

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* hipermutante em pacientes com fibrose cística e associação com resistência antimicrobiana em condições plantônicas e em biofilme.

Autora: Larissa Lutz

Orientador: Afonso L. Barth

Tese de Doutorado

Porto Alegre, 2010.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* hipermutante em pacientes com fibrose cística e associação com resistência antimicrobiana em condições plantônicas e em biofilme.

Autora: Larissa Lutz

Orientador: Prof. Dr. Afonso L. Barth

Unidades de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

Tese proposta para obtenção de grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2010.

L975p Lutz, Larissa

Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* hipermutante em pacientes com fibrose cística e associação com resistência antimicrobiana em condições plantônicas e em biofilme / Larissa Lutz ; orient. Afonso L. Barth. - 2010.

103 f. : il. color.

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. *Pseudomonas aeruginosa* 2. Fibrose cística 3. Biofilmes 4. Resistência microbiana a medicamentos I. Barth, Afonso Luis II. Título.

NLM: WI 820

Resumo

Foram avaliados 528 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* de 131 pacientes fibrocísticos atendidos em um centro de referência em fibrose cística (FC) durante o período de 2005 a 2008. 135 isolados clínicos (25,6%) apresentaram subpopulação hipermutante (isolados com altas taxas de mutações) utilizando teste modificado de suscetibilidade aos antimicrobianos. Destes, 9 isolados (6,7%) de 7 pacientes foram classificados como hipermutantes (HPM) segundo estimativa da frequência de mutação. Após seqüenciamento do gene *mutS* e análise de mutações relacionadas à inativação do sistema de reparo de erros no pareamento do DNA (Mismatch Repair System - MRS), foi possível observar este tipo de mutação em 5 isolados HPM de 4 pacientes. Avaliamos a formação de biofilme em 45 isolados NHPM, 9 HPM e suas respectivas subpopulações por duas metodologias. Segundo o primeiro método, 24 (53,3%) e 3 (21,4%) isolados NHPM e HPM, respectivamente, foram classificados como não-formadores de biofilme. Pelo segundo método, apenas 4 (8,9%) isolados NHPM e nenhum isolado HPM foram classificados nessa categoria. Os percentuais de resistência aos antibióticos ceftazidima, ciprofloxacino e tobramicina em condições de biofilme foram mais elevados que aqueles obtidos em crescimento plantônico e, em ambas as condições, foi possível evidenciar forte associação entre hipermutabilidade e aumento de resistência antibiótica. A associação dos macrolídeos azitromicina e claritromicina, em concentrações sub-inibidoras, com os antibióticos anti-pseudomonas, demonstrou ação inibitória sobre isolados clínicos de *P. aeruginosa* em condições de biofilme, o que sugere sua indicação no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* pela sua ação anti-biofilme.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, fibrose cística, resistência antimicrobiana, hipermutação, biofilme.

Abstract

We evaluated 528 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in 131 CF patients attended at a referral center for cystic fibrosis (CF) during the period of 2005 to 2008. 135 clinical isolates (25.6%) presented hypermutable subpopulation (isolates with high mutation rates) using a modified antimicrobial susceptibility method. Of these, 9 isolates (6.7%) of 7 patients were classified as hypermutable (HPM) according to the estimate of mutation frequency. After gene sequencing and analysis of *mutS* mutations related to inactivation of the repair system errors in DNA pairing (Mismatch Repair System - MRS), we observed this type of mutation in 5 HPM isolates of 4 patients. We evaluated the biofilm formation in 45 isolates NHPM, 9 HPM and their subpopulations by two methods. According the first method, 24 (53.3%) and 3 (21.4%) isolates NHPM and HPM, respectively, were classified as non-biofilm formers. According the second method, only 4 (8.9%) isolates NHPM and none HPM were classified in this category. The percentages of resistance to antibiotics ceftazidime, ciprofloxacin and tobramycin in conditions of biofilm were higher than those obtained in planktonic growth, and in both conditions, it was observed a strong association between hypermutability and increased antibiotic resistance. The association of macrolides azithromycin and clarithromycin, in sub-inhibitory concentrations, with anti-pseudomonas antibiotics, has shown inhibitory activity on clinical isolates of *P. aeruginosa* in biofilm conditions, which should be recommended for treatment of CF *P. aeruginosa* infections due to its anti-biofilm action.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, antimicrobial resistance, hypermutation, biofilm.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Afonso Luís Barth pela orientação segura e sempre presente em todos os momentos da execução deste trabalho, por ter propiciado crescimento profissional e pessoal através deste, de outros trabalhos e do convívio desde minha formação na graduação.

Ao Prof. Dr. Tyrone Pitt e à Profa. Dra. Elizabeth de Andrade Marques pela valiosa contribuição e estímulo na realização do projeto que gerou este estudo.

Aos colegas da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial a Izolete, a Dirce, a Eliane, a Alice, a Fernanda e o Rodrigo, pelo incentivo e grande auxílio técnico fundamentais na realização deste trabalho.

Aos alunos que participaram deste estudo, em especial, a Dariane, a Mariana, a Lisandra e a Caroline, pela troca de aprendizado e auxílio técnico na realização deste trabalho.

Aos meus companheiros de jornada, Cyntia, Vanessa, Luciana, Leandro e Valério, pelo incentivo em persistir na pesquisa científica no nosso país, apesar das dificuldades encontradas no caminho.

Aos meus pais, Silvio e Armgard, que sempre presentes com seu amor incondicional, têm auxiliado incansavelmente a minha caminhada.

À minha irmã Letícia, pelas consultorias de inglês, pelo amor e incentivo.

À minha irmã Vanessa e toda minha família pelo amor e apoio reconfortantes.

Ao Gustavo, 'soluções das alturas', pelo amor, paciência e estímulo constantes, fundamentais na fase final deste estudo.

A toda família Duarte e Schmitt, em especial à Bete, pelo carinho, pela acolhida e pelas comidinhas especiais que alimentam corpo e alma.

À comadre Vanessa e ao compadre Lucas pela super força e à Bellinha pela vontade de viver!

A todos meus amigos, em especial à Cyntia, Dirce, Marina, Karine e Grazi, pela amizade, apoio e compreensão.

Ao pessoal do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e do Curso de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.

Aos fundos de incentivo à pesquisa que contribuíram para a execução deste trabalho: Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Centro Nacional de Ciência e Tecnologia (CNPq).

“Alterações pequenas e graduais podem levar a transformações dramáticas, se considerarmos o fator tempo.”

Gilles Deleuze

Lista de abreviaturas

AHLs - acylated homoserine lactones (*N*-acil homoserina lactonas)

ATCC - American Type Culture Collection

BGN - Bacilos Gram-Negativos

BIC – Biofilm Minimal Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima em Biofilme)

CAMHB – Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado)

CFTR - Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

ESBL – Extended Spectrum Beta-Lactamase (Beta-Lactamases de Espectro Estendido)

EPS - Exopolissacarídeo

FC - Fibrose Cística

HPM – Hypermutator (Hipermutante)

LPS – Lipopolissacarídeo

MBL - Metalo Beta-Lactamases

MHA – Mueller Hinton Agar (Agar Mueller Hinton)

MHB – Mueller Hinton Broth (Caldo Mueller Hinton)

MIC - Minimal Inhibitory Concentration (Concentração Inibitória Mínima)

MRS – Mismatch Repair System (Sistema de Reparo do Pareamento Inadequado de Bases no Processo da Replicação do DNA)

NHPM – Non-Hypermutator (Não-Hipermutante)

PCR – Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis (Eletroforese em Gel com Campo Elétrico Pulsado)

Sumário

Introdução	09
Revisão da literatura	12
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
<i>P. aeruginosa</i> e fibrose cística	13
<i>P. aeruginosa</i> e resistência aos antimicrobianos	16
<i>P. aeruginosa</i> e hipermutação	18
<i>P. aeruginosa</i> e biofilme	23
Referências bibliográficas da introdução e revisão da literatura	29
Objetivos do estudo	40
Objetivo Geral	40
Objetivos Específicos	40
Manuscrito 1	
Detection of Hypermutable <i>Pseudomonas aeruginosa</i> in Cystic Fibrosis Patients from Southern Brazilian	41
Manuscrito 2	
Hypermutable <i>Pseudomonas aeruginosa</i> from cystic fibrosis patients is associated with biofilm formation and reduced antibiotic susceptibility in biofilm conditions	62
Manuscrito 3	
Effectiveness of macrolides in combination with other antimicrobial agents against Cystic Fibrosis <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates in biofilm	80
Considerações Finais	101

Introdução

P. aeruginosa é o patógeno humano mais importante entre os bacilos gram-negativos não fermentadores (1). É o terceiro patógeno mais isolado em infecções hospitalares no Brasil, segundo dados de programas de vigilância epidemiológica, podendo causar infecções graves em diversos sítios (2;3). Uma grande variedade de doenças tem sido associada à *P. aeruginosa*, incluindo doenças pulmonares, especialmente entre indivíduos portadores de fibrose cística (FC) (4).

A fibrose cística é uma doença hereditária autossômica recessiva que apresenta uma maior incidência em populações caucasianas de descendência européia (5;6). A FC é resultado de uma alteração na atividade de uma proteína reguladora de transporte iônico, a CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), a qual altera o equilíbrio hidroeletrolítico corpóreo (5;7). Trata-se de uma doença com uma taxa de sobrevida baixa, de modo que atualmente somente cerca da metade dos pacientes com fibrose cística sobrevivem à terceira década de vida (8). Uma das principais causas de morbidade e mortalidade na FC é a doença pulmonar crônica, causada por um ciclo vicioso de infecção e inflamação que leva à deterioração progressiva da função pulmonar, insuficiência respiratória e morte (9).

Estudos sugerem que o ambiente único do pulmão fibrocístico, que apresenta 1) uma resposta inflamatória oscilante, 2) a exposição agressiva a antibioticoterapia prolongada e 3) a disponibilidade variável de nutrientes, é altamente propício a um fenótipo bacteriano hipermutante (10-12). Nas últimas décadas, vários estudos têm demonstrado forte evidência para um papel relevante da hipermutação na evolução de populações naturais de bactérias, em particular nas doenças infecciosas. Hipermutação ocorre quando defeitos nos genes de reparo de DNA bacteriano levam a um aumento geral na frequência de mutação. Um dos mecanismos mais importantes

de reparo de DNA em bactérias é o sistema de reparo do pareamento de bases inadequado no processo da replicação do DNA (Mismatch Repair System - MRS). A inativação do MRS leva a um aumento na taxa de mutação devido a sua incapacidade para reparar pareamentos inadequados de forma eficiente. A remoção deste mecanismo também aumenta a frequência de transferência horizontal de genes, um importante fator de aquisição de resistência nas bactérias (13). Portanto, o papel da hipermutação na resistência a antibióticos apresenta grande importância (10;14-18) e o desenvolvimento de uma abordagem apropriada para sua avaliação pode ser uma evolução na prática de microbiologia clínica (10;17;19;20).

Além disso, evidências sugerem que *P. aeruginosa* forma biofilme dentro das vias aéreas de pacientes fibrocísticos com infecção pulmonar crônica (21-24). O biofilme forma uma barreira protetora para as células bacterianas pois limita a exposição aos radicais oxidativos, antibióticos e fagócitos (25). Biofilmes bacterianos desempenham um papel relevante nas infecções persistentes, as quais raramente são erradicadas com a terapia antimicrobiana. Apesar das evidências de que *P. aeruginosa* cresce nas vias respiratórias dos pacientes com FC na forma de biofilme, os métodos laboratoriais disponíveis para determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos em condições de biofilme não são validados, gerando controvérsias sobre a sua utilidade clínica. Os métodos padronizados de teste de suscetibilidade são aqueles que utilizam as bactérias no estado plantônico. No entanto, este padrão de suscetibilidade pode não ser o mais adequado para guiar o tratamento das bactérias que estão nas vias aéreas na forma de biofilme (26). Assim, no sentido de avaliar técnicas com a forma de crescimento bacteriano em biofilme, tem aumentado o interesse na proposta de modelos metodológicos de determinação da concentração inibitória mínima em biofilmes *in vitro* (12).

Os antibióticos macrolídeos já estão sendo utilizados e investigados para tratar doenças pulmonares crônicas e inflamatórias, incluindo panbronquiolites difusas, fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica e asma. Embora os macrolídeos não possuam atividade intrínseca antimicrobiana contra *P. aeruginosa* em concentrações terapêuticas, existe um grande interesse nas possibilidades de uso destes antibióticos associados a outras classes de antimicrobianos de uso terapêutico (27-29). A atividade anti-inflamatória dos macrolídeos foi demonstrada em vários estudos, incluindo ensaios clínicos (30-35). Além disso, os efeitos potenciais dos macrolídeos sobre o biofilme bacteriano, com redução de fatores de virulência bacteriana quando utilizado em concentração sub-inibitória, também tem sido avaliados (36).

Assim, a avaliação laboratorial da prevalência de isolados hipermutantes de *P. aeruginosa* em pacientes com FC, através de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos modificados e de análise da frequência de mutações; a determinação de mutações em genes relacionados ao sistema de reparo do DNA nos isolados classificados fenotipicamente como hipermutantes; a avaliação do crescimento em biofilme na suscetibilidade aos antimicrobianos de uso terapêutico bem como a ação dos macrolídeos como inibidores de biofilme tornam-se relevantes para a prática clínica do manejo das infecções respiratórias por *P. aeruginosa* na fibrose cística.

Revisão da literatura

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas é um amplo e complexo gênero de bactérias Gram-negativas que inclui espécies com implicações clínicas e ambientais. Atualmente, foram classificadas 160 espécies dentro deste gênero, sendo somente 12 espécies de interesse clínico. De forma geral, *Pseudomonas* spp. é um microrganismo aeróbio, não-fermentador da glicose, não esporulado, apresentando-se na forma de bacilos Gram-negativos (BGN), oxidase e catalase positivas e, geralmente, móveis com um ou muitos flagelos polares (4).

P. aeruginosa faz parte do grupo das *Pseudomonas* fluorescentes e produz pioverdina ou fluoresceína, um pigmento amarelo-esverdeado ou amarelo-amarronzado. Outras cepas desta espécie poderão produzir um pigmento de coloração azul, denominado piocianina. Quando piocianina combina com pioverdina, uma coloração verde característica de *P. aeruginosa* é produzida. Nenhum outro BGN não-fermentador produz piocianina, logo sua presença pode ser usada para identificar esta espécie. Somente cerca de 4% das cepas clínicas não produzem piocianina (amostras apiocianogênicas), não sendo então detectada a coloração típica da espécie (1;4;8).

A maioria dos isolados de *P. aeruginosa* são β -hemolíticos em meio de ágar sangue e produzem colônias com bordas irregulares, comumente chamadas de colônias espreiadas de característica metálica. As colônias podem apresentar coloração esverdeada devido à produção de pigmentos em meio de ágar sangue e outros meios seletivos como MacConkey, bem como ter aspecto mucóide devido à produção de alginate, o que é comum em FC. Muitas cepas produzem um odor semelhante ao de uva, devido à presença do 2-aminoacetofenona, e odor adocicado,

devido à produção de trimetilamina. Outras características chaves na identificação de *P. aeruginosa* incluem bioquimismo positivo para o citrato, crescimento a 42°C e utilização da acetamida (1;8).

P. aeruginosa é o patógeno humano mais importante entre os bacilos Gram negativos não-fermentadores (1). Trata-se de uma bactéria ubiqüitária de metabolismo bastante versátil que pouco coloniza indivíduos saudáveis, sendo raramente causa de infecções comunitárias. Entretanto, *P. aeruginosa* é o terceiro patógeno mais isolado em infecções hospitalares no Brasil, segundo dados de programas de vigilância epidemiológica, podendo causar infecções graves em diversos sítios (2;3). Uma grande variedade de doenças tem sido relacionada à *P. aeruginosa*, incluindo bacteremia, infecções de tecidos moles, doenças pulmonares, especialmente entre indivíduos portadores de FC, infecções urinárias nosocomiais, endocardites, infecções seguidas de queimaduras ou trauma e, em alguns casos, sistema nervoso central, incluindo meningites (4).

P. aeruginosa pode produzir uma variedade de fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade, tais como a produção de endotoxinas (lipopolissacarídeo - LPS), motilidade, pili, cápsula e diversas exotoxinas: proteases, hemolisinas, lecitinasas, elastase e DNase. Em infecções do trato respiratório inferior de pacientes com FC, a maioria das cepas desta bactéria produz colônias mucóides devido a uma produção aumentada do polissacarídeo alginato (1).

