionella pneumophila*: The Paradox of a Highly Sensitive Opportunistic Waterborne Pathogen Able to Persist in the Environment. *Front Microbiol* 2016; 7: 486.
- 251 Hiraishi A, Furuhashi K, Matsumoto A, Koike KA, Fukuyama M, Tabuchi K. Phenotypic and genetic diversity of chlorine-resistant *Methylobacterium* strains isolated from various environments. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(6): 2099-107.
-

- 252 Furuhashi K, Banzai AU, Kawakami Y, Ishizaki N, Yoshida Y, Goto K, et al. Genotyping and chlorine-resistance of *Methylobacterium aquaticum* isolated from water samples in Japan. *Biocontrol Sci* 2011; 16(3): 103-7.
- 253 Furuhashi K, Kato Y, Goto K, Hara M, Yoshida S, Fukuyama M. Isolation and identification of *Methylobacterium* species from the tap water in hospitals in Japan and their antibiotic susceptibility. *Microbiol Immunol* 2006; 50(1): 11-7.
- 254 Mazari-Hiriart M, Lopez-Vidal Y, Ponce de LS, Castillo-Rojas G, Hernandez-Eugenio C, Rojo F. Bacteria and disinfection byproducts in water from southern Mexico City. *Arch Environ Health* 2003; 58(4): 233-7.
- 255 Sun W, Liu W, Cui L, Zhang M, Wang B. Characterization and identification of a chlorine-resistant bacterium, *Sphingomonas* TS001, from a model drinking water distribution system. *Sci Total Environ* 2013; 458-460: 169-75.
- 256 Howard K, Inglis TJ. The effect of free chlorine on *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Res* 2003; 37(18): 4425-32.
- 257 Grobe S, Wingender J, Flemming HC. Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. *Int J Hyg Environ Health* 2001; 204(2-3): 139-42.
- 258 Mead GC, Adams BW. Chlorine resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from turkeys and turkey products. *Lett Appl Microbiol* 1986; 3: 131-3.
- 259 Bolton KJ, Dodd CER, Mead GC, Waites WM. Chlorine resistance of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants. *Lett Appl Microbiol* 1988; 6: 31-4.
- 260 Mokgatla RM, Brozel VS, Gouws PA. Isolation of *Salmonella* resistant to hypochlorous acid from a poultry abattoir. *Lett Appl Microbiol* 1998; 27(6): 379-82.
- 261 Rasmussen LH, Kjeldgaard J, Christensen JP, Ingmer H. Multilocus sequence typing and biocide tolerance of *Arcobacter butzleri* from Danish broiler carcasses. *BMC Res Notes* 2013; 6: 322.
- 262 Zhuang RY, Beuchat LR, Angulo FJ. Fate of *Salmonella montevideo* on and in raw tomatoes as affected by temperature and treatment with chlorine. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(6): 2127-31.
- 263 LeChevallier MW, Seidler RJ, Evans TM. Enumeration and characterization of standard plate count bacteria in chlorinated and raw water supplies. *Appl Environ Microbiol* 1980; 40(5): 922-30.
- 264 Mir J, Morato J, Ribas F. Resistance to chlorine of freshwater bacterial strains. *J Appl Microbiol* 1997; 82(1): 7-18.
- 265 Chiao TH, Clancy TM, Pinto A, Xi C, Raskin L. Differential resistance of drinking water bacterial populations to monochloramine disinfection. *Environ Sci Technol* 2014; 48(7): 4038-47.
- 266 Hwang C, Ling F, Andersen GL, LeChevallier MW, Liu WT. Microbial community dynamics of an urban drinking water distribution system subjected to phases of chloramination and chlorination treatments. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(22): 7856-65.
- 267 Poitelon JB, Joyeux M, Welte B, Duguet JP, Prestel E, DuBow MS. Variations of bacterial 16S rDNA phylotypes prior to and after chlorination for drinking water production from two surface water treatment plants. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; 37(2): 117-28.
-

