

## **Pseudomonas aeruginosa**

Silvia Campana,  
Centro Fibrosi Cistica, Azienda Ospedaliera Universitaria Meyer, Firenze  
([S.CAMPANA@MEYER.IT](mailto:S.CAMPANA@MEYER.IT))

*P.aeruginosa* rappresenta il principale patogeno respiratorio dei pazienti affetti da FC (Jones *et al*, 2002). Infatti, negli Stati Uniti il 29.8% dei pazienti tra 2 e 5 anni e che l'81.3% dei pazienti tra 26 e 30 anni sono infettati con *P. aeruginosa*, simili prevalenze sono stati osservate anche in paesi Europei.

*P. aeruginosa* è un bacillo Gram-negativo aerobio obbligato, non fermentante, asporigeno, ubiquitario in natura, essendo diffuso in acqua, suolo e piante. Nonostante ciò, esso è un patogeno nosocomiale di notevole rilevanza data la sua capacità di sopravvivere in numerose condizioni ambientali come quelle che si ritrovano nell'ambiente ospedaliero (lavandini, soluzioni di lavaggio, disinfettanti, endoscopi, spirometri, piscine per fisioterapia). Nei soggetti sani, *P. aeruginosa* è considerato un patogeno opportunisto che, occasionalmente, colonizza la cute, l'orecchio esterno, le vie respiratorie superiori o l'intestino crasso. Le più importanti infezioni sostenute da *P. aeruginosa* sono quelle polmonari, le setticemie, otiti, infezioni urinarie e oculari, endocarditi e infezioni delle ustioni.

La ragione della peculiare predilezione di *P. aeruginosa* per l'epitelio del polmone di pazienti con FC al momento non è nota, ma recenti studi hanno fornito varie considerazioni utili a spiegare la colonizzazione microbica e la prevalenza di tale germe in questi pazienti.

Le alterazioni della proteina CFTR caratteristiche della fibrosi cistica causano una variazione ridotta dei glicolipidi e delle glicoproteine delle membrane apicali, che vanno a costituire efficienti recettori per le adesine di *P. aeruginosa*. Nelle condizioni di ridotti livelli di idratazione che si ritrovano nelle vie aeree dei pazienti con fibrosi cistica, la normale attività mucociliare può non essere efficiente nel rimuovere batteri e altri patogeni intrappolati nella barriera mucosa. Dal momento che la colonizzazione da parte *P. aeruginosa* segue quella di altri patogeni, è possibile che una preesistente infiammazione e l'incapacità di incrementare la *clearance* mucociliare in risposta alla stimolazione porti alla progressiva colonizzazione con vari microrganismi, incluso *Pseudomonas* (Govan *et al*, 1996).

La colonizzazione da parte di *P. aeruginosa* è stata suddivisa in due periodi: una prima fase di **colonizzazione precoce** e intermittente presenza del germe (Burns *et al* 2001) e una seconda fase di infezione cronica. La prima fase è stata descritta come un periodo caratterizzato dallo sporadico isolamento del batterio e normali livelli di specifici anticorpi anti-*P. aeruginosa* nel siero del paziente (Høiby *et al.*, 2005); tale periodo sembra non causare un significativo declino della funzionalità polmonare e può protrarsi per un periodo di tempo variabile da 0 a 5.5 anni. I ceppi batterici responsabili della prima colonizzazione sono simili a quelli isolati dall'ambiente, caratterizzati da rapida crescita, fenotipo non mucoide e una relativa sensibilità agli antibiotici (Jensen *et al.* 1997).

La fase successiva nella naturale progressione della malattia è lo stabilirsi di un'**infezione cronica**, che è stata definita (Johansen *et al.*,1992) come una condizione in cui il batterio è presente in coltura per un periodo di tempo minimo di sei mesi e/o in cui c'è un incremento della risposta immunitaria valutabile tramite la presenza elevati livelli di anticorpi specifici anti-*P. aeruginosa* (Govan, Deretic, 1996). Durante l'infezione cronica la popolazione batterica si adatta all'ambiente delle vie aeree FC. Tale processo è correlato con un notevole riarrangiamento genetico con accumulo di mutazioni responsabili della perdita della funzionalità di alcuni geni di *P. aeruginosa* (Smith *et al* 2006). Una mutazione molto comune in

questa fase riguarda il gene *muca* (Martin *et al* 1993) che causa la transizione da fenotipo non mucoide a mucoide caratterizzato dalla over-produzione di alginato, un polisaccaride che circonda la cellula batterica (Fig 1)