***P. aeruginosa* e fibrose cística**

A fibrose cística (FC), também conhecida como mucoviscidose, é uma doença hereditária autossômica recessiva que apresenta uma incidência variável de acordo com as etnias, sendo encontrada principalmente em populações caucasianas de descendência européia (5;6). Na região sul do Brasil é estimado cerca de um caso

a cada 2.000 a 5.000 nascimentos (37). A FC foi descrita pela primeira vez na década de 30 por Dorothy Andersen que caracterizou clínica, anatomopatológica e epidemiologicamente esta doença. Trata-se de uma doença com uma taxa de sobrevivência baixa, de modo que atualmente somente cerca da metade dos pacientes com fibrose cística sobrevivem à terceira década de vida (8).

A FC é resultado de uma alteração na atividade de uma proteína reguladora de transporte iônico, a CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), a qual altera o equilíbrio hidroeletrolítico corpóreo (5;7). Sob aspectos genéticos, esta alteração ocorre no gene da FC, localizado no braço longo do cromossomo sete, o qual codifica a proteína CFTR de forma errônea. Mais de 1500 mutações já foram descritas neste gene, com efeitos sobre a síntese e/ou estrutura da proteína. Com base em alguns estudos, as mutações foram classificadas em seis categorias de acordo com os seus efeitos: 1) não-síntese da CFTR; 2) defeito no seu processamento; 3) defeito na sua regulação; 4) defeito na sua condutância; 5) alteração parcial na sua produção ou processamento e 6) defeito na regulação de outros canais. Desse modo, o tipo e intensidade de cada mutação serão determinantes no desenvolvimento, progressão e grau de severidade da doença. (38;39).

Fisiologicamente, o transporte dos íons cloro, dependente da proteína CFTR, se modifica, principalmente nas glândulas exócrinas e na superfície epitelial das células da mucosa. Isso causa uma redução na excreção do cloro e, conseqüentemente, aumento da carga negativa dentro da célula, resultando em fluxo maior de íons sódio para o meio intracelular para manter o equilíbrio eletrolítico. Seguindo o movimento do sódio, a água flui, por osmose, para o interior da célula, promovendo o ressecamento do meio extracelular, desidratando as secreções mucosas e aumentando sua viscosidade, o que vai favorecer a obstrução dos ductos,

seguido de reação inflamatória e início de processo de fibrose. Além disso, o acúmulo de muco torna o ambiente mais suscetível à colonização e à proliferação bacteriana (6;39).

As manifestações clínicas da FC são variáveis, incluindo pneumopatia crônica, insuficiência pancreática exócrina e elevada concentração de eletrólitos no suor (40). No entanto, 80 a 95% dos pacientes fibrocísticos são acometidos por doenças pulmonares, associadas a uma maior morbidade, além de ser causa de morte em mais de 90% destes pacientes (6). A doença pulmonar na FC caracteriza-se pela colonização e infecção respiratória por bactérias que provocam dano tecidual. Os microrganismos que mais acometem as vias aéreas dos pacientes fibrocísticos são: *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* e complexo *Burkholderia cepacia* (5;6;8;41). Vários outros microrganismos têm sido isolados de pacientes com FC, e são considerados patógenos emergentes, mas de importância clínica duvidosa.

A maioria dos pacientes fibrocísticos apresenta uma característica padrão de infecção respiratória, a qual se inicia com *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae* durante a infância e evolui para *P. aeruginosa* na adolescência. A infecção respiratória causada por *P. aeruginosa* atinge cerca de 80% dos pacientes com FC, sendo sua colonização muito difícil de ser erradicada, mesmo com antibioticoterapia (5;42;43). Até o aparecimento deste patógeno, a maioria das outras bactérias que colonizam os pulmões destes pacientes pode ser moderadamente controlada pelo uso de antimicrobianos, evitando assim, a infecção crônica. No entanto, a colonização por *P. aeruginosa*, de difícil erradicação, está fortemente relacionada à cronicidade da infecção bacteriana (5).

P. aeruginosa tem um tropismo particular pelas células epiteliais do trato respiratório dos pacientes com FC e pode resistir às defesas do hospedeiro. Uma vez

estabelecida a infecção, esta bactéria tende a sofrer uma mudança fenotípica. Estudos demonstraram que o fenótipo bacteriano no meio ambiente, antes da entrada nos pulmões dos pacientes com FC, consiste em não mucoidia, motilidade e LPS liso, sendo alterado para um fenótipo fibrocístico de forma mucóide, imóvel e com LPS rugoso no ambiente pulmonar destes pacientes (4). Contudo, no cultivo *in vitro*, a *P. aeruginosa* pode apresentar colônias de aspecto mucóide ou não, com presença ou ausência de pigmentação (8). A transição deste patógeno da forma não-mucóide para mucóide nos pulmões dos fibrocísticos é usualmente associada com a aceleração do declínio da função pulmonar, muito provavelmente, devido ao exopolissacarídeo mucóide interferir nas defesas fagocitárias do hospedeiro além da facilitar a formação de biofilmes (4). Tem sido observado que esta transformação para cepas mucóides é praticamente inevitável, independente do tipo de cepa envolvida (5).

O estabelecimento da *P. aeruginosa* no trato respiratório dos pacientes com FC conduz a danos na superfície epitelial, obstruindo as vias aéreas e progressivamente deteriorando seu fluxo, diminuindo a função pulmonar. Ademais, reações inflamatórias são desencadeadas durante este processo, mediadas pelo sistema imune, contribuindo para aumentar mais o índice de morbidade e mortalidade destes pacientes. A colonização crônica e suas conseqüências imunopatológicas de episódios intermitentes de exarcebação pulmonar são os principais fatores responsáveis pela morbi-mortalidade (5).

***P. aeruginosa* e resistência aos antimicrobianos**

P. aeruginosa apresenta resistência intrínseca a várias classes de antibióticos e tem a habilidade de desenvolver resistência através de mutações em diferentes loci cromossomais ou por aquisição horizontal de genes de resistência transportados em plasmídios, transposons ou integrons. É intrinsecamente resistente à penicilina,

ampicilina, cefalosporinas de 1ª e 2ª gerações, sulfametoxazol-trimetoprima e cloranfenicol. É usualmente sensível aos aminoglicosídeos, penicilinas semi-sintéticas como piperacilina e ticarcilina, cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações, ceftazidima, cefepime, carbapenêmicos e fluorquinolonas. O tratamento para infecções mais severas, no entanto, requer uma terapia combinada de ceftazidima, piperacilina ou carbapenêmico (imipenem ou meropenem) associado com um aminoglicosídeo (tobramicina ou ampicacina) (4;44).

A suscetibilidade aos antimicrobianos de *P. aeruginosa* isoladas das culturas iniciais dos fibrocísticos é similar ao perfil das amostras associadas a outras patologias. No entanto, uma vez estabelecida a infecção por *P. aeruginosa*, a sua erradicação é quase impossível, e a antibioticoterapia termina tendo a finalidade de diminuir a carga bacteriana para melhora clínica (8). A partir disso, um aspecto importante da infecção crônica pulmonar na FC é a habilidade da *P. aeruginosa* persistir no pulmão do paciente (6).

O uso freqüente de antimicrobianos pode favorecer o aparecimento de cepas multirresistentes, dificultando ainda mais o tratamento. Estes microrganismos apresentam ampla diversidade de mecanismos de resistência, quer seja ela intrínseca, como citado anteriormente, ou, ainda, adquirida através do processo de “pressão seletiva” exercida no meio pelo uso, muitas vezes, indiscriminado de antimicrobianos (45). Os principais mecanismos de resistência destas bactérias são: hiperexpressão de bombas de efluxo, baixa permeabilidade da membrana externa, perda de porina, expressão de enzimas inativadoras de antibióticos, como *AmpC*, betalactamases de espectro estendido (ESBL), e, principalmente, metalo- betalactamases (MBL) (46).

Metallo beta-lactamases em *P. aeruginosa* tem sido relatadas com frequência crescente em todo o mundo e os genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP-1}* são os mais descritos em isolados brasileiros (47-52). No entanto, há apenas relatos esparsos de MBL em *P. aeruginosa*

de FC e eles indicam uma baixa prevalência de carbapenemases nos pacientes fibrocísticos (53-56).

***P. aeruginosa* e hipermutação**

Os conceitos darwinianos básicos demonstram que na evolução, microrganismos geneticamente adaptáveis são selecionados por mutações e/ou recombinações e que esses sobrevivem melhor em um ambiente hostil do que os microrganismos geneticamente não-adaptados. Vários estudos relatam a forma como uma bactéria mantém o compasso com seu ambiente em constante modificação, particularmente em relação ao desafio imposto pela terapia antibiótica. A resposta parece estar, em parte, na propensão do organismo em apresentar variações fenotípicas através da regulação da expressão de genes ou de mutações genéticas. Bactérias capazes de se adaptar a mudanças em seus ambientes desenvolvem mecanismos para produzir altas taxas de mutação em regiões específicas de seus genomas, o que resulta na rápida geração de variantes, maximizando a diversidade da população. Esses microrganismos são denominados hipermutantes, cepas com altas taxas de mutação quando comparadas com aquelas comumente encontradas em uma espécie em particular, e que apresentam benefícios de adaptação para colonizar ambientes ou nichos anatômicos específicos (57).

Essas cepas hipermutantes geralmente possuem alterações em genes que participam dos sistemas de reparo do DNA (58). Em análise mais específica, é possível notar que mutações no locus *mutS* são comuns em isolados com um fenótipo hipermutante (59). Esse gene e outros loci relacionados são componentes do sistema de reparo do pareamento inadequado no processo da replicação do DNA (Mismatch Repair System - MRS) necessário para o reparo de mutações no DNA. O MRS não apenas protege contra erros de replicação, mas também age como uma barreira à

recombinação entre cromossomos divergentes (recombinação homóloga). Mutações nesses loci podem resultar em “MRS negativo”, ou seja, um fenótipo hipermutante no qual a recombinação homóloga ocorre 1000 vezes mais freqüentemente do que em bactérias encontradas na natureza (60). A aquisição de um fenótipo mutante estável pode conferir à bactéria uma vantagem seletiva, particularmente em ambientes com alto nível de stress, porque taxas altas de mutação e recombinação permitem uma adaptação mais rápida (13;61-63). Contudo, esse contínuo acúmulo de mutações irá, eventualmente, levar a uma perda de adaptabilidade e, portanto, a uma desvantagem de sobrevivência, o que caracteriza um paradoxo. Uma hipótese que explica esse paradoxo é que bactérias MRS negativas são capazes de restaurar a função MRS pela recombinação com organismos encontrados na natureza enquanto retêm mutações adquiridas durante o período hipermutante (64;65). MRS é um grande protetor contra os eventos de recombinação entre espécies. A remoção desta barreira, também aumenta a freqüência de transferência horizontal de genes, que é um importante mecanismo de aquisição de resistência nas bactérias (13).

O reparo do DNA é um processo essencial em todos os organismos vivos. (66;67). Em *Escherichia coli* o caminho de reparo da combinação inadequada é iniciado pelas proteínas MutS, MutL e MutH. MutS reconhece pares de base com erro de pareamento assim como inserções ou deleções de um a quatro nucleotídeos. MutL forma um complexo com MutS que ativa a endonuclease MutH, e a DNA helicase II (produto genético uvrD) assegura a separação necessária das fitas de DNA. A inativação do sistema MRS leva a um aumento da taxa de mutação por causa de sua inabilidade de reparar o pareamento das bases nucleotídicas com eficiência. Adicionalmente, como o requerimento para a homologia da seqüência do DNA em combinação genética generalizada é relaxado em cepas deficientes de MRS; há um aumento da recombinação entre seqüências divergentes (homólogas), quebrando a

barreira para a recombinação entre diferentes genes bacterianos (68;69). A ocorrência de cepas hipermutantes em populações naturais tem sido estudada principalmente em *E. coli*, *Salmonella* sp. e *Neisseria meningitidis* (59;70;71) e tem sido estimada em torno de 1% em cepas patogênicas e comensais (59;70).

Ciclos de exacerbações clínicas e inflamações em FC podem resultar em um ambiente pulmonar heterogêneo, no qual a *P. aeruginosa* deve se adaptar para sobreviver. De Visser (72) sugere que hipermutantes podem ser seletivamente favorecidos à curto prazo, em ambientes em modificações constantes. Um exemplo disso pode ser a seleção de mutantes que requerem aminoácidos específicos para o crescimento devido à composição rica em aminoácidos do exudato inflamatório do pulmão. De fato, a correlação entre o aumento na concentração de aminoácidos no escarro e auxotrofia da *P. aeruginosa* tem sido demonstrada em doenças severas das vias aéreas da FC (73;74). Hipermutantes podem demonstrar mutações em diversos genes como, por exemplo, os genes associados à mucosidade e ao lipopolissacarídeo flagelar. Algumas dessas mutações secundárias podem ter um efeito positivo sobre a sobrevivência de bactérias, incluindo propriedades vantajosas, tais como a resistência aos antibióticos e virulência aumentada (13;66;67). Isso explicaria a emergência destas variantes em FC que podem estar implicadas na patogênese da doença. Se isolados hipermutantes conduzem ao acúmulo de outras mutações, torna-se importante identificar os fatores selecionadores para essas formas (10).

A seleção de hipermutantes pode ser favorecida por antibióticos que, quando administrados de forma sistêmica ou nebulizados, podem ser desigualmente distribuídos no pulmão, resultando em gradientes concentrados e, possivelmente, em concentrações subterapêuticas. Isso pode resultar em populações cada vez mais diversas que sejam capazes de adaptar-se de forma mais eficiente e alcançar novos 'picos de adaptabilidade'. O papel dos antibióticos na seleção de hipermutantes foi

demonstrado no intestino de ratos gnobióticos com uma cepa de *E. coli* encontrada na natureza e suas variantes isogênicas mutantes. Ao selecionar um alelo de resistência, o antibiótico também selecionou um alelo mutante, levando a conclusão de que bactérias hipermutantes podem ser consideradas marcadores de risco para a ineficácia do antibiótico (75). Essa hipótese é corroborada pelo estudo de Oliver e colaboradores (10), o qual indica que o uso persistente e agressivo de antibióticos pode acelerar a taxa de mutação e levar à emergência de novos fenótipos melhor adaptados ao pulmão do paciente fibrocístico. No entanto, não está esclarecido se algum determinado antibiótico é particularmente apto a levar a *P. aeruginosa* a um fenótipo hipermutante.

Um atributo comum de isolados de *P. aeruginosa* da FC é sua extensiva variação fenotípica com um constante perfil genotípico do DNA cromossômico. Um estudo sobre o impacto da mutação e recombinação de genes em *P. aeruginosa* revelou uma grande escala de rearranjos do genoma dentro de um único clone isolado de pacientes com FC (76). Rearranjos cromossômicos podem ser fatores contribuintes para a diversificação de clones prevalentes em pacientes com FC e essa diversidade indica sua habilidade para adaptar-se a condições ambientais em modificação. Genes necessários para a replicação do DNA, proteínas e síntese da parede celular, assim como genes de fatores de virulência também podem exibir uma diversidade aumentada em cepas hipermutáveis, indicando que a hipermutabilidade *per se* pode influenciar mutações em outras estruturas genéticas.

Pacientes com FC adquirem, primeiro, cepas de *P. aeruginosa* que possuem taxas normais de mutação espontânea. Enquanto persistem no pulmão dos pacientes com FC, variantes hipermutantes emergem e tendem a tomar o lugar de populações iniciais como resultado da evolução adaptativa. Um estudo espanhol descreveu uma alta prevalência (36%) de isolados hipermutantes de *P. aeruginosa* em pacientes

fibrocísticos adultos. Uma ligação entre altas taxas de resistência a antibióticos em pacientes com FC e a presença de uma alta proporção de *P. aeruginosa* hipermutantes também foi estabelecida (10).

Nos últimos anos, o papel da hipermutação no desenvolvimento de resistência a antibióticos começou a receber atenção (13-15;17;18;77-79). Estes estudos demonstraram a importância das hipermutações no processo de adaptação de *P. aeruginosa* no pulmão fibrocístico e lançam alguma luz sobre os processos genéticos que podem ser importantes nessa transformação e sugerem que o ambiente único do pulmão fibrocístico, com o fornecimento de nutrientes variável, oscilando a resposta inflamatória e exposição agressiva e antibioticoterapia prolongada, é altamente propício para o estabelecimento de um fenótipo hipermutante estável.

Da perspectiva da prática de microbiologia clínica, técnicas de estimativas de frequência de mutação para determinação da prevalência de populações bacterianas hipermutantes requerem o uso de procedimentos que consomem tempo e que seriam complicados de adaptar às rotinas de laboratórios clínicos de microbiologia. Oliver e colaboradores (10) determinaram a prevalência de hipermutação através de um teste de estimativa da frequência de mutação em que diluições sucessivas de base 10 da suspensão bacteriana são semeadas em Agar Muller Hinton com e sem rifampicina. Uma amostra é considerada como hipermutante (HPM) quando a frequência de mutação for de pelo menos 20 vezes maior que a taxa observada na cepa controle *P. aeruginosa* PAO1. Por outro lado, Maciá e colaboradores (17) adaptaram métodos de suscetibilidade convencionais para detecção da presença ou ausência de subpopulações hipermutantes no interior das zonas de inibição dos halos dos discos de antibióticos nos testes de disco-difusão, ou da elipse formada em torno da fita de Etest[®].

