



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Alex Guerra Ferreira

A influência do crescimento em biofilme na susceptibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* associadas a infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística

Rio de Janeiro

2008

Alex Guerra Ferreira

A influência do crescimento em biofilme na susceptibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* associadas a infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística



-Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Coorientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth

Rio de Janeiro

2008

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

F383 Ferreira, Alex Guerra.
A influência do crescimento em biofilme na susceptibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* associadas a infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística / Alex Guerra Ferreira. – 2008.
85 f.

Orientadora: Elizabeth de Andrade Marques
Coorientador: Afonso Luis Barth
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 2. Fibrose cística – Teses. 3. Pulmões – Infecções – Teses. 4. Biofilme – Teses. I. Marques, Elizabeth de Andrade. II. Barth, Afonso Luis. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 576.8

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Alex Guerra Ferreira

A influência do crescimento em biofilme na susceptibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* associadas a infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 16 de agosto de 2008.

Orientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Domenico Capone
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2008

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a memória do meu pai

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar pelo caminho mais correto.

A minha mãe, pelo simples fato de existir.

A Prof^a. Elizabeth de Andrade Marques, pela oportunidade, confiança e o exemplo profissional.

A Fabiana Cordeiro, pelos momentos maravilhosos e inesquecíveis que passei ao seu lado.

A Rachel Leite Ribeiro e Robson de Souza Leão, pela amizade nas horas mais difíceis.

A Márcia Cruz Mota Fonseca Jones, por ter me ensinado os primeiros passos na Microbiologia e me tratado como um filho.

A Júnior e Carla, pela caminhada juntos desde a iniciação científica.

Aos companheiros do laboratório 2: Ana Karine, Diana, Elenice, Fernanda, Gisele, Luciene, Rosana e Viviane, pela ajuda durante a execução do trabalho.

A Denílson Ferreira Batista, por ter sido sempre prestativo e divertido comigo.

A Ana Paula D'Alincourt Carvalho, pelo grande auxílio em umas das etapas do trabalho.

A todos os Professores e Funcionários da Disciplina de Microbiologia e Imunologia que me ajudaram desde que cheguei aqui.

Aos meus amigos David e Wallace, por serem meus irmãos em famílias diferentes.

Aos amigos que fiz durante a graduação: Ana Lúcia, André, Claudia, Juliana, Jeanine, Luis Filipi, Maria Clara e Monique.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Prefiro ser um homem de paradoxos a um homem de preconceitos.

Jean-Jacques Rousseau

RESUMO

FERREIRA, Alex Guerra. **A influência do crescimento em biofilme na susceptibilidade a antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* associadas a infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística.** 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

A infecção pulmonar crônica por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística (FC) está associada a um dano progressivo do tecido pulmonar, que tem como consequência à falência respiratória e morte na maioria dos pacientes. A antibioticoterapia traz importantes contribuições, porém a capacidade deste microrganismo em persistir no ambiente pulmonar após o tratamento pode estar relacionada com a formação de biofilme e a resistência a ação dos antimicrobianos nesta forma de crescimento. Em 40 amostras de *P. aeruginosa* obtidas de 20 pacientes fibrocísticos com infecção crônica: analisamos a capacidade de formação de biofilme, comparamos as concentrações inibitórias mínimas de cinco antimicrobianos nas duas formas de crescimento, planctônica (CIM) e biofilme (BIC) e fizemos a tipagem molecular pela técnica de PFGE. Todas as amostras mostraram-se capazes de formar biofilme, sendo que 47,5% e 45% delas revelaram capacidade moderada e fraca, respectivamente e não houve diferença significativa entre os morfotipos não mucóide e mucóide. Ao compararmos CIMs e BICs verificamos aumentos significativos para todos os antimicrobianos. Todas as amostras foram susceptíveis aos aminoglicosídeos pela CIM, porém na BIC os índices de resistência foram de 92,5%; 85% e 45% para tobramicina, gentamicina e amicacina, respectivamente. A tipagem molecular revelou uma grande diversidade entre as amostras (27 perfis), já que 75% dos pacientes mostraram-se colonizados por cepas distintas. Entretanto, alguns pacientes apresentaram-se colonizados por amostras com o mesmo perfil. Correlacionando os perfis clonais encontrados com a formação de biofilme e os valores da BIC, verificamos que não houve associação entre nenhum perfil e o comportamento fenotípico. Nossos resultados reforçam a necessidade de padronização e implementação de testes *in vitro* que possam detectar essas peculiaridades e que representem de maneira mais fidedigna a verdadeira fisiopatologia das infecções pulmonares por *P. aeruginosa*, impactando de forma positiva na conduta médica frente aos pacientes.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Fibrose cística. Biofilme. Resistência.

ABSTRACT

FERREIRA, Alex Guerra. **Influence of biofilm growth on antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* associated with chronic lung infections in cystic fibrosis patients**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

The chronic pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis (CF) is associated with a gradual damage of the pulmonary tissue, resulting the respiratory bankruptcy and death in the majority of the patients. Antibiotic therapy has a important contribution, however the capacity of these microorganisms in persisting in the pulmonary environment after the treatment have been related with their ability biofilm of formation and the resistance to action of antimicrobials in this form of growth. In 40 gotten samples of *P. aeruginosa* of 20 CF patients with chronic infection: we analyze the capacity of formation of biofilm, compare the minimal inhibitory concentration of five antimicrobials in the two forms of growth, planctonic (MIC) and biofilm (BIC) and made the molecular typing by the PFGE technique. All the samples had revealed capable to form biofilm, being that 47.5% and 45% of them had disclosed moderate and weak capacity, respectively and it did not have significant difference between the morfotypes nonmucoid and mucoid. With it, we compare MICs and BICs verify significant increases for all the antimicrobials. All the samples had been susceptible to the aminoglycosides by the CIM, however in the BIC the resistance levels had been of 92,5%; 85% and 45% for tobramycin, gentamicin and amikacin, respectively. The molecular typing disclosed a great diversity between the samples (27 profiles), since 75% of the patients had revealed colonized for distinct strains. However, some patients had presented samples with the same profile. Correlating the clonal profiles found with the formation of biofilm and the values of the BIC, we verify that did not have association between the clonal profile and phenotypic behavior. Our results show the importance of standardization and implementation of tests in vitro that they can detect these peculiarities and that pulmonary infections for *P. aeruginosa* represent in trustwother way the true physiopatology them, reflecting of positive form in the medical behavior in front of the patients.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Cystic Fibrosis. Biofilm. Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do teste de susceptibilidade para o crescimento em biofilme.....	34
Figura 2	Representação do resultado mostrando as três categorias (fraco, moderado e forte) no teste de formação do biofilme em <i>P. aeruginosa</i>	42
Figura 3	Comparação entre a formação de biofilme em <i>P. aeruginosa</i> não mucóide e mucóide.....	44
Figura 4	Comparação entre a formação de biofilme entre o primeiro e o segundo isolado de <i>P. aeruginosa</i>	46
Figura 5	Distribuição das densidades bacterianas do biofilme em 40 amostras de <i>P. aeruginosa</i> , analisada por paciente.....	47
Figura 6	Comparação entre os valores de CIM e BIC para ceftazidima.....	50
Figura 7	Comparação entre os valores de CIM e BIC para tobramicina.....	50
Figura 8	Comparação entre os valores de CIM e BIC para amicacina.....	51
Figura 9	Comparação entre os valores de CIM e BIC para gentamicina.....	51
Figura 10	Comparação entre os valores de CIM e BIC para ciprofloxacina.....	52
Figura 11	Dendrograma mostrando os coeficientes de similaridade entre os perfis gerados por PFGE das 40 amostras de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes com FC.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características da amostragem estudada.....	38
Tabela 2	Concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos para 40 amostras de <i>P. aeruginosa</i>	40
Tabela 3	Distribuição das concentrações inibitórias mínimas para <i>P. aeruginosa</i> não mucóide e mucóide.....	41
Tabela 4	Comparação da capacidade de formação de biofilme em <i>P. aeruginosa</i>	43
Tabela 5	Comparação entre <i>P. aeruginosa</i> não mucóide e mucóide quanto à capacidade de formação de biofilme.....	45
Tabela 6	Concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos para 40 amostras de <i>P. aeruginosa</i> sob crescimento em biofilme.....	48
Tabela 7	Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos para <i>P. aeruginosa</i> não mucóide e mucóide crescidas em biofilme.....	49
Tabela 8	Comparação da CIM ₅₀ e BIC ₅₀ em 40 amostras de <i>P. aeruginosa</i> ..	53
Tabela 9	Comparação do perfil de susceptibilidade entre amostras de <i>P. aeruginosa</i> com crescimento planctônico (CIM) e em biofilme (BIC).....	54
Tabela 10	Perfil de resistência das 40 amostras de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com os resultados obtidos na BIC.....	55
Tabela 11	Comparação entre os perfis genotípicos e a capacidade de formação do biofilme.....	59
Tabela 12	Comparação entre os perfis de PFGE idênticos e as concentrações inibitórias mínimas das amostras de <i>P. aeruginosa</i> crescidas em biofilme.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

acyl-HSLs	acylhomoserina lactonas
AMI	Amicacina
ATCC	“American Type Culture Colection”
BGN-NF	Bastonetes Gram-negativos Não fermentadores
BIC	Concentração inibitória mínima para o crescimento em biofilme
C4-HSL	N-butyryl-L- homoserina lactona
CAMHB	<i>Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth</i>
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CFTR	Proteína reguladora de condutância transmembranar da fibrose cística
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLED	<i>Cystine Lactose Eletrolites Deficient</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
DNA	Ácido desoxi-ribonucleico
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etileno diamino-tetra-acético
FC	Fibrose cística
FIOCRUZ	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GEN	Gentamicina
HCl	Ácido clorídrico
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Fernandes Figueira
Kb	Quiilobases
LPS	lipopolissacarídeo
M	Mucóide
ml	mililitro
NaCl	Cloreto de sódio
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NM	Não Mucóide
PCR	reação em cadeia da polimerase
PFGE	eletroforese em gel de campo pulsado
pH	Potencial Hidrogenionico
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> -
RFLP	polimorfismo dos fragmentos de restrição
TOB	Tobramicina
TSA	<i>Tryptcase Soy Agar</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
µg	microgramas
µL	microlitro
3OC12-HSL	N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserina lactona

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	28
1.1	Objetivo geral	28
1.2	Objetivos específicos	28
2	MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1	Pacientes, espécimes clínicos e amostras bacterianas	30
2.2	Determinação das concentrações inibitórias mínimas para <i>P. aeruginosa</i>	31
2.3	Formação de biofilme	32
2.4	Determinação das concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos em <i>P. aeruginosa</i> sob crescimento em biofilme...	33
2.5	Perfil de fragmentação do dna cromossômico por Eletroforese em campo pulsado, PFGE (Pulsed-Field Gel Electrophoresis)	35
3	RESULTADOS	37
3.1	Características da amostragem	37
3.2	Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos para <i>P. aeruginosa</i>	39
3.3	Formação de biofilme	41
3.4	Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos para <i>P. aeruginosa</i> sob crescimento em biofilme (BIC)	47
3.5	Análise comparativa entre as Concentrações Inibitórias Mínimas em <i>P. aeruginosa</i> sob as condições de crescimento planctônico (CIM) e em biofilme (BIC)	49
3.6	Tipagem molecular	56
4	DISCUSSÃO	62
4.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e biofilme na Fibrose Cística	62
4.2	Biofilme e resistência	64
4.3	Tipagem molecular	69
	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	75

INTRODUÇÃO

Fibrose cística

A Fibrose Cística (FC) se manifesta como uma síndrome clínica caracterizada pela ocorrência de infecções pulmonares crônicas e alterações gastrintestinais e nutricionais (Liczak, Cannom & Píer, 2002). Trata-se de uma doença autossômica recessiva encontrada predominantemente na população caucasiana, sendo consequência de mutações no gene que codifica a glicoproteína reguladora de condutância transmembranar da fibrose cística (CFTR), uma proteína presente em células epiteliais de diversos tecidos e que atua na homeostase de íons e fluidos. Atualmente, são reconhecidas aproximadamente 1500 mutações relacionadas com diferentes graus de severidade e manifestação da doença (Shreve *et al.*, 1999; Moore *et al.*, 2004; Riordan, 2007).

Apesar de vários órgãos serem afetados, a infecção pulmonar crônica é a principal causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com FC. Nas vias aéreas o mecanismo de defesa depende de um sistema mucociliar, que consiste na presença de uma camada bifásica de muco sobre as células epiteliais ciliadas. A fase superior do muco é viscosa, permitindo a captura de partículas e microrganismos, enquanto que a camada inferior é mais fluida, para que haja o batimento ciliar criando um fluxo unidirecional que carrega os corpos estranhos para nasofaringe, onde serão eliminados ou deglutidos (Rogers *et al.*, 1993; Engelhardt *et al.*, 1994; Liczak, Cannom & Píer, 2002; Bagge *et al.*, 2004; Foweraker *et al.*, 2005).

Nos pacientes fibrocísticos, a perda ou redução da função da proteína CFTR provoca alterações na secreção e na reabsorção do muco, tornando-o uma camada uniformemente viscosa o que dificulta a criação de um fluxo pelo movimento ciliar, favorecendo a persistência de bactérias nas vias aéreas e a doença pulmonar crônica nestes pacientes (Sperra & Collins, 1993; Oliver *et al.*, 2000; Tramper – Sanders *et al.*, 2005).

Até a primeira metade do século XX, 80% dos recém-natos portadores da FC morriam antes de completar um ano de idade e o óbito ocorria em todos os pacientes até os 10 anos (Manno, 2005). Nas décadas de 50 e 60 estudos

descreveram uma considerável proporção de pacientes alcançando a adolescência (Nivens *et al.*, 2001; Liczak, Cannom & Píer, 2002). Após os anos 90, aproximadamente um terço dos fibrocísticos atinge a idade adulta, com uma expectativa de vida superior a 30 anos nos países desenvolvidos. O aumento da sobrevida média destes pacientes está ligado a um avanço do conhecimento sobre a doença, representado pela adoção de princípios multidisciplinares padronizados no tratamento dos portadores de FC (FitzSimmons, 1993; Hutchison & Govan, 1999; Liczak, Cannom & Píer, 2002; Ratjen & Doring, 2003).

Aspectos microbiológicos na FC

As infecções pulmonares crônicas, que perpetuam o declínio da função pulmonar, são a principal causa de morbidade e mortalidade nos pacientes com FC (Hutchison & Govan, 1999; Liczak, Cannom & Píer, 2002). Essas infecções são principalmente de etiologia bacteriana e restritas a poucos patógenos como: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e espécies do grupo dos bastonetes Gram negativos não fermentadores (BGN-NF), caracterizando-se por quadros progressivamente crônicos com episódios de exacerbação aguda (Govan & Nelson, 1993; Saiman & Siegel, 2004).

Admite-se que os pacientes com FC têm o pulmão inicialmente colonizado por *S. aureus* e *H. influenzae*, duas espécies bacterianas presentes no trato respiratório superior (Umetsu *et al.*, 1990; Hoiby, 1995; *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry*, 2003). Atualmente não há consenso sobre o uso de antibioticoterapia anti-estafilocócica, de forma rotineira ou intermitente, a fim de prevenir a progressão da infecção para um estágio de grave patologia (Ulrich, Liczak & Govan, 1992). Sugere-se que a infecção por *S. aureus* precede a infecção do parênquima pulmonar dos fibrocísticos pelos BGN-NF, dentre os quais destaca-se a *Pseudomonas aeruginosa* que é a espécie mais freqüente e responsável pela maior taxa de morbidade e mortalidade nesses pacientes (Govan & Nelson, 1992; Hutchison & Govan, 1999; Burns *et al.*, 2001).

O aumento da sobrevida dos pacientes foi acompanhado do isolamento de outros BGN-NF além da *P. aeruginosa*, como as bactérias do Complexo

Burkholderia cepacia (CBc), microrganismos caracteristicamente ambientais encontrados em numerosas fontes de água, soluções detergentes e líquidos endovenosos, que tiveram um aumento na frequência de isolamento no escarro de fibrocísticos nas últimas décadas (Gilligan, 1991; Gladman *et al.*, 1992; Burns & Saiman, 1999, Sibley, Rabin & Surette, 2006). O CBc é composto por nove espécies, que são encontradas em diferentes frequências nos pacientes com FC e apresentam variações quanto a apresentação clínica e produção de fatores de virulência. Além disso, estas bactérias apresentam resistência inata a maioria dos antimicrobianos e algumas espécies possuem alta capacidade de transmissão entre os pacientes (Li Puma *et al.*, 1998; Coenye *et al.*, 2001; Saiman *et al.*, 2003; Govan, Brown & Jones, 2007).

A colonização por espécies do CBc nesses pacientes pode evoluir de três formas: colonização assintomática, infecção com declínio da função pulmonar e deterioração pulmonar aguda com bacteremia, pneumonia necrozante, sinais de septicemia e evolução rápida do paciente ao óbito: caracterizando a “síndrome cepacia” (Coenye *et al.*, 2000; Vinion-Dubiel *et al.*, 2004, Govan, Brown & Jones, 2007).

Outros BGN-NF são isolados dos pacientes com FC em menor frequência, como *Stenotrophomonas maltophilia*, cujo potencial patogênico ainda não está definido, e *Achromobacter xylosoxidans*, frequentemente associado com exacerbações dos sintomas pulmonares (Denton *et al.*, 1998; Saiman *et al.*, 2001; Rabin & Surette, 2006). *Burkholderia pseudomallei* e espécies do gênero *Pandoraea* spp. também já foram isoladas, porém os efeitos da colonização por estes microrganismos no curso da doença destes pacientes permanecem desconhecidos (Barth *et al.*, 2007; Pimentel & Macleod, 2008).

***Pseudomonas aeruginosa* e a FC**

P. aeruginosa é um BGN-NF com grande versatilidade nutricional, sendo capaz de utilizar diversos compostos orgânicos, assim como é capaz de crescer em meios de cultura contendo somente acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. É um microrganismo aeróbio, mas pode crescer

em condições de anaerobiose utilizando o nitrato ou a arginina como aceptor final de elétrons. É móvel devido a presença de flagelo polar monotríqueo e produz pigmentos hidrossolúveis, tais como a pioverdina (pigmento fluorescente) e a piocianina (pigmento fenazina de cor azul). A combinação destes dois pigmentos é responsável pela cor verde brilhante, característica patognomônica das colônias de *P. aeruginosa*. Algumas amostras também produzem outros pigmentos hidrossolúveis como piorrubina ou piomelanina (Vasil, 1986; Pollack, 1995).

P. aeruginosa é uma bactéria ubíqua, com predileção por ambientes úmidos, sendo encontrada no solo, água e plantas. São pouco freqüentes como constituintes da microbiota de indivíduos saudáveis (Kiska & Gilligan, 2001). Trata-se de um microrganismo com elevado potencial adaptativo, sendo um patógeno oportunista causador de uma variedade de infecções em humanos e outros animais (Goldberg & Pier, 2000).

Este microrganismo é o principal patógeno, tanto em importância quanto em prevalência, encontrado no pulmão dos pacientes com FC (Singh *et al.*, 2000). A colonização crônica por esta bactéria associada à inflamação das vias aéreas conduz a um dano progressivo do tecido pulmonar, que tem como consequência à falência respiratória e morte em cerca de 85% dos fibrocísticos (Hoiby, 1993; Welsh, *et al.*, 1995; Gibson, Burns & Ramsey, 2003).

A colonização do pulmão destes pacientes pela *P. aeruginosa* pode ocorrer antes dos seis meses de idade, podendo se tornar crônica já na primeira década de vida, com aumento da freqüência das exacerbações pulmonares (Armstrong *et al.*, 1997; Rosenfeld *et al.*, 2001). A partir da adolescência, mais de 80% dos pacientes com FC são considerados cronicamente infectados por *P. aeruginosa* (Heijerman, 2005; Moreau-Marquis, Stanton & O'Toole, 2007).

Características fisiopatológicas resultantes do funcionamento inadequado da proteína CFTR tornam o tecido pulmonar do fibrocístico particularmente susceptível a colonização por *P. aeruginosa* (Hutchison & Govan, 1999). O aumento da expressão de asialo-GM₁ na superfície apical das células do epitélio respiratório favorece a adesão destes microrganismos (Saiman & Prince, 1993; De Bentzmann *et al.*, 1996; Davies *et al.*, 1997). Além disso, a elevada viscosidade e osmolaridade do fluido da superfície das vias aéreas afetam a atuação de peptídeos antimicrobianos e defensinas no combate a *P. aeruginosa*, permitindo que a bactéria

se estabeleça causando um quadro infeccioso (Smith *et al.*, 1996; Goldman *et al.*, 1997).

