

AVALIAÇÃO DA TRANSCRIÇÃO DO SISTEMA DE BOMBA DE EFLUXO AdeABC EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Acinetobacter baumannii* ANTES E APÓS A INDUÇÃO *IN VITRO* DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA B

Quantification of AdeABC efflux pump system transcription before and after in vitro polymyxin B resistance induction in Acinetobacter baumannii clinical isolates

PISSULIN, Camila^{1*}; SIQUEIRA, Carolina^{1*}; GIRARDELLO, Raquel²

¹Graduadas em biomedicina – Universidade São Francisco

²Professora do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde –
Universidade São Francisco

*As duas coautoras contribuíram da mesma forma para este estudo.

RESUMO

A. baumannii é classificado como um dos seis principais microrganismos multirresistentes em hospitais ao redor do mundo, sendo encontrada quase que exclusivamente em ambiente hospitalar, especialmente nas unidades de terapia intensiva (UTI). A perda ou modificação de porinas, somada a expressão de sistemas de bombas de efluxo e produção de enzimas beta-lactamases pode desempenhar papel significativo no desenvolvimento de resistência aos diversos antimicrobianos nessa espécie, sendo as polimixinas as últimas opções terapêuticas. Dois mecanismos de resistência às polimixinas foram descritos em *A. baumannii* e o segundo relata mutações nos genes que codificam o LPS bacteriano. Ambos os mecanismos levam a redução da carga de superfície e conseqüente redução da interação entre as polimixinas e a superfície celular. Este estudo tem por objetivo avaliar se o principal sistema de efluxo de *A. baumannii* AdeABC apresenta algum papel significativo na resistência à polimixina B em isolados clínicos multirresistentes. A resistência à polimixina B foi induzida por cultivos consecutivos em concentrações crescentes de polimixina B. Foi realizado teste de sensibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em caldo. PCR para oxa carbapenemases foi realizada para caracterização da resistência aos carbapenêmicos. O nível de transcrição do gene *adeB*, que compõe a bomba de efluxo AdeABC foram avaliados por qRT-PCR. Após a indução de resistência à polimixina B, aumento nas CIM para esse antibiótico e redução das CIMs para beta-lactâmicos foram observados. Além disso, redução de uma a duas vezes da transcrição do gene *adeB* foi observada em todos os isolados avaliados, quando expostos a doses subótimas de polimixina B. Nossos resultados mostram que o sistema de bomba de efluxo AdeABC parece não estar relacionado ao mecanismo de resistência às polimixinas. Por outro lado, a indução de resistência à polimixina B, por uso de concentrações subinibitórias da droga parece reduzir a expressão do sistema de bomba de efluxo AdeABC, que acarreta a reversão da sensibilidade aos beta-lactâmicos, aumentando as opções terapêuticas e reduzindo a nefrotoxicidade de doses maiores de polimixina B.

Palavras-chave: Polimixinas; carbapenêmicos; *Acinetobacter baumannii*; Sistemas de bombas de efluxo; AdeABC

ABSTRACT

A. baumannii is one of the six main multi-drug resistant microorganisms from hospitals worldwide, especially in intensive care units (ICU). The loss or modification of porins, together with the expression of efflux pump systems and beta-lactamase enzymes production, may be a significant role in the development of resistance to diverse antimicrobials in this specie, being polymyxins the last therapeutic options. Two mechanisms of resistance to polymyxins have been described in *A. baumannii* so far. The first one involves the modification of lipid A by the addition of phosphoethanolamine, and the second reports mutations in the genes encoding bacterial LPS. Both mechanisms lead to reduction of surface charge, and consequent decrease in the interaction between polymyxins and the bacterial cell. This study aims to assess whether the main efflux system of *A. baumannii* AdeABC plays a significant role in polymyxin B resistance in multi-drug resistant clinical isolates. Resistance to polymyxin B was induced by consecutive cultures in increasing concentrations of polymyxin B. Antimicrobial susceptibility tests were performed by broth microdilution. PCR for oxacarbapenemases was performed to characterize carbapenem resistance, and the transcription level of *adeB* gene, that compound the AdeABC efflux pump was evaluated by qRT-PCR. After *in vitro* induction of resistance to polymyxin B, an increase in MICs for this antibiotic and a reduction in MICs for beta-lactams were observed. Furthermore, a one- to two-fold reduction in *adeB* gene transcription was observed for all isolates evaluated, when exposed to suboptimal doses of polymyxin B. Our results show that the AdeABC efflux pump system appears to be unrelated to the resistance mechanism to polymyxins. On the other hand, the induction of resistance to polymyxin B, by using sub-inhibitory concentrations of the drug, seems to reduce the expression of the AdeABC efflux pump system, which causes a reversal of susceptibility to beta-lactams, increasing therapeutic options and reducing nephrotoxicity of higher doses of polymyxin B.