- 268 Pang YC, Xi JY, Xu Y, Huo ZY, Hu HY. Shifts of live bacterial community in secondary effluent by chlorine disinfection revealed by Miseq high-throughput sequencing combined with propidium monoazide treatment. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100(14): 6435-46.
- 269 Acharya SM, Kurisu F, Kasuga I, Furumai H. Chlorine dose determines bacterial community structure of subsequent regrowth in reclaimed water. *J Water Environ Technol* 2016; 14(1): 15-24.
- 270 Young SB, Setlow P. Mechanisms of killing of *Bacillus subtilis* spores by hypochlorite and chlorine dioxide. *J Appl Microbiol* 2003; 95(1): 54-67.
- 271 Falkinham JO, III. Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69(9): 5685-9.
- 272 Berg JD, Matin A, Roberts PV. Effect of antecedent growth conditions on sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44(4): 814-9.
- 273 Stewart MH, Olson BH. Impact of growth conditions on resistance of *Klebsiella pneumoniae* to chloramines. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(8): 2649-53.
- 274 Goel S, Bouwer EJ. Factors influencing inactivation of *Klebsiella pneumoniae* by chlorine and chloramine. *Water Res* 2004; 38(2): 301-8.
- 275 Kuchta JM, States SJ, McGlaughlin JE, Overmeyer JH, Wadowsky RM, McNamara AM, e.a. Enhanced chlorine resistance of tap water-adapted *Legionella pneumophila* as compared with agar medium-passaged strains. *Appl Environ Microbiol* 1985; 50(1): 21-6.
- 276 Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 2005; 43 Spec No: 93-100.
- 277 Ramamurthy T, Ghosh A, Pazhani GP, Shinoda S. Current Perspectives on Viable but Non-Culturable (VBNC) Pathogenic Bacteria. *Front Public Health* 2014; 2: 103.
- 278 Ayrapetyan M, Oliver JD. The viable but non-culturable state and its relevance in food safety. *Curr Opin Food Safety* 2016; 8: 127-33.
- 279 Pienaar JA, Singh A, Barnard TG. The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: a general review. *Afr J Lab Med* 2016; 5(1): a368.
- 280 Chang CW, Hwang YH, Cheng WY, Chang CP. Effects of chlorination and heat disinfection on long-term starved *Legionella pneumophila* in warm water. *J Appl Microbiol* 2007; 102(6): 1636-44.
- 281 Garcia MT, Jones S, Pelaz C, Millar RD, Abu KY. *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environ Microbiol* 2007; 9(5): 1267-77.
- 282 Alleron L, Merlet N, Lacombe C, Frere J. Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Curr Microbiol* 2008; 57(5): 497-502.
- 283 Alleron L, Khemiri A, Koubar M, Lacombe C, Coquet L, Cosette P, e.a. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. *Water Res* 2013; 47(17): 6606-17.
- 284 Moreno Y, Piqueres P, Alonso JL, Jimenez A, Gonzalez A, Ferrus MA. Survival and viability of *Helicobacter pylori* after inoculation into chlorinated drinking water. *Water Res* 2007; 41(15): 3490-6.
- 285 Giao MS, Azevedo NF, Wilks SA, Vieira MJ, Keevil CW. Effect of chlorine on incorporation of *Helicobacter pylori* into drinking water biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(5): 1669-73.
-