***P. aeruginosa* e biofilme**

Os microrganismos, sejam eles procariontes ou eucariontes, têm o potencial de viver na forma de um ou dois fenótipos: sésil ou plantônico. As formas planctônicas são as formas bacterianas livres (“free-floating”). O fenótipo sésil é caracterizado pela vida bacteriana em grupo, podendo ser também denominado como biofilme (46). Ao longo das últimas décadas, inúmeras definições para biofilme bacteriano já foram propostas por diversos pesquisadores. A reunião de algumas dessas definições poderá melhor elucidar o que é um biofilme. O biofilme caracteriza-se pela formação de uma comunidade de bactérias envolvidas por uma fina camada (matriz) polissacarídica extracelular (EPS), a qual facilita sua adesão a superfícies biológicas e interfaces sintéticas, e é separada por canais abertos de água que agem como um sistema circulatório primitivo para condução de nutrientes e remoção de restos metabólicos. As células bacterianas permanecem irreversivelmente unidas umas as outras, às interfaces ou até mesmo aos substratos que circulam dentro da matriz. Enquanto biofilme, cada bactéria ocupa um microambiente específico, o qual é determinado pelas células circundantes, a proximidade ao canal (ambos determinam o pH e a disponibilidade de nutrientes e oxigênio) e a matriz EPS. A estrutura de biofilme em microcolônias e os canais de água são influenciados pelo fluido circulante, a composição de nutrientes e pequenas moléculas intercelulares mensageiras, ou quoromonas (acylated homoserine lactones - AHLs). Além disso, a vida em comunidade altera o fenótipo da bactéria com relação à taxa de crescimento bacteriano e transcrição de genes (41;44;80-82).

O mecanismo de formação do biofilme é um processo complexo, dinâmico e que envolve várias etapas, embora mais estudos sejam necessários para que haja um melhor entendimento sobre este sistema (44). A formação de um biofilme pode ser estruturada em cinco estágios (46):

Estágio 1) fase em que cada bactéria ainda no estágio sésil, inicialmente, se adere através de flagelos ao tecido, resultando no desenvolvimento da primeira camada bacteriana. Esta adesão celular pode iniciar-se em segundos, sendo comumente induzida por sinais do ambiente como alterações na concentração de nutrientes, oxigênio, pH e temperatura. Durante o primeiro estágio, as bactérias apresentam uma taxa de crescimento logarítmico.

Estágio 2) durante este estágio, agregados celulares são formados e a motilidade é diminuída. À medida que ocorre a multiplicação bacteriana, com conseqüente aumento da aderência de célula bacteriana ao tecido e, principalmente, adesão entre as células bacterianas, é desencadeada a formação de uma matriz polissacarídica, devido à produção de exopolissacarídeos (EPS) por estes microrganismos, estabelecendo um biofilme bacteriano (6;24;41;83). Esta matriz é constituída de EPS, uma variedade de proteínas, glicoproteínas, glicolipídeos e, em alguns casos, DNA extracelular (84) Os biofilmes são altamente hidratados, o que mantém suas células unidas, através de canais de água que fazem comunicação com o meio extracelular. Estes canais intersticiais facilitam a troca de nutrientes e servem como canais de liberação de produtos de degradação. Desse modo, o biofilme torna-se um ambiente favorável para trocas de materiais genéticos (DNA), devido ao livre acesso a um *pool* de genes. A transferência horizontal de genes também é facilitada, uma vez que as células estão próximas umas as outras, facilitando a captação de DNA por transformação e conjugação (84). Neste estágio, as células localizadas em regiões diferentes do biofilme podem apresentar diferentes padrões de expressão genética (85).

Estágio 3) primeiro estágio de maturação do biofilme, quando os agregados celulares são produzidos de forma progressiva em camadas, com uma espessura maior do que 10µm.

Estágio 4) segundo estágio de maturação do biofilme, quando este alcança uma espessura maior do que 100µm.

Estágio 5) estágio de dispersão celular. Algumas bactérias desenvolvem o fenótipo planctônico e deixam o biofilme.

Além dessas etapas, parte da formação do biofilme é dependente do mecanismo de *quorum-sensing*. Este mecanismo permite que as células se comuniquem umas com as outras através de moléculas sinalizadoras, desencadeando um grupo específico de genes, que resulta na formação do biofilme (24). Pequenas moléculas sinalizadoras – membros da classe das *N*-acil homoserina lactonas (AHLs) - são secretadas pela *P. aeruginosa* em biofilme para o ambiente local, onde interagem com as células vizinhas. Este tipo de regulação tem sido chamado de *quorum-sensing*, por que sugere o requerimento de um “coro” (*quorate*) da população bacteriana que é necessário para ativação dos genes de resposta de AHLs. O *quorum-sensing* tem sido associado à regulação gênica, desencadeando a expressão de vários fatores que facilitam a persistência bacteriana, permitindo que o patógeno, por exemplo, não sofra ação dos antibióticos (6;81;82;86).

Mais de 60% de todas as infecções humanas são causadas por bactérias na forma de biofilmes bacterianos. O biofilme confere proteção contra os mecanismos de defesa imune do hospedeiro e entrada dos antimicrobianos, dificultando assim, a difusão da droga nos tecidos. Estudos demonstram que concentração de antibiótico para eliminar bactérias produtoras de biofilme é de 10 a 1000 vezes maior do que a concentração necessária para as mesmas espécies na forma planctônica (82;87;88). Os antibióticos administrados aos pacientes em muitos casos não atingem as células do interior do biofilme protegidas pela matriz EPS, preservando a fonte de re-infecção do microrganismo. A matriz também protege as células do interior do biofilme contra a ação dos anticorpos produzidos pelo sistema imune e contra os radicais livres e outros

compostos reativos produzidos na explosão de fagócitos recrutados para o combate do biofilme (26). Existe um número de razões possíveis para a perda da ação do antimicrobiano no fenótipo de biofilme. A resistência pode ser devido à carga negativa da matriz extracelular, impedindo a penetração de drogas positivamente carregadas. Além disso, uma redução metabólica e uma taxa menor no crescimento bacteriano em biofilme e a produção de enzimas inativadoras de antibióticos podem ser algumas das hipóteses responsáveis pela dificuldade de eliminar os biofilmes do organismo (41;80;82;86;89).

Crescimento lento indubitavelmente contribui para a resistência aos antimicrobianos. Com a exceção dos aminoglicosídeos, a matriz exopolissacarídica não tem notoriamente retardado a difusão dos antibióticos. Por exemplo, fluoroquinolonas penetram bem o biofilme. Em estudo que avaliou o crescimento lento e resistência em *P. aeruginosa* crescendo em forma de biofilme e na fase estacionária, a resistência aos antibióticos nessas duas populações foi similar, e concluíram que crescimento lento é potencialmente um fator em resistência. Contudo, estes dados devem ser interpretados com precauções, à medida que os resultados não são normatizados e células crescendo em biofilme ou na fase estacionária devem ter outros atributos em comum além de baixas taxas de metabolismo, como a ativação de reguladores de resposta ao stress e bombas de efluxo de resistência a múltiplos antimicrobianos, que representam mecanismos generalizados de resistência e devem ser considerados como candidatos a mecanismos de resistência em biofilme (89). Outro estudo sugere um mecanismo geral de resistência em biofilme, ao observar que em *P. aeruginosa* crescendo em biofilme, a vasta maioria das células era eliminada por concentrações baixas de fluoroquinolonas, mas pequenas frações de “persistentes” (*persistors*) permanecem invulneráveis à morte (80).

Pesquisas em biofilme têm demonstrado diferenças entre bactérias na forma plantônica e em biofilme que implicam em alterações fisiológicas devido a aderência a superfície, o que configura um fenótipo único em biofilme. Esse fenótipo único poderia fornecer “alvos” (*targets*) que poderiam indicar quando é necessário administrar antibióticos profilaticamente para prevenir infecções por bactérias em biofilme. Entendendo o desenvolvimento do biofilme, agentes quimioterápicos poderiam ser desenvolvidos para promover a prevenção da transição de um estágio de maturação do biofilme ao estágio de fenótipo único de biofilme (82).

Os isolados de *P. aeruginosa* provenientes dos fibrocísticos são freqüentemente testados em laboratórios através de metodologias tradicionais de disco-difusão (Kirby-Bauer) e microdiluição em caldo, conforme descrito no *Clinical Laboratory Standard Institute* (90) para verificação de seu padrão de suscetibilidade frente aos antibióticos, entretanto são raramente erradicados por estes agentes, identificados como potencialmente efetivos por estes testes, uma vez que o teste padrão de sensibilidade aos antimicrobianos é padronizado para determinação da concentração inibitória mínima (MIC) da droga necessária para eliminar os microrganismos no seu estágio plantônico, diferente do estágio sésil bacteriano (41;91;92).

Em um estudo de Moskowitz e colaboradores (93), a concentração inibitória mínima em biofilme (BIC) para isolados de *P. aeruginosa* foi determinada utilizando uma técnica de microdiluição em caldo modificada (método modificado de Calgary). A formação de biofilme é estimulada imergindo os pinos de uma tampa de poliestireno na suspensão bacteriana e, posteriormente, em soluções contendo as mesmas diluições seriadas dos antibióticos testadas para determinação da MIC. Os biofilmes formados nos pinos da tampa são então transferidos para os poços da placa por centrifugação ou sonicação, e feita a interpretação da concentração inibitória mínima

em biofilme após leitura da densidade ótica. A variabilidade dos valores de BIC entre uma série de amostras em um mesmo paciente ou de diferentes pacientes em um período de tempo seria um indicio para implementar uma metodologia que oferecesse valores BIC para a rotina clínica, à medida que esses dados alterariam os regimes de antibioticoterapia (94).

Neste estudo, segundo o resultado do teste de suscetibilidade aos antimicrobianos convencional, o tratamento para infecção pulmonar por *P. aeruginosa* incluiria um β -lactâmico como antibiótico de escolha em todos os regimes. Por outro lado, se o tratamento fosse baseado em testes de suscetibilidade aos antimicrobianos em condições de biofilme, β -lactâmicos seriam incluídos em menos da metade dos esquemas de tratamento, enquanto que cerca de 60% dos esquemas incluiriam o macrolídeo azitromicina. Houve discordância significativa entre os dois métodos de testes de suscetibilidade, convencional e de biofilme, indicando a mesma combinação em apenas 20% das ocasiões (94). Assim, a inabilidade de erradicar infecções crônicas causadas por *P. aeruginosa* em pacientes com FC pode resultar, em parte, do regime de tratamento baseado em testes de sensibilidade que pouco refletem a forma de crescimento bacteriano no trato respiratório destes pacientes (95).

Um recente documento inglês de diretrizes em microbiologia da fibrose cística (96) inicia com a afirmação de que para uma melhoria na prestação de cuidados aos portadores de fibrose cística é absolutamente essencial que a microbiologia de cada indivíduo seja totalmente compreendida. Embora neste documento não haja evidências significativas para apoiar o uso rotineiro de métodos de ensaio de suscetibilidade aos antimicrobianos em biofilme, eles afirmam que as condições de cultivo bacteriano podem ter um impacto significativo sobre os resultados dos testes de suscetibilidade.

Referências bibliográficas da introdução e da revisão da literatura

- (1) Hall GS. Nonfermentative and Miscellaneous Gram-Negative Bacilli. Textbook of Diagnostic Microbiology. 3rd ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2007. p. 546-85.
- (2) Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 2004 Feb;8(1):25-79.
- (3) Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis* 2001 Aug;5(4):200-14.
- (4) Blondel-Hill E, Henry DA, Speert DP. Pseudomonas. In: Murray PR, editor. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington, D.C.: AMS Press; 2007. p. 734-48.
- (5) Hutchison ML, Govan JR. Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect* 1999 Oct;1(12):1005-14.
- (6) Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2002 Apr;15(2):194-222.
- (7) Knowles MR, Stutts MJ, Yankaskas JR, Gatzky JT, Boucher RC, Jr. Abnormal respiratory epithelial ion transport in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 1986 Jun;7(2):285-97.
- (8) Neto NL. Fibrose cística - enfoque multidisciplinar. Florianópolis: Secretaria de Saúde do Estado de Santa Catarina; 2008.
- (9) Staab D. Cystic fibrosis -- therapeutic challenge in cystic fibrosis children. *Eur J Endocrinol* 2004 Aug;151 Suppl 1:S77-S80.

- (10) Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 2000 May 19;288(5469):1251-4.
- (11) Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Jun;49(6):2276-82.
- (12) Rogers GB, Hoffman LR, Whiteley M, Daniels TW, Carroll MP, Bruce KD. Revealing the dynamics of polymicrobial infections: implications for antibiotic therapy. *Trends Microbiol* 2010 Aug;18(8):357-64.
- (13) Chopra I, O'Neill AJ, Miller K. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist Updat* 2003 Jun;6(3):137-45.
- (14) Montanari S, Oliver A, Salerno P, Mena A, Bertoni G, Tummler B, et al. Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Microbiology* 2007 May;153(Pt 5):1445-54.
- (15) Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL, Oliver A. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Aug;49(8):3382-6.
- (16) Blazquez J, Oliver A, Gomez-Gomez JM. Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Curr Drug Targets* 2002 Aug;3(4):345-9.
- (17) Macia MD, Borrell N, Perez JL, Oliver A. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Jul;48(7):2665-72.

- (18) Oliver A, Baquero F, Blazquez J. The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Mol Microbiol* 2002 Mar;43(6):1641-50.
- (19) Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis. *J Bacteriol* 2010 Dec;192(23):6191-9.
- (20) Woodford N, Ellington MJ. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin Microbiol Infect* 2007 Jan;13(1):5-18.
- (21) Baltimore RS, Christie CD, Smith GJ. Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am Rev Respir Dis* 1989 Dec;140(6):1650-61.
- (22) Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-64.
- (23) Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002 Apr 18;416(6882):740-3.
- (24) Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000 Oct 12;407(6805):762-4.
- (25) Hacht RA, Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998 Apr 1;42(4):974-7.
- (26) Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999 May 21;284(5418):1318-22.

- (27) Lopez-Boado YS, Rubin BK. Macrolides as immunomodulatory medications for the therapy of chronic lung diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2008 Jun;8(3):286-91.
- (28) Schoni MH. Macrolide antibiotic therapy in patients with cystic fibrosis. *Swiss Med Wkly* 2003 May 31;133(21-22):297-301.
- (29) Nguyen T, Louie SG, Beringer PM, Gill MA. Potential role of macrolide antibiotics in the management of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2002 Nov;8(6):521-8.
- (30) Shinkai M, Foster GH, Rubin BK. Macrolide antibiotics modulate ERK phosphorylation and IL-8 and GM-CSF production by human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006 Jan;290(1):L75-L85.
- (31) Shinkai M, Lopez-Boado YS, Rubin BK. Clarithromycin has an immunomodulatory effect on ERK-mediated inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Antimicrob Chemother* 2007 Jun;59(6):1096-101.
- (32) Shinkai M, Tamaoki J, Kobayashi H, Kanoh S, Motoyoshi K, Kute T, et al. Clarithromycin delays progression of bronchial epithelial cells from G1 phase to S phase and delays cell growth via extracellular signal-regulated protein kinase suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 2006 May;50(5):1738-44.
- (33) Parnham MJ. Immunomodulatory effects of antimicrobials in the therapy of respiratory tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 2005 Apr;18(2):125-31.
- (34) Culic O, Erakovic V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol* 2001 Oct 19;429(1-3):209-29.
- (35) Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2004 Jul;54(1):21-8.

- (36) Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Gomi K, Watanabe A, Mchami T. Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilms formed on titanium medical devices. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32(6):481-4.
- (37) Raskin S, Phillips JA, III, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T, et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet* 1993 Jul 1;46(6):665-9.
- (38) Ratjen F, Doring G. Cystic fibrosis. *Lancet* 2003 Feb 22;361(9358):681-9.
- (39) Damas C, Amorim A, Gomes I. [Cystic fibrosis: review]. *Rev Port Pneumol* 2008 Jan;14(1):89-112.
- (40) Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 Nov;154(5):1229-56.
- (41) Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002 Apr;15(2):167-93.
- (42) Hudson VL, Wielinski CL, Regelman WE. Prognostic implications of initial oropharyngeal bacterial flora in patients with cystic fibrosis diagnosed before the age of two years. *J Pediatr* 1993;122:854-60.
- (43) Hoiby N. Microbiology of cystic fibrosis. *Cystic fibrosis*. London: Chapman and Hall; 1995.
- (44) Tavares W. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos*. 3rt ed. São Paulo: Atheneu; 2001.
- (45) Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 2002 Mar 1;34(5):634-40.
- (46) Lehman DC, Thomas JG. Biofilms: Architects of Disease. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 3rt ed. St Louis: Saunders Elsevier; 2007. p. 884-95.