A colonização inicial pode ser resultado do contato social ou da aquisição em visitas a hospitais ou clínicas, porém a grande diversidade clonal dos isolados sugere uma origem ambiental (Speert & Campbell, 1987; Burns *et al.*, 2001). Normalmente, o morfotipo não mucóide (NM) é o responsável por esta colonização inicial e pelo início da patogênese, devido ao arsenal de fatores de virulência que expressa como: lipolissacarídeo, pili, sistema de secreção do tipo III, exotoxina A, elastases e proteases; fatores estes que, associados à resposta inflamatória causam o dano tecidual no pulmão (Martin *et al.*, 1994; O'Toole & Kolter, 1998; Terada *et al.*, 1999; Hentzer *et al.*, 2001; Finnam *et al.*, 2004).

Estudos longitudinais mostram que este morfotipo NM adquirido inicialmente, pode permanecer no pulmão dos fibrocísticos por vários anos (Mahenthiralingam *et al.*, 1996; Renders *et al.*, 1996). A caracterização do estágio de infecção crônica, normalmente se dá pelo aumento das exacerbações e pela conversão do morfotipo NM para o mucóide (M) (Liczak, Cannom & Píer, 2002). Este fenótipo é resultado da hiperprodução de alginato, um polímero acetilado composto por monômeros de β -1,4 associados aos ácidos D-manurônico e L-glucurônico (Ryder, Byrd & Wozniak, 2007). A conversão para o morfotipo M está associada a mutações no gene regulador *muc A* que capacitam a bactéria a sobreviver no ambiente hostil que é o pulmão do fibrocístico (Martin *et al.*, 1993; Mahenthiralingam *et al.*, 1994; Drenkard & Ausubel, 2002).

O aparecimento do morfotipo M está associado a um pior prognóstico para os pacientes, com aumento da deterioração pulmonar. Estudos mostram que uma minoria de pacientes que não apresenta o morfotipo M possui a função pulmonar significativamente melhor do que aqueles que colonizados por este fenótipo (Parad *et al.*, 1999; Sener *et al.*, 2001; Bagge *et al.*, 2004; Heijerman, 2005). O alginato atua como um importante fator de proteção contra a ação das imunidades inata e adquirida, protegendo o microrganismo contra a fagocitose, o estresse oxidativo e o sistema complemento, além de agir como uma relevante barreira à ação de antimicrobianos, garantindo assim a persistência da *P. aeruginosa* no pulmão dos fibrocísticos (Gilligan, 1991; May, Shinabarged & Mahara, 1991; Moss, 1995; Hentzer *et al.*, 2001; Liczak, Cannom & Píer, 2002).

Antibioticoterapia na FC

A antibioticoterapia traz importantes contribuições para os pacientes com FC, pois diminui a densidade bacteriana, erradica os microrganismos e trata a exacerbação pulmonar, reduzindo a morbidade e aumentando a expectativa de vida destes pacientes (Beaulac *et al.*, 1996; Ratijen, 2001a; Finnan *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004). Existem alguns documentos orientativos para o tratamento desses pacientes, porém a maioria das decisões a respeito de quando tratar e quais antibióticos utilizar é empírica e baseada na idade dos pacientes, nos microrganismos infectantes e na severidade da exacerbação pulmonar e, portanto, a conduta pode ser variável entre os diferentes centros de atendimento. (Doring *et al.*, 2000; Liczak, Cannom & Píer, 2002).

A antibioticoterapia é necessária para impedir o rápido declínio da função respiratória dos pacientes infectados por *P. aeruginosa*, entretanto o tratamento é muito difícil, já que dos antimicrobianos que mostram atividade *in vitro*, somente uma minoria é eficaz nas concentrações recomendáveis para a terapêutica (Deretic *et al.*, 1995; Giamarellou & Antoniadou, 2001). Além disso, mesmo quando o tratamento é adequado, a presença do morfotipo M torna a erradicação deste microrganismo rara (Macia *et al.*, 2004; Manno *et al.*, 2005).

Alguns β -lactâmicos são ativos contra estes microrganismos, como as carboxipenicilinas (carbenicilina e ticarcilina), as ureidopenicilinas (azlocilina e piperacilina), as cefalosporinas (ceftazidima e cefepime), o monobactâmico aztreonam e os carbapenens (imipenem e meropenem). Além disso, também podem ser empregados aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina e tobramicina) e quinolonas (ciprofloxacina) (Livermore, 2001; Geller *et al.*, 2002; Saiman & Siegel, 2003; Smyth *et al.*, 2005).

Esquemas terapêuticos utilizando monoterapia ou terapia combinada com antimicrobianos por via oral, para o tratamento de infecções leves, e por via intravenosa, para infecções moderadas ou graves, têm sido propostos para o combate à doença pulmonar causada por *P. aeruginosa* (Liczak, Cannom & Píer, 2002). Segundo o Consenso Europeu de FC, o tratamento primário da infecção precoce por *P. aeruginosa* consiste na utilização de antimicrobianos via oral e

inalatória e no caso de exacerbações deve-se utilizar terapia intravenosa (Doring *et al.*, 2000).

O tratamento com quinolonas por via oral, em particular a ciprofloxacina, que é tão eficaz por esta via quanto por via intravenosa, vem sendo utilizado juntamente com a nebulização de tobramicina ou polimixina, pois o uso de antimicrobiano por via inalatória permite que se consiga altas concentrações nas vias aéreas, com boa eficácia clínica e baixa incidência de efeitos adversos, uma vez que a absorção sistêmica é praticamente nula (Sermet-Gaudelus *et al.*, 2002). Contudo o uso da ciprofloxacina é limitado, devido a sua toxicidade para pacientes pediátricos e a rápida emergência de resistência (Church *et al.*, 1997).

Outro esquema terapêutico baseia-se na administração sistêmica juntamente com a nebulização. Como terapia intravenosa foi descrita a associação de um aminoglicosídeo com um β -lactâmico, ou a combinação deste último com a ciprofloxacina e para nebulização, colistina ou tobramicina. Além disso, a nebulização tem sido empregada na antibioticoterapia profilática (Manno *et al.*, 2005).

No Brasil, um dos esquemas utilizados para a erradicação da *P. aeruginosa* do pulmão dos fibrocísticos, durante as fases iniciais da colonização, consiste na administração intravenosa de ceftazidima associada ao uso de um aminoglicosídeo por via inalatória (amicacina ou tobramicina). A partir do estabelecimento da infecção crônica, acrescentam-se ciclos intermitentes de tobramicina inalatória a fim de se evitar os quadros de exacerbação pulmonar (Frederiksen *et al.*, 1997). A melhor opção de tratamento ainda não está estabelecida e, a despeito de uma intervenção precoce e agressiva, pode não ser possível erradicar a *P. aeruginosa* das vias respiratórias de pacientes com FC, devido, em parte, a capacidade de formação de biofilme desta bactéria (Doring *et al.*, 2000; Costerton, 2001).

Biofilme

Biofilmes podem ser definidos simplesmente como comunidades de microrganismos aderidos a uma superfície (O'Toole, Kaplan & Kolter, 2000a). Estas células bacterianas encontram-se embebidas em uma matriz composta por

proteínas, polissacarídeos e ácido nucléico que é secretada pelos próprios componentes do biofilme (Costerton *et al.*, 1995; Whitchurch *et al.*, 2002).

O crescimento em biofilme é uma alternativa a vida planctônica, sendo considerado uma estratégia de sobrevivência da bactéria (Höiby *et al.*, 2001). Trata-se de uma forma de desenvolvimento microbiano, pois estas bactérias sofrem alterações na forma e função que passam a ter um papel proeminente no ciclo de vida destes microrganismos (Shimkets & Brun, 1999). O biofilme representa um sistema biológico com elevado nível de organização, onde as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais (O'Toole, Kaplan & Kolter, 2000a).

Os biofilmes podem ser compostos por uma ou mais espécies microbianas e podem ser formados em uma ampla gama de superfícies bióticas e abióticas. Enquanto que os biofilmes polimicrobianos predominam na maioria dos ambientes os biofilmes monomicrobianos existem em várias infecções e na superfície de dispositivos médicos (Dickinson & Bisno, 1993; Adal & Farr, 1996; Archibald & Gaynes; 1997).

A formação do biofilme pelas bactérias é um processo que pode ser dividido em quatro estágios: adesão a uma superfície, estabelecimento de uma monocamada de bactérias, formação de microcolônias e por último a maturação deste biofilme (Head & Yu, 2004). Esta formação tem início quando a bactéria identifica condições ambientais, como alterações na temperatura, na osmolaridade, no pH e na disponibilidade de ferro e oxigênio, que sinalizam a transição para o crescimento em biofilme (Wang *et al.*, 1996; Palmer & White, 1997; Wimpenny & Colasanti, 1997; Pratt & Kolter, 1998; Stoodley *et al.*, 1999; Waltnick & Kolter, 1999; O'Toole *et al.*, 2000b).

Para crescer em biofilme a bactéria precisa ser capaz de aderir e se mover em superfícies, estimar a densidade bacteriana através da quantidade de moléculas sinalizadoras da comunicação intercelular e formar uma estrutura tridimensional de células embebidas por uma matriz (O'Toole, Kaplan & Kolter, 2000a). Desta forma a bactéria poderá formar uma comunidade e obter benefícios adicionais da versatilidade fenotípica das bactérias vizinhas (Davey & O'Toole, 2000). Os organismos podem viver de forma independente no ambiente, porém em muitos casos eles proliferam mais efetivamente interagindo e formando comunidades, por

isso o crescimento em biofilme parece ser uma característica crítica para a persistência das bactérias (Caldwell *et al.*, 1997).

Em mais de 65% das infecções humanas de etiologia bacteriana, verifica-se a presença de biofilme, sendo este uma importante forma de persistência da bactéria e a principal causa de episódios recorrentes (Gander, 1996; Mittelman, 1997; Costerton, Stewart & Greenberg, 1999; Potera, 1999). Particularmente, nas infecções pulmonares crônicas dos pacientes fibrocísticos, a persistência da *P. aeruginosa* tem sido associada à sua habilidade desta bactéria em formar biofilme, tendo um papel importante na patogênese (Costerton *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2000; Worlitzsch *et al.*, 2002; O'May *et al.*, 2006).

Grandes aglomerados de *P. aeruginosa* têm sido encontrados em secções do tecido pulmonar, em abscessos e no escarro de pacientes portadores de FC, sendo estas estruturas análogas as microcolônias comumente observadas quando esta bactéria forma biofilme em superfícies abióticas. Este dado associado à detecção de moléculas sinalizadoras da comunicação intercelular, no escarro destes indivíduos, são evidências de que a *P. aeruginosa* forma biofilme no pulmão dos pacientes fibrocísticos (Govan & Deretic, 1996; Heydorn *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2000; Höiby *et al.*, 2001; Worlitzch *et al.*, 2002; Moreau-Marquis, Stanton & O'Toole, 2008).

Em *P. aeruginosa*, o flagelo é responsável pela locomoção da célula bacteriana até a proximidade da superfície e, em conjunto com o lipolissacarídeo (LPS) e outras proteínas de membrana externa, medeiam as interações iniciais e promove a formação de uma monocamada de bactérias (Saiman *et al.*, 1990; Ramphal *et al.*, 1991; Prince, 1992; Ramphal & Lory, 1992; Fletcher *et al.*, 1993; Grant *et al.*, 1993; Makin & Beveridge, 1996; Simpson, Smyth *et al.*, 1996; St. Geme & Cutter, 1996; Ottemann & Miller, 1997). A formação das microcolônias depende do pili tipo-IV, responsável pela mobilidade do tipo "twitching", usada pela bactéria para se locomover através da superfície na qual ela está aderida (Davies *et al.*, 1998). Há indicações de que a bactéria utiliza este tipo de mobilidade quando está em contato com outras bactérias, sugerindo um comportamento comunitário (Semmler, Whitchurch & Mattick, 1999).

Após os estágios iniciais de interação da *P. aeruginosa* com a superfície e da formação de microcolônias, ocorrem alterações na expressão gênica que levam a diferenciação das bactérias e a formação da estrutura do biofilme, fatos estes que caracterizam a etapa de maturação do biofilme (Davies *et al.*, 1998; Davey &

O'Toole, 2000; Singh *et al.*, 2000). Estas são adaptações do microrganismo à vida em biofilme e consistem em respostas as condições físico-químicas na comunidade bacteriana (Van Loosdrecht, Picioreanu & Heinen, 1997; Wimpenny & Colasanti, 1997).

Em *P. aeruginosa*, as alterações na expressão gênica são provocadas pela ação das moléculas sinalizadoras da comunicação intercelular, conhecidas como acylhomoserina lactonas (acyl-HSLs) no modelo de regulação dependente da densidade bacteriana (Pesci & Iglewski, 1997; Whiteley, Lee & Greenberg, 2000). Duas importantes moléculas que atuam neste complexo sistema regulatório são a N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserina lactona (3OC12-HSL) e a N-butiryl-L-HSL (C4-HSL), e são os principais sinalizadores da maturação do biofilme em *P. aeruginosa*, pois são capazes de se difundir livremente entre a membrana celular e entre as células (Tang *et al.*, 1996; Rumbaugh, Griswold & Hamood, 1999).

Estudos mostram que, dentre estas alterações destacam-se a regulação negativa da síntese do flagelo que acarreta num fenótipo imóvel por parte da bactéria e a regulação positiva da produção de moléculas componentes da matriz extracelular, como por exemplo, a hiperprodução do exopolissacarídeo (Garret, Perlegas & Wozniak, 1999).

Um dos principais aspectos do biofilme bacteriano é sua resistência aos agentes antimicrobianos, que no caso das infecções pulmonares crônicas por *P. aeruginosa* na FC, seria um dos fatores relacionados com a recorrência dos sintomas, após o término da antibioticoterapia (Davey & O'Toole, 2000; Drenkard, 2003).

Biofilme e resistência

O biofilme pode ser até mil vezes mais resistente a erradicação por agentes antimicrobianos do que as células planctônicas, dificultando o tratamento e tornando a infecção crônica (Ceri *et al.*, 1999). *In vivo*, os antimicrobianos podem suprimir os sintomas da infecção matando as bactérias planctônicas, mas falham em erradicar aquelas que estão no interior do biofilme e quando a terapia acaba o biofilme atua como um sítio para o retorno da infecção (Stewart & Costerton, 2001).

Esta resistência pode ser revertida quando as bactérias em biofilme são submetidas a condições que permitam o seu crescimento planctônico, sugerindo que esta resistência é multifatorial, e somente uma combinação de diferentes mecanismos poderia responder pelos níveis de resistência observados no biofilme (Donlan, 2000; Stewart & Costerton, 2001; Walters *et al.*, 2003).

Um dos mecanismos implicados na resistência do biofilme de *P. aeruginosa* é a penetração restrita do antimicrobiano (Stewart, 1996). A matriz extracelular atua como uma barreira efetiva, prevenindo o acesso dos antimicrobianos as células do interior da comunidade. Esta limitação do transporte se daria pela ligação das moléculas do agente a sítios de reação presentes na matriz (Thien-Fah & O'Toole, 2001; Drenkard, 2003). Em *P. aeruginosa*, a matriz extracelular do biofilme é capaz de retardar a penetração dos aminoglicosídeos, principalmente quando o alginato está presente, porém parece não ser eficaz contra outras classes de antimicrobianos, indicando nestes casos, a presença de outros mecanismos (Suci *et al.*, 1994; Shigeta *et al.*, 1997; Vransky, Stewart & Suci, 1997).

Outro importante mecanismo descrito é a heterogeneidade metabólica da população residente no biofilme. Diferenças na densidade bacteriana determinam gradientes de nutrientes e disponibilidade de oxigênio dentro da estrutura do biofilme, que resultam em diferenças na taxa de crescimento e na atividade metabólica entre as bactérias e, como os antimicrobianos atuam principalmente em células metabolicamente ativas, foi postulado que a heterogeneidade induziria a diferenças nos níveis de susceptibilidade (De Beer *et al.*, 1994; Drenkard, 2003).

A ação dos β -lactâmicos contra o biofilme de *P. aeruginosa* é significativamente afetada na presença de células com baixa taxa de crescimento ou na fase estacionária, já que esta classe atua em bactérias em divisão (Evans *et al.*, 1991; Tanaka *et al.*, 1999; Brooun, Liu & Lewis, 2000).

Grande parte da população do biofilme está em condições de limitação de oxigênio, cuja ausência reduz a atividade antimicrobiana de diversos agentes. Estudos mostram que a ação de quinolonas e aminoglicosídeos em biofilmes de *P. aeruginosa* está restrita a áreas adjacentes a interface com o ar e sua atividade bactericida só ocorre em zonas com elevada concentração de oxigênio (Zabinski *et al.*, 1995; Sauer *et al.*, 2002; Walters *et al.*, 2003).

Outras alterações fenotípicas da bactéria decorrentes do crescimento em biofilme estão associadas à ocorrência de resistência. Dentre estas alterações

destacam-se a diminuição da permeabilidade da membrana externa, com mudanças na estrutura do lipolissacarídeo que diminuem a afinidade pelos aminoglicosídeos; a expressão e hiperprodução de bombas de efluxo, que extraem da célula agentes antimicrobianos de classes distintas; e a ativação da resposta geral ao estresse, que leva a alterações fisiológicas que protegem a célula contra diversas condições ambientais desfavoráveis, incluindo a presença de agentes químicos bactericidas. Essas condições presentes no biofilme induzem ou selecionam variantes resistentes a elevadas concentrações de antimicrobianos. Adicionalmente, estudos são necessários para elucidar como cada um desses mecanismos contribui para a resistência do crescimento em biofilme (Ma *et al.*, 1996; Whiteley *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Sauer *et al.*, 2002).

Tipagem molecular

Devido à importância de *P. aeruginosa* como agente de infecções hospitalares e o surgimento de amostras multirresistentes, os estudos epidemiológicos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras tornam-se muito importantes, pois permitem a caracterização de surtos de infecção, avaliação de possíveis fontes de transmissão e aquisição deste patógeno e também podem determinar a prevalência de grupos clonais dentro de uma população bacteriana, visando o monitoramento da emergência e disseminação de bactérias multirresistentes e/ou potencialmente virulentas Olive & Bean, 1999; Sader *et al.*, 2003).

Métodos genotípicos, tais como determinação do perfil plasmidial, ribotipagem, avaliação do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP), amplificação de segmentos do DNA empregando a reação em cadeia da polimerase (PCR) e principalmente, a análise dos perfis de fragmentação do DNA, após digestão com enzimas de restrição, através de eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), são recomendados para a tipagem de microrganismos com propósitos epidemiológicos. Estes métodos são menos sujeitos a variações e apresentam maior poder discriminatório, maior reprodutibilidade e, em alguns casos, permitem o estabelecimento de bancos de

dados para caracterização dos microrganismos (Tenover, Arbeit & Goering, 1997; Olive & Bean, 1999; Belkum *et al.*, 2001).

A técnica de RFLP usando sondas para a região contígua ao gene da exotoxina A (tox A) tem sido utilizada, mostrando bom poder discriminatório, inclusive em amostras isoladas de pacientes com FC. Entretanto, este método é tecnicamente complexo, sendo realizado somente em laboratórios de referência (International *Pseudomonas aeruginosa* typing study group, 1994).

A determinação do perfil plasmidial foi o primeiro método molecular a ser usado como ferramenta para a tipagem de bactérias. O uso desta técnica para a determinação do grau de similaridade entre as amostras de *P. aeruginosa* é limitado, pois poucas possuem plasmídeos e a maioria deles carrega genes de resistência a antimicrobianos que podem ser adquiridos ou perdidos durante um surto (Maslow, Mulligan & Arbeit, 1993). Entretanto, esta técnica pode auxiliar na determinação da transmissão de plasmídeos carregando um determinado gene de resistência entre amostras de mesma espécie ou entre espécies distintas dentro de um mesmo hospital (Weber, Pfaller & Herwaldt, 1997; Tenover, Arbeit & Goering, 1997).

A técnica da reação em cadeia da polimerase utilizando iniciadores randômicos (*Random Amplified Polymorphic DNA* - RAPD) tem mostrado bons resultados em estudos epidemiológicos de *P. aeruginosa* (Mahenthalingam *et al.*, 1996; Renders *et al.*, 1996; Campbell, Mahenthalingam & Speert, 2000).