- 286 Liu L, Le Y, Jin J, Zhou Y, Chen G. Chlorine stress mediates microbial surface attachment in drinking
water systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; 99(6): 2861-9.
- 287 Foschino R, Nervegna I, Motta A, Galli A. Bactericidal activity of chlorine dioxide against
Escherichia coli in water and on hard surfaces. *J Food Prot* 1998; 61(6): 668-72.
- 288 LeChevallier MW, Cawthon CD, Lee RG. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water
supplies. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54(3): 649-54.
- 289 Shemesh M, Kolter R, Losick R. The biocide chlorine dioxide stimulates biofilm formation in
Bacillus subtilis by activation of the histidine kinase KinC. *J Bacteriol* 2010; 192(24): 6352-6.
- 290 Seyfried PL, Fraser DJ. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in chlorinated swimming pools. *Can
J Microbiol* 1980; 26(3): 350-5.
- 291 Shrivastava R, Upreti RK, Jain SR, Prasad KN, Seth PK, Chaturvedi UC. Suboptimal chlorine
treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*.
Ecotoxicol Environ Saf 2004; 58(2): 277-83.
- 292 Rice SA, van den Akker B, Pomati F, Roser D. A risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in
swimming pools: a review. *J Water Health* 2012; 10(2): 181-96.
- 293 Leyval C, Arz C, Block JC, Rizet M. *Escherichia coli* resistance to chlorine after successive
chlorinations. *Environ Technol Lett* 1984; 5: 359-64.
- 294 Goeres DM, Palys T, Sandel BB, Geiger J. Evaluation of disinfectant efficacy against biofilm and
suspended bacteria in a laboratory swimming pool model. *Water Res* 2004; 38(13): 3103-9.
- 295 Vess RW, Anderson RL, Carr JH, Bond WW, Favero MS. The colonization of solid PVC surfaces and
the acquisition of resistance to germicides by water micro-organisms. *J Appl Bacteriol* 1993; 74(2):
215-21.
- 296 Buckingham-Meyer K, Goeres DM, Hamilton MA. Comparative evaluation of biofilm disinfectant
efficacy tests. *J Microbiol Methods* 2007; 70(2): 236-44.
- 297 Douterelo I, Sharpe R, Boxall J. Bacterial community dynamics during the early stages of biofilm
formation in a chlorinated experimental drinking water distribution system: implications for drinking
water discoloration. *J Appl Microbiol* 2014; 117(1): 286-301.
- 298 Schwering M, Song J, Louie M, Turner RJ, Ceri H. Multi-species biofilms defined from drinking
water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling* 2013;
29(8): 917-28.
- 299 Norwood DE, Gilmour A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria*
monocytogenes in a steady-state multispecies biofilm. *J Appl Microbiol* 2000; 88(3): 512-20.
- 300 Leriche V, Briandet R, Carpentier B. Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated
alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to
another. *Environ Microbiol* 2003; 5(1): 64-71.
- 301 Bridier A, Sanchez-Vizueté MP, Le CD, Aymerich S, Meylheuc T, Maillard JY, e.a. Biofilms of a
Bacillus subtilis hospital isolate protect *Staphylococcus aureus* from biocide action. *PLoS One* 2012;
7(9): e44506.
-