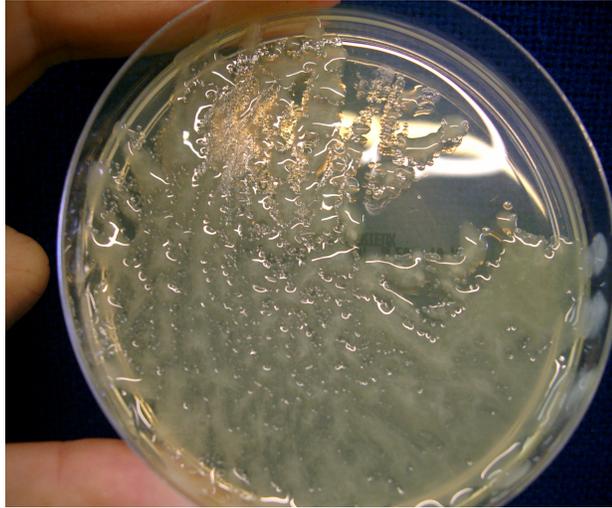


Fig.1: colonie mucoidi di *Pseudomonas aeruginosa*

All'interno di questa matrice i batteri crescono aggregate in microcolonie, organizzate in biofilm.

Le conseguenze della biosintesi dell'alginato da parte di ceppi mucoidi nel polmone di pazienti con FC sono stati ampiamente studiati (Pedersen SS, 1992) ed includono lo stabilirsi e l'intrattabilità della colonizzazione batterica e la progressiva infiammazione polmonare cui segue la malattia.

Altri cambiamenti legati al cronicizzarsi dell'infezione includono: la perdita della motilità, la perdita di un componente (antigene O) del lipopolisaccaride (LPS), la comparsa di varianti auxotrofe (Barth *et al* 2005, Luzar *et al* 1985)

La colonizzazione cronica da parte di *P. aeruginosa* è quindi attualmente considerata un evento prognostico sfavorevole per i pazienti con FC, e la prevenzione o, per lo meno, il ritardo dell'evento tramite una aggressiva **terapia al momento della prima colonizzazione**, diminuisce l'insorgenza di resistenza, riduce il numero di trattamenti antibiotici (con significativa riduzione dei costi) con importanti implicazioni per la prognosi a lungo termine (Munck *et al*, 2001, Taccetti *et al* 2005).

La percentuale di ceppi multi o pan resistenti è in preoccupante aumento in molti ambiti clinici compresa l'FC ponendo il problema di quali misure possano essere adottate per prevenire l'insorgenza di resistenze.

**Resistenze di *Pseudomonas aeruginosa*.** *P.aeruginosa* può sviluppare la resistenza ad un agente antimicrobico attraverso i seguenti meccanismi:

-alterazione del bersaglio contro il quale è diretto il farmaco

-diminuito *uptake*

-sviluppo di sistemi d'efflusso

-inattivazione o modificazione del farmaco

Tra i meccanismi di resistenza agli agenti antimicrobici si distinguono:

resistenze intrinseche o naturali

resistenze acquisite

**La resistenza intrinseca** è dovuta a caratteristiche legate alla fisiologia batterica e comprende:

- struttura della parete batterica
- meccanismo delle pompe d'efflusso
- formazione del biofilm

**La parete** circonda e racchiude completamente il batterio, e conferisce al batterio molte proprietà: forma, carattere antigene, protezione dalla lisi per osmosi, sensibilità ai batteriofagi e agli agenti chimici.

**Le pompe d'efflusso** sono sistemi che hanno la capacità di estrarre attivamente il farmaco e si basano sul principio secondo cui, per impedire l'ingresso del farmaco, è necessario estrarlo ad una velocità maggiore rispetto a quella d'ingresso.

Per *P.aeruginosa* sono state finora descritte 4 pompe d'efflusso (De Kievit et al. 2001). I geni che codificano queste pompe sono organizzati come operoni, con il primo gene che codifica una proteina di membrana il secondo gene codifica il trasportatore che esporta la sostanza attraverso la membrana interna e infine un terzo gene codifica una proteina associata alla membrana esterna che facilita il passaggio del substrato all'esterno. Questi tre componenti formano un canale che collega la membrana citoplasmatica e la membrana esterna permettendo l'efflusso diretto della sostanza dal citoplasma all'ambiente extracellulare (Fig 2).