O método de macrorrestrrição é o mais discriminatório, nele as bactérias são embebidas em “plugs” de agarose e lisadas “*in situ*”, e seu DNA genômico é digerido com enzimas de restrição que clivam o cromossomo de forma infreqüente, e este material é submetido a uma eletroforese em gel de campo pulsado (Struelens *et al.*, 1993; Agodi *et al.*, 2000).

Estudos mostram um alto nível de diversidade genotípica entre amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, refletindo a mesma diversidade verificada em amostras ambientais, o que sugere que estes pacientes adquirem as cepas de *P. aeruginosa* de maneira independente, provavelmente de reservatórios ambientais distintos (Romling *et al.*, 1994b; Jensen *et al.*, 1997; Burns *et al.*, 2001).

Tem sido demonstrado a ocorrência de cepas de *P. aeruginosa* agressivas e transmissíveis em centros de atendimento a pacientes com FC, indicando que alguns clones têm a habilidade de se difundir entre os fibrocísticos. Esta transmissão pode ocorrer por rota direta ou indireta e estes clones possuem vantagens evolutivas

significativas para colonizar o pulmão dos pacientes (Fluge *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2001; Anthony *et al.*, 2002; Armstrong *et al.*, 2002; O'Carroll *et al.*, 2004). Estudos similares sugerem que a transmissão cruzada de *P. aeruginosa* entre pacientes com FC ocorre mais frequentemente quando o contato é mais intenso, principalmente entre irmãos (Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al.*, 2007).

Cepas de *P. aeruginosa* genotipicamente diferentes podem colonizar os pacientes fibrocísticos, porém normalmente é aceito que uma vez infectados estes pacientes tendem a abrigar o mesmo clone durante o curso da doença, indicando que mesmo durante os períodos de antibioticoterapia, a cepa original não é erradicada (Römling, Fiedler & Bobhammer, 1994; Burns *et al.*, 2001). Outros pacientes parecem manter variantes de um clone original, caracterizados por pequenas diferenças no genoma, indicando uma adaptação da bactéria ao microambiente pulmonar dos pacientes com FC durante a infecção crônica. Este processo corresponde as consideráveis adaptações genéticas e acumulação ou perda por mutações funcionais em genes específicos da *P. aeruginosa* (Struelens *et al.*, 1993; Silbert, Barth & Sader, 2001; Smith *et al.*, 2006).

A infecção e colonização do pulmão dos pacientes com FC por *P. aeruginosa* é um processo muito dinâmico, já que freqüentemente verifica-se uma colonização mista por diferentes clones isolados em momentos diferentes. A predominância de um clone varia ao longo do tempo, com um predominando em um determinado período e outro clone em outro período, sugerindo uma co-infecção (Renders *et al.*, 1997; Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al.*, 2007).

Em pacientes acompanhados por longos períodos verifica-se a ocorrência de diversos clones distintos, com períodos de estabelecimento de uma infecção seguidos pela eliminação de clones específicos, indicando a substituição de clones infectantes. Essa troca seria resultado de uma intensa competição por nichos específicos no pulmão dos fibrocísticos, revelando que alguns clones possuem fatores competitivos mais vantajosos, principalmente no que tange as condições nutricionais e a tolerância ao sistema imune e aos períodos de antibioticoterapia (Boukadida *et al.*, 1993; Silbert, Barth & Sader, 2001; Jelsbak *et al.*, 2007).

Durante o curso da infecção pulmonar por *P. aeruginosa* na FC, normalmente ocorre à conversão do morfotipo NM no M. Estudos longitudinais mostram que o desenvolvimento do fenótipo M começa a partir de uma população inicial NM e que ambas apresentam o mesmo perfil de fragmentação do DNA. Em alguns casos os

dois morfotipos podem co-existir, indicando que cada um ocupa um nicho específico diferente no pulmão do fibrocístico e que a persistência da bactéria neste local pode ser decorrente da sua habilidade em formar biofilme, entretanto poucos são os estudos que correlacionam grupos clonais de *P. aeruginosa* à sua capacidade de formação de biofilme (Romling, Fiedler & Bobhammer, 1994a; Hoiby, 2004; Jelsbak *et al.*, 2007).

Considerações finais

A escolha da antibioticoterapia deve ser conduzida pelos testes de susceptibilidade *in vitro*, entretanto a padronização dos métodos laboratoriais disponíveis para determinação da susceptibilidade a antimicrobianos visa especificamente a terapia de infecções por *P. aeruginosa* de infecções sangüíneas e urinárias, só tendo sido validado para essas condições. A realização desses testes para os isolados de FC, tem gerado controvérsias sobre a sua utilidade clínica, já que as características peculiares de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, como a presença de diferentes morfotipos na mesma população infectante e o crescimento em biofilme, afetam adversamente o desempenho e a interpretação dos testes de sensibilidade a antimicrobianos (Smith *et al.*, 2003; Foweraker *et al.*, 2005).

A determinação do perfil de resistência de um microrganismo em condições de crescimento em biofilme prescinde de uma metodologia fácil e reprodutível, por isso a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ainda é o método padrão, apesar de só aferir a ação dos antimicrobianos contra bactérias de vida livre. No caso das infecções pulmonares crônicas por *P. aeruginosa* na FC, esta técnica não reflete o modo de crescimento da bactéria “*in vivo*” (Costerton *et al.*, 1995; Ceri *et al.*, 1999; Moskowitz *et al.*, 2004).

Apesar de já existirem recomendações consensuais e diferenciadas para a realização dos testes de sensibilidade em *P. aeruginosa* na FC, de forma a otimizá-los, como por exemplo, modificações no tempo de incubação, preparo do inóculo e a definição da melhor metodologia, eles não são capazes de avaliar a susceptibilidade em condições de formação de biofilme. Assim, a padronização e implementação de testes de sensibilidade simples que possam detectar essas peculiaridades

representa um passo importante para os laboratórios de microbiologia clínica no complexo campo das infecções pulmonares na FC e certamente terá um impacto positivo na conduta médica frente aos pacientes, permitindo estabelecer a terapia antimicrobiana adequada para impedir o desenvolvimento de resistência (Burns *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2003; Foweraker *et al.*, 2005).

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Determinar a influência do crescimento em biofilme, na susceptibilidade a antimicrobianos de uso terapêutico, em *P. aeruginosa* associadas a infecções pulmonares crônicas em pacientes com FC.

1.2 Objetivos específicos

- Determinar através de técnica quantitativa (Concentração Inibitória Mínima-CIM) a susceptibilidade aos antimicrobianos amicacina, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina e tobramicina para *P. aeruginosa* sob crescimento planctônico e comparar os valores de CIM obtidos para os morfotipos Não Mucóide (NM) e Mucóide (M);
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme em *P. aeruginosa* e comparar os resultados obtidos com os fenótipos NM e M;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima de amicacina, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina e tobramicina para *P. aeruginosa* sob a condição de crescimento em biofilme (BIC) e comparar as BICs entre os morfotipos NM e M;
- Comparar os resultados da susceptibilidade de *P. aeruginosa* crescidas em condições de biofilme (BICs) com as determinações das CIMs;
- Analisar o polimorfismo genético das amostras, por técnica de Perfil de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado, PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*);

- Correlacionar os grupos clonais encontrados com a densidade do biofilme e as BICs.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes, Espécimes clínicos e Amostras bacterianas

Os pacientes incluídos neste estudo fazem acompanhamento no Departamento de Pneumologia do Instituto Fernandes Figueira (IFF – FIOCRUZ) e no Departamento de Pneumologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE-UERJ), dois centros de referência, no Rio de Janeiro, responsáveis pelo atendimento a pacientes com FC pediátricos e adultos, respectivamente. O acompanhamento microbiológico regular dos pacientes de ambos os centros é realizado no Laboratório de Bacteriologia Clínica do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (LABAC-UERJ), onde os espécimes respiratórios são processados e os patógenos identificados.

Para este estudo foram selecionados 20 pacientes, sendo 14 atendidos no IFF – FIOCRUZ e seis atendidos no HUPE – UERJ. Os pacientes foram incluídos por apresentarem infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa*, definida como: pelo menos quatro culturas positivas para *P. aeruginosa* em um ano com intervalo mínimo de três meses entre elas (Macia *et al.*, 2005). Foram selecionadas duas amostras por paciente, com intervalo mínimo de isolamento de quatro meses, sendo uma representante do morfotipo M e uma do NM, perfazendo em total de 40 amostras.

Todas as amostras de *P. aeruginosa* foram estocadas em solução de leite desnatado a 10% (Skim Milk; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) contendo glicerol a 10% e mantidas a -20°C até a realização dos testes, quando foram então avaliadas quanto à pureza e tiveram sua identificação confirmada através de testes fisiológicos convencionais, tais como a caracterização morfo-tintorial após coloração pelo método de Gram, avaliação do metabolismo oxidativo da glicose, detecção da produção de oxidase, mobilidade, descarboxilação da arginina, crescimento a 42°C (Schreckenberger, 2000) e produção de pigmentos utilizando-se os meios King A (detecção de piocianina e piorrubina) e King B (detecção de pioverdina) (King, Ward & Raney, 1954).

2.2 Determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas de antimicrobianos para *P. aeruginosa*

As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as recomendações de execução descritas no *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003) e os critérios de leitura obedeceram às orientações descritas no *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007). Foram selecionados representantes das principais classes de antimicrobianos utilizadas no tratamento das infecções pulmonares por *P. aeruginosa*: amicacina (AMI), ceftazidima (CAZ), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB) e ciprofloxacina (CIP) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.).

Foram preparadas soluções estoque, em solução de carbonato de sódio para ceftazidima e em água de osmose reversa (Mili-Q) estéril para os outros antimicrobianos, dez vezes mais concentradas que a maior concentração utilizada. A partir das soluções estoques foram realizadas diluições dos antimicrobianos em meio *Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth* (CAMHB; Difco, Detroit, Mich.) previamente distribuídos em microplacas de 96 poços (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y.). As concentrações utilizadas corresponderam a faixa de 0,06µg/mL a 64µg/mL para todos os antimicrobianos testados.

A partir de cultura recente em ágar *Cystine Lactose Electrolyte Deficient* (CLED; Difco, Detroit, Mich) foram selecionadas de três a cinco colônias para obtenção de uma suspensão padronizada, em solução salina fisiológica, com turbidez equivalente a do padrão 0,5 na escala de McFarland. Posteriormente foi realizada uma diluição de 1:100 em solução salina esterilizada e alíquotas de 5µL foram aplicadas em cada orifício da microplaca, resultando em um inóculo contendo cerca de 10⁴ UFC/mL.

As placas de microtitulação foram incubadas em aerobiose a 35±2°C por 16-20h. A CIM foi considerada como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano. Como controle foi utilizada a amostra *P. aeruginosa* ATCC 27853.

2.3 Formação de Biofilme

O teste para formação de biofilme em amostras de *P. aeruginosa* foi feito de acordo com Moskowitz *et al.*, 2004.

Após estoque a -20°C as amostras foram submetidas a duas passagens em ágar-CLED (Difco, Detroit, Mich), duas a três colônias foram semeadas em CAMHB (Difco, Detroit, Mich) acrescido de 0,4% de L-arginina (Sigma, St. Louis, Mo.) a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o ajuste desta cultura para uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de McFarland em um novo tubo com CAMHB, $100\mu\text{L}$ foram transferidos para uma microplaca de 96 poços (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catálogo nº. 269787). Cada amostra foi testada em triplicata e três poços contendo apenas CAMHB foram utilizados como controle negativo. O biofilme foi formado numa tampa especial de poliestireno contendo pinos: a tampa com pinos (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catalogo nº. 445497) que foram imersos nos orifícios da microplaca. Este sistema foi incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20h sem agitação.

Após a incubação, a tampa com pinos foi lavada três vezes com água Mili-Q estéril para retirar as bactérias que não fazem parte do biofilme. Para corar este biofilme, a tampa com pinos foi colocada em uma solução aquosa de cristal violeta a 0,1% por 15 minutos. A seguir foi lavada mais três vezes com água Mili-Q para retirar o excesso de cristal violeta e deixado em temperatura ambiente por várias horas para secar.

A fim de solubilizar o cristal violeta adsorvido, a tampa com pinos foi incubada em 95% de etanol ($150\mu\text{L}$ por poço da microplaca) por 15 minutos. Após este tempo, a microplaca foi submetida a um espectrofotômetro (Spectramax 190 Gemini ELISA, Molecular Devices Corp. Sunnyvale, Calif.) e a absorbância foi medida a 590nm.

Para quantificação da densidade do biofilme foi utilizada como controle para o teste a cepa de *P. aeruginosa* PAO1, que é sabidamente uma forte formadora de biofilme e as amostras foram classificadas quanto à capacidade de formar biofilme proporcionalmente ao resultado da cepa controle como: fracas, até 0,33 vezes o biofilme da PAO1; moderadas, de 0,34 a 0,66 vezes o biofilme da PAO1 ou fortes, acima de 0,67 vezes o biofilme da PAO1. Também foi incluída a cepa ATCC,

considerada uma fraca produtora de biofilme a fim de validar a execução do teste (Head e Yu, 2004 e Lee *et al.*, 2005).

2.4 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos em *P. aeruginosa* sob crescimento em Biofilme (BIC)

A concentração inibitória mínima dos cinco antimicrobianos foi determinada também nas populações bacterianas após estimulação para formação de biofilme (Concentração Inibitória do Biofilme – BIC), de acordo com o descrito por Moskowitz *et al.*, 2004.

Após estoque a -20°C as amostras foram submetidas a duas passagens em ágar-CLED (Difco, Detroit, Mich), duas a três colônias foram semeadas em CAMHB (Difco, Detroit, Mich) acrescido de 0,4% de L-arginina (Sigma, St. Louis, Mo.) a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após o ajuste desta cultura para uma suspensão equivalente a 0,5 na escala de McFarland em um novo tubo com CAMHB, $100\mu\text{L}$ foram transferidos para uma microplaca de 96 poços (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catálogo nº. 269787). Cada amostra foi testada em triplicata e três poços contendo apenas CAMHB foram utilizados como controle negativo. O biofilme foi formado numa tampa com pinos (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y. catalogo nº. 445497) que foram imersos nos orifícios da microplaca. Este sistema foi incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20 horas sem agitação (Figura 1).

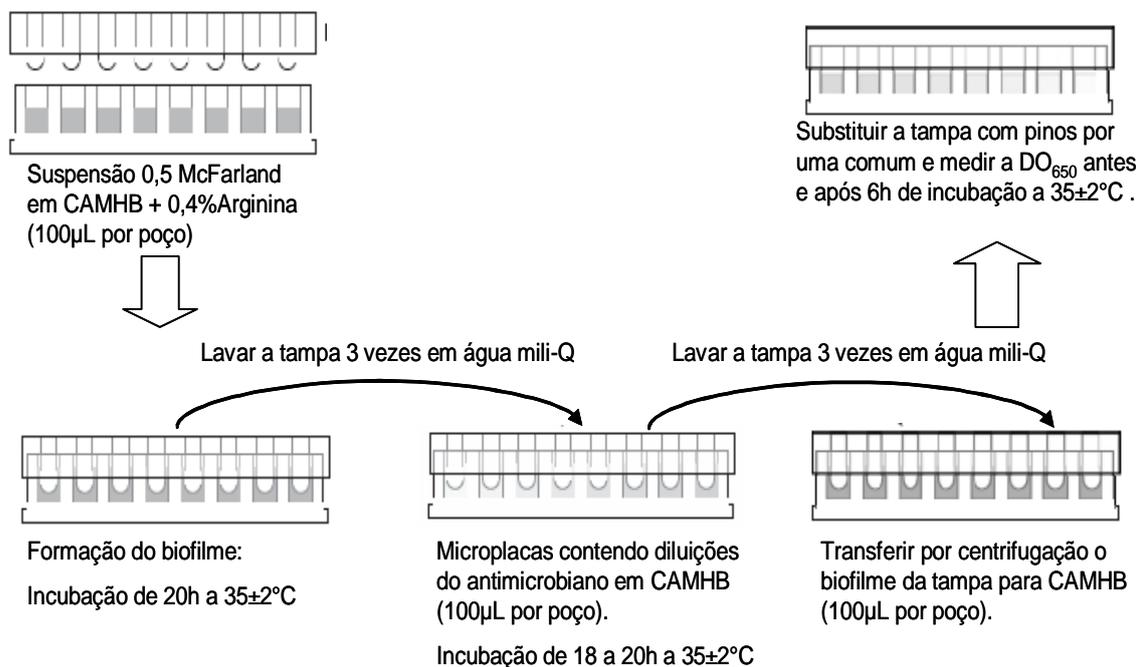
Após a incubação, a tampa com pinos foi lavada três vezes com água Mili-Q estéril, para retirar as bactérias frouxamente aderidas e então colocada em microplacas contendo diluições seriadas (\log_2) do antimicrobiano em $100\mu\text{L}$ de CAMHB por poço, exceto nos poços controles. O intervalo de concentrações foi de $0,5\mu\text{g/mL}$ a $1024\mu\text{g/mL}$, e o sistema foi incubado a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 20h (Figura 1).

Após a incubação com o antimicrobiano, a tampa com pinos foi lavada três vezes com água Mili-Q estéril, a fim de se retirar resíduos do antimicrobiano, e colocada em uma nova microplaca contendo apenas CAMHB ($100\mu\text{L}$ por poço). Com o objetivo de transferir o biofilme da tampa com pinos para os poços, este sistema foi submetido à centrifugação a 805xg por 20 minutos. A tampa com pinos

foi então descartada e substituída por uma tampa de microplaca comum (Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y.). A densidade ótica a 650nm (DO_{650}) foi medida em um espectrofotômetro (Spectramax 190 Gemini ELISA, Molecular Devices Corp. Sunnyvale, Calif.), antes e após uma incubação a $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 6h (Figura 1).

A formação adequada de biofilme para os controles positivos é definida por uma diferença na DO_{650} (DO_{650} após as 6h de incubação menos a DO_{650} antes desta incubação) maior ou igual a 0,05. A BIC é definida como a menor concentração do antimicrobiano que resultou em uma diferença de DO_{650} menor ou igual que 10% do resultado do controle positivo. O ponto de corte de 10% representa uma diferença de crescimento após 6h de incubação correspondente a 1-log_{10} . Como controles para esta técnica foram utilizadas as cepas de *P. aeruginosa*, formadoras de biofilme, ATCC 27853 e PAO1.

Figura 1 - Representação esquemática do teste de susceptibilidade para o crescimento em biofilme



Legenda: CAMHB - *Cátion-Adjusted Mueller Hinton Broth*; DO – Densidade ótica

Fonte: Ferreira, 2008

2.5 Perfil de Fragmentação do DNA Cromossômico por Eletroforese em Campo Pulsado, PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *P. aeruginosa* foi realizada conforme descrito por Carvalho *et al.*, 2006. As amostras bacterianas foram semeadas em placas contendo *Tryptcase Soy Agar* (TSA; Difco, Detroit, Mich.) e incubadas a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por 18-24h. A seguir, as células bacterianas foram suspensas em 500 μL de tampão PIV (1M NaCl, 10mM Tris-HCl, pH 7,6) de forma a ter turvação equivalente a do padrão 5 da escala de McFarland. À suspensão bacteriana foi adicionado igual volume de agarose de baixo ponto de fusão (NuSieve GTG agarose; FMC BioProducts, Rockland, Maine, EUA) a 2% preparada em tampão PIV. A mistura obtida foi vertida em moldes apropriados para a obtenção de blocos.

Após a solidificação da agarose, os blocos foram colocados em 3,5mL de solução de lise (6mM Tris-HCl, pH 7,6; 1M NaCl; 100mM EDTA; 0,5% Brij-58; 0,2% desoxicolato sódico; 0,5% lauril sarcosinato de sódio; 1mg/mL de lisozima) e incubados por 15-18h a $36\pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação branda. Após esse período, os tubos foram resfriados a 4°C - 8°C e a solução foi substituída por 2,0mL de solução ESP (0,5M EDTA, pH 8,0; 1% Sarcosyl; 0,1mg/mL de proteinase K) com incubação por 18-24h a $50\pm 1^\circ\text{C}$ sob leve agitação. A seguir, a solução foi substituída por nova solução ESP e incubada durante 18-24h a $50\pm 1^\circ\text{C}$. Os blocos foram, então, lavados em tampão TE (10mM Tris-HCl, pH 7,6; 0,1mM EDTA) por 5 vezes a $36\pm 1^\circ\text{C}$, sob agitação branda (três lavagens de 20 a 30 minutos cada, duas lavagens de 2h cada e uma lavagem de 24h).