- 302 Wang R, Kalchayanand N, Schmidt JW, Harhay DM. Mixed biofilm formation by Shiga toxin-
producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium enhanced bacterial
resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. *J Food Prot* 2013; 76(9): 1513-22.
- 303 Sanchez-Vizueté P, Le CD, Bridier A, Herry JM, Aymerich S, Briandet R. Identification of ypqP as a
New *Bacillus subtilis* biofilm determinant that mediates the protection of *Staphylococcus aureus*
against antimicrobial agents in mixed-species communities. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(1):
109-18.
- 304 Simoes LC, Simoes M, Vieira MJ. Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water
on resistance of biofilms to disinfection. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(19): 6673-9.
- 305 Abdel-Nour M, Duncan C, Low DE, Guyard C. Biofilms: the stronghold of *Legionella pneumophila*.
Int J Mol Sci 2013; 14(11): 21660-75.
- 306 Jakubek D, Guillaume C, Binet M, Leblon G, DuBow M, Le BM. Susceptibility of *Legionella* strains
to the chlorinated biocide, monochloramine. *Microbes Environ* 2013; 28(3): 336-45.
- 307 Giao MS, Wilks S, Azevedo NF, Vieira MJ, Keevil CW. Incorporation of natural uncultivable
Legionella pneumophila into potable water biofilms provides a protective niche against chlorination
stress. *Biofouling* 2009; 25(4): 335-41.
- 308 Cooper IR, White J, Mahenthiralingam E, Hanlon GW. Long-term persistence of a single *Legionella*
pneumophila strain possessing the mip gene in a municipal shower despite repeated cycles of
chlorination. *J Hosp Infect* 2008; 70(2): 154-9.
- 309 Cooper IR, Hanlon GW. Resistance of *Legionella pneumophila* serotype 1 biofilms to chlorine-based
disinfection. *J Hosp Infect* 2010; 74(2): 152-9.
- 310 Jakubek D, Le BM, Leblon G, DuBow M, Binet M. The impact of monochloramine on the diversity
and dynamics of *Legionella pneumophila* subpopulations in a nuclear power plant cooling circuit.
FEMS Microbiol Ecol 2013; 85(2): 302-12.
- 311 Howard K, Inglis TJ. Disinfection of *Burkholderia pseudomallei* in potable water. *Water Res* 2005;
39(6): 1085-92.
- 312 Capita R, Riesco-Pelaez F, Alonso-Hernando A, Alonso-Calleja C. Exposure of *Escherichia coli*
ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm,
resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(4): 1268-80.
- 313 Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food
contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol* 2001; 64(3): 367-72.
- 314 Hedberg CW, Angulo FJ, White KE, Langkop CW, Schell WL, Stobierski MG, e.a. Outbreaks of
salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: implications for public health. The
Investigation Team. *Epidemiol Infect* 1999; 122(3): 385-93.
- 315 Proctor ME, Hamacher M, Tortorello ML, Archer JR, Davis JP. Multistate outbreak of *Salmonella*
serovar Muenchen infections associated with alfalfa sprouts grown from seeds pretreated with
calcium hypochlorite. *J Clin Microbiol* 2001; 39(10): 3461-5.
-

- 316 Brooks JT, Rowe SY, Shillam P, Heltzel DM, Hunter SB, Slutsker L, e.a. Salmonella Typhimurium infections transmitted by chlorine-pretreated clover sprout seeds. *Am J Epidemiol* 2001; 154(11): 1020-8.
- 317 Stewart DS, Reineke KF, Ulaszek JM, Tortorello ML. Growth of Salmonella during sprouting of alfalfa seeds associated with salmonellosis outbreaks. *J Food Prot* 2001; 64(5): 618-22.
- 318 Fett WF. Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts. *J Food Prot* 2000; 63(5): 625-32.
- 319 Winthrop KL, Palumbo MS, Farrar JA, Mohle-Boetani JC, Abbott S, Beatty ME, e.a. Alfalfa sprouts and Salmonella Kottbus infection: a multistate outbreak following inadequate seed disinfection with heat and chlorine. *J Food Prot* 2003; 66(1): 13-7.
- 320 Dodd CE, Chaffey BJ, Waites WM. Plasmid profiles as indicators of the source of contamination of Staphylococcus aureus endemic within poultry processing plants. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54(6): 1541-9.
- 321 Stewart MH, Olson BH. Physiological studies of chloramine resistance developed by Klebsiella pneumoniae under low-nutrient growth conditions. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(9): 2918-27.
- 322 Power KN, Schneider RP, Marshall KC. The effect of growth conditions on survival and recovery of Klebsiella oxytoca after exposure to chlorine. *Wat Res* 1997; 31(1): 135-9.
- 323 Gebendorfer KM, Drazic A, Le Y, Gundlach J, Bepperling A, Kastenmuller A, e.a. Identification of a hypochlorite-specific transcription factor from Escherichia coli. *J Biol Chem* 2012; 287(9): 6892-903.
- 324 Drazic A, Kutzner E, Winter J, Eisenreich W. Metabolic Response of Escherichia coli upon Treatment with Hypochlorite at Sub-Lethal Concentrations. *PLoS One* 2015; 10(5): e0125823.
- 325 Andreoletti O, Budka H, Buncic S, Colin P, Collins JD, De Koeijer A, e.a. Assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *The EFSA Journal* 2008; 659: 1-26.
- 326 Gundlach J, Winter J. Evolution of Escherichia coli for maximum HOCl resistance through constitutive expression of the OxyR regulon. *Microbiology* 2014; 160(Pt 8): 1690-704.
- 327 Alonso-Calleja C, Guerrero-Ramos E, Alonso-Hernando A, Capita R. Adaptation and cross-adaptation of Escherichia coli ATCC 12806 to several food-grade biocides. *Food Control* 2015; 56: 86-94.
- 328 Alonso-Hernando A, Capita R, Prieto M, Alonso-Calleja C. Adaptation and cross-adaptation of Listeria monocytogenes and Salmonella enterica to poultry decontaminants. *J Microbiol* 2009; 47(2): 142-6.
- 329 Potenski CJ, Gandhi M, Matthews KR. Exposure of Salmonella Enteritidis to chlorine or food preservatives decreases [corrected] susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 220(2): 181-6.
- 330 Alonso-Hernando A, Capita R, Prieto M, Alonso-Calleja C. Comparison of antibiotic resistance patterns in Listeria monocytogenes and Salmonella enterica strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control* 2009; 20: 1108-11.
-