Keywords: Polymyxins, Carbapenems, *Acinetobacter baumannii*; Efflux Pump Systems; AdeABC

INTRODUÇÃO

A. baumannii é classificado como um dos seis principais microrganismos multirresistentes em hospitais ao redor do mundo (BORGES et al., 2019), sendo encontrada quase que exclusivamente em ambiente hospitalar, especialmente nas unidades de terapia intensiva (UTI), assim como, nos equipamentos de ventilação mecânica, colchões e almofadas, umidificadores e nas vestes do profissional de saúde (PICOLI et al., 2018). Estudos evidenciam que a principal via de transmissão de *A. baumannii* ocorre pelas mãos dos profissionais de saúde, sendo que os níveis de colonização por este patógeno na pele de profissionais da saúde variavam de 25 a 40%, enfatizando a importância da higienização adequada das mãos (VIEIRA et al., 2015).

No Brasil, esse microrganismo é o quarto patógeno causador de infecções de corrente sanguínea, relacionadas à assistência à saúde, em UTI adulto, sendo o segundo entre os Gram negativos (ANVISA, 2015). Segundo Vila *et al.* (2007) diversos fatores, como a habilidade de crescer com necessidades nutricionais mínimas em diferentes valores de temperaturas e pH, facilitam a capacidade de adaptação de *A. baumannii*. Fatores de virulência, como produção de *pili* e a capacidade de síntese de biofilme, sideróforos, entre outros, provavelmente também colaboram na capacidade de adaptação dessa espécie. Esses fatores promovem alta capacidade de sobrevivência no ambiente hospitalar e, associados às altas taxas de resistência e contra processos de descontaminação, além da produção de fatores de virulência, torna os microrganismos da espécie *A. baumannii* um grave problema para o controle e disseminação de infecções e surtos em todo o mundo. *A. baumannii* é capaz de sobreviver em superfícies por cerca de 25 dias, o que explica a alta patogenicidade entre os pacientes hospitalizados (RICAS et al., 2013; NOWAK et al., 2016).

A. baumannii é um patógeno oportunista de grande importância nas infecções relacionadas à assistência à saúde e de pacientes imunocomprometidos, causando infecções em diversos sítios como pneumonia, corrente sanguínea, urina, meningite, entre outros. *A. baumannii* também pode colonizar a microbiota da pele, principalmente em regiões como a axila e a virilha (VILA et al., 2007). Essas infecções, por muitas vezes, são difíceis de serem tratadas devido a sua alta resistência aos antimicrobianos. Ainda que os carbapenêmicos sejam utilizados como recurso terapêutico para *A. baumannii*, a transmissão de resistência desse microrganismo, principalmente pela produção de enzimas beta-lactamases da classe das oxacilinas, coloca em risco o resultado do tratamento com estes fármacos (BOETTGER et al., 2020).

Estudos mostram que *A. baumannii* apresentam menor permeabilidade da membrana celular externa em relação à superfície de outros bacilos Gram negativos, devido ao menor número e tamanho das suas porinas (VILA et al., 2007). Além disso, a perda ou modificação de porinas, somada a expressão de sistemas de bombas de efluxo e produção de enzimas beta-lactamases pode desempenhar papel significativo no desenvolvimento de resistência aos diversos antimicrobianos nessa espécie (SATO & NAKAE 1991; OBARA & NAKAE, 2001).

Os sistemas de bomba de efluxo são mecanismos considerados comum entre as bactérias Gram-negativas. São compostos por proteínas da membrana externa, associada a uma proteína de membrana interna, que têm como função proteger as células de efeitos tóxicos, à medida que realizam o efluxo de metabólitos, além de enzimas necessárias para o metabolismo celular. Em determinadas situações, podem ser hiperexpressas e contribuir para a resistência aos antibióticos, ejetando uma quantidade significativa desses agentes para fora da célula bacteriana, impedindo sua atividade. Uma importante característica desse mecanismo é a variada especificidade de substratos apresentada pelas bombas de efluxo, ou seja, sua capacidade de expulsar da célula bacteriana, antibióticos de diferentes classes, favorecendo a multirresistência aos antibióticos (SIMÕES et al., 2016).