Um ou dois blocos de cada amostra foram colocados em 200 μL do tampão da enzima (20 μL do tampão; 180 μL de água milliQ esterilizada) e incubados por 2h à $36\pm 1^\circ\text{C}$. Após esse período, os blocos foram submetidos ao tratamento com solução contendo 15U da enzima de restrição *SpeI* (Boehringer Mannheim Corporation, Indianapolis, Ind, EUA) por 16-18h a $36\pm 1^\circ\text{C}$ em aerobiose.

A enzima de restrição foi retirada e os blocos contendo o DNA digerido foram fundidos à 72°C e aplicados em gel de agarose (SeaKem GTG agarose; FMC) a 1,0% em 0,4X TBE. A separação eletroforética foi realizada no sistema CHEF DRIII

(Bio-Rad Laboratories, Richmond, California, EUA) por 18h a 6V/cm, com pulso inicial de 5 segundos e pulso final de 35 segundos, a 14°C. Para a visualização das bandas obtidas, o gel de agarose foi imerso em solução de brometo de etídio (0,5µg/mL) por 30 minutos, sob agitação, descorado em água por no mínimo 2h, observado em transiluminador de UV e posteriormente fotografado.

Os resultados obtidos foram analisados visualmente seguindo os critérios de Tenover *et al.* (1995): amostras bacterianas que apresentam o mesmo perfil são consideradas idênticas. As que possuem diferença de uma a três bandas, refletindo um evento genético, são consideradas muito relacionadas. Amostras com diferenças de quatro a seis bandas, representando dois eventos genéticos distintos, são consideradas como possivelmente relacionadas. Aquelas contendo sete ou mais bandas de diferença, representando três ou mais eventos genéticos, são consideradas não correlacionadas.

As amostras também foram analisadas com auxílio do aplicativo GelCompar versão 3 (Applied Maths) e os percentuais de similaridade foram determinados pelo Coeficiente de Dice. Os dendrogramas foram construídos usando-se tolerância de 1,5 % e otimização de 1,5 %. Foram considerados clones idênticos aqueles com percentuais de similaridades iguais ou superiores a 85%.

Para validar a análise comparativa entre as diferentes situações abordadas neste estudo foram utilizados o teste-t e o teste Exato de Fisher. Os dados foram avaliados no aplicativo *Prisma* (GraphPad, Inc., versão 4.0). Qualquer diferença foi considerada significativa quando $p \leq 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Características da amostragem

As 40 amostras de *P. aeruginosa* foram selecionadas no período de maio de 2002 a fevereiro de 2006, a partir de culturas do escarro de 20 pacientes com infecção pulmonar crônica, sendo 11 do sexo feminino e nove do sexo masculino. Os 14 pacientes atendidos no IFF possuíam uma média de idade de 11,8 anos, na faixa etária de cinco a 20 anos. Os seis pacientes atendidos no HUPE tinham idade média de 30,4 anos, na faixa etária de 23 a 44 anos. De cada paciente foram estudadas duas amostras, sendo uma representante do morfotipo NM e outra do M. O intervalo mínimo de isolamento entre elas variou de quatro a 41 meses (Tabela 1).

Tabela 1 - Características da amostragem estudada

Paciente	Sexo	Data de Nascimento	Centro de Origem	Amostras de <i>P. aeruginosa</i>		Data de Isolamento
				Isolado	Morfotipo	
1	F	18/04/1980	HUPE	A	NM	8/10/2003
				B	M	23/3/2005
2	F	22/05/2003	IFF	A	M	6/10/2003
				B	NM	9/12/2004
3	M	10/09/1996	IFF	A	M	26/6/2003
				B	NM	17/2/2005
4	M	11/05/1989	IFF	A	M	10/7/2003
				B	NM	12/5/2005
5	F	31/03/1988	IFF	A	NM	18/3/2004
				B	M	22/7/2004
6	M	10/11/1996	IFF	A	M	10/7/2003
				B	NM	20/10/2005
7	M	05/03/1985	HUPE	A	M	25/11/2003
				B	NM	11/3/2005
8	M	27/09/1983	HUPE	A	NM	4/4/2003
				B	M	20/5/2005
9	F	9/07/1999	IFF	A	NM	5/5/2003
				B	M	14/4/2005
10	F	23/09/1996	IFF	A	NM	15/5/2003
				B	M	15/9/2005
11	F	22/03/2002	IFF	A	NM	28/8/2003
				B	M	9/12/2004
12	F	7/10/1991	IFF	A	M	26/6/2003
				B	NM	14/4/2005
13	M	1/12/1992	IFF	A	NM	1/12/2003
				B	M	27/1/2005
14	M	16/07/1975	HUPE	A	NM	7/5/2002
				B	M	7/10/2005
15	F	31/07/1998	IFF	A	M	18/9/2003
				B	NM	12/5/2005
16	F	1/06/2000	IFF	A	NM	15/5/2003
				B	M	16/9/2004
17	F	2/05/1997	IFF	A	M	14/8/2003
				B	NM	9/12/2004
18	M	20/11/2000	IFF	A	M	15/5/2003
				B	NM	15/9/2005
19	F	29/10/1963	HUPE	A	M	18/6/2003
				B	NM	1/4/2005
20	M	23/02/1985	HUPE	A	NM	25/11/2003
				B	M	10/2/2006

Legenda: NM - Não mucóide; M – Mucóide IFF - Instituto Fernandes Figueira; HUPE - Hospital Universitário Pedro Ernesto; M – Masculino; F – Feminino.

Intervalo mínimo (4 meses) Intervalo máximo (41 meses)

Fonte: Ferreira, 2008

3.2 Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos para *P. aeruginosa*

A determinação da CIM para *P. aeruginosa* em condições de crescimento planctônico foi feita pela técnica de microdiluição em caldo para os antimicrobianos: AMI, CAZ, CIP, GEN e TOB. A maioria das amostras foi susceptível para CAZ (92,5%, n=37), com 50% (n=20) dos isolados apresentando CIM de 2µg/mL (n=20). Apenas duas amostras apresentaram sensibilidade intermediária (CIM=16µg/mL) e uma revelou resistência plena ao antimicrobiano (CIM=64µg/mL) Todas as amostras foram sensíveis aos três aminoglicosídeos testados. Com relação a AMI e TOB, a CIM mais freqüente foi 0,25µg/mL, encontrada em 32,5% (n=13) e 42,5% (n=17) das amostras, respectivamente. Com relação a GEN a CIM mais freqüente foi 0,5µg/mL, resultado obtido para 45% das amostras (n=18). A análise da CIM de CIP mostrou que 92,5% (n=37) foram sensíveis (CIM ≤ 1µg/mL), com 35% destas amostras apresentando CIM de 0,06µg/mL. Três amostras apresentaram perfil intermediário para este antimicrobiano, com CIM de 2µg/m (Tabela 2).

Tabela 2 - Concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos para 40 amostras de *P. aeruginosa*

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Nº de amostras (%)				
	AMI	CAZ	CIP	GEN	TOB
0,06	0	0	14 (35)	0	4 (10)
0,125	0	0	9 (22,5)	5 (12,5)	8 (20)
0,25	13 (32,5)	1 (2,5)	6 (15)	9 (22,5)	17 (42,5)
0,5	8 (20)	1 (2,5)	4 (10)	18 (45)	9 (22,5)
1	10 (25)	6 (15)	4 (10)	6 (15)	2 (5)
2	5 (12,5)	20 (50)	3 (7,5)	1 (2,5)	0
4	2 (5)	5 (12,5)	0	1 (2,5)	0
8	2 (5)	4 (10)	0	0	0
16	0	2 (5)	0	0	0
32	0	0	0	0	0
64	0	1 (2,5)	0	0	0

Legenda: AMI – Amicacina - susceptível $\leq 16\mu\text{g/mL}$, intermediário = $32\mu\text{g/mL}$, resistente $\geq 64\mu\text{g/mL}$ (CLSI2007); CAZ – Ceftazidima - susceptível $\leq 8\mu\text{g/mL}$, intermediário = $16\mu\text{g/mL}$, resistente $\geq 32\mu\text{g/mL}$ (CLSI2007); CIP – Ciprofloxacina - susceptível $\leq 1\mu\text{g/mL}$, intermediário = $2\mu\text{g/mL}$, resistente $\geq 4\mu\text{g/mL}$ (CLSI2007); GEN – Gentamicina, TOB – Tobramicina - susceptível $\leq 4\mu\text{g/mL}$, intermediário = $8\mu\text{g/mL}$, resistente $\geq 16\mu\text{g/mL}$ (CLSI2007).

Fonte: Ferreira, 2008.

Considerando a análise comparativa da distribuição das CIMs para os dois morfotipos (NM e M) de *P. aeruginosa*, pode-se notar que não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas para *P. aeruginosa* não mucóide e mucóide

Antimicrobianos	Nº de Amostras (%)						p
	Mucóide			Não Mucóide			
	≤ 1 µg/mL	2 – 8 µg/mL	≥ 16 µg/mL	≤ 1 µg/mL	2 – 8 µg/mL	≥ 16 µg/mL	
Amicacina	14 (70)	6 (30)	0	17 (85)	3 (15)	0	0,45
Ceftazidima	6 (30)	12 (60)	2 (10)	2 (10)	17 (85)	1 (5)	0,12
Ciprofloxacina	18 (90)	2 (10)	0	19 (95)	1 (5)	0	1,00
Gentamicina	18 (90)	2 (10)	0	20 (100)	0	0	0,48
Tobramicina	20 (100)	0	0	20 (100)	0	0	-

Legenda: p – Teste Exato de Fisher (significativo quando $p \leq 0,05$).

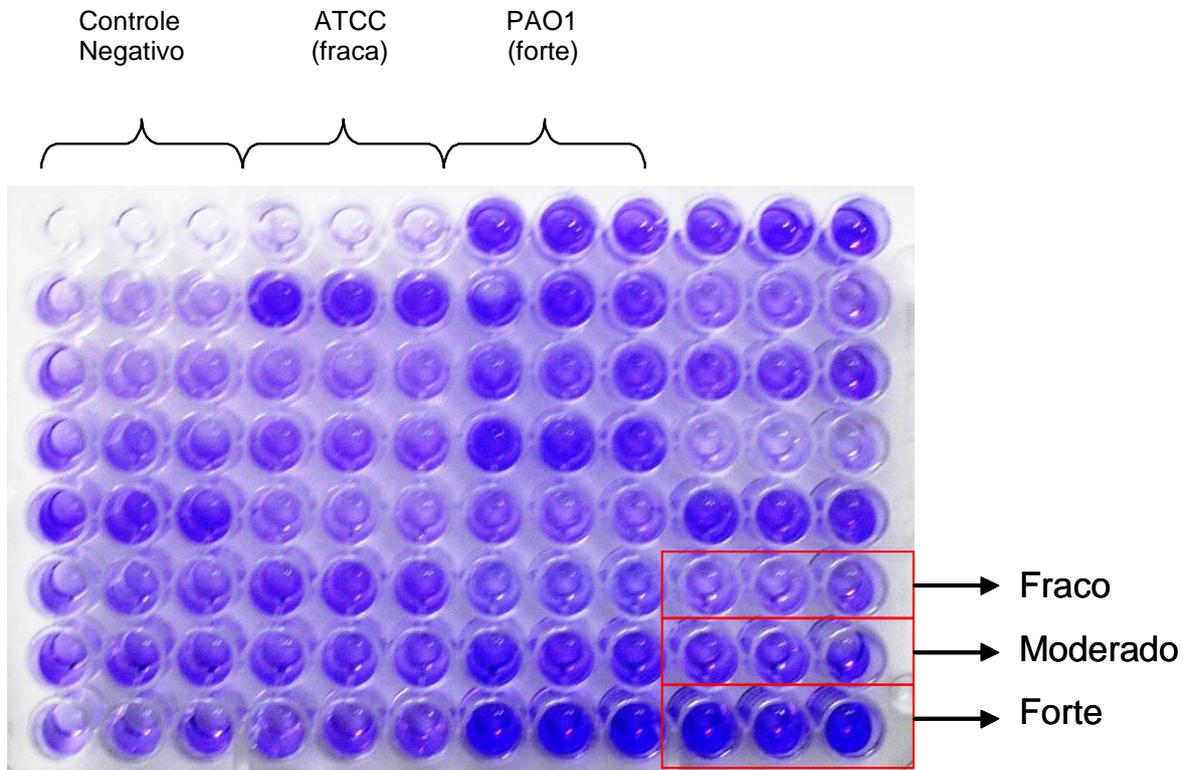
Fonte: Ferreira, 2008.

3.3 Formação de Biofilme

Ao analisar a formação do biofilme da cepa controle PAO1, cuja DO foi de 1,216 as amostras que apresentaram uma DO de até 0,400 foram consideradas fracas formadoras de biofilme, aquelas que apresentaram uma DO entre 0,401 e 0,800 foram identificadas como formadoras moderadas e as amostras que revelaram uma DO acima de 0,801 foram classificadas como fortes formadoras de biofilme. A cepa ATCC 27853, considerada uma fraca formadora de biofilme apresentou uma DO de 0,310.

A figura 2 ilustra o resultado visual das três categorias encontradas a partir da densidade do biofilme das amostras de *P. aeruginosa* estudadas.

Figura 2 - Representação do resultado mostrando as três categorias (fraco, moderado e forte) no teste de formação do biofilme em *P. aeruginosa*



Fonte: Ferreira, 2008.

Todas as 40 amostras de *P. aeruginosa* estudadas foram capazes de formar biofilme, destas 19 (47,5%) revelaram uma capacidade moderada de formação de biofilme, enquanto que outras 18 (45%) amostras mostraram uma fraca capacidade. Apenas três (7,5%) amostras mostraram uma capacidade forte de formar biofilme. As amostras classificadas como fracas formadoras de biofilme apresentaram uma DO média de 0,246 e o intervalo de variação foi de 0,099 a 0,384, as moderadas variaram entre 0,429 e 0,773, com DO média de 0,575. As três amostras (4B, 11B e 18A) que revelaram uma formação de biofilme forte apresentaram uma DO maior do que a cepa controle (>1,200) (Tabela 4).

Tabela 4 - Comparação da capacidade de formação de biofilme em *P. aeruginosa*

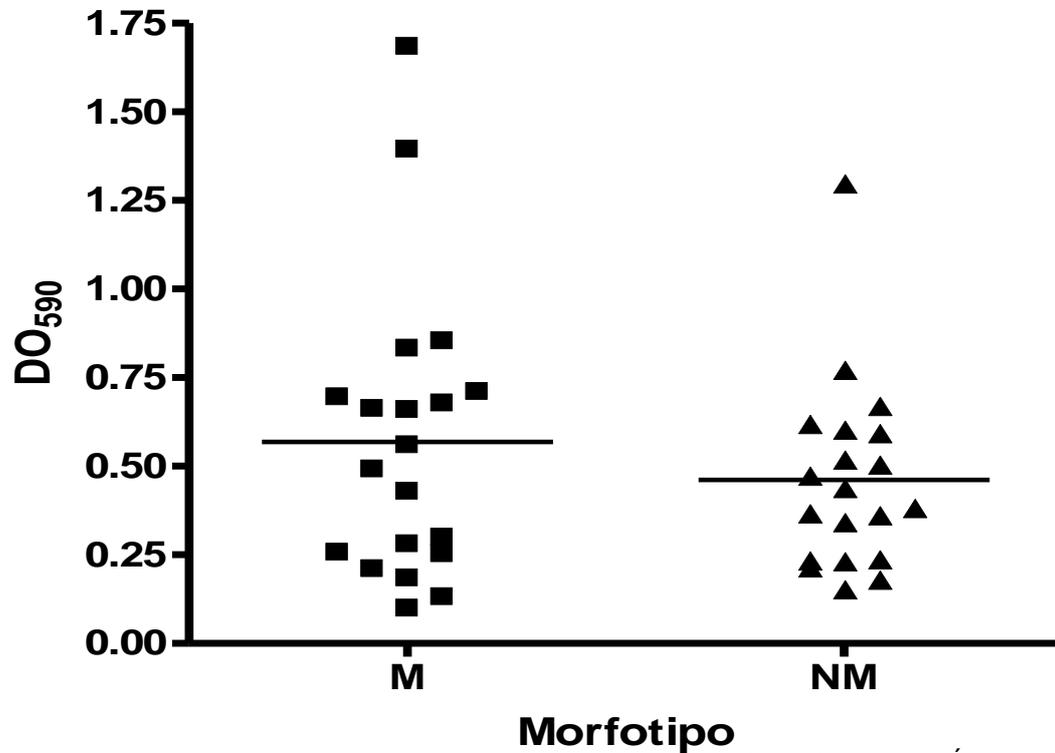
Capacidade de formação de biofilme	Nº de amostras (%)	DO média	Intervalo de variação da DO
Fraca	18 (45)	0,246	0,099 – 0,384
Moderada	19 (47,5)	0,575	0,429 – 0,773
Forte	3 (7,5)	1,459	1,299 – 1,685

Legenda: DO – Densidade ótica.

Fonte, Ferreira, 2008.

A análise comparativa entre a média das DOs dos morfotipos NM e M, mostrou que apesar da DO média ter sido maior para o morfotipo M (0,568) em relação ao NM (0,461), esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,3326$) (Figura 3).

Figura 3 - Comparação entre a formação de biofilme em *P. aeruginosa* não mucóide e mucóide



Legenda: $p = 0,3326$ (Teste t); NM – Não mucóide; M – Mucóide; DO – Densidade Ótica

Fonte: Ferreira, 2008.

Na análise estratificada dos morfotipos, de acordo com a densidade do biofilme, também não foi verificada nenhuma diferença significativa (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação entre *P. aeruginosa* não mucóide e mucóide quanto à capacidade de formação de biofilme

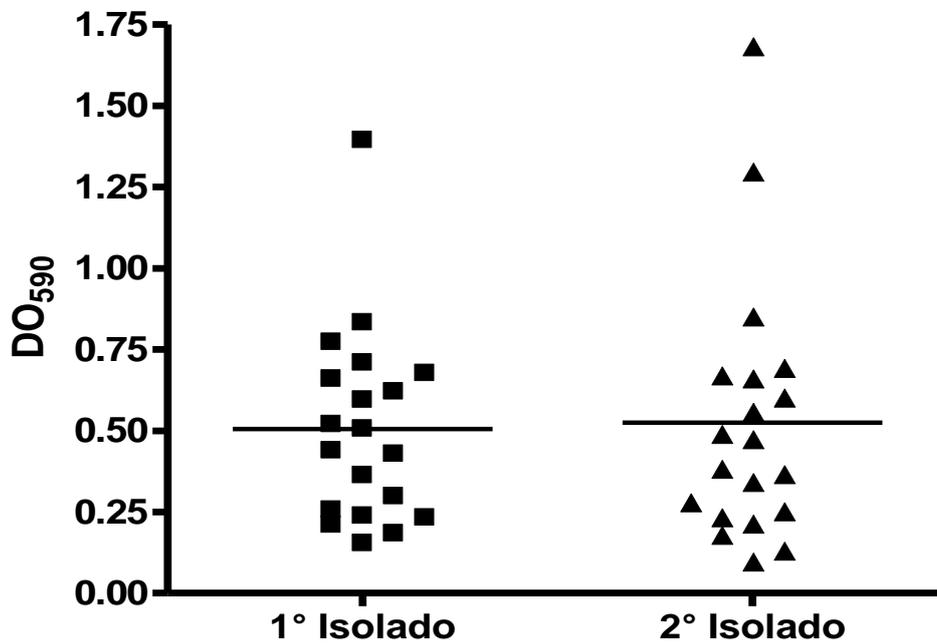
Formação de biofilme	Nº de amostras (%)	
	Não mucoide	Mucoide
Fraca	10 (50)	8 (40)
Moderada	9 (45)	10 (50)
Forte	1 (5)	2 (10)

Legenda: $p=0,60$ (Teste Exato de Fisher).

Fonte: Ferreira, 2008.

A análise comparativa da formação de biofilme entre o primeiro e o segundo isolado nos 20 pacientes, mostrou que não houve aumento nem diminuição significativos (Figura 4). Para esta análise foram avaliadas duas condições, uma na qual os pacientes possuíam o primeiro isolado NM e o segundo isolado M e a outra naqueles pacientes cuja seqüência de isolamento era o inverso, porém nas duas situações não houve diferença significativa.