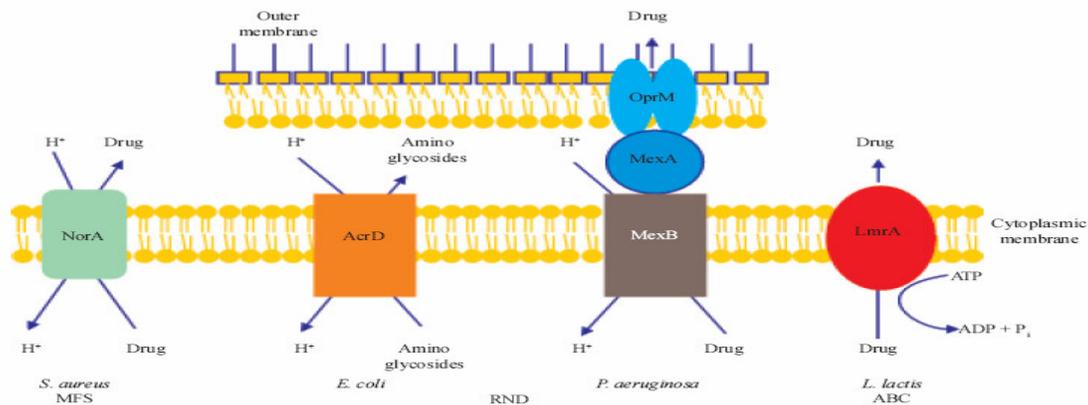
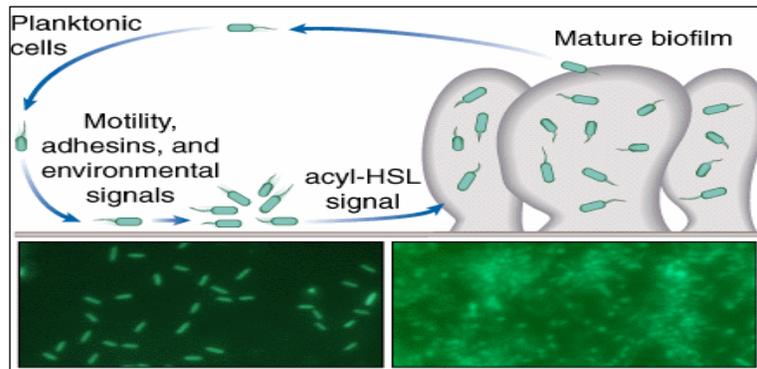


Fig. 2: struttura della pompa d'efflusso

**La formazione del biofilm** porta alla formazione di microcolonie di batteri ricoperte dall'esopolisaccaride alginato (MEP) (Fig 3). Il primo evento nella formazione del biofilm è rappresentato dal processo di adesione mediato da strutture della superficie cellulare di *P. aeruginosa*, quali il flagello e strutture di tipo CUP (Chaperone Usher Pathway); nelle fasi successive la strutturazione delle microcolonie in un biofilm maturo implica l'intervento di diversi determinanti per l'espressione di alcuni geni legati al "quorum sensing", una modalità di comunicazione tra batteri basata sulla produzione di sostanze diffusibili che correlano direttamente con la densità cellulare in un determinato ambiente. Nel caso di *P. aeruginosa* la molecola segnale è l'omoserina lattone, che interagisce tramite vari attivatori trascrizionali che coordinano l'espressione di un pool di geni correlati alla virulenza e codificanti vari fattori, quali alginato, proteasi, emolisine A e pigmenti che facilitano la persistenza del batterio nel polmone (Davies et al., 1998).

Il MEP rappresenta anche una barriera difensiva nei confronti di agenti antimicrobici e del sistema immunitario dell'ospite. La fagocitosi è inibita e contribuendo al processo infiammatorio e al danno polmonare. Inoltre, la lenta crescita batterica, limitata dalla carenza di ferro all'interno del biofilm, riduce la suscettibilità batterica agli antibiotici, contribuendo in tal modo all'inabilità ad eradicare *P. aeruginosa* anche con i trattamenti antibiotici più aggressivi.



**Fig.3:** Biofilm polisaccaridico prodotto da *Pseudomonas aeruginosa*

**La resistenza acquisita** riguarda invece i meccanismi di resistenza che i batteri hanno acquisito in seguito a differenti meccanismi di mutazioni del DNA batterico (resistenze ad evoluzione verticale), o a mutazioni dovute a trasferimento di un gene esogeno da batteri resistenti mediante processi di: trasformazione, trasduzione o coniugazione (resistenze ad evoluzione orizzontale) (Livermore *et al.* 2002).