- (47) Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics (Sao Paulo)* 2010;65(9):825-9.
- (48) Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection* 2007 Dec;35(6):457-60.
- (49) Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Goncalves AL, Barth AL. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2005 Dec;56(6):1148-51.
- (50) Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003 Oct;52(4):699-702.
- (51) Gales AC, Torres PL, Vilarinho DS, Melo RS, Silva CF, Cereda RF. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital. *Braz J Infect Dis* 2004 Aug;8(4):267-71.
- (52) Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005 Jan;11(1):73-6.
- (53) Juan NC, Oliver A. [Carbapenemases in *Pseudomonas* spp.]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010 Jan;28 Suppl 1:19-28.
- (54) Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, Konig C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008 Mar;7(2):123-7.

- (55) Cardoso O, Alves AF, Leitao R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *Int J Antimicrob Agents* 2008 Apr;31(4):375-9.
- (56) Paixao VA, Barros TF, Mota CM, Moreira TF, Santana MA, Reis JN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Braz J Infect Dis* 2010 Aug;14(4):406-9.
- (57) Moxon ER, Rainey PB, Nowak MA, Lenski RE. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Curr Biol* 1994 Jan 1;4(1):24-33.
- (58) Miller JH. Spontaneous mutators in bacteria: insights into pathways of mutagenesis and repair. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:625-43.
- (59) LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. High mutation frequencies among *Escherichia coli* and *Salmonella* pathogens. *Science* 1996 Nov 15;274(5290):1208-11.
- (60) Giraud A, Radman M, Matic I, Taddei F. The rise and fall of mutator bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2001 Oct;4(5):582-5.
- (61) Chao L, Vargas C, Spear BB, Cox EC. Transposable elements as mutator genes in evolution. *Nature* 1983 Jun 16;303(5918):633-5.
- (62) Taddei F, Radman M, Maynard-Smith J, Toupance B, Gouyon PH, Godelle B. Role of mutator alleles in adaptive evolution. *Nature* 1997 Jun 12;387(6634):700-2.
- (63) Sniegowski PD, Gerrish PJ, Lenski RE. Evolution of high mutation rates in experimental populations of *E. coli*. *Nature* 1997 Jun 12;387(6634):703-5.
- (64) Denamur E, Lecointre G, Darlu P, Tenaillon O, Acquaviva C, Sayada C, et al. Evolutionary implications of the frequent horizontal transfer of mismatch repair genes. *Cell* 2000 Nov 22;103(5):711-21.

- (65) Brown EW, LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA. Phylogenetic evidence for horizontal transfer of mutS alleles among naturally occurring Escherichia coli strains. J Bacteriol 2001 Mar;183(5):1631-44.
- (66) Modrich P. Mechanisms and biological effects of mismatch repair. Annu Rev Genet 1991;25:229-53.
- (67) Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. Annu Rev Biochem 1996;65:101-33.
- (68) Rayssiguier C, Thaler DS, Radman M. The barrier to recombination between Escherichia coli and Salmonella typhimurium is disrupted in mismatch-repair mutants. Nature 1989 Nov 23;342(6248):396-401.
- (69) Matic I, Rayssiguier C, Radman M. Interspecies gene exchange in bacteria: the role of SOS and mismatch repair systems in evolution of species. Cell 1995 Feb 10;80(3):507-15.
- (70) Matic I, Radman M, Taddei F, Picard B, Doit C, Bingen E, et al. Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic Escherichia coli. Science 1997 Sep 19;277(5333):1833-4.
- (71) Richardson AR, Stojiljkovic I. Mismatch repair and the regulation of phase variation in Neisseria meningitidis. Mol Microbiol 2001 May;40(3):645-55.
- (72) de Visser JA. The fate of microbial mutators. Microbiology 2002 May;148(Pt 5):1247-52.
- (73) Thomas SR, Ray A, Hodson ME, Pitt TL. Increased sputum amino acid concentrations and auxotrophy of Pseudomonas aeruginosa in severe cystic fibrosis lung disease. Thorax 2000 Sep;55(9):795-7.
- (74) Barth AL, Pitt TL. The high amino-acid content of sputum from cystic fibrosis patients promotes growth of auxotrophic Pseudomonas aeruginosa. J Med Microbiol 1996;45:110-9.

- (75) Giraud A, Matic I, Radman M, Fons M, Taddei F. Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Mar;46(3):863-5.
- (76) Römling U, Wingender J, Müller H, Tümmler B. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol* 1994;60:1734-8.
- (77) Blazquez J. Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis* 2003 Nov 1;37(9):1201-9.
- (78) Giraud A, Matic I, Radman M, Fons M, Taddei F. Mutator bacteria as a risk factor in treatment of infectious diseases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002 Mar;46(3):863-5.
- (79) Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blazquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 Nov;48(11):4226-33.
- (80) Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Apr;45(4):999-1007.
- (81) Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002 Sep;8(9):881-90.
- (82) Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Reviews* 2003;2:114-22.
- (83) Hall-Stoodley L, Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol* 2005 Jan;13(1):7-10.
- (84) Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ. The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *J Bacteriol* 2007 Nov;189(22):7945-7.

- (85) Ghigo JM. Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res Microbiol* 2003 Jan;154(1):1-8.
- (86) Del Pozo JL, Patel R. The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clin Pharmacol Ther* 2007 Aug;82(2):204-9.
- (87) Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000 Dec;64(4):847-67.
- (88) Frank KL, Patel R. Activity of sodium metabisulfite against planktonic and biofilm *Staphylococcus* species. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007 Apr;57(4):355-9.
- (89) Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol* 2001 Dec;183(23):6746-51.
- (90) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing - Information supplement. Approved document M2-A8 and M7-A6. 16 ed. ed. Wayne, Pennsylvania.: 2006.
- (91) Prosser BL, Taylor D, Dix BA, Cleeland R. Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob Agents Chemother* 1987 Oct;31(10):1502-6.
- (92) Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect* 2003 Nov;5(13):1213-9.
- (93) Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004 May;42(5):1915-22.
- (94) Moskowitz SM, Foster JM, Emerson JC, Gibson RL, Burns JL. Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. *J Antimicrob Chemother* 2005 Nov;56(5):879-86.

- (95) Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Nov;40(11):2517-22.
- (96) Laboratory Standard for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. 2010. Cystic Fibrosis Trust. 6-11-2010.

Ref Type: Online Source

Objetivos do estudo

Objetivo Geral

Avaliar a prevalência de *P. aeruginosa* hipermutante em pacientes pediátricos e adultos com FC e estabelecer sua associação com resistência aos antimicrobianos em condições plantônicas e em biofilme.

Objetivos Específicos

- 1) Determinar a prevalência de populações hipermutantes na população geral de *P. aeruginosa* de amostras clínicas do trato respiratório de pacientes com FC, utilizando método de disco-difusão modificado, análise da frequência de mutação e análise de mutações no gene *mutS*;
- 2) Avaliar a associação entre hipermutabilidade e os fenótipos mucóide e não-mucóide, perfil de resistência aos antimicrobianos e perfil molecular após técnica de macrorestrição do DNA bacteriano;
- 3) Determinar a concentração inibitória mínima em condições de biofilme bacteriano (BIC) para isolados de *Pseudomonas aeruginosa* do trato respiratório de pacientes com FC, bem como a concentração inibitória mínima padronizada em condições plantônicas de crescimento bacteriano (MIC);
- 4) Comparar os valores de BIC com os valores de MIC obtidos e possíveis implicações em mudança do antibiótico de escolha;
- 5) Avaliar a associação dos macrolídeos aos antimicrobianos de uso terapêutico na inibição do crescimento bacteriano em condições de biofilme;
- 6) Avaliar a associação de hipermutabilidade com produção de biofilme e resistência antimicrobiana em biofilme.

Manuscrito 1

Submetido para a revista BMC infection Disease.

Article title: Detection of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients from Southern Brazilian

MS ID: 5103714049681510

Authors: Larissa Lutz, Alice B M P Machado, Dariane C Pereira, Caroline Raupp and Afonso L Barth

Journal: BMC Infectious Diseases

Dear Dr Barth

Thank you for submitting your article. This acknowledgement and any queries below are for the contact author. This e-mail has also been copied to each author on the paper, as well as the person submitting. Please bear in mind that all queries regarding the paper should be made through the contact author.

A pdf file has been generated from your submitted manuscript and figures. We would be most grateful if you could check this file and let us know if any aspect is missing or incorrect. Any additional files you uploaded will also be sent in their original format for review.

Detection of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients from Southern Brazilian

Larissa Lutz¹, Alice BMP Machado¹, Dariane C. Pereira¹, Caroline Raupp¹, Afonso L. Barth^{1*}

¹Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Patologia Clínica - Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Ramiro Barcelos 2350 Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90.035-003

Phone: (+51) 3359 8452 (+51) 3359 8860 FAX: (+51) 3359 8310

*Corresponding Author:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Patologia Clínica - Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Ramiro Barcelos 2350 Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90.035-003

Phone: (+51) 3359 8607 FAX: (+51) 3359 8310

E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Abstract

Background

Pseudomonas aeruginosa is the most relevant pathogen related to lung infections in patients with cystic fibrosis (CF). Hypermutator (HPM - strains with increased spontaneous mutation rate as a result of defects in DNA repair system) *P. aeruginosa* isolates have been found at high frequencies in CF chronic lung infections. In this work we aimed 1) to establish the prevalence of HPM *P. aeruginosa* from sputum of CF patients, 2) to detect mutations in the mismatch repair system (MRS) genes, 3) to evaluate the PFGE profile from a set of HPM and non-hypermutator (NHPM) isolates, and 4) to associate HPM with antibiotic resistance.

Methods

We have studied, during the period from 2005 to 2008, 528 clinical isolates *P. aeruginosa* collected from sputum of 131 CF patients attending a CF Reference Center in Southern Brazil. Antibiotic susceptibility profile, resistant subpopulation quantification and mutation frequency were determined. Sequencing assay to detect mutations in the MRS and PFGE from a set of isolates (HPM and NHPM) was performed.

Results

We found a total of 135 (25,6%) isolates with resistant subpopulations and nine of them (6.7%) were characterized as HPM by the mutation frequency method. *mutS* gene defective was observed in five of nine HPM isolates. During the 30 months of study, there was no trend to hypermutator stability. PFGE results indicate that HPM are diverse from the original NHPM strain. This would indicate that HPM are new clones which colonize the CF patients. Moreover, HPM proved to be more resistant than NHPM isolates, although the difference was only statistically significant for ciprofloxacin.

Conclusions

Although low prevalence of HPM was observed, this work supports the hypothesis that the respiratory tract of CF patients represents an environment that favors the selection of highly adaptive mutator phenotypes. HPM might be a problem for treatment as they tended to be more resistant to antimicrobials than NHPM. However, as the detection of hypermutators poses as a challenge in the clinical laboratory the phenomenon of hypermutability might be overlooked. Therefore, one has to be aware of the hypermutability in *P. aeruginosa* in CF as this may influence the therapeutics of these patients.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, hypermutation, antibiotic resistance.

Background

The emergence of mutations is one of the major factors underlying evolution, providing the working material for natural selection. Antibiotic resistance has been classically considered the result of a process of natural selection, driven by the use of antibiotics. Bacteria, that have to face the antibiotic challenge, evolve to acquire resistance and, under this strong selective pressure, only the fittest survive, leading to the spread of resistance mechanisms and resistant clones. Horizontal transference of resistance mechanisms seems to be the main way of antibiotic resistance acquisition. Nevertheless, recent findings on hypermutability and antibiotic-induced hypermutation in bacteria have modified this landscape [1,2]. Over the last decades, several studies have provided strong evidence for a relevant role of hypermutators in the evolution of natural bacterial populations, particularly in the field of infectious diseases. Hypermutation microorganisms or hypermutators are those that have an increased spontaneous mutation rate as a result of defects in the DNA repair or error avoidance systems.

Hypermutation occurs when defects in the bacterial DNA repair genes lead to a general increase in mutation frequency. One of the most important DNA repair mechanisms in bacteria is the methyl-directed mismatch repair system (MRS). The inactivation of the MRS leads to an increase in the mutation rate because of its inability to repair mismatches efficiently. In addition, as the requirement for DNA sequence homology in generalized genetic recombination is relaxed in MRS-deficient strains (MRS negative), MRS deficiency increases recombination between divergent sequences, disrupting the barrier for recombination between different bacterial genera. MRS is a major constraint to interspecies recombination events. Removal of this barrier, also enhances the frequency of horizontal gene transfer, which is an important mechanism of acquired drug resistance in bacteria [3]. In the last decade, the role of

hypermutation in antibiotic resistance has began to receive attention [1,4-8] and the development of an appropriate approach to test their susceptibility may be a step forward for clinical microbiology practice [6,7]. In the clinical setting, hypermutation strains of *Pseudomonas aeruginosa* have been isolated from the lungs of individuals with cystic fibrosis (CF) with *mutS* being the gene most frequently involved [2,6,7,9]. Studies suggested that the unique environment of the CF lung, with its variable nutrient supply, fluctuating inflammatory response and exposure to aggressive and prolonged antibiotic therapy, is highly prone to the establishment of a stable hypermutable phenotype [6,10,11].

In this work, we aimed 1) to establish the prevalence of hypermutator *P. aeruginosa* from sputum of individuals with cystic fibrosis, 2) to associate the HPM isolates with mutations in the MRS genes, 3) to evaluate macrorrestriction profile from a set of isolates (HPM and NHPM) from de same CF patient using pulsed field gel electrophoresis, and 4) to associate the HPM isolates with antibiotic resistance.

Methods

Patients and clinical samples. *P. aeruginosa* isolates representing different colony morphotypes (mucoid, non-mucoid, pigmented, non-pigmented) were selected from sputum culture from CF patients, attending at CF center from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. In addition to that, series of isolates from the same patient collected on a regular basis were also evaluated. Identification of the isolates was performed with conventional tests [12], and using the API 20NE system (bioMe´rieux, Marcy l’Etoile, France).

Susceptibility testing and resistant subpopulation quantification. Susceptibility to amikacin (AMK), cefepime (FEP), ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP), gentamicin (CN), imipenem (IPM), meropenem (MEM), piperacillin-tazobactam (TZP), ticarcilin-clavulanic acid (TIM) and tobramycin (TOB) were assessed using

conventional disks (Oxoid®) by disk diffusion method according CLSI [13]. The presence (or absence) of resistant subpopulations within the inhibition zones, and the smallest inhibition zone diameters was recorded after an extra 12 h of incubation adapting from Maciá et al [7]. *P. aeruginosa* PAO1 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control of the procedure. Only the isolates which inhibition zone diameters were reduced by ≥ 5 mm for at least three of five antibiotics CAZ, CIP, IMI, MEM and TOB were considered a resistant subpopulation. This subpopulation were retested after growing in antibiotic free medium to confirm the stability of the resistance phenotype and to exclude the possibility that colonies growing within the inhibition zones were a consequence of antibiotic inactivation during the incubation period.

Phenotypic determination of mutation frequency. Mutation frequencies were estimated as previously described by Oliver et al [6]. Briefly, triplicate independent 10 ml Mueller Hinton Broth (MHB) overnight cultures of the *P. aeruginosa* isolates were collected and resuspended in 1 ml of saline solution. Serial 10-fold dilutions MHB were plated in Mueller Hinton Agar (MHA) with and without 300 μ g of rifampin/ mL, and after 36 h of incubation, colonies were counted and the mean fraction of mutants was estimated. As previously defined, isolates were considered hypermutators (HPM) when the mutation frequency was at least 20-fold higher than that obtained for the control strain *P. aeruginosa* PAO1 (up to 1.000-fold). *P. aeruginosa* PAO1 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control of the procedure.

PCR and sequencing. The genotypic characterization of hypermutability was obtained by sequencing *mutS* gene. Initially a Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed according Kenna et al [14]. PCR conditions were the same for all genes. DNA was extracted by a boiled preparation for each strain. Each 25 ml PCR reaction contained the following reagents: approximately 20 ng DNA, 250 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 1.5 mM $MgCl_2$ (Invitrogen®), 1X PCR buffer

(Invitrogen[®]), 20 pmol of each primer (Invitrogen[®]), 1.25 U Taq polymerase platinum (Invitrogen[®]) and sterile distilled water. DNA was amplified in a thermal cycler (MJ Research[®], Inc). PCR conditions were as follows: 1 cycle of 95 °C for 15 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 1 min, 1 min at the appropriate annealing temperature for the primer pair used (Table 1) and 72 °C for 1 min, with a final extension step of 72 °C for 10 min. Samples (10µl) of PCR product were run alongside a 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen[®]) on a 2% agarose gel (Invitrogen[®]) in 1X TBE Buffer. Coloration with ethidium bromide (0.5µg/mL) allowed visualization in UV transilluminator and the images were captured using a GelCapture Program (Applied Biosystems[®]). PAO1 was used as a positive control and the negative control consisted of PCR reaction mix without DNA. PCR products were purified using the USB/ExoSAP-IT[®] purification kit (Invitrogen[®]), 5µL of the amplicon were mixed with 2µL of the purification enzyme and submitted first to 37°C for 15 min to enzyme activation and then, to 80°C for 30 min to enzyme inactivation.