Figura 4 - Comparação entre a formação de biofilme entre o primeiro e o segundo isolado de *P. aeruginosa*

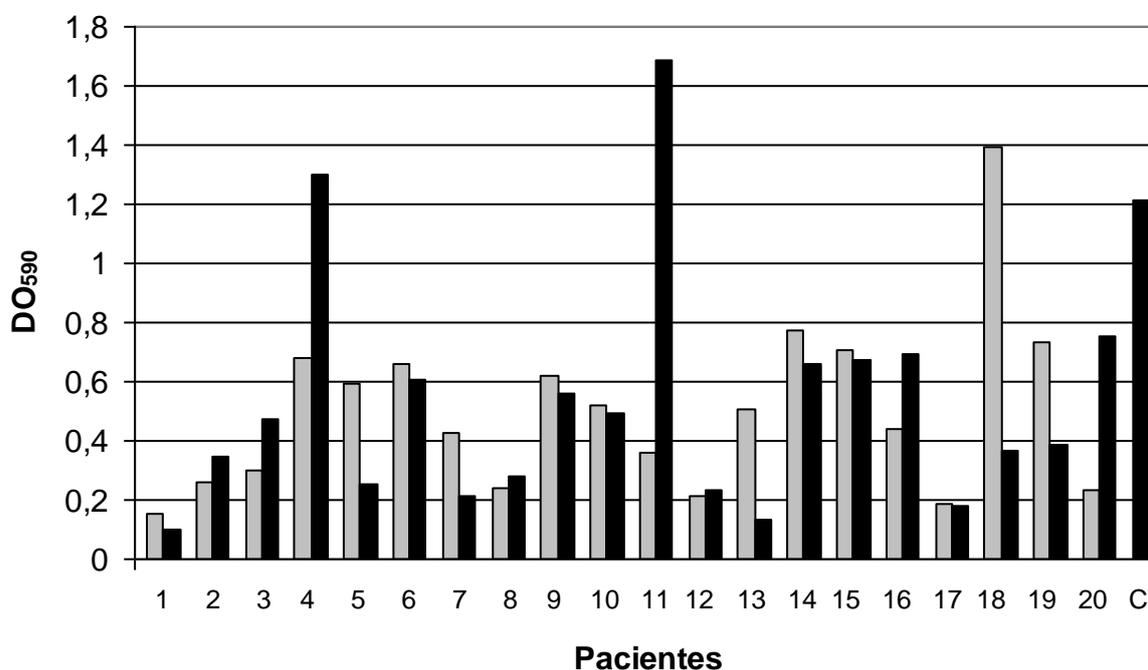


Legenda: $p = 0,8608$ (Teste t); DO – Densidade Ótica.

Fonte: Ferreira, 2008.

Na distribuição das DOs das 40 amostras, analisadas agora por paciente individualmente, verificamos que em oito deles (2, 3, 4, 8, 11, 12, 16 e 20) houve um aumento na densidade do biofilme do segundo isolado em relação ao primeiro, porém apenas no caso dos pacientes 4, 11 e 20 foram verificados aumentos significativos. Por outro lado, em 11 pacientes (1, 5, 6, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 18 e 19) houve decréscimo na densidade do biofilme entre o primeiro e o segundo isolado e em cinco deles (5, 7, 13, 18 e 19) pode-se verificar uma redução significativa. As duas amostras do paciente 17 apresentaram uma densidade bacteriana similar (Figura 5).

Figura 5 - Distribuição das densidades bacterianas do biofilme em 40 amostras de *P. aeruginosa*, analisada por paciente



Legenda: DO – Densidade Ótica; C – Cepa controle (PAO1).

Fonte: Ferreira, 2008.

3.4 Concentração Inibitória Mínima de antimicrobianos para *P. aeruginosa* sob crescimento em biofilme (BIC)

A determinação da concentração inibitória mínima dos cinco antimicrobianos para *P. aeruginosa* quando em condições de crescimento em biofilme mostrou em relação a CAZ que todas as amostras apresentaram uma BIC $\geq 2\mu\text{g/mL}$ e 22 delas (55%) apresentaram valores entre $16\mu\text{g/mL}$ e $128\mu\text{g/mL}$. O crescimento em concentrações maiores que $128\mu\text{g/mL}$ foi verificado em 32,5% ($n=13$) das amostras (Tabela 6).

No caso dos aminoglicosídeos, para AMI todas as amostras apresentaram uma BIC $\geq 2\mu\text{g/mL}$ e 24 delas (60%) apresentaram BIC entre $16\mu\text{g/mL}$ e $128\mu\text{g/mL}$. Níveis acima de $128\mu\text{g/mL}$ foram encontrados em 22,5% ($n=9$) das amostras. Para GEN, 40% ($n=16$) apresentaram BIC de $32\mu\text{g/mL}$, enquanto que 10% ($n=4$) revelaram crescimento em concentrações elevadas do antimicrobiano ($\geq 256\mu\text{g/mL}$).

Quanto a TOB, 55% (n=22) das amostras apresentaram BIC entre 32 e 64 μ g/mL e 10% (n=4) delas apresentaram BIC maior que 128 μ g/mL (Tabela 6).

Para CIP, 12,5% (n=5) das amostras apresentaram BIC de 0,5 μ g/mL, enquanto que 65% (n=29) revelaram BIC entre 2 e 64 μ g/mL, duas amostras apresentaram BIC de 256 e 1024 μ g/mL (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos para 40 amostras de *P. aeruginosa* sob crescimento em biofilme

Concentração (μ g/mL)	Nº de amostras (%)				
	AMI	CAZ	CIP	GEN	TOB
0,5	0	0	5 (12,5)	1 (2,5)	0
1	0	0	0	0	0
2	1 (2,5)	1 (2,5)	6 (15)	1 (2,5)	1 (2,5)
4	5 (12,5)	1 (2,5)	5 (12,5)	1 (2,5)	1 (2,5)
8	1 (2,5)	3 (7,5)	4 (10)	3 (7,5)	1 (2,5)
16	5 (12,5)	7 (17,5)	6 (15)	5 (12,5)	4 (10)
32	10 (25)	5 (12,5)	5 (12,5)	16 (40)	10 (25)
64	6 (15)	5 (12,5)	3 (7,5)	7 (17,5)	12 (30)
128	3 (7,5)	5 (12,5)	2 (5)	2 (5)	7 (17,5)
256	4 (10)	6 (15)	2 (5)	2 (5)	3 (7,5)
512	2 (5)	2 (5)	0	1 (2,5)	1 (2,5)
1024	3 (7,5)	5 (12,5)	2 (5)	1 (2,5)	0

Legenda: AMI – Amicacina; CAZ – Ceftazidima; CIP – Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; TOB – Tobramicina.

Fonte: Ferreira, 2008

A análise comparativa dos valores da BIC entre os dois morfotipos estudados revelou que não houve diferença significativa para nenhum dos cinco antimicrobianos testados (Tabela 7).

Tabela 7 - Distribuição das concentrações inibitórias mínimas de antimicrobianos para *P. aeruginosa* não mucóide e mucóide crescidas em biofilme

Antimicrobianos	Nº de Amostras (%)						p
	Não Mucóide			Mucóide			
	≤ 1 µg/mL	2 – 8 µg/mL	≥ 16 µg/mL	≤ 1 µg/mL	2 – 8 µg/mL	≥ 16 µg/mL	
Amicacina	0	5 (25)	15 (75)	0	2 (10)	18 (90)	0,40
Ceftazidima	1 (5)	3 (15)	16 (80)	0	1 (5)	19 (95)	0,40
Ciprofloxacina	2 (10)	7 (35)	11 (55)	0	9 (45)	11 (55)	0,75
Gentamicina	0	4 (20)	16 (80)	0	2 (10)	18 (90)	0,66
Tobramicina	0	1 (5)	19 (95)	0	2 (10)	18 (90)	1,00

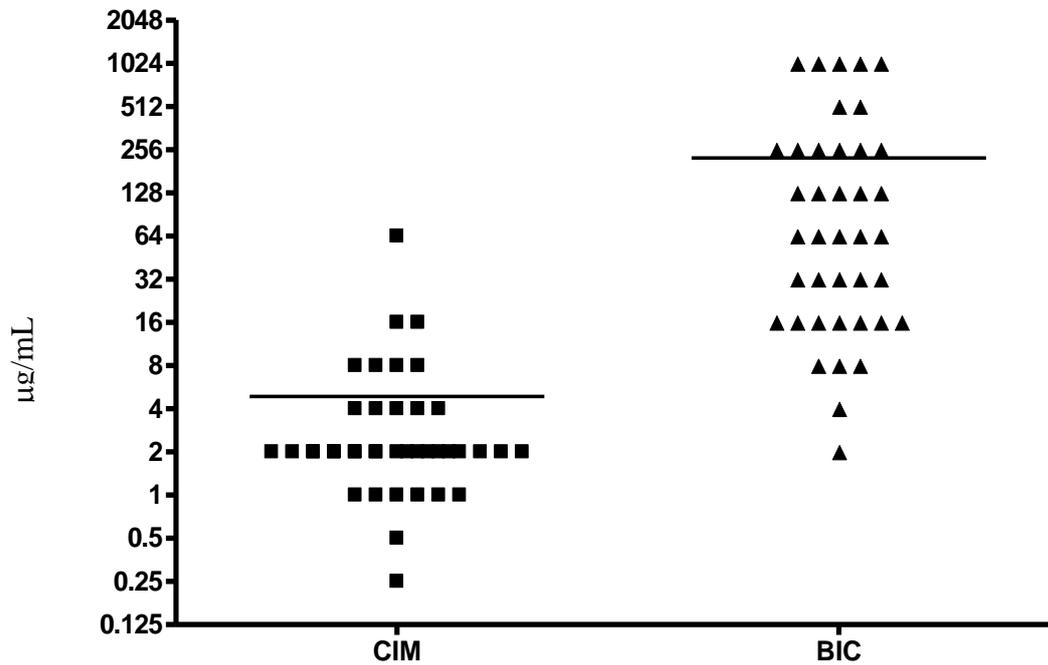
Legenda: p – Teste Exato de Fisher (significativo quando $p \leq 0,05$).

Fonte: Ferreira, 2008.

3.5 Análise comparativa entre as Concentrações Inibitórias Mínimas em *P. aeruginosa* sob as condições de crescimento planctônico (CIM) e em biofilme (BIC)

Comparando-se a média das concentrações inibitórias mínimas obtidas sob as condições de crescimento planctônico (CIM) e em biofilme (BIC) das 40 amostras de *P. aeruginosa*, verificou-se haver para todos os antimicrobianos testados uma diferença estatisticamente significativa. Para CAZ, a média das CIMs foi de 4,8µg/mL e a das BICs foi de 223µg/mL ($P < 0,0001$) (Figura 6). Para TOB, as médias das CIMs e das BICs foram 0,2µg/mL e 83µg/mL ($P < 0,0001$), respectivamente (Figura 7) e para AMI verificou-se médias de 1,2µg/mL para as CIMs e 158µg/mL para as BICs ($P = 0,0006$) (Figura 8). As médias para GEN foram 0,5µg/mL e 84µg/mL, para CIMs e BICs ($P = 0,0039$), respectivamente (Figura 9) e para CIP, as médias foram 0,3µg/mL para CIMs e 83µg/mL para BICs ($P = 0,0234$) (Figura 10).

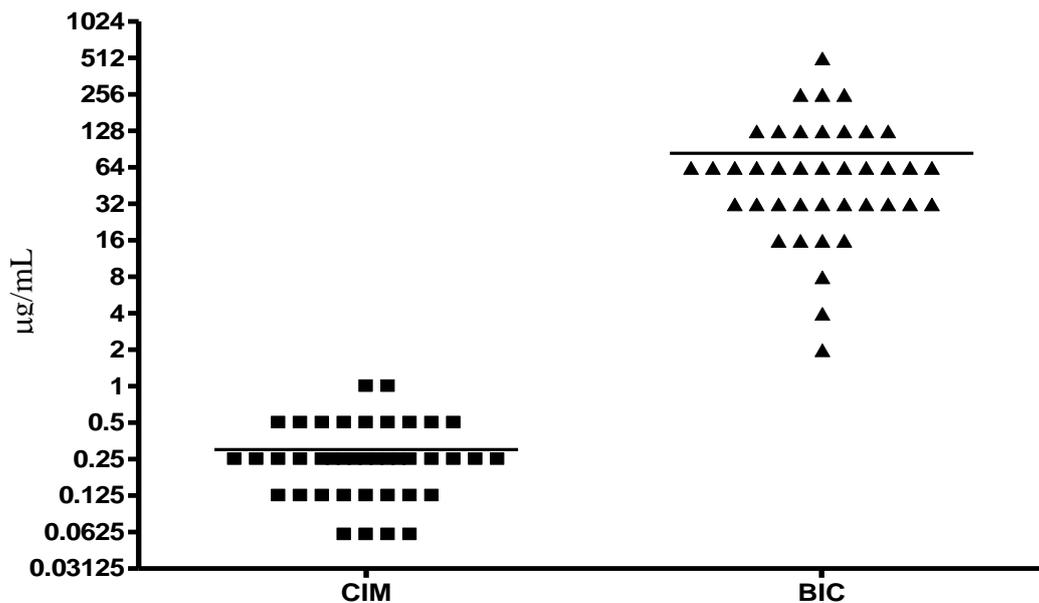
Figura 6 - Comparação entre os valores de CIM e BIC para ceftazidima



Legenda: P = 0,0001 (Teste t); CIM – Concentração inibitória mínima; BIC - Concentração inibitória mínima em biofilme.

Fonte: Ferreira, 2008.

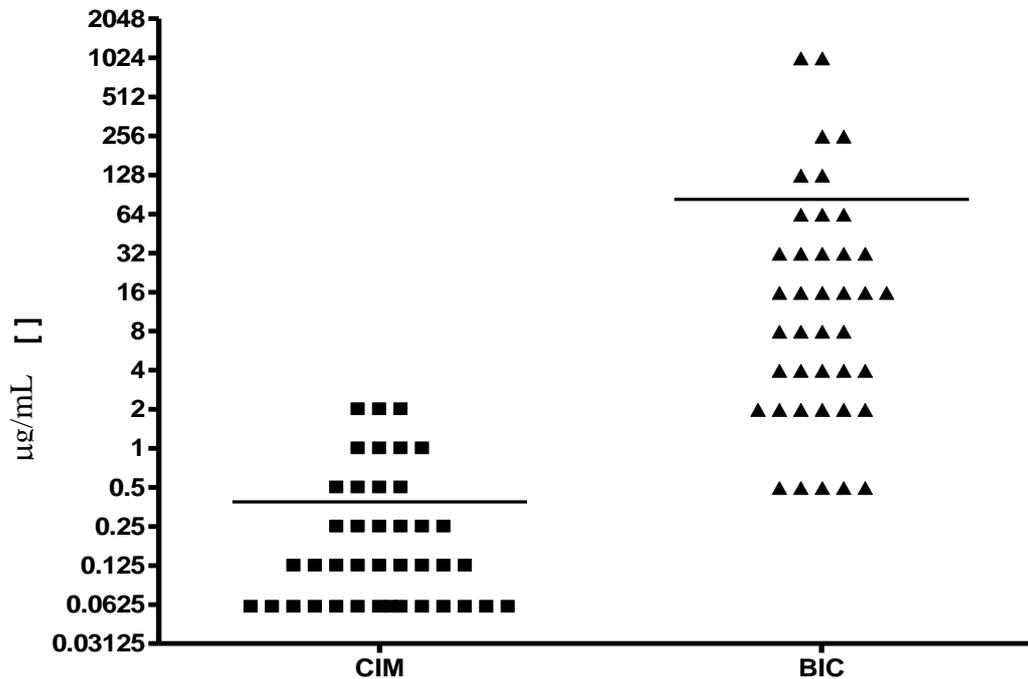
Figura 7- Comparação entre os valores de CIM e BIC para tobramicina



Legenda: P = 0,0001 (Teste t); CIM – Concentração inibitória mínima; BIC - Concentração inibitória mínima em biofilme.

Fonte: Ferreira, 2008.

Figura 10 - Comparação entre os valores de CIM e BIC para ciprofloxacina



Legenda: P = 0,0234 (Teste t); CIM – Concentração inibitória mínima; BIC - Concentração inibitória mínima em biofilme.

Fonte: Ferreira, 2008.

Comparamos também as concentrações inibitórias mínimas para 50% das amostras nas duas condições (BIC_{50} e a CIM_{50}) e observamos uma expressiva diferença entre elas. Para TOB foi visto um aumento de 256 vezes da BIC_{50} em relação a CIM_{50} . O intervalo de variação das CIMs foi de 0,06 a $1\mu\text{g/mL}$, enquanto que os da BICs foi de 2 a $512\mu\text{g/mL}$ (Tabela 8).

No caso dos outros dois aminoglicosídeos, o aumento foi de 64 vezes da BIC_{50} ($32\mu\text{g/mL}$) em relação a CIM_{50} ($0,5\mu\text{g/mL}$). Quanto aos intervalos de variação, houve uma pequena diferença para a AMI em que as CIMs variaram de 0,25 a $8\mu\text{g/mL}$ e as BICs de 2 a $1024\mu\text{g/mL}$, enquanto que para a GEN as CIMs variaram de 0,125 a $4\mu\text{g/mL}$ e as BICs de 0,5 a $1024\mu\text{g/mL}$ (Tabela 8).

A BIC_{50} de CIP mostrou-se 128 vezes maior do que a CIM_{50} , enquanto que o intervalo de variação das CIMs foi de 0,06 a $2\mu\text{g/mL}$ o das BICs foi de 0,5 a 1024. Para CAZ verificou-se o menor aumento na relação entre BIC_{50} e CIM_{50} , cerca de 30 vezes, e as concentrações variaram de 0,06 a $2\mu\text{g/mL}$, no caso das CIMs e de 0,5 a $1024\mu\text{g/mL}$ no caso das BICs (Tabela 8).

Tabela 8 - Comparação da CIM₅₀ e BIC₅₀ em 40 amostras de *P. aeruginosa*

Antimicrobianos	Concentração (µg/mL)			
	CIM		BIC	
	CIM ₅₀	Intervalo	BIC ₅₀	Intervalo
Amicacina	0,5	0,25-8	32	2-1024
Ceftazidima	2	0,25-64	64	2-1024
Ciprofloxacina	0,125	0,06-2	16	0,5-1024
Gentamicina	0,5	0,125-4	32	0,5-1024
Tobramicina	0,25	0,06-1	64	2-512

Legenda: CIM - Concentração inibitória mínima; BIC - Concentração inibitória mínima na condição de crescimento em biofilme.

Fonte: Ferreira, 2008.

Como não há critérios de interpretação padronizados para a categorização das amostras a partir das concentrações inibitórias mínimas do crescimento em biofilme, utilizamos os critérios de leitura definidos pelo CLSI para análise da CIM na caracterização dos perfis de resistência nas duas situações: CIM e BIC. Desta forma verificou-se um aumento significativo no número de amostras resistentes para todos os antimicrobianos quando testadas sob a condição de biofilme. No caso dos três aminoglicosídeos todas as amostras mostraram-se susceptíveis pela CIM, enquanto que na BIC para AMI, 10 (25%) e 18 (45%) das amostras mostraram-se com resistência intermediária e plena, respectivamente. Para GEN e TOB, 34 (85%) e 37 (92,5%) amostras foram classificadas como resistentes, respectivamente. O único antimicrobiano testado que apresentou amostras resistentes pela CIM foi a CAZ, com 7,5% (n=3) das amostras, já no caso da BIC este valor sobe para 87,5% (n=35) das amostras. Para CIP não verificamos amostras resistentes pela CIM, apenas intermediárias (7,5%; n=3), já no caso da BIC a taxas foram 15% (n=6) de amostras intermediárias e 72,5% (n=29) resistentes. Dentre os cinco antimicrobianos, o maior índice de resistência foi verificado para TOB, com 38 (n=95%) amostras e o menor para AMI, 28 (n=70%) amostras (Tabela 9).

Tabela 9- Comparação do perfil de susceptibilidade entre amostras de *P. aeruginosa* com crescimento planctônico (CIM) e em biofilme (BIC)

Antimicrobianos	Nº de Amostras (%)						p
	CIM			BIC			
	S	I	R	S	I	R	
Amicacina	40 (100)	0	0	12 (30)	10 (25)	18 (45)	<0,0001
Ceftazidima	37 (92,5)	2 (5)	1 (2,5)	5 (12,5)	7 (17,5)	28 (70)	<0,0001
Ciprofloxacina	37 (92,5)	3 (7,5)	0	5 (12,5)	6 (15)	29 (72,5)	<0,0001
Gentamicina	40 (100)	0	0	3 (7,5)	3 (7,5)	34 (85)	<0,0001
Tobramicina	40 (100)	0	0	2 (5)	1 (2,5)	37 (92,5)	<0,0001

Legenda: S – Sensível; I – Intermediário; R – Resistente (Considerando os pontos de corte da CIM estabelecidos pelo CLSI 2007 para *P. aeruginosa*); p – Teste Exato de Fisher (significativo quando $p < 0,05$).