La resistenza legata alle mutazioni cromosomiche costituisce circa il 10% delle resistenze acquisite e solitamente riguarda un solo antibiotico. Il livello iniziale di resistenza appare estremamente basso e facilmente superabile con un aumento del dosaggio del farmaco antibatterico; questo tipo di resistenza viene definito *multi-step* in quanto sono necessarie più mutazioni successive anche se in alcuni casi (per i chinolonici e la streptomina) è sufficiente una sola mutazione (*one-step*) per ottenere effetti significativi (Goodman and Gilman's 2001).

La resistenza per trasferimento orizzontale riguarda circa il 90% delle resistenze acquisite. Non si verifica solamente tra microrganismi della stessa specie, ma anche tra specie diverse e spesso riguarda resistenze multiple; cioè la resistenza non è diretta contro un solo antibiotico ma contro più antibiotici simultaneamente. La resistenza extracromosomica, inoltre, determina un'immediata resistenza al farmaco che non è superabile alzando il dosaggio (Goodman and Gilman's 2001). I meccanismi meglio conosciuti di acquisizione della multiresistenza agli antibiotici anti-*Pseudomonas* sono quattro e sono dovuti a mutazioni che:

- attivano la produzione di AmpC  $\beta$ -lattamasi (Juan *et al.* 2005).
- riducono l'espressione della porina OprD, influenzando sulla suscettibilità ai carbapenemi (Livermore *et al.* 2001).
- alterano l'espressione dei sistemi d'efflusso (Poole 2004).
- causano la formazione di topoisomerasi responsabili della resistenza ai chinolonici (Akasaka *et al.* 2001).

I principali meccanismi di resistenza acquisita di *P.aeruginosa* per le 4 classi di farmaci anti-*Pseudomonas* più utilizzati ( $\beta$ -lattamici, aminoglicosidi, fluorochinolonici, polimixine) sono i seguenti:

**La resistenza ai  $\beta$ -lattamici** Il meccanismo più comune è l'incremento della produzione di AmpC  $\beta$ -lattamasi che causa ridotta sensibilità ai  $\beta$ -lattamici quali penicilline, cefemi e monobactami (Rossolini 2005).

Sono state classificate tre tipi diversi di  $\beta$ -lattamasi :

Penicillasi a spettro ristretto che degradano le penicilline e le cefalosporine anti-*Pseudomonas*, ma non attive per i cefemi, i monobactami e i carbapenemi (Bush *et al.* 1995).

$\beta$ -lattamasi (ESBLs) ad ampio spettro che degradano penicilline, cefemi, monobactami (aztreonam), ma non i carbapenemi (imipenem e meropenem) (Bradford 2001).

Metallo- $\beta$ -lattamasi (MBL) è un tipo di resistente emergente, degradano quasi tutti i  $\beta$ -lattamici anti-*Pseudomonas* tranne i monobactami.

Gli enzimi del secondo e del terzo gruppo sono quelli clinicamente più rilevanti a causa del loro ampio spettro d'azione e sono identificati con frequenza crescente negli ambienti clinici (Bush 2001).

Le mutazioni che causano la diminuzione dell'espressione della porina OprD conferiscono resistenza all'imipenem e, in maniera ridotta, al meropenem (Rossolini 2005, Livermore 2001).

Le mutazioni che comportano l'*up-regulation* di alcuni sistemi d'efflusso possono risultare in una diminuita suscettibilità ai  $\beta$ -lattamici

**Le resistenze agli aminoglicosidi** sono dovute prevalentemente alla produzione di enzimi alterati (Poole 2005) codificati da determinanti di resistenza acquisiti per trasferimento orizzontale. Questo tipo di resistenza è dovuta all'alterazione della funzione dei seguenti enzimi: l'adenilil-trasferasi e le acetil-trasferasi (Shaw *et al* 1993).

Le resistenze ai fluorochinoloni sono dovute alle mutazioni legate all'*up-regulation* delle pompe d'efflusso, oppure a mutazioni dei siti bersaglio delle topoisomerasi (Jalal *et al* 2000).

**Le resistenze acquisite alla colistina.** La resistenza alle polimixine è molto rara, nei pazienti FC, sono state segnalate recentemente resistenze alla colistina (Hogardt *et al.* 2004). Tale resistenza sembra dovuta ad una alterazione della struttura della membrana esterna.