Samples were sequenced using the automatic sequencer ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer armed with 50 cm capillaries and POP6 polymer (Applied Biosystems). DNA templates (30 to 45 ng) were labeled with 3.2 pmol of the forward primer used in PCR and 2 µL of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems) in a final volume of 10 µL. Labeling reactions were performed in a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) thermocycler with a initial denaturing step of 96 °C for 3 min followed by 25 cycles of 96 °C for 10 sec, 55 °C for 5 sec and 60 °C for 4 min. Labeled samples were purified by isopropanol precipitation followed by 70% ethanol rinsing. Precipitated products were suspended in 10 µL formamide, denatured at 95 °C for 5 min, ice-cooled for 5 min and electroinjected in the automatic sequencer. Sequencing data were collected using the software Data Collection v1.0.1 (Applied Biosystems). DNA sequences were analyzed using the BioNumerics[®]

Software (Applied Maths, St. Marten-Latem, Belgium). Sequences were compared to the published PAO1 genome sequence (GenBank NC002516 or Pseudomonas Genoma Database V2) in BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Metallo beta-lactamase detection. PCR was performed to detect metallo beta-lactamases genes *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} [15,16]. All isolate selected showed reduced susceptibility to imipenem and/or meropenem according interpretative criteria by CLSI [13]. Each 50 µL PCR reaction was performed contained the following reagents: approximately 20 ng DNA, 200 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 2.5 mM MgCl₂ (Invitrogen®), 1X PCR buffer (Invitrogen®), 25 pmol of each primer (Invitrogen®), 2.5 U Taq polymerase platinum (Invitrogen®) and sterile distilled water. DNA was amplified in a thermal cycler (MJ Research®, Inc). PCR conditions and the appropriate annealing temperature for the primer pair were used according Gales et al [15] and Sander et al [16]. Samples (10µl) of PCR product were run alongside a 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen®) on a 2% agarose gel (Invitrogen®) in 1X TBE Buffer. Coloration with ethidium bromide (0.5µg/mL) allowed visualization in UV transilluminator and the images were captured using a GelCapture Program (Applied Biosystems®). *P. aeruginosa* SPM-1 (48-1997A) and IMP-1 (PSA 319) strains were used as positive control of *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1}, respectively.

Molecular typing using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). PFGE was performed using *SpeI* restriction endonuclease, CHEF DRII System (Bio-Rad®) and the switch time varied from 5 to 30 seconds, as previously described [17]. Analysis of PFGE patterns were performed by visual inspection of photographs of ethidium bromide-stained gels. The isolates were classified as identical if they shared the same bands, closely related if they differed by one to three bands, related if they differed by three to seven bands and as distinct if they varied by more than seven bands [18].

Statistic Analyzis. Data were analyzed using Student T- test, Fisher exact test, McNemar test and Kappa coefficient. SPSS program were used to process the data. Any difference were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results and Discussion

We have studied, from 2005 to 2008, 528 *P. aeruginosa* from the lower respiratory tract collected from 131 CF patients (mean: 4 isolates/patient) attending a CF Reference Center in Sourthen Brazil. We found a total of 135 (25.6%) isolates with resistant subpopulations within the inhibition zones which met the criteria proposed by Macia et al [7]. These isolates were then analyzed by mutation frequency estimative method and nine of them (6.7%) presented mutation frequency 20-fold higher than PAO1, and were characterized as HPM [6]. The HPM prevalence was similar to another CF Reference Centers in Brazil (Leão et al, Universidade do Estado do Rio de Janeiro - personal communication). Conversely, two other CF European Centers in Spain have reported higher prevalence levels (29% and 37%) of HPM [6,7]. It has to be considered that higher prevalence of HPM appear to be associated to *P. aeruginosa* from the chronic stage of the pulmonary infection in CF patients. In line with this, another study has accessed the prevalence of HPM regarding early stages of the pulmonary infection in CF patients and found a prevalence of only 10% of HPM [14].

As we found nine HPM isolates from seven patients, we proceed to evaluate the hypermutation phenotype within the same patient during a period of 30 months. All seven patients with HPM presented also NHPM isolates. There was no trend to a stability of the HPM phenotype, as after the recovery of the HPM isolate, we saw no further identification of this phenotype with the exception of one patient which presented three isolates with the HPM phenotype (Figure). It has been proposed that once adapted, the hypermutator is expected to revert to the original nonhypermutator state as deleterious mutations may accumulate in hypermutator populations leading to

a decreased fitness [4,19]. Conversely, reversion to nonhypermutators seems to be infrequent in the *P. aeruginosa* CF lung isolates because the same hypermutator strain was consistently recovered for years in several CF patients [6,20,21].

The genotypic characterization of hypermutability was performed by sequencing *mutS* gene from the nine HPM strains (Table 2). The analysis of the MRS gene sequences of HPM isolates from this study had shown heterogeneity of mutations in the *mutS* gene. We found several synonymous (silent) substitutions in one or more loci of this gene among HPM, but we also found mutations responsible for amino acid changes, mainly due to base substitution. After sequencing and alignment of the *mutS* gene, we observed alteration of amino acids in five isolates from four patients. These results confirm that the hypermutation phenomenon in isolates of *P. aeruginosa* is associated with MRS mutations, as previously described [5,8,14,22]. Further analysis of other MRS related genes (as *uvrD*, *mutL*, *mutM*, *mutT*, *mutY* genes) are warranted to better associate HPM to MRS mutations.

It is important to evaluate whether HPM *P. aeruginosa* originates from NHPM strains within the same patient or whether HPM are from a distinct origin. Therefore, we compared pairs of isolates HPM and NHPM from the same patient by macrorestriction analysis of DNA using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) to establish their genetic relatedness. Our results showed that HPM are diverse from the original NHPM strain. This would indicate that HPM are new clones which colonize the CF patients. However, one could speculate that HPM isolates may display different macrorestriction profile by PFGE in comparison to NHPM due to the diversity of mutations that these strains are prone. Natural selection, by favoring adaptations, can also select for the mechanism(s) that has/have generated the adaptive changes by hitchhiking. These mutator mechanisms can sometimes respond very specifically, though blindly, to the challenge of the environment. Such stress-induced increases mutation rates enhancing genetic

polymorphism, which is the structural component of the barrier to genetic exchange. Since MRS is one of the enzymatic controls of this barrier, the modulation of these systems can lead to a burst of speciation [19].

When we compared the susceptibility profile of the nine HPM versus 519 NHPM isolates for AMK, FEP, CAZ, CIP, CN, IMI, MEM, TZP, TIM and TOB, the HPM isolates in general proved to be more resistant or similar to all antibiotics tested. However, the difference in the resistance was statistically significant (Pearson chi-square test) only for ciprofloxacin (Table 3). The association of resistance with HPM isolates has also been demonstrated by others studies [5-7]. Using *P. aeruginosa* strain PAO1 with a *mutS* deletion (strain PAODelta*mutS*), when *in vitro* populations of low concentration and seemingly susceptible, hypermutable bacteria are confronted with antipseudomonal agents, mutants for which the MICs and the minimum bactericidal concentrations are in the range of clinical resistance will almost invariably ascend to dominance within 24 to 36 h. This does not occur for PAO1 without the *mutS* deletion. Detailed analysis of this evolution of acquired resistance to two of these antibiotics, imipenem and ciprofloxacin, indicate that although the rates of mutation to resistance in PAODelta*mutS* are on the order of 1×10^{-6} per generation, resistant mutants are very likely to either be present bacteria or arise after the bacterial populations are confronted with antibiotics [23].

We observed 75 (14.25%) *P. aeruginosa* isolates from 27 (20.6%) patients presenting resistance to carbapenems imipenem and/or meropenem according to CLSI breakpoints [13]. Among HPM isolates, one of nine (11.11%) presented this resistance profile. All isolates with reduced susceptibility were submitted to PCR to detect *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} genes. Only one isolate, NHPM, presented *bla*_{SPM-1} gene. Metallo beta-lactamase have been reported with increasing frequency worldwide and *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} genes are described as more frequent in Brazilian *P. aeruginosa* isolates

[15,24-28]. There are only sparse reports of MBL among CF *P. aeruginosa* and they indicated a low prevalence of these carbapenemases in CF [29-32]. This confirms that the carbapenem resistance mechanisms in CF *P. aeruginosa* might be multiple and not only due to SPM-1 and IMP-1 carbapenemase.

Only 2 (22%) of HPM isolates presented mucoid phenotype, while more than 47% NHPM isolates presented this phenotype from CF lung chronic infection ($p=0.131$). Conversely, Maciá and collaborators found a statistically significant co-relation between HPM and the mucoid phenotype [5]. Mucoid colonies are particularly prevalent in samples from the respiratory tract of CF patients. The transition of *P. aeruginosa* from non mucoid to mucoid phenotype in the lungs of CF patients is usually associated with an increased decline in lung function and an adverse prognosis [33]. In relation to pigment, 100% of HPM isolates were pigmented while 98% of NHPM isolates had this phenotype.

In order to evaluate association between hypermutation with clinical data, we accessed data from seven patients with HPM and NHPM isolates, six male and one female. Seven out of nine HPM isolates were obtained when the patient was attending the hospital (inpatients). We compared lung function (FEV1 and FVC), Schwachmann score, weight, days in hospital, antibiotic treatment, and outcome (respiratory capacity) from CF patients in the period when HPM were isolated in comparison to the period of NHPM. No difference was observed in relation to the severity of the disease and the presence of HPM isolates. Moreover, it seems that in all periods when *P. aeruginosa* was identified in clinical samples of CF patient the respiratory capacity decreased. All CF patients with HPM strains received several cycles of combinations of antimicrobial agents previously and during the study including the period when HPM and when NHPM were recovered.

Conclusions

Although low prevalence of hypermutator phenotype was observed in *P. aeruginosa* isolates from CF patients attending a CF Reference Center in Southern Brazil, this work is in line with the hypothesis that the respiratory tract of CF patients represents an environment that favors the selection of highly adaptive mutator phenotypes. During the period of the study, there was no trend to hypermutator stability. However, as the detection of hypermutators poses as a challenge in the clinical laboratory the phenomenon of hypermutability might be overlooked. Therefore, one has to be aware of the hypermutability in *P. aeruginosa* in CF as this may influence the therapeutics of these patients.

Acknowledgements and Funding

We acknowledge Dr Ana Cristina Gales from Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, who kindly provided *P. aeruginosa* SPM-1 (48-1997A) and IMP-1 (PSA 319) strains used as positive control of *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1}, respectively.

This work was supported by FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

References

1. Blazquez J, Oliver A, Gomez-Gomez JM: **Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance?** *Curr Drug Targets* 2002, **3**: 345-349.
2. Woodford N, Ellington MJ: **The emergence of antibiotic resistance by mutation.** *Clin Microbiol Infect* 2007, **13**: 5-18.
3. Chopra I, O'Neill AJ, Miller K: **The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria.** *Drug Resist Updat* 2003, **6**: 137-145.
4. Montanari S, Oliver A, Salerno P, Mena A, Bertoni G, Tummler B *et al.*: **Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis.** *Microbiology* 2007, **153**: 1445-1454.
5. Macia MD, Blanquer D, Togores B, Sauleda J, Perez JL, Oliver A: **Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**: 3382-3386.
6. Oliver A, Canton R, Campo P, Baquero F, Blazquez J: **High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection.** *Science* 2000, **288**: 1251-1254.
7. Macia MD, Borrell N, Perez JL, Oliver A: **Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**: 2665-2672.
8. Oliver A, Baquero F, Blazquez J: **The mismatch repair system (mutS, mutL and uvrD genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants.** *Mol Microbiol* 2002, **43**: 1641-1650.
9. Mulcahy LR, Burns JL, Lory S, Lewis K: **Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Producing High Levels of Persister Cells in Patients with Cystic Fibrosis.** *J Bacteriol* 2010, **192**: 6191-6199.
10. Ciofu O, Riis B, Pressler T, Poulsen HE, Hoiby N: **Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**: 2276-2282.
11. Rogers GB, Hoffman LR, Whiteley M, Daniels TW, Carroll MP, Bruce KD: **Revealing the dynamics of polymicrobial infections: implications for antibiotic therapy.** *Trends Microbiol* 2010, **18**: 357-364.
12. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC: **Manual of Clinical Microbiology.** 8 edition Washington: ASM Press; 2003.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute: *Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S20.* Wayne: CLSI; 2010.

14. Kenna DT, Doherty CJ, Foweraker J, Macaskill L, Barcus VA, Govan JR: **Hypermutable in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis.** *Microbiology* 2007, **153**: 1852-1859.
15. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS: **Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase.** *J Antimicrob Chemother* 2003, **52**: 699-702.
16. Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S *et al.*: **PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (*bla*M_{PM}) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams.** *J Clin Microbiol* 1996, **34**: 2909-2913.
17. Kaufmann ME, Pitt TL: **Pulsed-field gel electrophoresis of bacterial DNA.** In *Methods in Practical Laboratory Bacteriology*. Edited by Chart H. London: CRC Press; 1994:83-92.
18. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH *et al.*: **Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.** *J Clin Microbiol* 1995, **33**: 2233-2239.
19. Taddei F, Vulic M, Radman M, Matic I: **Genetic variability and adaptation to stress.** *EXS* 1997, **83**: 271-290.
20. Hogardt M, Schubert S, Adler K, Gotzfried M, Heesemann J: **Sequence variability and functional analysis of MutS of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolates.** *Int J Med Microbiol* 2006, **296**: 313-320.
21. Hogardt M, Hoboth C, Schmoldt S, Henke C, Bader L, Heesemann J: **Stage-specific adaptation of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* isolates during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis.** *J Infect Dis* 2007, **195**: 70-80.
22. Henrichfreise B, Wiegand I, Pfister W, Wiedemann B: **Resistance mechanisms of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from Germany and correlation with hypermutation.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**: 4062-4070.
23. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A: **The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms.** *J Clin Microbiol* 1999, **37**: 1771-1776.
24. Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F: **Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital.** *Clinics (Sao Paulo)* 2010, **65**: 825-829.
25. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL: **Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil.** *Infection* 2007, **35**: 457-460.

26. Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Goncalves AL, Barth AL: **Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil.** *J Antimicrob Chemother* 2005, **56**: 1148-1151.
27. Gales AC, Torres PL, Vilarinho DS, Melo RS, Silva CF, Cereda RF: **Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak in an intensive care unit of a teaching hospital.** *Braz J Infect Dis* 2004, **8**: 267-271.
28. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC: **IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital.** *Clin Microbiol Infect* 2005, **11**: 73-76.
29. Juan NC, Oliver A: **[Carbapenemases in *Pseudomonas* spp.].** *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010, **28 Suppl 1**: 19-28.
30. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, Konig C, Hebestreit H *et al.*: **Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis.** *J Cyst Fibros* 2008, **7**: 123-127.
31. Cardoso O, Alves AF, Leitao R: **Metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient.** *Int J Antimicrob Agents* 2008, **31**: 375-379.
32. Paixao VA, Barros TF, Mota CM, Moreira TF, Santana MA, Reis JN: **Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis.** *Braz J Infect Dis* 2010, **14**: 406-409.
33. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC: **Manual of Clinical Microbiology.** Washington: ASM Press; 2007.

Table 1. PCR primer sequences and annealing temperatures for *P. aeruginosa* mismatch repair system and error prevention genes

Gene	Primers (5' - 3')	Annealing Temperature (°C)	Reference
<i>mutS1</i>	ATGACCGACCTCTCCCAGCA	62	[14]
<i>mutS2</i>	TCTGGAATCAGCAGCTCGGC		
<i>mutS3</i>	GCCGCTTCAGCGTCCAGGAGATAA	65	[14]
<i>mutS4</i>	TTTTCGCTCAGCGCCTGCAGCT		
<i>mutS5</i>	GAAGTCTGGCC AAGGCGAT	59	[14]
<i>mutS6</i>	TTCGCCAGCACGTCCAGTTC		
<i>mutS7</i>	CCGCATCCATGGCTACTTCA	58	[14]
<i>mutS8</i>	GATGCGGTCCACCAGGGA		
<i>mutS9</i>	GCGGTTCTCGAACACACCT	59	[14]
<i>mutS10</i>	TAGTTCTCTCCTCAGGCGGG		

Table 2. *mutS* gene mutations in *P. aeruginosa* with hypermutator phenotype

Isolate No	<i>mutS</i> gene position	Mutation type	Nucleotide	Amino acid
223	195	base substitution	g->c	R->P
	264	base substitution	c->t	T->I
434	117	base substitution	a->g	N->S
	141	base substitution	a->g	H->R
	288	base substitution	t->g	V->G
	294	base substitution	g->c	R->X
559	117	base substitution	a->g	N->S
	141	base substitution	a->g	H->R
608	195	base substitution	g->c	R->P
	264	base substitution	c->t	T->I
646	117	base substitution	a->g	N->S
	141	base substitution	a->g	H->R

a: adenine c: cytosine, g: guanine, t: thymine, A: Alanine, G: Glutamine, H: Histidine , I: Isoleucine, N: Asparagine , P: Proline , R: Arginine, T: Threonine, V: Valine, X: Unspecified or unknown amino acid.