Os sistemas de bombas de efluxo são divididos em 6 famílias: sistema de ligação de ATP (ABC), facilitadores principais (MFS), família resistência-nodulação-divisão (RND), família de extrusão de multidrogas e compostos tóxicos (MATE), família de baixa resistência a multidrogas (SMR) e superfamílias das transportadoras drogas/metabólitos (DMT). Em *A. baumannii*, esta resistência está associada, principalmente, ao sistema de bomba de efluxo denominado AdeABC, pertencente à família RND. AdeA é uma proteína transmembrana, o AdeB é um transportador (a bomba propriamente dita) e AdeC é uma proteína de membrana externa (MARCHETTI et al., 2010).

Os antimicrobianos mais comuns expelidos pelas bombas de efluxo são de maneira geral os macrolídeos, tetraciclina, quinolonas e os beta-lactâmicos. Antibióticos beta-lactâmicos são considerados a principal alternativa terapêutica para infecções relacionadas à assistência à saúde por *A. baumannii*. No entanto, os diversos mecanismos intrínsecos e adquiridos de microrganismos dessa espécie, com frequência os torna multirresistentes (VIEIRA et al., 2015). Em torno de 80% das infecções adquiridas em ambiente hospitalar por *A. baumannii* apresentam também resistência aos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos. A produção de oxacilinas é o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, sendo a OXA-23 e OXA-72, as enzimas mais disseminadas no Brasil (VASCONCELOS et al., 2015; BOETTGER et al., 2020). Recentemente, a indústria farmacêutica tem lançado novas opções para enzimas carbapenemases produzidas por enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*, no entanto, nenhum desses novos antibióticos tem atividade contra as oxacilinas de *A. baumannii*. Dessa forma, as polimixinas acabam sendo a última opção terapêutica para essas infecções graves (VASCONCELOS et al., 2015).

As polimixinas foram descobertas em 1947, a partir de moléculas produzidas por bactérias da espécie *Paenibacillus polymyxa* e se apresentam em duas formas clínicas, polimixina B, mais utilizada no Brasil e polimixina E, também chamada de colistina, mais utilizada em outros países. As duas moléculas se diferenciam por um único aminoácido, D-Leucina na molécula de colistina e D-Fenilalanina na molécula de polimixina B (BERGEN et al., 2006). Devido à sua natureza catiônica, as polimixinas possuem ação detergente, ligando eletrostaticamente seu anel policatiônico com os componentes da parede celular bacteriana, removendo as moléculas de Ca^{2+} e Mg^{2+} . Essa remoção de cátions desestabiliza a parede bacteriana, levando à formação de poros, levando à perda do conteúdo citoplasmático, e consequente morte celular. As polimixinas foram muito utilizadas até a década de 1970. No entanto, devido à nefrotoxicidade e à neurotoxicidade relacionadas ao seu uso, essas drogas foram substituídas por outros antimicrobianos que apresentavam o mesmo espectro de ação; porém, com menor toxicidade, como as cefalosporinas de amplo espectro e os aminoglicosídeos. No final da década de 90, as altas taxas de multirresistência apresentadas por bacilos Gram-negativos restringiram a escolha dos antimicrobianos para o tratamento de infecções causadas por esses agentes. Dessa forma, as polimixinas retornaram ao cenário hospitalar (LANDMAN et al., 2008; GIRARDELLO et al., 2016).

Dois mecanismos de resistência às polimixinas foram descritos em *Acinetobacter* spp. até o momento. O primeiro consiste na modificação no lipídio A do lipopolissacarídeo (LPS) que compõe a parede celular de bactérias Gram negativas, por adição de fosfoetanolamina, que leva a redução da carga negativa da superfície celular bacteriana e a consequente diminuição da sua interação com as polimixinas (ARROYO et al., 2011; BECEIRO et al., 2011). Esse mecanismo é controlado por um sistema de dois componentes denominado PmrAB. Esse sistema é composto por duas proteínas. A primeira funciona como sensor quinase PmrB, percebendo as alterações ambientais, entre elas, variações nos níveis de cátions e pH, e desencadeando a autofosforilação da proteína citoplasmática PmrA. Depois de fosforilada, PmrA regula a expressão do gene *pmrC* que promove a modificação do lipídio A pela adição de uma molécula de fosfoetanolamina. Mutações nos genes que compõem o sistema de dois

componentes PmrAB foram descritos em cepas que apresentavam resistência às polimixinas (ADAMS *et al.*, 2009; ARROYO *et al.*, 2011; BECEIRO *et al.*, 2011; PARK *et al.*, 2011).