Le resistenze di *P. aeruginosa* ai farmaci di una determinata classe sono in genere dovute non ad un singolo fattore di resistenza, ma a vari e diversi meccanismi di resistenza che possono provocare un aumento del livello di resistenza del batterio.

La **virulenza** di *P. aeruginosa* è dovuta anche alla produzione di molti fattori (esotossina A, elastasi, proteasi alcalina, emolisine, lipopolisaccaride, pili): tossine proteiche extracellulari o di membrana che provocano una specifica risposta anticorpale subito dopo l'inizio dell'infezione; metaboliti secondari, di basso peso molecolare, che sfuggono al riconoscimento immunitario e che possono giocare un ruolo importante nell'infezione cronica; proteinasi capaci di effettuare il clivaggio delle immunoglobuline, dei componenti del complemento, della transferrina, delle citochine e dei recettori di cellule immunocompetenti.

Inoltre la patogenicità di *P. aeruginosa* è dovuta alla sua capacità di superare le barriere anatomiche, alla resistenza ad un elevato numero di antibiotici e disinfettanti, ed alla capacità di sopravvivere in molte nicchie ecologiche. Tale versatilità, può essere in parte attribuita alla alta frequenza di mutazioni spontanee cui il germe va incontro in situazioni ambientali particolari, quali la presenza di elevati gradienti di concentrazione di antibiotico e tensioni di ossigeno non uniformi, che favoriscono la selezione di ceppi ipermutabili (Oliver *et al*, 2004).

**Studi epidemiologici**, effettuati utilizzando varie metodiche di genotipizzazione, suggeriscono che la trasmissione di *P. aeruginosa* possa avvenire tramite contatto diretto tra pazienti o tramite fonti ambientali contaminate. Per tale motivo i Centri FC hanno messo a punto un programma di segregazione che prevede la separazione dei pazienti colonizzati da *P. aeruginosa* da quelli non colonizzati, allo scopo di evitare fenomeni di cross-infezione, inoltre vengono osservate misure igieniche di decontaminazione del personale medico e dell'ambiente, incluse la disinfezione di equipaggiamenti medicali e di lavandini (Saiman *et al.* 2004). Nella maggior parte dei casi il processo infettivo è sostenuto da ceppi clonali e ciascun paziente FC acquisisce un singolo ceppo di *P. aeruginosa* in modo indipendente, probabilmente da

diverse fonti ambientali (Romling *et al* 1994), tuttavia molti studi descrivono ceppi di *P. aeruginosa* altamente virulenti e trasmissibili in centri di cura FC europei ed australiani (Cheng *et al* 1996, Anthony *et al* 2002, Jones *et al* 2001, Scott FW *et al*. 2004).

La colonizzazione con alcuni di questi cloni epidemici ha un impatto negativo sullo stato clinico dei pazienti (Al-Aloul *et al* 2004).

### **Appendice tecnica**

(vedi Linee guida per l'esecuzione di campioni microbiologici dei pazienti fibrosi cistica-Gruppo di Microbiologia della SIFC)

Per l'isolamento di *P. aeruginosa* sono richiesti terreni selettivi ed consigliato l'uso di Mac Conkey Agar (o analoghi) e Agar Cetrimide (o analoghi). L'incubazione deve essere protratta oltre le 48 ore in quanto alcuni ceppi (ad esempio le varianti a colonia piccola) hanno tempi di crescita molto lenti. Dal singolo paziente si possono isolare contemporaneamente colonie con aspetto diverso (morfotipi) ognuna delle quali deve essere testata separatamente per la chemiosensibilità.

Nel caso di ceppi di *P. aeruginosa* multi o pan resistenti può essere indicato eseguire i test per le associazioni di farmaci al fine di evidenziare un eventuale effetto sinergico. L'identificazione di *P. aeruginosa* si esegue classicamente con test biochimici commerciali, tuttavia alcuni ceppi possono risultare di difficile identificazione e possono essere confusi con specie simili di gram negativi non fermentanti. La conferma dell'identificazione *P. aeruginosa* può essere effettuata con l'ausilio di tecniche molecolari, sono stati messi a punto infatti diversi metodi che sfruttano l'amplificazione di frammenti genici specifici da utilizzarsi su colonia isolata (Spilker *et al*. 2004) .

### **BIBLIOGRAFIA**

Al-Aloul M, Crawley C, Winstanley C, Hart CA, Ledson MJ, Walshaw MJ. Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax*. 2004; 59: 334-36.