- 331 Molina-Gonzales D, Alonso-Calleja C, Alonso-Hernando A, Capita R. Effect of sub-lethal concentrations of biocides on the susceptibility to antibiotics of multi-drug resistant *Salmonella enterica* strains. *Food Control* 2014; 40: 329-34.
- 332 Capita R, Alvarez-Fernandez E, Fernandez-Buelta E, Manteca J, Alonso-Calleja C. Decontamination treatments can increase the prevalence of resistance to antibiotics of *Escherichia coli* naturally present on poultry. *Food Microbiol* 2013; 34(1): 112-7.
- 333 Xi C, Zhang Y, Marrs CF, Ye W, Simon C, Foxman B, e.a. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75(17): 5714-8.
- 334 Armstrong JL, Shigeno DS, Calomiris JJ, Seidler RJ. Antibiotic-resistant bacteria in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 1981; 42(2): 277-83.
- 335 Armstrong JL, Calomiris JJ, Seidler RJ. Selection of antibiotic-resistant standard plate count bacteria during water treatment. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44(2): 308-16.
- 336 Shi P, Jia S, Zhang XX, Zhang T, Cheng S, Li A. Metagenomic insights into chlorination effects on microbial antibiotic resistance in drinking water. *Water Res* 2013; 47(1): 111-20.
- 337 Jia S, Shi P, Hu Q, Li B, Zhang T, Zhang XX. Bacterial Community Shift Drives Antibiotic Resistance Promotion during Drinking Water Chlorination. *Environ Sci Technol* 2015; 49(20): 12271-9.
- 338 Khan S, Beattie TK, Knapp CW. Relationship between antibiotic- and disinfectant-resistance profiles in bacteria harvested from tap water. *Chemosphere* 2016; 152: 132-41.
- 339 Karumathil DP, Yin HB, Kollanoor-Johny A, Venkitanarayanan K. Effect of chlorine exposure on the survival and antibiotic gene expression of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in water. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11(2): 1844-54.
- 340 Lv L, Jiang T, Zhang S, Yu X. Exposure to mutagenic disinfection byproducts leads to increase of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Sci Technol* 2014; 48(14): 8188-95.
- 341 Lv L, Yu X, Xu Q, Ye C. Induction of bacterial antibiotic resistance by mutagenic halogenated nitrogenous disinfection byproducts. *Environ Pollut* 2015; 205: 291-8.
- 342 Li D, Zeng S, He M, Gu AZ. Water Disinfection Byproducts Induce Antibiotic Resistance-Role of Environmental Pollutants in Resistance Phenomena. *Environ Sci Technol* 2016; 50(6): 3193-201.
- 343 Schets FM, van den Berg HH, Baan R, Lynch G, de Roda Husman AM. *Pseudomonas aeruginosa* on vinyl-canvas inflatables and foam teaching aids in swimming pools. *J Water Health* 2014; 12(4): 772-81.
- 344 Bouki C, Venieri D, Diamadopoulos E. Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicol Environ Saf* 2013; 91: 1-9.
- 345 Ferro G, Polo-Lopez MI, Fernandez-Ibanez P. Conventional and new processes for urban wastewater disinfection: effect on emerging and resistant microorganisms. In: Fatta-Kassinos D. *Advanced treatment technologies for urban wastewater, Handbook of Environmental Chemistry*. 107-28. Switzerland: Springer International Publishing, 2016.
- 346 Murray GE, Tobin RS, Junkins B, Kushner DJ. Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48(1): 73-7.
-