Table 3. Antimicrobial resistance of non-hypermotators (NHM) and hypermutators (HPM) *P. aeruginosa* isolates from CF patients

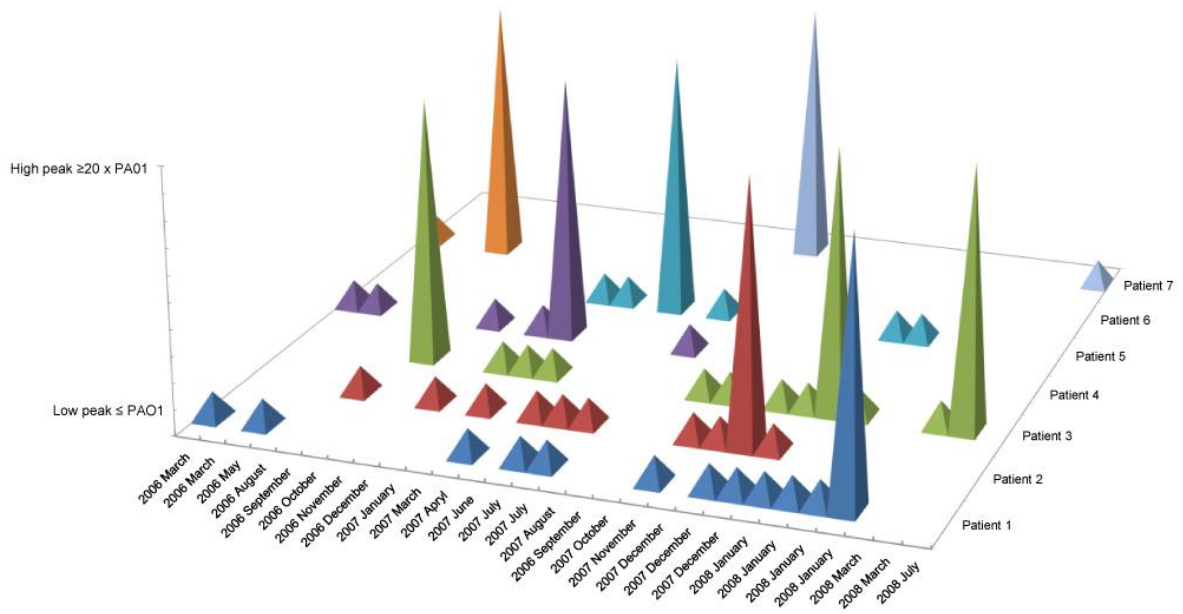
Antibiotic Agents	NHPM (%) n=519	HPM (%) n= 9	p ^a	CI ^b
AMK	30.9	55.6	0.200	0.189-0.210
FEP	14.4	44.4	0.051	0.045-0.056
CAZ	9.6	33.3	0.084	0.076-0.091
CIP	10.4	22.2	0.023	0.019-0.027
CN	35.3	66.7	0.116	0.107-0.124
IMP	13.5	11.1	1.000	1.000-1.000
MEM	6.9	11.1	1.000	1.000-1.000
TZP	13.7	44.4	0.062	0.056-0.068
TIM	31.2	66.7	0.084	0.077-0.091
TOB	14.6	11.1	0.230	0.219-0.241

AMK: amikacin, FEP: cefepim, CAZ: ceftazidim, CIP: ciprofloxacin, CN: gentamicin, IMP: imipenem, MEM: meropenem, TZP: piperacilin-tazobactam, TIM: ticarcilin-clavulanic acid, TOB: tobramycin.

^ap (Pearson chi-square test).

^bCI: Confidence Interval (Pearson chi-square test).

Figure. Distribution of HPM in a set of *P. aeruginosa* isolates from the same patient during 30 months.



Manuscrito 2

A ser submetido para a revista Journal of Clinical Microbiology.

Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients is associated with biofilm formation and reduced antibiotic susceptibility in biofilm conditions

Running title: Hypermutable cystic fibrosis *P. aeruginosa* and biofilm

Larissa Lutz¹; Dariane C. Pereira¹, Afonso L. Barth^{1*}

¹Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

*Correspondence Author:

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Serviço de Patologia Clínica - Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular

Rua Ramiro Barcelos 2350 Porto Alegre, RS, Brazil, CEP 90.035-003

Phone: (+51) 3359 8607 FAX: (+51) 3359 8310

E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

Abstract

The persistence of *P. aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis (CF) is associated, at least in part, with hypermutability and with growth in biofilm conditions. These characteristics are expected to be directly related to antimicrobial resistance. The laboratory methods available for assessment of biofilm formation as well as for determining the susceptibility in biofilm conditions are not standardized for the detection of these peculiar features of *P. aeruginosa*, leading to controversy about its clinical usefulness. The objectives of this study were: 1) to evaluate two methods for detection of CF *P. aeruginosa* biofilm formation, 2) to evaluate the influence of biofilm growth in the susceptibility to antimicrobials and 3) to associate biofilm formation and resistance in biofilm conditions with hypermutability. Two methodologies to assess biofilm formation and the minimal inhibitory concentration in planktonic and in biofilm conditions were performed. We obtained a divergence of results between the two methodologies of biofilm formation. However, regardless the assay, hypermutator isolates tended to be more able to form biofilm. High antibiotic resistance in biofilm conditions was observed when we compared with planktonic conditions and was higher in hypermutator isolates when compared with non-hypermutator isolates. The peculiar characteristics of hypermutability and biofilm formation in *P.aeruginosa* in CF lung infection may play an important role in the treatment of patients.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, biofilm, antibiotic susceptibility.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is the most common pathogen in CF and its prevalence increases with the patient age. Early infection can be cleared with aggressive antibiotic treatment, such as with an oral quinolone plus an inhaled antibiotic. However, after the initial isolation, *P. aeruginosa* may be found intermittently in the respiratory secretion becoming, eventually, responsible for chronic infection. The latter is associated with a faster deterioration of lung function, increased hospitalization and survival reduction (1,17). *P. aeruginosa* forms biofilm within the airways of patients with chronic CF pulmonary infection (5,6,16), which acts as a protective barrier around the bacterial cells and limits exposure to oxidative radicals, antibiotics and phagocytes. Bacterial biofilm play a relevant role in persistent infections, which are rarely eradicated with antimicrobial therapy.

Moreover, the unique environment of the CF lung, with variable nutrient supply, and high inflammatory response as well as the exposure of bacteria to aggressive and prolonged antibiotic therapy, leads to the establishment of a stable hypermutable phenotype (2,19). Hypermutation microorganisms or hypermutators (HPM) are those that have an increased spontaneous mutation rate as a result of defects in DNA repair error systems. The association of resistance with HPM isolates has been demonstrated by several studies (2,3,19).

Although, high hypermutant frequency has been described in *P. aeruginosa* from CF chronic lung infection and despite the evidence that *P. aeruginosa* grows in the airway of CF patients as biofilms, conventional antibiotic susceptibility testing are standardized for planktonically grown bacteria. The standard antibiotic tests also do not consider the detection of hypermutation in the susceptibility profile. To access the role of these features an alternative approach to test susceptibility in biofilm conditions and

recovering hypermutable subpopulations, may be a step forward in the clinical microbiology practice (10,11,14,15).

The objectives of this study were: 1) to evaluate two methods for detection of CF *P. aeruginosa* biofilm formation, 2) to evaluate the influence of biofilm growth in susceptibility to antimicrobials and 3) to associate biofilm formation and resistance in biofilm conditions with hypermutability.

Materials and Methods

Bacterial isolates.

P. aeruginosa clinical isolates were collected from the sputum of CF patients attending at a Cystic Fibrosis Center at *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* in southern Brazil, from December/2005 to July/2008. Sputum samples were cultured quantitatively by standard microbiological methods (13). Isolates of *P. aeruginosa* obtained from the sputum culture were stored in glycerol at -80°C. Prior to testing, the microorganisms were subcultured in trypticase soy broth (TSB) with 5% KNO₃ and incubated overnight after retrieval from -80°C. Bacteria were then subcultured in MacConkey (bioMérieux, France) agar and incubated overnight.

Hypermutator phenotype was detected as previously described (Lutz et al, submitted). We included in this study nine HPM isolates from seven patients, their respective subpopulation hypermutant and nine isolates non-hypermutator (NHPM) from the same patient. We also used additional 36 NHPM isolates from other patients. *P. aeruginosa* ATCC 27853 (planktonic antimicrobial susceptibility assay) and PA01 (biofilm production and biofilm antimicrobial susceptibility assay) were used for quality control.

Antimicrobial agents

Antibiotic were obtained from the manufacturers as follows: ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP) and tobramycin (TOB) (Sigma-Aldrich[®] Co, St Louis, USA). Stock solution were prepared following the instructions of the manufactures and stored at -80°C until use. Working solutions were prepared in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) (BectonDickinson-BD[®], Sparks, USA) at 512 mg/L for all antibiotics. The working solutions were used to prepare the serial two-fold dilutions in CAMHB in 96-well plate.

Biofilm formation assay A

The first biofilm formation technique (assay A) was performed according to the microtiter-plate technique for quantification of biofilm formation as proposed by Stepanovic et al (18). A bacterial suspension in saline was prepared with an inoculum density equivalent to 0.5 McFarland (Densimat, bioMèrieux[®]). Afterwards, 180 µl of the TSB containing 1% glucose were inoculated in a microplate and 20 µL of the bacterial inoculum into all but the negative control of a flat-bottom 96-well microplate and incubated at 37°C for 18h. Non-adhered cells were removed with the aid of a pipette. The weels were washed three times with sterile saline. The remained cells adhered to the bottom of the well (biofilm) was fixed with methanol, stained with crystal violet and resuspended with 95% ethilic alcohol. The biofilm was measured by the optical density (OD) of the solution at 450 nm. The biofilm formation was categorized as weak (WF), moderate (MF) and strong forming (SF) according to table 1.

To access the reproducibility of the method, each isolate was submitted five times to the assay in quadruplicate.

Biofilm formation assay B

The second biofilm formation (assay B) was performed by a technique adapted from Moskovitz et al (11). A bacterial suspension in saline was prepared with an inoculum density equivalent to 0.5 McFarland (Densimat, bioMérieux®). Afterwards, 180 µl of the TSB containing 1% glucose were inoculated in a microplate and 20 µL of the bacterial inoculum into all but the negative control of a flat-bottom 96-well microtiter plate (catalog no. 269787; Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y.). The plates were covered with lids presenting 96 pegs (catalog no. 445497; Nunc TSP system) in which the biofilm could build up, followed by incubation at 37°C for 18h. Peg lids were rinsed three times with sterile saline to remove non-binding cells, incubated in fresh TSB containing 1% glucose in a new microplate and centrifugated at 805 X g for 20 min. The peg lid was discarded and replaced by a standard lid. The optical density at 450nm was measured on a microplate colorimeter before and after incubation at 37°C for 6h. The biofilm formation was categorized as described above (table 1). The reproducibility of this method was accessed as also described above.

MIC and BIC determination

Minimal inhibitory concentration (MIC) in the planktonic state was determined by broth microdilution using the two-fold dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (4). The antibiotic concentration ranged from 0.5 to 256 mg/L for the anti-pseudomonas antibiotics CAZ, CIP and TOB. Biofilm inhibitory concentration (BIC) values were performed as previously described (11). Briefly, a bacterial suspension in CAMHB containing 5% KNO₃ was prepared with an inoculum density equivalent to 0.5 McFarland (Densimat, bioMérieux®). Afterwards, 100 µl were inoculated into all but the negative control of a flat-bottom 96-well microplate (catalog no. 269787; Nalgene Nunc International, Rochester, N.Y.). Plates were covered with

lids presenting 96 pegs (catalog no. 445497; Nunc TSP system) in which the biofilms can build up, followed by incubation at 37°C for 20h. Peg lids were rinsed three times with sterile saline to remove non-binding cells, placed onto flat-bottom microplates containing a range of antibiotic concentrations; pegs carrying control biofilms were submerged in antibiotic-free medium and incubated for 18 to 20h at 37°C. After antibiotic incubation, peg lids were again rinsed three times in sterile saline incubated in fresh CAMHB in a new microplate and centrifugated at 805 X g for 20 min. The peg lid was discarded and replaced by a standard lid. The optical density at 450nm was measured on a microtiter plate colorimeter before and after incubation at 37°C for 6h and 12 h. The biofilms inhibitory concentrations were defined as the lowest concentration where the medium was not turbid. CLSI criteria (4) were used to classify the isolates as "Susceptible", "Intermediate" or "Resistant". All isolate were submitted to the assay in quadruplicate.

Statistical Analysis

Data were analyzed using Fisher exact test and Wilcoxon coefficient. SPSS program were used to process the data. Any difference were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

Biofilm formation of *P.aeruginosa* was estimated for 63 *P. aeruginosa* from 34 patients by both biofilm formation assays. Both assays presented similar reproducibility (Wilcoxon Signed Ranks Test = 0.535) although there was a diversity of results among the two methodologies (Table 2).

According the assay A, 53.3% and 21.4% of NHPM and HPM isolates were not able to form biofilm, respectively (Table 3). There was a significant trend of biofilm

formation and hypermutability ($p=0.038$). None isolate was classified as strong biofilm forming by the assay A.

According to assay B only 8.9% of NHPM were not able to form biofilm in contrast to HPM isolates which produced biofilm in some degree ($p=0.022$). Moreover, 15.6% and 21.4% of NHPM and HPM were strong biofilm forming, respectively (Table 4).

Minimal inhibitory concentration and biofilm inhibitory concentration of ceftazidime, ciprofloxacin and tobramycin were performed for the 63 clinical isolates of *P. aeruginosa*. Values of MIC_{50} and BIC_{50} for NHPM were similar for all three antibiotics tested. In contrast, the BIC_{50} of tobramycin and ceftazidime were considerably higher than MIC_{50} for HPM. BIC_{90} had higher values than MIC_{90} for all three antibiotics considering NHPM, and for CAZ and CIP for HPM. It is of note that the BIC_{90} values of HPM were higher than NHPM (Table 5).

Discussion

In this study we assessed biofilm formation, hypermutability and biofilm implication to antimicrobial susceptibility among *P. aeruginosa* from CF. Two methodologies were used which provided a diversity of results. In fact, the assays used different procedures: the first uses microplates without peg lids, in which the biofilm measure takes into account only the biofilm formed in the bottom of the well; the second assay was performed using microplates with peg lid, ensuring biofilm formation in the interface with oxygen. Due to the latter characteristic, the second assay would be more reliable for strict aerobic bacteria such as *P. aeruginosa*. In fact, assay B (with peg lids) detected more biofilm forming isolates regardless of the hypermutability state of the isolates. Moreover, strong biofilm forming isolates were detected only by this method.

In this study, *P. aeruginosa* with high frequency of mutation (HPM) were able to form biofilm more efficiently than NHPM *P. aeruginosa* considering both methodologies. One hypothesis which would explain the association between hypermutability and biofilm formation is the fact that HPM present several mutations which favor the expression of virulence factors such as biofilm leading to increased bacteria survival in the CF airway.

All classical proposals of treatment regimens against CF *P. aeruginosa* chronic infections include a beta-lactam (12), however, in this study the values of BIC for ceftazidime were, in general, higher than those obtained for tobramycin and ciprofloxacin. This is even more significant for HPM in relation to NHPM isolates. It is of note that beta-lactam antibiotics have shown to act more efficiently against rapidly growing bacteria (12), which occurs when the microorganism is in the planktonic form in opposition to the slow growing bacteria in the biofilm community and/or in the hypermutability state.

Ciprofloxacin, however, was the antibiotic that presented best performance against bacteria growing in biofilms. We found BIC values of ciprofloxacin consistently lower than BIC of ceftazidime and tobramycin in particular for HPM isolates. This result is expected since fluoroquinolones present superior action in relation to ceftazidime against slow growing bacteria (12).

The host-pathogen interactions responsible for progressive CF lung disease are complex (8) and *P. aeruginosa* infections are difficult to eradicate (7). The poor correlation between the results of *in vitro* CF *P. aeruginosa* susceptibility tests and the clinical efficacy of antimicrobial treatment probably results, at least in part, of the model of growth at the site of infection (15). It has become evident that biofilm-grown cells express properties distinct from those of planktonic cells, one of which is an increased

resistance to antimicrobial agents (11). This study corroborates this fact and also indicates that there is an association between biofilm and hypermutability.