Fonte: Ferreira, 2008.

Ao compararmos os perfis de resistência das 40 amostras considerando os resultados obtidos através da determinação da BIC, verificamos que todas as amostras apresentaram resistência à pelo menos um dos antimicrobianos e 22 (55%) amostras apresentaram resistência (intermediária e plena) a todos os antimicrobianos testados, destas nove (4A, 4B, 5B, 6B, 10B, 12B, 13A, 13B e 20B) mostraram resistência plena aos cinco antimicrobianos (Tabela 10).

Tabela 10- Perfil de resistência das 40 amostras de *P. aeruginosa* de acordo com os resultados obtidos na BIC

Paciente	Amostra	AMI	CAZ	CIP	GEN	TOB
1	A	R	S	R	S	R
	B	R	I	R	R	R
2	A	R	I	R	R	R
	B	I	I	R	R	R
3	A	I	S	R	I	R
	B	I	S	R	R	R
4	A	R	R	R	R	R
	B	R	R	R	R	R
5	A	S	R	R	R	R
	B	R	R	R	R	R
6	A	I	R	R	R	R
	B	R	R	R	R	R
7	A	R	I	R	R	R
	B	R	S	R	R	R
8	A	S	S	S	R	R
	B	S	R	R	R	R
9	A	S	R	S	R	R
	B	I	R	I	R	R
10	A	I	R	R	R	R
	B	R	R	R	R	R
11	A	R	I	R	R	R
	B	I	R	R	R	R
12	A	S	R	I	R	R
	B	R	R	R	R	R
13	A	R	R	R	R	R
	B	R	R	R	R	R
14	A	I	R	R	R	R
	B	I	R	R	R	R
15	A	S	I	R	R	R
	B	R	I	R	R	R
16	A	S	R	I	I	S
	B	S	R	I	R	I
17	A	R	R	S	R	S
	B	S	R	I	S	R
18	A	S	R	R	R	R
	B	S	R	I	S	R
19	A	S	R	S	I	R
	B	R	R	S	R	R
20	A	I	R	R	R	R
	B	R	R	R	R	R

Legenda: S – Suceptível; I – Intermediário; R – Resistente (Considerando os pontos de corte da CIM estabelecidos pelo CLSI 2007 para *P. aeruginosa*); AMI – Amicacina; CAZ – Ceftazidima; CIP- Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; TOB – Tobramicina.

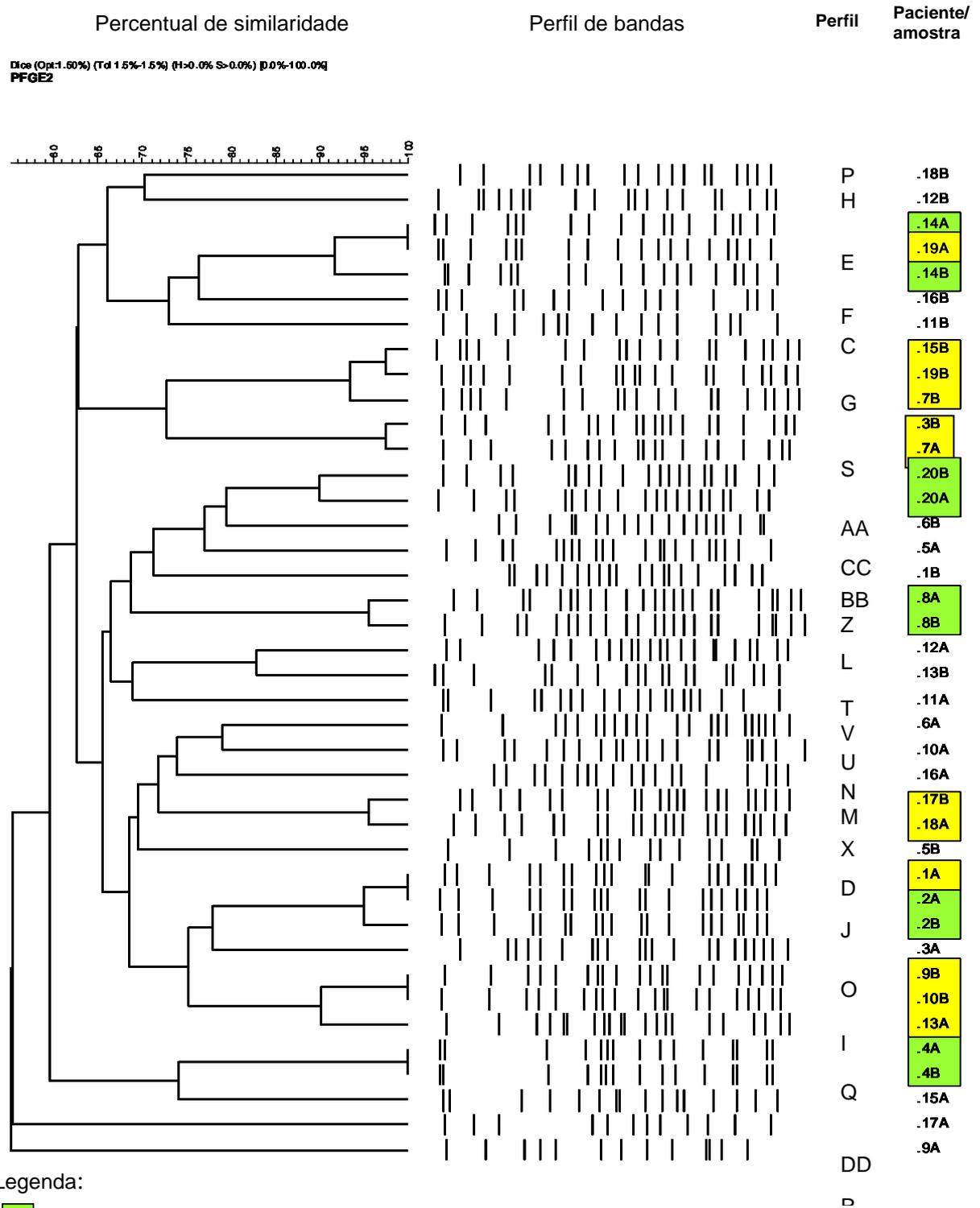
Fonte: Ferreira, 2008.

3.6 Tipagem Molecular

A análise molecular das 40 amostras de *P. aeruginosa* por PFGE, mostrou uma grande diversidade genética entre elas, com 27 perfis, não sendo evidenciado nenhum grupo clonal prevalente. Ao comparar as amostras obtidas de pacientes dos dois centros de atendimento aos fibrocísticos (IFF e HUPE) também não identificamos nenhum grupo clonal prevalente.

As duas cepas obtidas do mesmo paciente em diferentes períodos mostraram ser de clones distintos na maioria dos casos, apenas cinco pacientes apresentaram-se colonizados pelo mesmo clone (pacientes 2, 4, 8, 14 e 20). Clones idênticos ou muito relacionados também foram encontrados em pacientes distintos, tanto intra quanto inter pacientes atendidos, nos dois centros de referência. (pacientes 1 e 2: clone O; pacientes 3 e 7: clone S; pacientes 9, 10 e 13: clone Q; pacientes 14 e 19: clone E; pacientes 7, 15 e 19; clone G; pacientes 17 e 18: clone D) (Figura 11).

Figura 11- Dendrograma mostrando os coeficientes de similaridade entre os perfis gerados por PFGE das 40 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC



Legenda:

- Clones Idênticos no mesmo paciente
- Clones idênticos em pacientes distintos

Fonte: Ferreira, 2008.

A tabela 11 correlaciona os perfis de fragmentação com a capacidade de formação do biofilme nas 40 amostras de *P. aeruginosa*. A grande diversidade genotípica (27 perfis de PFGE) foi acompanhada de uma significativa variabilidade quanto à formação de biofilme e não foi possível estabelecer nenhuma associação entre um grupo clonal e um perfil de densidade do biofilme.

Tabela 11 - Comparação entre os perfis genotípicos e a capacidade de formação do biofilme

Paciente	Amostra	Morfotipo	Data de Isolamento	Perfil PFGE	Formação de Biofilme
1	A	NM	8/10/2003	O	+
	B	M	23/3/2005	Z	+
2	A	M	6/10/2003	O	+
	B	NM	9/12/2004	O	+
3	A	M	26/6/2003	I	+
	B	NM	17/2/2005	S	++
4	A	M	10/7/2003	DD	++
	B	NM	12/5/2005	DD	+++
5	A	NM	18/3/2004	BB	++
	B	M	22/7/2004	J	+
6	A	M	10/7/2003	N	++
	B	NM	20/10/2005	CC	++
7	A	M	25/11/2003	S	++
	B	NM	11/3/2005	G	+
8	A	NM	4/4/2003	L	+
	B	M	20/5/2005	L	+
9	A	NM	5/5/2003	A	++
	B	M	14/4/2005	Q	++
10	A	NM	15/5/2003	M	++
	B	M	15/9/2005	Q	++
11	A	NM	28/8/2003	U	+
	B	M	9/12/2004	C	+++
12	A	M	26/6/2003	T	+
	B	NM	14/4/2005	H	+
13	A	NM	1/12/2003	Q	++
	B	M	27/1/2005	V	+
14	A	NM	7/5/2002	E	++
	B	M	7/10/2005	E	++
15	A	M	18/9/2003	R	++
	B	NM	12/5/2005	G	++
16	A	NM	15/5/2003	X	++
	B	M	16/9/2004	F	++
17	A	M	14/8/2003	B	+
	B	NM	9/12/2004	D	+
18	A	M	15/5/2003	D	+++
	B	NM	15/9/2005	P	+
19	A	M	18/6/2003	E	++
	B	NM	1/4/2005	G	+
20	A	NM	25/11/2003	AA	+
	B	M	10/2/2006	AA	++

Legenda: NM - Não mucóide; M – Mucóide IFF - Instituto Fernandes Figueira; HUPE - Hospital Universitário Pedro Ernesto; + fraca; ++ moderada; +++ forte.

Fonte: Ferreira, 2008.

A comparação entre as amostras de mesmo perfil PFGE e suas respectivas BICs não mostrou uma associação entre estes parâmetros, pois todas as amostras que mostram um mesmo genótipo, apresentaram fenótipos distintos (Tabela 12).

Analisando-se esses aspectos em relação aos isolados de mesmo grupo clonal em um mesmo paciente, observou-se que em quatro dos cinco pacientes foi possível constatar um aumento na densidade bacteriana do biofilme quando comparados o primeiro e o segundo isolado, sendo que em dois deles (pacientes 4 e 20) o aumento correspondeu a mudança na classificação da intensidade do biofilme houve.

Em relação aos resultados das BICs, embora sem diferenças importantes, observamos, de um modo geral, uma tendência ao aumento BIC encontrada no segundo isolado em relação ao primeiro. Fazendo a mesma análise por antimicrobiano, verificamos que apenas para CAZ houve um aumento da BIC entre o primeiro e o segundo para os cinco pacientes. Para TOB o comportamento foi diferente, já que em quatro pacientes houve decréscimo no valor da BIC entre o primeiro e o segundo isolado (Tabela 12).

Observamos que as amostras dos pacientes quatro e 20, para os quais houve o aumento expressivo da densidade de biofilme, foram as que mostraram um aumento da BICs para o maior número de antimicrobianos: quatro e cinco, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12 – Comparação entre os perfis de PFGE idênticos e as concentrações inibitórias mínimas das amostras de *P. aeruginosa* crescidas em biofilme

Paciente/ Amostras	Perfil PFGE	DO do Biofilme	BIC (µg/mL)				
			AMI	CAZ	CIP	GEN	TOB
1A	O	0,154	256	2	256	4	512
2A	O	0,257	128	16	32	16	32
2B	O	0,344	32	16	64	64	16
3A	S	0,475	32	8	16	8	128
7A	S	0,429	512	16	16	64	64
4A	DD	0,678	512	256	16	256	128
4B	DD	1,299	1024	1024	8	1024	32
8A	L	0,239	4	8	0,5	32	128
8B	L	0,281	16	32	8	64	32
9B	Q	0,560	32	128	2	32	128
10B	Q	0,492	256	256	128	256	256
13A	Q	0,506	256	64	32	32	64
14A	E	0,773	32	32	16	32	64
14B	E	0,663	32	512	4	64	32
19A	E	0,833	2	128	0,5	8	64
7B	G	0,216	128	4	1024	512	64
15B	G	0,672	64	16	16	128	32
19B	G	0,384	64	1024	0,5	64	128
17B	D	0,181	4	32	2	0,5	64
18A	D	1,395	4	1024	4	32	32
20A	AA	0,233	32	256	32	16	32
20B	AA	0,853	128	1024	256	64	64

Legenda: BIC – Concentração inibitória mínima para o crescimento em biofilme; AMI – Amicacina; CAZ – Ceftazidima; CIP – Ciprofloxacina; GEN – Gentamicina; TOB – Tobramicina; DO < 0,400 (fraca), DO entre 0,401 e 0,800 (moderada), DO > 0,801 (forte).

Fonte: Ferreira, 2008.

4 DISCUSSÃO

4.1 *Pseudomonas aeruginosa* e biofilme na Fibrose Cística

Uma em cada seis mil crianças brasileiras tem FC, doença genética que afeta principalmente o pâncreas e os pulmões. No entanto apenas 3% dessas crianças são diagnosticadas, o que contribui para o óbito na maioria dos casos. Nos Estados Unidos a sobrevida média dos pacientes ultrapassa os 30 anos, mas no Brasil em algumas regiões não chega a 10 anos (<http://www.abram.com.br> Associação Brasileira de Assistência a Mucoviscidose – ABRAM- 2008).

A infecção pulmonar crônica é a principal causa de morbidade e mortalidade nestes pacientes, destacando-se em frequência e gravidade as infecções por *P. aeruginosa*, presente em mais de 80% dos pacientes. A infecção por este patógeno, em geral, ocorre antes dos três anos de idade e a partir do estabelecimento da infecção crônica o paciente é acometido por episódios de exacerbações que requerem antibioticoterapia (Burns *et al.*, 2001; Cantón *et al.*, 2002; Foweraker *et al.*, 2005).

O pulmão do paciente fibrocístico é um ambiente bastante hostil, caracterizado pela desidratação, influxo de leucócitos e uma resposta inflamatória exacerbada, com um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, que provocam a deterioração do tecido pulmonar, estes fatores associados a freqüente e, muitas vezes, prolongada antibioticoterapia exige da *P. aeruginosa* uma adaptação a este ambiente. Neste sentido o crescimento em biofilme é uma estratégia essencial para a persistência deste microrganismo, pois protege a bactéria da ação do sistema imune e dos antimicrobianos (Oliver *et al.*, 2000; O'Toole, Kaplan & Kolter, 2000; Ciofu *et al.*, 2005).

Biofilmes são comunidades bacterianas aderidas a uma superfície e embebidas por uma matriz extracelular polimérica secretada pelos seus componentes. Eles podem causar problemas significativos em diversas áreas: industrial, sistema de distribuição de água e processamento de alimentos. Na área médica estima-se que os biofilmes estejam envolvidos em 65 a 80% das infecções

microbianas (Donlan & Costerton, 2002; Flemming, 2002; Fux *et al.*, 2005; Wagner & Iglewski, 2008).

Singh *et al.* (2000) evidenciaram a presença do crescimento em biofilme da *P. aeruginosa* no pulmão dos pacientes com FC através da detecção de moléculas sinalizadoras da comunicação intercelular, que coordenam a formação do biofilme, no escarro destes pacientes, comprovando a hipótese de que esta estratégia de crescimento desempenha um importante papel na infecção crônica por esta bactéria.

A detecção *in vitro* da formação de biofilme em *P. aeruginosa* tem sido demonstrada em diversos trabalhos. Em geral, a maioria mostra que 100% das amostras formam biofilme, embora variem na intensidade dos mesmos (Head & Yu, 2004). Verificamos que as 40 amostras incluídas em nosso estudo, mostraram-se capazes de formar biofilme *in vitro* em níveis variáveis. A maioria apresentou uma capacidade moderada (47,5%) e fraca (45%) de formação de biofilme e 7,5% das amostras mostraram uma capacidade forte de formar biofilme.

Lee *et al.*, (2005) ao estudarem a formação de biofilme em 20 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de oito pacientes com FC, encontram diferentes níveis de formação de biofilme não só entre amostras de pacientes distintos, bem como nos isolados de um mesmo paciente. Nosso estudo também revelou diversidade entre as amostras obtidas de um mesmo paciente, o que provavelmente reflete um comportamento adaptado a diferentes momentos da infecção crônica.

Ao compararmos os primeiros e os segundos isolados de cada paciente verificamos que não houve diferença significativa quanto à formação do biofilme, ao contrário de Lee *et al.*, (2005), que verificaram uma redução na capacidade de formar biofilme nos isolados das fases mais avançadas da infecção crônica e propuseram que a sobrevivência longitudinal da *P. aeruginosa* no pulmão dos fibrocísticos envolveria estratégias não relacionadas ao desenvolvimento de biofilme. Esta diferença pode ser justificada pelo fato de que em nosso trabalho o intervalo máximo de isolamento entre duas amostras do mesmo paciente foi de 41 meses, enquanto que no estudo citado os intervalos foram em média 14 anos, o que indicaria que o crescimento em biofilme seria importante nos estágios iniciais da infecção crônica.

Uma das características mais marcantes da infecção do pulmão do paciente com FC por *P. aeruginosa* é a conversão desta bactéria para o morfotipo M, caracterizado pela hiperprodução de alginato, que confere uma vantagem seletiva

para este microrganismo no ambiente pulmonar, pois atua na evasão do sistema imune e na proteção contra a ação dos antimicrobianos. Neste sentido considerava-se que a formação de biofilme era dependente da presença do alginato, pois este seria o principal componente da matriz. Recentemente comprovou-se que a síntese de alginato não é necessária para o desenvolvimento do biofilme e que este polissacarídeo não é um dos principais componentes da matriz extracelular, neste caso a formação de biofilme precederia a conversão para o morfotipo M (Nivens *et al.*, 2001; Liczak, Cannon & Píer, 2002; Wozniak *et al.*, 2003; Stapper *et al.*, 2004; Ryder, Byrd & Wozniak, 2007).

Moskowitz *et al.*, (2004) compararam seis amostras de *P. aeruginosa* NM e seis M e não detectaram nenhuma diferença entre elas quanto à formação de biofilme. Em nosso estudo, também não encontramos diferença entre os morfotipos NM e M em nenhuma das situações: casos em que o primeiro isolado de um paciente era NM e o segundo NM e casos em que a ordem de isolamento foi inversa.

É importante ressaltar que a metodologia empregada para a análise da formação de biofilme se baseia no uso de cristal violeta, um corante básico que se liga a moléculas de superfície carregadas negativamente e que, portanto, afere apenas a biomassa do biofilme, não fornecendo nenhuma informação sobre os componentes da matriz extracelular (Peeters, Nelis & Coenye, 2008). Desta forma, apesar do alginato não ser importante para a formação do biofilme, sua ausência pode implicar em alterações na estrutura e nas propriedades do biofilme.

4.2 Biofilme e Resistência

As infecções por microrganismos formadores de biofilme são caracterizadas pela recorrência dos sintomas mesmo após tratamentos repetidos com antimicrobianos, isso ocorre porque *in vivo*, os antibióticos são capazes de eliminar a população de bactérias planctônicas, mas não as bactérias em biofilme. Em geral, as bactérias residentes nesta comunidade podem apresentar-se até 1000 vezes mais resistentes aos antimicrobianos do que as de planctônica, desta forma os agentes da antibioticoterapia falham em eliminar as bactérias em biofilme e, quando

o tratamento é interrompido este atua como um sítio para a recorrência da infecção (Ceri *et al.*, 1999; Davey & O'Toole, 2000; Stewart & Costerton, 2001; Hoiby, 2002).

Este modelo aplica-se adequadamente as infecções pulmonares crônicas por *P. aeruginosa* nos pacientes fibrocísticos, já que eles são acometidos constantemente por exacerbações e submetidos freqüentemente a antibioticoterapia (Liczak, Cannon & Píer, 2002).

Diversos estudos mostram que amostras de *P. aeruginosa* são menos susceptíveis a ação de antimicrobianos quando crescem em biofilme, embora com algumas diferenças nos resultados encontradas para algumas classes (Brooun, Liu & Lewis, 2000; De Kievit *et al.*, 2001; Drenkard & Ausubel, 2002; Walters *et al.*, 2003). Ceri *et al.*, (1999) determinaram a CIM e a BIC da cepa controle de *P. aeruginosa* ATCC 27853 para oito antimicrobianos (amicacina, aztreonam, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, piperacilina e tobramicina), verificando aumentos significativos para todos eles quando CIM e BIC foram comparadas. Destacando-se a maior diferença para CAZ, cuja BIC foi 1000 vezes maior do que a CIM. Para os aminoglicosídeos, o destaque foi para a GEN com a BIC 60 vezes maior.