- 347 Huang JJ, Hu HY, Tang F, Li Y, Lu SQ, Lu Y. Inactivation and reactivation of antibiotic-resistant
bacteria by chlorination in secondary effluents of a municipal wastewater treatment plant. *Water Res*
2011; 45(9): 2775-81.
- 348 Lin W, Zhang M, Zhang S, Yu X. Can chlorination co-select antibiotic-resistance genes?
Chemosphere 2016; 156: 412-9.
- 349 Macauley JJ, Qiang Z, Adams CD, Surampalli R, Mormile MR. Disinfection of swine wastewater
using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Res* 2006; 40(10): 2017-26.
- 350 Paes FA, Hissa DC, Angelim AL, Pinto NW, Grangeiro TB, Melo VM. Diversity of a chlorine-
resistant *Bacillus* population isolated from a wastewater treatment station. *Water Environ Res* 2012;
84(3): 274-81.
- 351 Guo MT, Yuan QB, Yang J. Distinguishing effects of ultraviolet exposure and chlorination on the
horizontal transfer of antibiotic resistance genes in municipal wastewater. *Environ Sci Technol* 2015;
49(9): 5771-8.
- 352 Lin W, Li S, Zhang S, Yu X. Reduction in horizontal transfer of conjugative plasmid by UV
irradiation and low-level chlorination. *Water Res* 2016; 91: 331-8.
- 353 Falkinham JO, III. Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. *Int J Environ Res*
Public Health 2015; 12(5): 4533-45.
- 354 Falkinham JO, Pruden A, Edwards M. Opportunistic Premise Plumbing Pathogens: Increasingly
Important Pathogens in Drinking Water. *Pathogens* 2015; 4(2): 373-86.
- 355 Belly RT, Kydd GC. Silver resistance in microorganisms. *Dev Ind Microbiol* 1982; 23: 567-577.
- 356 Choudhury P, Kumar R. Multidrug- and metal-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated
from *Penaeus monodon* of the coastal waters of deltaic Sundarban. *Can J Microbiol.* 1998; 44(2):
186-9.
-

Gezondheidsraad

Adviezen

De taak van de Gezondheidsraad is ministers en parlement te adviseren over vraagstukken op het gebied van de volksgezondheid. De meeste adviezen die de Gezondheidsraad jaarlijks uitbrengt worden geschreven op verzoek van een van de bewinds-

lieden. Met enige regelmaat brengt de Gezondheidsraad ook ongevraagde adviezen uit, die een signalerende functie hebben. In sommige gevallen leidt een signalerend advies tot het verzoek van een minister om over dit onderwerp verder te adviseren.

Aandachtsgebieden



Optimale gezondheidszorg
Wat is het optimale resultaat van zorg (cure en care) gezien de risico's en kansen?



Preventie
Met welke vormen van preventie valt er een aanzienlijke gezondheidswinst te behalen?



Gezonde voeding
Welke voedingsmiddelen bevorderen een goede gezondheid en welke brengen bepaalde gezondheidsrisico's met zich mee?



Gezonde leefomgeving
Welke invloeden uit het milieu kunnen een positief of negatief effect hebben op de gezondheid?



Gezonde arbeidsomstandigheden
Hoe kunnen werknemers beschermd worden tegen arbeidsomstandigheden die hun gezondheid mogelijk schaden?



Innovatie en kennisinfrastructuur
Om kennis te kunnen oogsten op het gebied van de gezondheidszorg moet er eerst gezaaid worden.