Akasaka T, Tanaka M, Yamaguchi A, Sato K. Type II topoisomerase mutations in fluoroquinolone-resistant clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in 1998 and 1999: role of target enzyme in mechanism of fluoroquinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001; 45: 2263-2268.

Anthony M, Rose B, Pegler B, Elskins M, Service H, Thamotharampillai K, Watson J, Robinson M, Bye P, Merlino J, Harbour C. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 2772-78

Barth AL, Pitt TL. Auxotrophic variants of *Pseudomonas aeruginosa* are selected from protophic wild-strains in respiratory infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 1995; 33: 37-40.

Bradford P. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance treat. *Clin Microbiol Rev*. 2001; 14: 933-951.

Burns J, Gibson S, McNamara, Yim D, Emerson J, Rosenfeld M, Hiatt P, McCoy , Castile R, Smith AL, Ramsey BW: Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis.

J Infect Dis. 2001; 183: 444-452.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1211-1233.

Bush K. New-  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 1085-1089

Cheng K, Smyth RL, Govan JR, Doherty C, Winstanley C, Denning N, Heaf DP, van Saene H, Hart CA. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet* 2006; 348: 639-642.

Chernish RN, Aaron SD. Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2003;9(6):509-15. Review.

Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 1998;280(5361):295-8.

De Kievit T, Parkins MD, Gillis RJ, Srikumar R, Ceri H, Poole K, Iglewski BH, Storey DJ. Multidrug Efflux Pumps: Expression Patterns and Contribution to Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2001; 45: 1761-1770.

Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics 10/e. Mc Graw Hill 2001.

Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 1996;60(3):539-74. Review.

Hancock RE. Resistance mechanism in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 1998; 27(suppl1): S93-S99.

Høiby N, Frederiksen B, Pressler T. Eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection. *J Cyst Fibros.* 2005;4 Suppl 2:49-54. Review.

Hogardt M, Sabine Schmoltdt S, Götzfried M, Adler K, Heesemann J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54(6): 1057-1061.

Jalal S, Ciofu O, Høiby N, Gotoh N, Wretling B. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 710-712.

Jones AM, Govan JR, Doherty CJ, Dodd ME, Isalska BJ, Stanbridge TN, Webb AK. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet.* 2001; 358: 557-58

Jones AM, Dodd ME, Doherty CJ, Govan JR, Webb AK. Increased treatment requirements of patients with cystic fibrosis who harbour a highly transmissible strain of *Pseudomonas aeruginosa*. Thorax. 2002;57(11):924-5.

Jensen ET, Giwercman B, Ojeniyi B, Bansborg JM, Hansen A, Koch C, Fiehn E., Høiby N. Epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis the possible role of contamination by dental equipment. 1997; 36: 117-122.

Johansen HK, Høiby N. Seasonal onset of initial colonisation and chronic infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis in Denmark. Thorax. 1992;47(2):109-11.

Juan C, Macia MD, Gutierrez O, Vidal C, Perez JL, Oliver A. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 4733-4738.

Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps, and carbapenems. J Antimicrob Chemother . 2001; 47: 247-250.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst night- mare? Clin Infect Dis. 2002; 34: 634-640.

Luzar MA, Montie TC. Avirulence and altered physiological property of cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect Immun. 1985; 50: 572-76.

Martin DW, Scurr MJ, Mudd MH, Govan JR, Holloway W, Deretic V. mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. Proc Natl acad Sci USA. 1993; 90: 8377-81.

Munck A, Bonacorsi S, Mariani-Kurdjian P, Lebourgeois M, Gerardin M, Brahim N, Navarro J, Bingen E. Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis patients with initial and subsequent colonization. Pediatr Pulmonol. 2001; 32: 288-92

Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blasquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implication for susceptibility testing and treatment of chronic infections. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 88:4226-33

Pedersen SS, Høiby N, Espersen F, Koch C. Role of alginate in infection with mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. Thorax. 1992;47:6-13.

Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2004; 10: 12-26.

Poole K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 479-487.

Romling U, Fiedler J, Bosshammer D, Grothues D, Greipel J, von der Hartdt H, Tummler B. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. J Infect Dis. 1994; 170:1616-21

Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Microbiol Infect. 2005; 11: 17-32.

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

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

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. Microbiol Rev. 1993; 57: 138-163.

Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103: 8487-8492.

Spilker TT, Coenye T, Vandamme P, LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2074-9.

Taccetti G, Campana S, Festini F, Mascherini M, Döring G. Early eradication therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. 2005; 26:458-61.