The evolutionary ecology of *P. aeruginosa* in the CF lungs leads to bacterial populations undergoing long-term adaptation to new challenged environments. This generates hypermutators which are more prone to antibiotic resistance as previously documented (9,10,14). In this trend, as expected, we have shown that superior biofilm forming and high antibiotic resistance in biofilm conditions are associated with hypermutable CF *P. aeruginosa*.

Acknowledgements and Funding

We acknowledge the financial support by FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

References

1. **Baltimore, R. S., C. D. Christie, and G. J. Smith.** 1989. Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am.Rev.Respir.Dis.* **140**:1650-1661.
2. **Blazquez, J., A. Oliver, and J. M. Gomez-Gomez.** 2002. Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Curr.Drug Targets.* **3**:345-349.
3. **Chopra, I., A. J. O'Neill, and K. Miller.** 2003. The role of mutators in the emergence of antibiotic-resistant bacteria. *Drug Resist.Updat.* **6**:137-145.
4. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** 2009. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically M07-A8. CLSI, Wayne.
5. **Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie.** 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu.Rev.Microbiol.* **41**:435-464.
6. **Drenkard, E. and F. M. Ausubel.** 2002. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* **416**:740-743.
7. **Hoiby, N., J. H. Krogh, C. Moser, Z. Song, O. Ciofu, and A. Kharazmi.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes.Infect.* **3**:23-35.
8. **Kenna, D. T., C. J. Doherty, J. Foweraker, L. Macaskill, V. A. Barcus, and J. R. Govan.** 2007. Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology* **153**:1852-1859.
9. **Macia, M. D., D. Blanquer, B. Tогores, J. Sauleda, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2005. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob.Agents Chemother.* **49**:3382-3386.
10. **Macia, M. D., N. Borrell, J. L. Perez, and A. Oliver.** 2004. Detection and susceptibility testing of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* strains with the Etest and disk diffusion. *Antimicrob.Agents Chemother.* **48**:2665-2672.
11. **Moskowitz, S. M., J. M. Foster, J. Emerson, and J. L. Burns.** 2004. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J.Clin.Microbiol.* **42**:1915-1922.
12. **Moskowitz, S. M., J. M. Foster, J. C. Emerson, R. L. Gibson, and J. L. Burns.** 2005. Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection. *J.Antimicrob.Chemother.* **56**:879-886.

13. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC, Tenover FC. Manual of Clinical Microbiology. 8. 2003. Washington, ASM Press.
14. **Oliver, A, R. Canton, P. Campo, F. Baquero, and J. Blazquez.** 2000. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* **288**:1251-1254.
15. **Rogers, G. B., L. R. Hoffman, M. Whiteley, T. W. Daniels, M. P. Carroll, and K. D. Bruce.** 2010. Revealing the dynamics of polymicrobial infections: implications for antibiotic therapy. *Trends Microbiol.* **18**:357-364.
16. **Singh, P. K., A. L. Schaefer, M. R. Parsek, T. O. Moninger, M. J. Welsh, and E. P. Greenberg.** 2000. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* **407**:762-764.
17. **Staab, D.** 2004. Cystic fibrosis – therapeutic challenge in cystic fibrosis children. *Eur.J.Endocrinol.* **151 Suppl 1**:S77-S80.
18. **Stepanovic, S., D. Vukovic, V. Hola, B. G. Di, S. Djukic, I. Cirkovic, and F. Ruzicka.** 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **115**:891-899.
19. **Woodford, N. and M. J. Ellington.** 2007. The emergence of antibiotic resistance by mutation. *Clin.Microbiol.Infect.* **13**:5-18.

Table 1. Classification of biofilm formation.

Categorization	
Non-forming	$OD < OD_{bp}^a$
Weak	$OD \geq OD_{bp}$
Moderate	$OD \geq 2X OD_{bp}$
Strong	$OD \geq 4x OD_{bp}$

^a $OD_{bp} = \text{mean OD NC} + 3xSD$; ^bNegative Control; ^cStandard Deviation

Table 2. Comparison between biofilm formation assay A and B (Wilcoxon Signed Ranks Test)

	Wilcoxon Rank	N
Assay B x Assay A	Negative Ranks	3 ^a
	Positive Ranks	52 ^b
	Ties	4 ^c
	Total	59

^a Assay B < Assay A

^b Assay B > Assay A

^c Assay B = Assay A

Table 3. Frequency of biofilm formation in *P. aeruginosa* HPM and NHPM according assay A.

		Biofilm Formation Assay A			
		NF ^a	WF ^b	MF ^c	Total
NHPM	N	24	18	3	45
	%	53.3%	40.0%	6.7%	100%
HPM	N	3	11	0	14
	%	21.4%	78.6%	0%	100%
Total	N	27	29	3	59
	%	45.8%	49.2%	5.1%	100%

Statistic significance p= 0,038 (Fisher exact test).

^aNon-Forming, ^bWeak Forming, ^cModerate Forming biofilm.

Table 4. Frequency of biofilm formation in *P. aeruginosa* HPM and NHPM according assay B.

		Biofilm Formation Assay B				
		NF ^a	WF ^b	MF ^c	SF ^d	Total
NHPM	N	4	16	18	7	45
	%	8.9%	35.6%	40.0%	15.6%	100%
HPM	N	0	0	11	3	14
	%	0%	0%	78.6%	21.4%	100%
Total	N	4	16	29	10	59
	%	6.8%	27.1%	49.2%	16.9%	100%

Statistic significance p= 0,022 (Fisher exact test).

^aNon-Forming, ^bWeak Forming, ^cModerate Forming, ^dStrong Forming biofilm.

Table 5. MIC₅₀, MIC₉₀, BIC₅₀ and BIC₉₀ values to ceftazidime, ciprofloxacin and tobramycin.

Antimicrobial agents	NHPM (n=45)			HPM (n=18)		
	MIC Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	MIC Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀
Ceftazidime	0.5-64	2	8	1-256	2	16
Ciprofloxacin	0.5-128	0.5	8	0.5-32	0.5	16
Tobramycin	0.5-256	2	16	0.5-256	2	256
	BIC Range	BIC ₅₀	BIC ₉₀	BIC Range	BIC ₅₀	BIC ₉₀
Ceftazidime	0.5-256	2	128	0.5-256	32	256
Ciprofloxacin	0.5-256	1	32	0.5-128	0.5	64
Tobramycin	0.5-256	4	64	2-256	16	256

Manuscrito 3

A ser submetido para a revista International Journal of Antimicrobial Agents.

**Effectiveness of macrolides in combination with other antimicrobial agents
against Cystic Fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* in biofilm**

Larissa Lutz¹, Dariane C. Pereira¹, Rodrigo M. Paiva¹, Afonso L. Barth^{1*}

¹Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil.

* Corresponding author:

Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre, RS, Brazil. Zip code: 90035903.

Tel.: 55 51 33598315; fax: 55 51 3359 8310.

E-mail address: albarth@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

Cystic fibrosis lung infections are chronic conditions in which respiratory failure is responsible for approximately 90% of the mortality associated with this genetic disease. The administration of macrolides for chronic pulmonary infection of cystic fibrosis patients has been reported to be beneficial. Although the mechanism of action remains unclear, anti-inflammatory effects as well as interference of macrolides with virulence factor production have been suggested to contribute to improve clinical outcome. In this study we evaluated 1) the minimal inhibitory concentration in planktonic grown (MIC) and in biofilm grown (BIC) and 2) the action of macrolides in combination with antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa* resistant isolates in biofilm-grown. Conventional and biofilm susceptibility methodologies were discordant, and BIC values were greater than MIC for all antibiotics tested. Tobramycin has shown the least action on biofilm mode of growth, with the major number of isolates resistant (38%) and ciprofloxacin was the most active on biofilm mode of growth with 18% of resistance. Macrolides plus anti-pseudomonas antibiotics against “Resistant” isolates can enhance the bactericidal activity. Azithromycin at 8 µg/mL has shown to be most active to decrease BIC values. The use of azithromycin at 8 µg/mL in combination with anti-pseudomonas agents resulted in classification change from “Resistant” to “Susceptible” for the majority (>60%) of isolates.

Keywords: bacterial biofilm, susceptibility testing, *P. aeruginosa*, azithromycin, macrolides.

1. INTRODUCTION

The main cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) is chronic lung disease caused by a vicious cycle of infection and inflammation which leads to progressive deterioration of pulmonary function, respiratory failure and death [1]. In particular, CF patients suffer from infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. A great body of *in vivo* and *in vitro* evidence suggests that *P. aeruginosa* produce biofilms within the airways of patients with chronic CF pulmonary infection [2-5], which is a protective barrier around the bacterial cells and limits exposure to oxidative radicals, antibiotics and phagocytes [6]. Bacterial biofilms play a relevant role in persistent infections, which are rarely eradicated with antimicrobial therapy.

Despite the evidence that *P. aeruginosa* grows in the airways of CF patients in biofilms, the susceptibility profile of the bacteria is usually evaluated *in vitro* in the planktonic state. Therefore, the antimicrobial therapy is based upon tests performed in the planktonic mode of growth. However, the planktonic susceptibility profile may not represent the actual susceptibility of the bacteria [7]. To overcome the potential shortfalls of traditional (planktonic) microbiological methods, interest in the development of biofilms models *in vitro* has been increasing [8].

Nowadays, macrolide antibiotics are being evaluated in treatment of chronic lung inflammatory diseases, including diffuse panbronchiolitis (DPB), CF, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. Although macrolides have no intrinsic antimicrobial activity against *P. aeruginosa* in therapeutic

concentrations, there is great interest in the evaluation of treatments of CF patients with these antibiotics, at least as complementary therapy [9-11]. The anti-inflammatory activity of macrolides has been demonstrated in many studies, including clinical trials [12-17]. Macrolides have also proved to present potential effects on inhibition of bacterial biofilm with reduction of bacterial virulence factors when used in sub-inhibitory concentrations [18].

In this study we aimed to evaluate the action of macrolides in combination with antimicrobial agents on biofilm-grown bacteria in order to assess whether their action would change the isolate classification from “Resistant” to “Susceptible” to anti-pseudomonas antibiotics in the presence of sub-inhibitory doses of macrolides.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 BACTERIAL ISOLATES

P. aeruginosa clinical isolates collected from the sputum of CF patients attending on the Cystic Fibrosis Center at *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* in southern Brazil, from December/2005 to July/2008. Sputum samples were cultured quantitatively by standard microbiological methods [19]. Isolates of *P.aeruginosa* obtained from the sputum culture were stored in glycerol at -80°C. *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* ATCC 25923 and PA01 (as reference of biofilm bacteria producing) were used for quality control.

Hypermutator phenotype was detected as previously described (Lutz et al, submitted). We included in this study nine HPM isolates from seven patients, their respective subpopulation hypermutant and nine isolates non-hypermutator (NHPM) from the same patient. We also used additional 36 NHPM isolates from other patients.

P. aeruginosa ATCC 27853 (planktonic antimicrobial susceptibility assay) and PA01 (biofilm production and biofilm antimicrobial susceptibility assay) were used for quality control.

3. DRUG SUSCEPTIBILITY

3.1. ANTIMICROBIAL AGENTS

Antibiotic were obtained from the manufacturers as follows: ceftazidime (CAZ), ciprofloxacin (CIP), tobramycin (TOB), clarithromycin (CLR) and azithromycin (AZI) (Sigma-Aldrich[®] Co, St Louis, USA). Stock solution were prepared following the instructions of the manufactures and stored at -80°C until use. Working solutions were prepared in cation-adjusted Mueller-Hinton broth (CAMHB) (Becton,Dickinson-BD[®], Sparks, USA) at 512 µg/mL for CAZ, CIP and TOB and 8192µg/mL for AZI and CLR. From these working solutions a serial two-fold dilutions were made in CAMHB in 96-well plate.

3.2. MIC AND BIC DETERMINATION

Minimal inhibitory concentration (MIC) values were determined by broth microdilution using the two-fold dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines [20]. The antibiotics concentrations tested ranged from 0.5 to 256 µg/mL for the anti-pseudomonas antibiotics CAZ, CIP and TOB and 8 to 4096 µg/mL for the macrolides AZI and CLR.

Biofilm inhibitory concentration (BIC) values were performed as previously described [21]. Prior to testing, the organism were subcultured in

trypticase soy broth with 5% KNO₃ and incubated overnight after retrieval from -80°C. Bacteria were then re-subcultured in MacConkey (bioMérieux, France) agar and incubated overnight. A bacterial suspension in CAMHB containing 5% KNO₃ was prepared with an inoculum density equivalent to 0.5 McFarland (Densimat, bioMérieux®). Afterwards, 100 µl were inoculated into all but the negative control of a flat-bottom 96-well microtiter plate. Then, plates were covered with lids presenting 96 pegs in which the biofilms can build up, followed by incubation at 37°C for 20h. Peg lids were rinsed three times with sterile saline to remove non-binding cells, placed onto flat-bottom microplates containing a range of antibiotic concentrations; pegs carrying control biofilms were submerged in antibiotic-free medium and incubated for 18 to 20h at 37°C. After antibiotic incubation, peg lids were again rinsed three times in sterile saline incubated in fresh CAMHB in a new microplate and centrifugated at 805 X g for 20 min. The peg lid was discarded and replaced by a standard lid. The optical density at 450nm was measured on a microtiter plate colorimeter before and after incubation at 37°C for 6h and 12 h. The biofilms inhibitory concentrations were defined as the lowest concentration where the medium was not turbid. CLSI criteria [22] were used to classify the isolates as "Susceptible", "Intermediate" or "Resistant".

3.3. MACROLIDES ASSAY AND INHIBITORY QUOCIENT

Antibiofilm assay was performed in a 96-well microplate containing CAZ, CIP or TOB in twofold dilutions and macrolides in sub-inhibitory concentrations of 1/128 or 1/64 of the MIC [23]. The isolates tested in this assay met the following criteria: BIC

value equivalent with “Resistant” or “Intermediate” classification according to CLSI interpretative criteria. With the purpose to assign antibiofilm activity of azithromycin and clarithromycin and to assess which sub-inhibitory concentrations were related with the best inhibitory outcome, we proposed a formulation for the inhibitory-quotient (IQ). The IQ was categorized as strong, weak or non-existent as depicted in Table 1. Strong IQ means a reduction in BIC when macrolides combination was tested and the isolates changed its classification from “Resistant” to “Susceptible”. Weak IQ means a reduction in BIC value when the isolate classification changed from “Resistant” to “Intermediate” category. Non-existent IQ means no change in the bacteria susceptibility classification.

3. RESULTS

MICs and BICs for ceftazidime, ciprofloxacin and tobramycin were performed in 55 clinical isolates of *P. aeruginosa* from 34 CF patients. The age of patients ranged from 2 to 30 years with a median of 13 years. The isolates included 11 mucoid phenotypes and 44 non-mucoid phenotypes. Percentage MIC₅₀ and BIC₅₀ values were similar only for ceftazidime and ciprofloxacin, whereas BIC₉₀ had higher values than MIC₉₀ for all drugs studied (Table 2). Statistical analysis of results obtained by the standard technique and the technique in biofilm showed no correlation between the two methodologies for ceftazidime, ciprofloxacin and tobramycin ($k=0,046$, $k=0,203$, $k=0,288$, respectively).

To better assess the relationship between differences in values of BIC and MIC, we used the CLSI interpretation criteria to classify the isolates as “Resistant”, “Intermediate” or “Susceptible”. According to this, more than 80% of isolates were “Susceptible” to the antibiotics when the minimal inhibitory concentration was measured in planktonic conditions. However, when we evaluated the antibiotic activity on biofilm the percentage of resistant isolates

increased four times to CAZ, twice to CIP and 2,5 times to TOB (Table 3). Tobramycin has shown the least action on biofilm mode of growth, with the higher number of isolates “Resistant” (38%) and ciprofloxacin was the most active on biofilm mode of growth with only 18% of isolates classified as “Resistant”.

To perform the macrolides assay for each antibiotic we have used 18 isolates “Resistant/Intermediate” to CAZ, 14 to CIP and 22 to TOB according BIC. In combination with the anti-pseudomonas antibiotics tested, azithromycin at 8 µg/mL concentration has shown a considerable decrease in BIC values leading to a classification change from “Resistant” to “Susceptible” in more than 60%. This can be evidenced by a higher percentage of “Strong” IQ (Table 4).

Although decreases of BIC values were observed when azithromycin was associated with anti-pseudomonas antibiotics, this macrolide demonstrated similarity of action against HPM and NHPM isolates when associated with tobramycin and ceftazidime (Table 5). In contrast, when associated with ciprofloxacin, azithromycin presented a better activity against NHPM than HPM ($p=0.001$).