Spoering & Lewis, (2001) também fizeram a comparação entre CIM e BIC, utilizando outra cepa controle de *P. aeruginosa*, a PAO1, e demonstraram que a concentração de TOB necessária para eliminar 90% das células do biofilme era de 50µg/mL, que corresponde a cinco vezes a concentração máxima que este antimicrobiano atinge clinicamente.

Poucos são os trabalhos com amostras clínicas. Moskowitz *et al.*, (2004) analisaram a CIM e a BIC para 94 amostras de *P. aeruginosa* isoladas de 41 pacientes com FC e não encontraram diferenças significativas entre os dois valores para AMI, CIP, GEN e TOB, porém para CAZ os valores da CIM₅₀ e da BIC₅₀ foram de 2µg/mL e 128µg/mL, respectivamente. Hill *et al.*, (2005) determinaram a BIC para 16 amostras de *P. aeruginosa* e mostraram que AMI e CAZ não foram efetivas contra nenhum dos isolados na condição de biofilme.

Em nosso trabalho, ao compararmos a CIM e a BIC das 40 amostras de *P. aeruginosa* para cinco antimicrobianos largamente utilizados no tratamento das infecções crônicas dos pacientes fibrocísticos (AMI, CAZ, CIP, GEN e TOB) verificamos que, assim como no estudo que envolveu a cepa ATCC 27853, houve um aumento significativo entre CIM e BIC para todos eles, o que pode ser explicado

pelo fato de que a maioria das nossas amostras apresentou-se muito sensível pela CIM, comportamento semelhante a esta cepa controle. Em relação aos trabalhos que utilizaram amostras clínicas e não verificaram alterações significativas para todos os antimicrobianos, a diferença pode estar no fato de que todos os isolados selecionados eram multirresistentes (Hill *et al.*, 2005).

No caso dos aminoglicosídeos todas as amostras mostraram-se sensíveis pela CIM, enquanto que pela BIC, 92,5%, 85 % e 45% foram resistentes a TOB, GEN e AMI respectivamente. Para TOB destaca-se o intervalo de variação das concentrações, na CIM foi 0,06µg/mL a 1µg/mL, enquanto que na BIC foi de 2µg/mL a 512µg/mL, ou seja a menor concentração encontrada pela BIC ficou uma diluição acima da maior concentração determinada pela CIM.

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos carregados positivamente e a resistência do biofilme de *P. aeruginosa* a esta classe seria mediada pela adsorção dos antimicrobianos a moléculas da matriz carregadas negativamente, o que retardaria a penetração destes agentes (Shigeta *et al.*, 1997). Para Walters *et al.*, (2003) outro fator determinante para a resistência do biofilme aos aminoglicosídeos seria a limitação de oxigênio e baixa atividade metabólica encontrada em algumas regiões do biofilme, pois a ação destes antimicrobianos depende da sua internalização através de um mecanismo de transporte que exige fosforilação oxidativa.

No caso da CIP verificamos um aumento de 120 vezes na relação BIC₅₀ e CIM₅₀, 16µg/mL e 0,125µg/mL respectivamente e enquanto 92,5% das amostras mostraram-se sensíveis pela CIM, na BIC este valor caiu para apenas 12,5%, já que 87,5% das amostras apresentaram perfil intermediário ou resistente. Vrany, Stewart & Suci, (1997) demonstraram que a penetração da CIP através do biofilme de *P. aeruginosa* não é retardada significativamente, o que sugere que a resistência a este antimicrobiano envolve outros mecanismos celulares.

Walters *et al.*, (2003) demonstraram que a ação da CIP em biofilmes de *P. aeruginosa* é limitada a áreas adjacentes a interface com o ar, o que indica que a limitação de oxigênio é um fator que aumenta a resistência do biofilme a este antimicrobiano. Outro importante mecanismo de resistência foi proposto por Brooun, Liu & Lewis, (2000), que indicaram a presença de uma bomba de efluxo expressa no biofilme de *P. aeruginosa*, cuja afinidade seria maior para CIP.

Para o β -lactâmico testado (CAZ) verificamos que a BIC₅₀ (64 μ g/mL) foi 30 vezes maior do que a CIM₅₀ (2 μ g/mL) e na comparação das taxas de resistência os valores foram semelhantes a CIP, 92,5% das amostras mostraram-se sensíveis pela CIM enquanto 87,5% apresentaram resistência a este antimicrobiano (perfil intermediário ou resistente).

De acordo com Borriello *et al.*, (2004), a resistência do biofilme aos β -lactâmicos é explicada em parte pela baixa disponibilidade de nutrientes em algumas regiões do biofilme, o que acarretaria numa menor atividade metabólica destas células, limitando a ação destes antimicrobianos que são mais efetivos contra bactérias com elevada taxa de divisão. Bagge *et al.*, (2004) demonstraram que outro fator determinante para a resistência do biofilme de *P. aeruginosa* a CAZ seria o fenótipo de hiperprodução de uma β -lactamase cromossomal, que degradaria o antimicrobiano retardando sua penetração, nesta condição de crescimento.

Segundo Banerjee & Stableforth, (2000) os antimicrobianos mais comuns para o tratamento das infecções pulmonares por *P. aeruginosa* em pacientes com FC são β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e polimixinas. Os autores sugerem o tratamento com a associação de um β -lactâmico e um aminoglicosídeo, esquema que é adotado em um dos centros de referência no atendimento a alguns dos pacientes incluídos em nosso estudo. Na condição de biofilme verificamos elevadas taxas de resistência para os dois grupos de antimicrobianos, o que pode justificar a dificuldade em erradicar a *P. aeruginosa* do pulmão destes pacientes, já que as bactérias em biofilme seriam capazes de sobreviver ao período de antibioticoterapia e após o fim do tratamento atuariam como sítio de recorrência para um novo quadro clínico.

Conway *et al.*, (2003) indicam um tratamento preventivo contra as exacerbações nestes pacientes cronicamente colonizados utilizando por via inalatória antimicrobianos como a TOB, pois o agente atinge concentrações mais eficazes no local da infecção. Porém o uso prolongado deste regime pode ser responsável pelos altos índices de resistência a esta droga na condição de biofilme que encontramos em nossas amostras (92,5%).

Alguns consensos propõem o tratamento baseado nas quinolonas, particularmente a CIP que é tão eficaz pela via oral quanto pela intravenosa, associada ao uso de um aminoglicosídeo de forma inalatória. Em nosso estudo, as

elevadas taxas de resistência a CIP (87,5%) e aos três aminoglicosídeos estudados na condição de biofilme, demonstram a necessidade de um monitoramento da resposta clínica da antibioticoterapia.

Segundo Van Devanter & Van Dalfsen, (2005), a exacerbação pulmonar causada pela *P. aeruginosa* representaria a combinação das duas formas de crescimento bacteriano, com o biofilme sendo o responsável pela infecção crônica e as bactérias planctônicas, que se desprendem desta estrutura, causadoras do quadro agudo. Neste sentido, um tratamento adequado para estes pacientes requer diferentes abordagens: períodos de estabilidade clínica devem ser mantidos através de uma terapia que iniba o crescimento do biofilme, enquanto que nos períodos de exacerbação os dois componentes da infecção, biofilme e células planctônicas devem ser alvos da antibioticoterapia.

Segundo Alkawash, Soothill & Schiller, (2006) apesar da síntese de alginato não ser indispensável ao desenvolvimento do biofilme, a presença deste polissacarídeo levaria a alterações na arquitetura e na resistência do biofilme, pois atuaria como uma barreira para a penetração dos antimicrobianos. Ao compararmos as BICs entre as amostras dos morfotipos NM e M não verificamos diferenças significativas, o que indica que a hiperprodução de alginato não foi um fator importante para a resistência das nossas amostras no crescimento em biofilme.

A antibioticoterapia traz importantes contribuições para os pacientes fibrocísticos, pois visa reduzir ou eliminar as bactérias do ambiente pulmonar, tratar os quadros de exacerbação pulmonar, diminuindo a morbidade e a mortalidade (Ratijen, 2001; Finnan *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004). Ela se baseia nos resultados dos testes de susceptibilidade padronizados e de uso corrente em laboratórios clínicos (disco-difusão e CIM). Estes testes seguem as orientações de execução e interpretação de documentos de consenso e, dentre eles, o documento americano (CLSI) é o mais utilizado, inclusive no Brasil. Os critérios interpretativos desses testes foram desenvolvidos para a terapia direta no tratamento de infecções da corrente sanguínea e do trato urinário e que só foram validados para estas infecções, pois utilizam como referência a maior concentração que os antimicrobianos atingem no soro. Além disto, esses testes são padronizados para bactérias crescidas em vida livre e o que se observa nestes pacientes é que dos antimicrobianos que mostram atividade *in vitro*, apenas uma minoria é eficaz *in vivo*, pois nesta condição os microrganismos crescem em biofilme, que é mais resistente

a atividade dos antimicrobianos (Giamarellou *et al.*, 2001; Bellais *et al.*, 2002; Macia *et al.*, 2004; Manno *et al.*, 2005).

A realização de testes de susceptibilidade realizados com a bactéria crescidas em biofilme seria mais indicada, pois eles mimetizam a fisiologia da infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* nos pacientes com FC, e, portanto, representariam melhor a condição *in vivo*. Porém, existem limitações para a sua aplicabilidade, já que não há critérios padronizados para a interpretação do teste de susceptibilidade em bactérias sob esta forma de crescimento (Moskowitz *et al.*, 2005). Além disso, ainda não foi comprovado se os dados obtidos pela BIC predizem de maneira mais adequada do que os testes convencionais a resposta clínica a antibioticoterapia em pacientes com FC, já que são necessários estudos clínicos laboratoriais para responder a essas questões.

A maioria das amostras, quando crescidas sob a condição de biofilme apresentaram *in vitro* resistência a todos os antimicrobianos testados, portanto a adoção de um esquema adequado para o tratamento das infecções pulmonares por *P. aeruginosa* nos pacientes fibrocísticos incluídos em nosso estudo representa um grande desafio para os profissionais da saúde.

4.3 Tipagem Molecular

A técnica de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE) é considerada o método de tipagem baseado em DNA mais discriminatório para analisar *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC. Esta técnica permite separar fragmentos de DNA com alto peso molecular, variando entre 10 a 800 Kb e possibilita a diferenciação de cepas com base nas variações qualitativas e quantitativas dos fragmentos gerados e é utilizada, essencialmente, para tipagem de amostras de uma mesma espécie, com base em suas diferenças clonais (Olive & Bean, 1999; Agodi *et al.*, 2000).

Em nosso estudo, a digestão do DNA cromossômico das amostras de *P. aeruginosa* com a enzima de restrição *SpeI* gerou de 13 a 23 fragmentos de DNA no gel de eletroforese, o dendrograma gerado pelo método UPGMA mostrou

percentuais de similaridade que variaram de 57% a 100%. Para a caracterização de grupos clonais utilizamos os critérios recomendados por Tenover *et al.* (1995).

Avaliamos a relação clonal das 40 amostras de *P. aeruginosa*, através da técnica de PFGE e os resultados obtidos foram analisados com os seguintes objetivos: a) verificar a ocorrência de um grupo clonal prevalente b) avaliar a relação clonal entre os dois isolados de um mesmo paciente c) correlacionar a presença de grupos clonais com a capacidade de formar biofilme e o perfil de resistência aos antimicrobianos nesta condição de crescimento.

O encontro de cepas epidêmicas é incomum na FC e durante muito tempo prevaleceu a idéia de que cada paciente é colonizado por cepas individualizadas e que tendem a ser mantidas durante todo o período de infecção crônica, sendo a infecção cruzada uma ocorrência rara. Entretanto, em 1996 Cheng *et al.*, relataram a disseminação de cepas de *P. aeruginosa* multiresistentes entre 55 pacientes pediátricos atendidos no *Alder Hey Children Hospital* (Centro de Referência de FC em Liverpool). Todos estavam colonizados por *P. aeruginosa* pertencente ao mesmo grupo clonal, denominado: *Liverpool Epidemic Strain* (LES).

Posteriormente, McCallum *et al.*, (2001) relataram que alguns pacientes adultos atendidos no *Cardiothoracic Center* em Liverpool, apresentavam infecção e, em alguns casos, a substituição da amostra infectante original pelo clone LES. Também no Reino Unido, em um centro regional em Manchester, foi descrita a ocorrência de um clone transmissível multirresistente (clone MA) (Jones *et al.*, 2001).

A presença de cepas epidêmicas em centros regionais no Reino Unido motivou estudos de vigilância para estabelecer a distribuição desses clones a nível nacional. Aproximadamente 1200 amostras de *P. aeruginosa* obtidas de 31 hospitais da Inglaterra e de Gales foram avaliadas. O clone LES foi identificado em 11% dos pacientes em 15 destes centros, seguido do clone Midlands 1, recuperados de 86 pacientes em 9 centros (Scott & Pitt, 2004). Outros trabalhos também têm mostrado a presença desses e de outros clones epidêmicos em diversas partes do mundo, embora alguns estudos de monitoramento não evidenciem a infecção cruzada dentro de suas unidades hospitalares (Armstrong *et al.*, 2002; Speert *et al.*, 2002).

Em nosso trabalho verificamos grande diversidade clonal (n=27) dentre as 40 amostras de *P. aeruginosa*, e nenhum grupo clonal prevalente. Ao compararmos as amostras obtidas de pacientes dos dois centros de atendimento aos fibrocísticos (IFF e HUPE) também não identificamos nenhum grupo clonal prevalente.

Parece ainda ser consensual que a maioria dos pacientes alberga, ao longo da evolução clínica, uma cepa de mesma origem clonal, independente do fenótipo. (Hunfeld *et al.*, 1999 ; Agodi *et al.*, 2000; Burns *et al.*, 2001). Em trabalho realizado em um centro na região Sul do Brasil, a análise de 97 isolados obtidos de 43 pacientes, mostrou grande diversidade de perfis PFGE sem a prevalência de um clone específico. Também ao avaliarem isolados coletados de um mesmo paciente em diferentes períodos, foi observado que a maioria era colonizada de forma persistente pelo mesmo genótipo de *P. aeruginosa*, independente do fenótipo NM ou M (Silbert, Barth & Sader, 2001)

Campana *et al.*, (2004) realizaram a tipagem molecular de 36 amostras de *P. aeruginosa* obtidas de 18 pacientes fibrocísticos, sendo uma amostra representante de cada morfotipo para cada paciente e verificaram que em todos eles os dois isolados apresentaram perfil de fragmentação idêntico.

Em nosso estudo, porém, as duas cepas obtidas do mesmo paciente (NM e M) em diferentes períodos, mostraram ser de clones distintos em 75% dos pacientes, indicando que estes pacientes já foram colonizados por mais de um clone de *P. aeruginosa* durante a evolução da doença pulmonar. Esses dados são concordantes com outros estudos que mostram a colonização por diferentes clones em um mesmo paciente, indicando heterogeneidade na população infectante durante o curso da infecção crônica e que, em alguns casos, a mudança de clones se associava com a antibioticoterapia (Boukadida *et al.*, 1993; Renders *et al.*, 1997).

Entendemos que estudos prospectivos nos pacientes atendidos nos dois centros, incluindo um número maior de isolados por paciente, são necessários para corroborar esses achados. Por outro lado, essa diversidade validou a amostragem incluída neste estudo, já que a maior diversidade de clones exclui a possibilidade de um resultado tendencioso nos testes de biofilme diante da ocorrência de um mesmo genótipo entre várias amostras.

Um dado que consideramos bastante relevante em nosso estudo foi que 12 dos 20 pacientes compartilhavam clones idênticos ou muito relacionados (1, 2, 3, 7, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 18 e 19), e em alguns casos os clones eram compartilhados por pacientes atendidos em centros diferentes (paciente 1 e 2: clone O; pacientes 7 e 15 :clone G). Esses dados podem indicar a possibilidade de transmissão entre os pacientes ou podem refletir aquisição independente dessas cepas a partir de diferentes origens.

A persistência da *P. aeruginosa* no pulmão dos pacientes fibrocísticos pode estar ligada a sua capacidade de formar biofilme e resistência aos antimicrobianos nesta condição, porém poucos estudos avaliam a correlação entre o perfil genotípico e estes parâmetros fenotípicos. Head & Yu, (2004) estudaram em 101 amostras de *P. aeruginosa* de pacientes fibrocísticos o perfil de fragmentação do PFGE e a formação de biofilme, obtendo uma grande diversidade genotípica e verificando diferentes capacidades de formação de biofilme entre as amostras, sem identificar nenhuma associação entre estes dois aspectos.

Em nosso trabalho não verificamos nenhuma relação entre os perfis de PFGE e a formação de biofilme, já que constatamos uma grande variabilidade nas duas abordagens. Em apenas cinco dos 27 perfis clonais encontrados os isolados apresentaram uma capacidade semelhante de formação de biofilme. A comparação feita entre os perfis clonais e as concentrações inibitórias para a condição de crescimento em biofilme das amostras revelou não haver nenhuma correlação entre o perfil genotípico e perfil de resistência para os cinco antimicrobianos testados (AMI, CAZ, CIP, GEN e TOB). Apesar disto podemos notar uma tendência a um aumento das BICs em amostras idênticas de um mesmo paciente isoladas em datas diferentes, o que sugere um aumento da resistência do biofilme em decorrência da contínua antibioticoterapia a qual os pacientes fibrocísticos são submetidos.

Nossos dados estão de acordo com a literatura, que indica não haver associação entre o genótipo e o fenótipo (formação de biofilme e resistência) em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC, pois trata-se de um microrganismo bastante versátil e capaz de se adaptar as constantes flutuações que ocorrem no ambiente pulmonar destes pacientes durante o curso da infecção crônica.

Nosso trabalho destaca-se por ser o primeiro no Brasil a abordar a resistência aos antimicrobianos na presença do biofilme em amostras de *P. aeruginosa* em pacientes com FC. A informação da elevada resistência na presença do biofilme contrastando com os dados dos testes de sensibilidade realizados nos laboratórios, os quais os clínicos se orientam para a antibioticoterapia, reforça a necessidade de padronização e implementação de testes *in vitro* que possam detectar essas peculiaridades e que representem de maneira mais fidedigna a verdadeira fisiologia das infecções pulmonares por *P. aeruginosa*, impactando de forma positiva na conduta médica frente aos pacientes.

CONCLUSÕES

- O teste de susceptibilidade para a determinação da CIM, executado e interpretado pelos critérios padronizados e utilizados nos laboratórios clínicos, revelou que todas as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* mostraram sensíveis para os aminoglicosídeos e 92,5% para ceftazidima e ciprofloxacina; não havendo diferença entre os morfotipos NM e M.
- Todas as amostras foram capazes de formar o biofilme, com grande diversidade quanto à densidade do mesmo. Não houve diferença significativa entre o biofilme das amostras NM e M, sugerindo que o alginato não seja essencial para a formação de biofilme em *P. aeruginosa*;
- As Concentrações Inibitórias das amostras sob crescimento em biofilme (BIC) mostraram-se mais elevadas do que as CIMs para todos os antimicrobianos. Utilizando os critérios de interpretação dos testes padronizados para inferir a susceptibilidade das amostras em biofilme, observamos que a maioria se mostrou resistente para todos os antimicrobianos, variando de 45% (amicacina) a 92,5% (tobramicina). Estes dados indicam que o crescimento em biofilme foi um fator significativo para a ocorrência de resistência em nossas amostras;
- Não houve diferença entre os morfotipos NM e M na comparação entre as BICs, indicando que a hiperprodução de alginato pode não ser um fator determinante para a resistência na nossa amostragem;
- Através da análise do polimorfismo genético verificamos grande diversidade e nenhum grupo clonal prevalente em nossa amostragem. Esta diversidade validou a amostragem incluída neste estudo, excluindo a possibilidade de um resultado tendencioso nos testes de biofilme diante da ocorrência de um mesmo genótipo entre várias amostras.

- Não houve nenhuma associação entre os grupos clonais encontrados, a capacidade de formar biofilme e a resistência verificada nesta condição de crescimento, indicando que em nossas amostras de *P. aeruginosa* a grande diversidade genotípica é acompanhada de uma significativa variabilidade fenotípica.
- Nossos resultados reforçam a necessidade de padronização e implementação de testes *in vitro* que possam detectar essas peculiaridades e que representem de maneira mais fidedigna a verdadeira fisiologia das infecções pulmonares por *P. aeruginosa*, impactando de forma positiva a conduta médica frente aos pacientes.