4. DISCUSSION

Over 60% of all human infections are caused by bacteria in the form of bacterial biofilms [7]. The biofilm provides protection against the mechanisms of host immune system as well as difficult the penetration of antimicrobials. Studies have shown that the concentration of antibiotic needed to eliminate biofilm-producing bacteria is 10 to 1000 times greater than the concentration for the same species in planktonic form [24-26]. *P. aeruginosa* infections can be difficult to eradicate due to their propensity to form biofilms [27] and their inherent resistance to antibiotics. Several factors have been suggested to account for biofilm resistance: the presence of an exopolysaccharide

matrix; the presence of persisters cells; and the biofilm phenotype [28]. It has become evident that biofilm-grown cells express properties distinct from those of planktonic cells, one of which is an increased resistance to antimicrobial agents.

A recent practice guideline about CF microbiology [29] states that to deliver optimum care to CF patients is absolutely essential that the microbiology of each individual must to be fully understood. Although this guideline considers that there is no evidence to support the routine of antibiotic biofilm testing, it establishes that the bacteriological culture conditions may have a significant impact on the results of susceptibility testing. In our study we obtained a significant discordance between the susceptibility of antibiotic in planktonic grown (MIC) and in biofilm grown (BIC). In general, the BIC was considerably higher than MIC for the three antibiotics evaluated. These findings are in accordance with other studies. Aaron et al [30] obtained twelve multiresistant isolates of *P. aeruginosa* from sputum samples of six CF patients and also found isolates in biofilm less susceptible to growth inhibition and killing by antimicrobials.

Ciprofloxacin was the single antibiotic which presented the highest percentage of activity for isolates in the biofilm mode of growth. In vitro studies indicated that ciprofloxacin is one of the most active agents against bacterial biofilm of *S. aureus* and *P. aeruginosa* [31-33]. This is probably related to the fluoroquinolones propriety of killing non-growing bacteria due to its ability to penetrate into biofilms. This could explain the best results obtained in this study with ciprofloxacin against biofilm.

Decreased exacerbations and improved pulmonary function have been demonstrated in patients with *P. aeruginosa* infections whom received macrolide antibiotics; however, the mechanism underlying these beneficial results is unclear [34]. The use of azithromycin, to treat chronic infections of *P. aeruginosa* in the lungs of CF patients has been gaining favor due to the improved outcome of CF patients treated

with this antibiotic [34-36]. Azithromycin is approved for treatment of acute pulmonary bacterial infections but not against *P. aeruginosa*, as MICs are significantly higher than the maximum concentration achievable in the lung tissue [37]. The main finding of our study was that resistant *P. aeruginosa* in biofilm conditions exposed to azithromycin in combinations with ceftzidime, ciprofloxacin and tobramycin were reverted to a “Susceptible” state, regardless been hypermutable. It was suggested that macrolides can inhibit the N-acetyl L-homoserine (AHL) mediated quorum-sensing mechanism in bacteria [38,39], which will in turn inhibit biofilm formation.

In conclusion, azithromycin had an inhibitory effect on *P. aeruginosa* in biofilm grown conditions when combined with antipseudomonas antibiotics. Since the *in vitro* tests performed in this study did not provide conditions for azithromycin to act on *P. aeruginosa* as immunomodulatory properties, it is suggested that the favorable results obtained with sub-inhibitory macrolide concentrations should be related to its ability to act on the bacterial biofilm.

5. ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

We acknowledge the financial support by FIPE (Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

Table 1. Inhibitory quotient categorization for ceftazidime, ciprofloxacin and tobramycin to evaluate the activity of macrolides in different concentrations against resistant *P. aeruginosa* isolates

Antimicrobial agents	Máx. serum concentration (µg/mL)	Inhibitory Quotient		
		STRONG	WEAK	NON-EXISTENT
Ceftazidime	8	≥2	0.5	0.25
Ciprofloxacin	1	≥1	0.5	0.25
Tobramycin	4	≥2	0.5	0.25

$$IQ = \frac{\text{Máximum serum concentration}}{\text{BIC ATBx+Macrolide}}$$

Table 2. Antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* as planktonic population (MIC) and as a biofilm population (BIC)

Antimicrobial agents	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			BIC ($\mu\text{g/mL}$)		
	Range	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	BIC ₅₀	BIC ₉₀
Ceftazidime	0.5-256	2	8	0.5-256	4	256
Ciprofloxacin	0.5-32	1	2	0.5-256	0.5	16
Tobramycin	1-256	1	4	0.5-256	32	64

Table 3. Antibiotic susceptibility results of *Pseudomonas aeruginosa* as planktonic population (MIC) and as a biofilm population (BIC) according the CLSI interpretative criteria

Antibiotic	MIC (n=55)			BIC (n=55)		
	S	I	R	S	I	R
Ceftazidime	49 (89%)	2 (4%)	4 (7%)	36 (66%)	3 (5%)	16 (29%)
Ciprofloxacin	46 (84%)	4 (7%)	5 (9%)	41 (75%)	4 (7%)	10 (18%)
Tobramycin	47 (85%)	0 (0%)	8 (15%)	31 (58%)	2 (4%)	20 (38%)

S: Suscetible, I: Intermediate, R: Resistant

Table 4. Inhibitory quotient for different sub-inhibitory concentrations of azithromycin and clarithromycin against *Pseudomonas aeruginosa* resistant isolates in combination with ceftazidime, ciprofloxacin and tobramycin

Antibiotic combination	IQ Number (%) isolates		
	STRONG	WEAK	NON-EXIST
CAZ + AZI (n=18)			
2µg/MI	12 (67%)	0 (0%)	6 (33%)
8µg/MI	16 (89%)	0 (0%)	2 (11%)
CAZ + CLR (n=18)			
2µg/MI	10 (59%)	1 (6%)	6 (35%)
8µg/mL	7 (41%)	1 (6%)	9 (53%)
CIP + AZI (n=14)			
2µg/mL	8 (57%)	0 (0%)	6 (43%)
8µg/mL	9 (64%)	0 (0%)	6 (36%)
CIP + CLR (n=14)			
2µg/mL	3 (21%)	4 (24%)	7 (50%)
8µg/mL	1 (7%)	0 (0%)	13 (93%)
TOB + AZI (n=22)			
2µg/mL	18 (82%)	2 (9%)	2 (9%)
8µg/mL	14 (64%)	1 (4%)	7 (32%)
TOB + CLR (n=22)			
2µg/mL	14 (67%)	1 (5%)	3 (14%)
8µg/mL	3 (14%)	9 (43%)	9 (43%)

Table 5. Macrolides association with anti-pseudomonas antibiotics against HPM and NHPM isolates

Antibiotic combination		NHPM %(N)	HPM %(N)	TOTAL	p^a
CAZ + 2 mg/L AZI	S	88.9 (8)	46.2 (6)	63.6 (14)	0.074
	R	11.1 (1)	53.8 (7)	36.4 (8)	
CAZ + 8 mg/L AZI	S	88.9 (8)	92.3 (12)	90.9 (20)	1.000
	R	11.1 (1)	7.7(1)	9.1 (2)	
CIP + 2 mg/L AZI	S	100.0 (8)	0 (0)	50.0 (8)	0.001
	R	0 (0)	100.0 (8)	50.0 (8)	
CIP + 8 mg/L AZI	S	100.0 (8)	12.5 (1)	56.3 (9)	0.001
	R	0 (0)	87.5 (7)	43.8 (7)	
TOB + 2 mg/L AZI	S	80.0 (8)	78.6 (11)	79.2 (19)	0.930
	I	10.0 (1)	14.3 (2)	12.5 (3)	
	R	10.0 (1)	7.1 (1)	8.3 (2)	
TOB + 8 mg/L AZI	S	80.0 (8)	46.2 (6)	60.9 (14)	0.308
	I	0 (0)	15.4 (2)	8.7 (2)	
	R	20.0 (2)	38.5 (5)	30.4 (7)	

S: Suscetible, I: Intermediate, R: Resistant.

^ap (Fisher exact test).

REFERENCES

1. Staab D. Cystic fibrosis - therapeutic challenge in cystic fibrosis children. *Eur J Endocrinol* 2004;151 Suppl 1:S77-S80.
2. Baltimore RS, Christie CD, Smith GJ. Immunohistopathologic localization of *Pseudomonas aeruginosa* in lungs from patients with cystic fibrosis. Implications for the pathogenesis of progressive lung deterioration. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1650-61.
3. Costerton JW, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1987;41:435-464.
4. Drenkard E, Ausubel FM. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 2002;416:740-3.
5. Singh PK, Schaefer AL, Parsek MR, Moninger TO, Welsh MJ, Greenberg EP. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000;407:762-4.
6. Hacht RA, Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:974-7.
7. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284:1318-22.
8. Rogers GB, Hoffman LR, Whiteley M, Daniels TW, Carroll MP, Bruce KD. Revealing the dynamics of polymicrobial infections: implications for antibiotic therapy. *Trends Microbiol* 2010;18:357-364.

9. Lopez-Boado YS, Rubin BK. Macrolides as immunomodulatory medications for the therapy of chronic lung diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2008;8:286-91.
10. Schoni MH. Macrolide antibiotic therapy in patients with cystic fibrosis. *Swiss Med Wkly* 2003;133:297-301.
11. Nguyen T, Louie SG, Beringer PM, Gill MA. Potential role of macrolide antibiotics in the management of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med* 2002;8:521-28.
12. Shinkai M, Foster GH, Rubin BK. Macrolide antibiotics modulate ERK phosphorylation and IL-8 and GM-CSF production by human bronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;290:L75-L85.
13. Shinkai M, Lopez-Boado YS, Rubin BK. Clarithromycin has an immunomodulatory effect on ERK-mediated inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *J Antimicrob Chemother* 2007;59:1096-1101.
14. Shinkai M, et al. Clarithromycin delays progression of bronchial epithelial cells from G1 phase to S phase and delays cell growth via extracellular signal-regulated protein kinase suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1738-44.
15. Parnham MJ. Immunomodulatory effects of antimicrobials in the therapy of respiratory tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:125-131.
16. Culic O, Erakovic V, Parnham MJ. Anti-inflammatory effects of macrolide antibiotics. *Eur J Pharmacol* 2001;429:209-29.
17. Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:21-28.

18. Fujimura S, Sato T, Kikuchi T, Gomi K, Watanabe A, and Mchami T. Combined efficacy of clarithromycin plus cefazolin or vancomycin against *Staphylococcus aureus* biofilms formed on titanium medical devices. *Int J Antimicrob Agents* 2008;32:481-4.
19. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC. *Manual of Clinical Microbiology* 2003;8thEd. Washington, ASM Press.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. M07-A8. CLSI 2009, Wayne.
21. Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J, Burns JL. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:1915-22.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S20. CLSI 2010, Wayne.
23. Ichimiya T, Yamasaki T, Nasu M. In-vitro effects of antimicrobial agents on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *J Antimicrob Chemother* 1994;34:331-41.
24. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000;64:847-67.
25. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Reviews* 2003;2:114-122.
26. Frank KL, Reichert EJ, Piper KE, Patel R. In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:888-95.
27. Hoiby N, Krogh JH, Moser C, Song Z, Ciofu O, Kharazmi A. *Pseudomonas aeruginosa* and the in vitro and in vivo biofilm mode of growth. *Microbes Infect* 2001;3:23-35.

28. Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol* 2002;292:107-113.
29. Cystic Fibrosis Trust. Laboratory Standard for processing microbiological samples from people with cystic fibrosis. 1stEd. CFT 2010.
30. Aaron SD, Ferris W, Ramotar K, Vandemheen K, Chan F, Saginur R. Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2002;40:4172-4179.
31. Soboh F, Khoury AE, Zamboni AC, Davidson D, Mittelman MW. Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1281-1286.
32. Gander S , Gilbert P. The development of a small-scale biofilm model suitable for studying the effects of antibiotics on biofilms of gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2010;40:329-334.
33. Dasugupta MK, Shishida H, Salama S, Singh R, Larabie M, Micetich RG. The effect of macrolide and quinolone antibiotics in methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm growth. *Ad Perit Dial* 1997;13:214-17.
34. Saiman L, et al. Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 2003;290:1749-56.
35. Equi A, Balfour-Lynn IM, Bush A, Rosenthal M. Long term azithromycin in children with cystic fibrosis: a randomised, placebo-controlled crossover trial. *Lancet* 2002;360:978-84.
36. Wolter J, Seeney S, Bell S, Bowler S, Masel P, McCormack J. Effect of long term treatment with azithromycin on disease parameters in cystic fibrosis: a randomised trial. *Thorax* 2002;57:212-16.

37. Girard AE, et al. Pharmacokinetic and in vivo studies with azithromycin (CP-62,993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:1948-54.
38. Skindersoe ME, et al. Effects of antibiotics on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3648-63.
39. Gordon CA, Hodges NA, Marriott C. Antibiotic interaction and diffusion through alginate and exopolysaccharide of cystic fibrosis-derived *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1998 22:667-74.

Considerações Finais

Nos últimos anos, o papel da hipermutação no desenvolvimento de resistência a antibióticos começou a receber maior atenção. Estudos demonstraram a importância das hipermutações no processo de adaptação de *P. aeruginosa* no pulmão fibrocístico e lançam alguma luz sobre os processos genéticos que podem ser importantes nesse fenômeno e sugerem que o ambiente único do pulmão fibrocístico, com o fornecimento variável de nutrientes, oscilando a resposta inflamatória e exposição agressiva e antibioticoterapia prolongada, é altamente propício para o estabelecimento de um fenótipo hipermutante estável.

Da perspectiva da prática de microbiologia clínica, técnicas de estimativas de frequência de mutação para determinação da prevalência de populações bacterianas hipermutantes requerem o uso de procedimentos que consomem tempo e que seriam complicados de adaptar às rotinas de laboratórios clínicos de microbiologia. Portanto, métodos de suscetibilidade convencionais adaptados para detecção de subpopulações hipermutantes bem como métodos de estimativa da frequência de mutação vem sendo propostos a fim de acessar a prevalência deste fenômeno e no sentido de esclarecer sua implicação no manejo das infecções respiratórias por *P. aeruginosa* na fibrose cística.

Aplicando estas metodologias de detecção de populações hipermutantes, foi obtida, neste estudo, uma baixa prevalência deste fenômeno em *P. aeruginosa* de pacientes fibrocísticos atendidos no Centro de Referência em FC do HCPA. Além disso, não houve uma tendência de estabilidade do fenótipo hipermutante durante os 30 meses de estudo. Contudo, como a detecção de microrganismos hipermutantes se torna um desafio em laboratórios de microbiologia clínica, o fenômeno de

hipermutabilidade pode estar sendo subestimado. Portanto, é preciso estar ciente da hipermutabilidade em *P. aeruginosa* na FC, pois isso pode influenciar na terapêutica desses pacientes.

Pesquisas em biofilme têm demonstrado diferenças entre bactérias na forma plantônica e em biofilme que implicam em alterações fisiológicas devido a aderência a superfície, o que configura um fenótipo único em biofilme. Esse fenótipo único poderia indicar quando é necessário administrar antibióticos profilaticamente para prevenir infecções por bactérias em biofilme. Em nosso estudo obtivemos uma discordância significativa entre o teste de sensibilidade aos antibióticos em crescimento plantônico e em biofilme. Pode-se evidenciar também que os percentuais de resistência a todos os antibióticos testados em condições de biofilme foram mais elevados que aqueles obtidos em condições plantônicas de crescimento, com exceção da ciprofloxacina. Estudos *in vitro* revelam que a ciprofloxacina é um dos agentes mais ativos contra o biofilme bacteriano de *S. aureus* e *P. aeruginosa* e pode estar relacionada com as propriedades das fluoroquinolonas de inibir as bactérias de crescimento lento e de penetrar em biofilmes.

Diminuição das exacerbações infecciosas e melhora da função pulmonar tem sido demonstrados em pacientes com infecções por *P. aeruginosa* submetidos a antibioticoterapia com macrolídeos, porém, o mecanismo associado a estes resultados não é claro. A azitromicina é aprovada para o tratamento de infecções bacterianas pulmonares agudas, mas não contra *P. aeruginosa*, pois as concentrações inibitórias mínimas são significativamente maiores do que a concentração máxima alcançável no tecido pulmonar. Em nosso estudo a azitromicina teve um efeito inibitório na *P. aeruginosa* em condições de biofilme quando combinado com antibióticos anti-pseudomonas. Uma vez que os testes *in vitro* realizados neste estudo não oferecem condições para azitromicina agir em *P. aeruginosa* como imunomodulador, supõe-se

que a ação inibitória da azitromicina em concentrações sub-inibidoras devem estar relacionados à sua capacidade de agir sobre o biofilme bacteriano. Portanto, azitromicina pode ser considerada como importante opção terapêutica no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* através da inibição do biofilme, em conjunto com a modulação das funções imunológicas que pode ser crucial na patogênese da infecção crônica por *P. aeruginosa*.