REFERÊNCIAS

Alvarez AE, Ribeiro AF, Hesselm G, Bertuzzo CS, Ribeiro JD. Cystic fibrosis at Brazilian center of excellence: clinical and laboratory characteristics of 104 patients and their association with genotype and disease severity. *J. Pediatr.* 2004; 80:371-379.

Armstrong DS, Grimwood K, Carzino R *et al.* Lower respiratory infection and inflammation in infants with newly diagnosed cystic fibrosis. *BMJ* 1995; 310:1571-1572.

August MJ, Hindler JA, Huber TW, Sewel DL. Quality control and quality assurance practices in clinical microbiology. Coord. Ed. A.S. Wessfeld. American Society for Microbiology. Washington, D.C., 1990.

ABRAM – Associação Brasileira de Assistência a Mucoviscidose - Fibrose Cística - situação atual da doença no Brasil. Disponível em: < <http://www.abram.org.br> > Acesso em: 19 Ago 2009.

Bagge, N., Schuster, M. Hentzer, M., Ciofu, O., Givskov, M., Greenberg, E.P. & Hoiby N. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm exposed to imipenem exhibit changes in global gene expression and β lactamases and alginate production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 1175-1187.

Barnini S, Dodi C, Campa M. Enhanced resolution of random amplified polymorphic DNA genotyping of *Pseudomonas aeruginosa*. *Letters in Applied Microbiol.* 2004; 39:274-277.

Belkum A, Struelens M, Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14:547-560.

Beringer PM, Appleman MD. Unusual respiratory bacterial flora in cystic fibrosis: microbiologic and clinical features. *Curr Opin Pulm Med.* 2000; 6:545-550.

Bombicino KA, Almuzara AN, Famiglietti AMR, Vay C. Evaluation of pyrrolidonyl arylamidase for the identification of nonfermenting Gram-negative rods. *Diag Microbiol Infec Dis.* 2007; 57:101-103.

Boukadida J, Montalembert M, Lenoir G, Scheinmann P, Verón M, Berche P. Molecular epidemiology of chronic pulmonary colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Med Microbiol.* 1993; 38:29-33.

Burdge DR, Nakielna EM, Rabin HR. Photosensitivity associated with ciprofloxacin use in adult patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995 Mar;39(3):793.

Burns JL, Emerson J, Stapp JR, Yim DL, Krzewinski J, Loudon L *et al*. Microbiology of sputum from patients at cystic fibrosis centers in the United States. *Clin Infect Dis*. 1998; 27 (1):158-63.

Burns JL, Saiman L. *Burkholderia cepacia* infections in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J*. 1999; 18:155-156.

Burns JL, Saiman L, Whittier S, Larone D, Krzewinski J, Liu Z, Marshal SA, Jones RN. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:1818-1822.

Carvalho APD, Albano RM, Oliveira DN, Cidade DAP, Teixeira LM, Marques EA. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. *Microbiol Drug Resist Mechan Epidemiol Dis*. 2006; 2(12):103-108.

Coia JE, Duckworth GJ, Edwards DI *et al*. Guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in healthcare facilities. *J Hosp Infect*. 2006; 63 (Suppl. 1):S1-S44.

Coenye T, Gillis M, Vandamme P. *Pseudomonas antimicrobica* Attafuah and Bradbury 1990 is a junior synonym of *Burkholderia gladioli* (Severini 1913) Yabuuchi. 1993. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2000; 6:2135-2139.

Coenye T, Vandamme P, Govan JR, LiPuma JJ. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol*. 2001; 39(10):3427-3436.

Coenye T, Goris J, Spilker T *et al*. Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp. nov. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:2062-2069.

Coenye T, Vancanneyt M, Falsen E, Swings J, Vandamme P. *Achromobacter insolitus* sp. nov. and *Achromobacter spanius* sp. nov., from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53:1819-1824.

De Baets F, Schelstraete P, Van daele S, Haerynck F, Vanechoutte M. *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis: Prevalence and clinical relevance. *J Cyst Fibrosis*. 2007; 6:75-78.

De Ley J, Segers P, Kersters K, Mannheim W, Lievens A. Intra- and intergeneric similarities of the *Bordetella* ribosomal ribonucleic acid cistrons: proposal for a new family, *Alcaligenaceae*. *Int J Syst Bacteriol*. 1986; 36:405-414.

Govan JRW, Nelson J W. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull.* 1992; 48:912–930.

Govan JRW, Brown AR, Jones AM. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiol.* 2007; 2:153-164.

Hansen CR, Pressler T, Hoiby N, Gormsen M. Chronic infection with *Achromobacter xylosoxidans* in cystic fibrosis patients; a retrospective case control study. *J Cyst Fibrosis.* 2006; 5:245-251.

Heijerman H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: A short review. *J Cyst Fibrosis.* 2005; 4:3-5.

Hendrie MS, Holding AJ, Shewan JM. Emended descriptions of the genus *Alcaligenes* and of *Alcaligenes faecalis* and proposal that the generic name *Achromobacter* be rejected: status of the named species of *Alcaligenes* and *Achromobacter*. Request for an Opinion. *Int J Syst Bacteriol.* 1974; 24:534-550.

Hirashi A. Direct automated sequencing of 16s rDNA amplified by polymerase chain reaction from bacterial cultures without DNA purification. *Letters in Applied Microbiology.* 1992; 15:210-213.

Holt JG. International Committee on Systematic Bacteriology, Judicial Commission, Minutes of the Meeting 3 September 1978, Minute 24, Rejection of the genus name *Achromobacter*. *Int J Syst Bacteriol.* 1979; 29:267-269.

Hutchison ML, Govan JRW. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes and Infection,* 1999; 1:1005-1014.

Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, Yomoda S, Okubo T, Nakamura A, O'Hara K. Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46:2014-2016.

Jeffrey B, Lyczak BJ, Carolyn L, Cannon LC, Gerald B. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15:194-222.

Jiang C, Finkbeiner WE, Widdicombe JH, McCray PBJr, Miller SS. Altered fluid transport across airway epithelium in cystic fibrosis. *Science.* 1993;15:424-427.

Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G *et al.* Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 2003; 41:4424-4427.

Kanellopoulou M, Pournaras S, Iglezos H, Skarmoutsou N, Papafrankas E, Maniatis AN. Persistent colonization of nine cystic fibrosis patients with an *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* clone. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23:336-669.

Kaur M, Ray P, Bhatta, Sharma M. Epidemiological typing of clinical isolates of *Achromobacter xylosoxidans*: comparison of phenotypic and genotypic methods. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009 (aceito para publicação).

Kernen Y, Sauty A, Roulet M. Detection and management of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. Rev Med Suisse. 2005;1:637-640.

Kerstens K, De Ley J. Genus *Alcaligenes* Castellani and Chalmers 1919, 936^{AL}, p. 365. In Krieg, N.R., and Holt, V. (eds), Bergey's manual of systematic bacteriology, 1984; Vol.1, Williams & Wilkins, Baltimore/London.

King EO, Ward MK, Raney DE. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J Lab Clin Med. 1954; 44(2):301-7.

Kiredjian M, Holmes B, Kersters K, Guilvout I, De Ley J. *Alcaligenes piechaudii*, a new species from human clinical specimens and the environment. Int J Syst Bacteriol. 1986; 36:282-287.

Klinger J D, Thomassen M J. Occurrence and antimicrobial susceptibility of gram negative nonfermentative bacilli in cystic fibrosis patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 1985; 3:149-158.

Knippschild M, Ansorg R. Epidemiological typing of *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* by antibacterial susceptibility testing, fatty acid analysis, PAGE of whole-cell protein and pulsed field gel electrophoresis. Zentralbl Bakteriologie. 1998; 288:145-157.

Krzewinski JW, Nguyen CD., Foster JM, Burns JL. Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2001; 39:3597-3602.

Laffneur K, Janssens M, Charlier J. Biochemical and susceptibility tests useful for identification of nonfermenting Gram-negative rods. J Clin Microbiol 2002; 40:1085-1087.

Lewis DA, Jones A, Parkhill J, Speert DP, Govan JR, Lipuma JJ, Lory S, Webb AK, Mahenthiralingam E. Identification of DNA markers for a transmissible *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis strain. Am J Resp Cell Mol Biol. 2005; 15.

Li Puma JJ, Osen JE, Dasen SE, Edlind D, Schidlow DV, Burns JL, Stull TL. RiboType analysis of *Pseudomonas cepacia* from cystic fibrosis treatment centers. J Pediatr. 1998; 113(5):859-862.

Lin YH, Liu PY, Shi ZY, Lau YJ, Hu BS. Comparison of polymerase chain reaction and pulsed-field gel electrophoresis for the epidemiological typing of *Alcaligenes xylosoxidans* subsp. *xylosoxidans* in a burn unit. Diagn Microbiol Infect Dis. 1997; 28:173-178.

Liu L, Coenye T, Burns JL, Whitby PW, Stull TL, LiPuma JJ. Ribosomal DNA-directed PCR for identification of *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* recovered from sputum samples from cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2002; 40:1210-1213.

Lyczak BJ, Cannon LC, Pier BG. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15:194-222.

Macfarlane L, Leavy A, McCaughan J. *et al*. Successful decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pediatric patients with cystic fibrosis (CF) using a three-step protocol. *J Hosp Infect*. 2007; 65:231-236.

Manno G, Cruciani M, Romano L, Scapolan S, Mentasti M, Lorini R, Minicucci L. Antimicrobial use and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. *Int J Antimicrob Ag*. 2005; 25:193-197.

Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Accurso FJ, Kronmal RA, Konstan MW, Burns JL *et al*. Association between pulmonary function and sputum biomarkers in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 175:822-8.

Moissenet D, Baculard A, Valcin M, Marchand V, Tournier G, Garbarg-Chenon A *et al*. Colonization by *Achromobacter xylosoxidans* in children with cystic fibrosis: a retrospective clinical study conducted by means of molecular epidemiological investigation. *Clin Infect Dis*. 1997; 24:274-275.

Molina-Cabrillana J, Santana-Reyes C, Gonzalez-Garcia A, Bordes-Benitez A, Horcajada I. Outbreak of *Achromobacter xylosoxidans* pseudobacteremia in a neonatal care unit related to contaminated chlorhexidine solution. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2007; 26:435-437.

Moore JE, Shaw A, Howard JL, Dooley JS, Elborn JS. Infection control and the significance of sputum and other respiratory secretions from adult patients with cystic fibrosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2004; 2:3-8.

Moura AM, Santos EA, Ferreira AG, Pereira RHV, Jones MCMF, Marques EA. Frequência de bastonetes Gram negativos não fermentadores em pacientes com Fibrose Cística atendidos em centro de referência no Rio de Janeiro. *Anais do 24 Congresso Brasileiro de Microbiologia*, 2007.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology* 8th ed., ASM Press, Washington, D.C, USA, 2004.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard. 2005. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Neuwirth C, Freby C, Ogier-Desserrey A, Perez-Martin S, Houzel A, Pechinot A, Duez JM, Huet F, Siebor E. VEB-1 in *Achromobacter xylosoxidans* from cystic fibrosis patient, France. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12 (11):1737-1739.

- Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. J Bacteriol. 2001; 183:1047–57.
- Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol. 1999. 37:1661-1669.
- Oliver A, Alarcon T, Caballero E, Canton R. Diagnóstico microbiológico de la colonización-infección broncopulmonar en el paciente con fibrosis quística. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2009; 27(2):89–104.
- Ortiz-Herrera M, Geronimo-Gallegos A, Cuevas-Schacht F, Perez-Fernandez L, Coria-Jimenez R. RAPD-PCR characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains obtained from cystic fibrosis patients. Salud Publica Mex. 2004; 46:149-157.
- Parad RB, Gerard CJ, Zurakowski D, Nichols DP, Pier G B. Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. Infect Immun. 1999. 67:4744–4750.
- Peltroche-Llacsahuanga H, Haase G, Kentrup H. Persistent airway colonization with *Alcaligenes xylosoxidans* in two brothers with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998; 17:132-134.
- Raso T, Bianco O, Grosso B, Zucca M, Savoia D. *Achromobacter xylosoxidans* respiratory tract infections in cystic fibrosis patients. APMIS. 2008; 118:837-41.
- Renders N, Verbrugh EH, Belkum AV. Dynamics of bacterial colonization in respiratory tract of patients with cystic fibrosis. Infect. Genet Evol. 2001; Vol 1, 29-39.
- Ribbeck-Busch K, Roder A, Hasse D, Boer W, Martínez JL, Hagemann M, Berg G. A molecular biological protocol to distinguish potentially human pathogenic *Stenotrophomonas maltophilia* from plant-associated *Stenotrophomonas rhizophila*. Environmental Microbiology. 2005; 7 (11):1853–1858.
- Riordan JR. CFTR functions and Prospects for therapy. Annu Rev Biochem. 2007; 77:15.1-15.26.
- Roman F, Canton R, Perez-Vazquez M *et al.* Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. J Clin Microbiol. 2004; 42:1450-1459.
- Sader H, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. and the SENTRY Participants Group (Latin America). 2003. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis. 8:25-79.

Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005; 171:1209-23.

Saiman L, Chen Y, Tabibi S, San GP, Zhou J, Liu Z *et al*. Identification and antimicrobial susceptibility of *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:3942-5.

Saiman L, Siegel J. The Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. *Ajlc Suppl – Am J Infect Control* 2003; 31(3).

Saiman L, Siegel J. Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17:57-71.

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977; 74(12): 5463–5467

Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol. Rev*. 1999; 79:S145-66.

Scott FF, Pitt TL. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol*. 2004; 53:609-15.

Segonds C, Heulin T, Marty N, Chabanon G. Differentiation of *Burkholderia* Species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the 16S rRNA Gene and Application to Cystic Fibrosis Isolates. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(7):2201-2208.

Sener B, Koseoglu O, Ozcelik U, Kocagoz T, Gunalp A. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol*. 2001. 291:387–393.

Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo- β -lactamases and integrases carried by Gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:5407-5413.

Shie SS, Huang CT, Leu HS. Characteristics of *Achromobacter xylosoxidans* bacteremias in northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2005; 38(4):277-82.

Shin KS, Han K, Lee J, Hong SB, Son BR, Youn SJ, Kim, J, Shin HS. Imipenem-resistant *Achromobacter xylosoxidans* carrying *bla_{VIM-2}*-containing class 1 integron. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2005; 53:215-220.

Shreve MR, Butler S, Kaplowitz HJ, Rabin HR, Stokes S, Light M, Warren E. Impact of microbiology practice on cumulative prevalence of respiratory tract bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:753-757.

- Sibley CD, Rabin H, Surette M. Cystic fibrosis: a polymicrobial infectious disease. *Future Microbiol.* 2006; 1:53-61.
- Silbert S, Barth AL, Sader HS. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:3976-3981.
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA. Approved lists of bacterial names. *Int J Syst Bacteriol.* 1980; 30:225-420.
- Smyth A, Walters S. Prophylactic antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2003; CD001912.
- Sofianou D, Markogiannakis A, Metzidie E, Pournara S, Tsakris A. VIM-2 metallo- β -lactamase in *Achromobacter xylosoxidans* em Europe. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005; 24:854-855.
- Stackebrandt E, Murray KGE, Trueper HG. *Proteobacteria* classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the "purple bacteria and their relatives." *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1988; 38:321-325.
- Starner TD, ShROUT JD, Parsek MR *et al.* Subinhibitory concentrations of azithromycin decrease nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilm formation and diminish established biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52:137-145.
- Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E, Krahl A, Gielem J, Barmeier H, Ratjen F. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *J Cyst Fibrosis.* 2005; 4:41-48.
- Tan K, Conway SP, Brownlee KG, Etherington C, Peckham D.G. *Alcaligenes* infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002; 34(2):101-4.
- Tena D, Carranza R, Barberá JR, Valdezate S, Garrancho JM, ArranzMet *et al.* Outbreak of long-term intravascular catheter-related bacteremia due to *Achromobacter xylosoxidans* subspecies *xylosoxidans* in a hemodialysis unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (2005) 24:727–732.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:2233-2239.
- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997. 18:426-439.
- Tsay RW, Lin LC, Chiou CS, Liao JC, Chen CH, Liu CE, Young TG. *Alcaligenes xylosoxidans* bacteremias: clinical features and microbiological characteristics of isolates. *J Microbiol Immunol Infect.* 2005; 38:194-199.
- U.S. CF Foudation, Patient Registry Annual Report. 2007; Bethesda, Maryland.

- Vandamme P, Holmes B, Vancanneyt M *et al.* Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 1997; 47:1188-1200.
- Van daele S, Verhelst, R, Claeys G, Verschraegen G *et al.* Shared genotypes of *Achromobacter xylosoxidans* strains isolated from patients a cystic fibrosis rehabilitation center. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:2998-3002.
- Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, Elaichouni A, De Vos P, Claeys G, Verschraegen G. Identification of *Acinetobacter* Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(1):11–15.
- Vanlaere E, Lipuma JJ, Baldwin A *et al.* *Burkholderia latens* sp. nov., *Burkholderia diffusa* sp. nov., *Burkholderia arboris* sp. nov., *Burkholderia seminalis* sp. nov. and *Burkholderia metallica* sp. nov., novel species within the *Burkholderia cepacia* complex. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58:1580-1590.
- Vergison A, Denis O, Deplano A *et al.* National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization im Belgian cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59:893-899.
- Vinion-Dubiel AD, Spilker T, Dean CR, Monteil H, Lipuma JJ, Goldberg JB. Correlation of *wbiI* genotype, serotype, and isolate source within species of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:4121-4126.
- Voynow JA, Scanlin TF. Cystic fibrosis. In: Panitch HB, editor. *Pediatric pulmonology, the requisites in pediatrics.* Philadelphia: Elsevier Mosby. 2005; 116-130.
- Voynow JA, Fischer BM, Zheng S. Proteases and cystic fibrosis. *Intern J Biochem Cell Biol.* 2008; 40:1238-1245.
- Vu-Thien H, Darbord JC, Moissenet D, Dulot C, Dufoureq JB, Marsol P, Garbarg-Chenon A. Investigation of an outbreak of wound infections due to *Alcaligenes xylosoxidans* transmitted by chlorhexidine in a burns unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1998; 17:724-726.
- Watson ME, Burns JL, Smith AL. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology.* 2004; 150:2947-2958.
- Weitkamp JH, Tang YW, Hass DW, Midha NK, Crowe JEr. Recurrent *Achromobacter xylosoxidans* bacteremias associated with persistent lymph nove infection in a patient with hyperimmunoglobulin M syndrome. *Clin Infect Dis.* 2000; 31:1183-1187.
- Wellinghausen N, Kothe J, Wirths B *et al.* Superiority of molecular techniques for identification of gram-negative, oxidase-positive rods, including morphologically nontypical *Pseudomonas aeruginosa*, from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:4070-4075.

Wellinghausen N, Wirths B, Poppert S. Fluorescence in situ hybridization for rapid identification of *Achromobacter xylosoxidans* and *Alcaligenes faecalis* recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(9):3415-3417.

Yabuuchi E, Ohyama A. *Achromobacter xylosoxidans* n. sp. from human ear discharge. *Jpn J Microbiol.* 1971; 15:477-481.

Yabuuchi E, Yano I, Goto S, Tanimura E, Ito T, Ohyama A. Description of *Achromobacter xylosoxidans* Yabuuchi and Ohyama 1971. *Int J Syst Bacteriol.* 1974; 24:470-477.

Yabuuchi E, Yano I. *Achromobacter* gen. nov. and *Achromobacter xylosoxidans* (ex Yabuuchi and Ohyama 1971) nom. rev. *Int J Syst Bacteriol.* 1981; 31:477-478.

Yabuuchi E, Kanamura Y, Kosako Y, Ezaki T. Emendation of genus *Achromobacter* and *Achromobacter xylosoxidans* (Yabuuchi and Yano) and proposal of *Achromobacter ruhlandii* (Parker and Vishniac) comb. Nov., *Achromobacter piechaudii* (Kiredjian et al.) comb. Nov., and *Achromobacter xylosoxidans* subsp. *denitrificans* (Ruger and Tan) com. Nov. *Microbiol Immunol.* 1998; 42:429-438.

Zhang L, Parente J, Harris SM, Woods DE, Hancock REW, Falla TJ. Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49:2921-2927.

Zbinden A, Böttger EC, Bosshard PP, Zbinden R. Evaluation of the colorimetric VITEK 2 card for identification of gram-negative nonfermentative rods: comparison to 16S rRNA gene sequencing. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(7):2270-3.