O segundo mecanismo descrito em *Acinetobacter* spp. é a perda total de LPS. Esse mecanismo é resultante de mutações pontuais ou inserções em genes que compõem a via de síntese do lipídio A, *lpxA*, *lpxC* e *lpxD* (MOFFATT *et al.*, 2010; MOFFATT *et al.*, 2011; VILA-FARRÉZ *et al.*, 2015).

As taxas de resistência às polimixinas em isolados de *A. baumannii* ainda são baixas, quando comparadas a isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, entretanto, isolados de *A. baumannii* multirresistentes apresentando elevadas MICs para polimixinas vem sendo descritos em todo o mundo (Li *et al.*, 2006; Skiada *et al.*, 2011; Vasconcelos *et al.*, 2015; Rossi *et al.*, 2017). Por outro lado, é comum na clínica observarmos o surgimento de resistência durante o tratamento com polimixina B, provavelmente resultando da indução pela exposição à doses subótimas.

Diversos mecanismos de resistência às polimixinas foram descritos até o momento, sendo a maioria em isolado de *Klebsiella pneumoniae*. Estudos com *A. baumannii* tem mostrado dois principais mecanismos de resistência envolvidos com a redução da carga negativa da superfície e diminuição da interação da molécula de polimixina, que é policatiônica, com a superfície da célula bacteriana. Entretanto, apesar de muitos estudos, relatos de cepas resistentes sem mecanismo esclarecido ainda são publicados (GIRARDELLO *et al.*, 2016). A hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo é um mecanismo muito descrito em isolados de Gram negativos, levando à resistência à diversos antibióticos, entre eles, quinolonas, macrolídeos, aminoglicosídeos e beta-lactâmicos (BOETTGER *et al.*, 2020). Alguns estudos com polimixina sugerem a participação de bombas de efluxo na resistência às polimixinas, mas esse mecanismo não está completamente elucidado (SUNDARAMOO *et al.*, 2020).

A elucidação de mecanismos de resistência às polimixinas é de essencial importância nos dias de hoje, levando em consideração a importância clínica da espécie *A. baumannii* e a falta de opções terapêuticas disponíveis atualmente. Sendo assim, este estudo tem por objetivo avaliar a transcrição do sistema de bomba de efluxo AdeABC em isolados clínicos de *A. baumannii* com resistência induzida à polimixina B.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção dos isolados clínicos de *A. baumannii*

Os isolados clínicos de *A. baumannii* foram selecionados a partir do banco de microrganismos do Laboratório de Microbiologia Molecular e Clínica, do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências da Saúde da USF, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da USF, sob número CAAE: 44416021. Como critérios de inclusão no estudo, foram considerados isolados bacterianos diferentes perfis de sensibilidade aos antibióticos, desde que sensíveis à polimixina B. Não foram incluídos no estudo mais de um isolado pertencente ao mesmo paciente, para evitar a seleção de cepas clonais.

Indução de resistência à polimixina B

Os isolados clínicos de *A. baumannii* foram submetidos ao cultivo em concentrações crescentes de sulfato de polimixina B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), em dias consecutivos, iniciou-se com a concentração de 0,125 µg/mL. Os subcultivos foram realizados

em meio Luria Bertani Ágar cátion ajustado (LBA-CA) até a obtenção de uma concentração inibitória mínima (CIM) de no mínimo 4 µg/mL que corresponde a CIM de resistência pelo documento BrCast, 2021 (Figura 1). O tempo necessário até que essa concentração seja atingida pode variar entre de 16 a 78 dias, dependendo do isolado. Após a indução de resistência, os isolados foram armazenados em TSB+15% de glicerol e 4 µg/mL de sulfato de polimixina B, a -20°C para posterior realização dos experimentos.

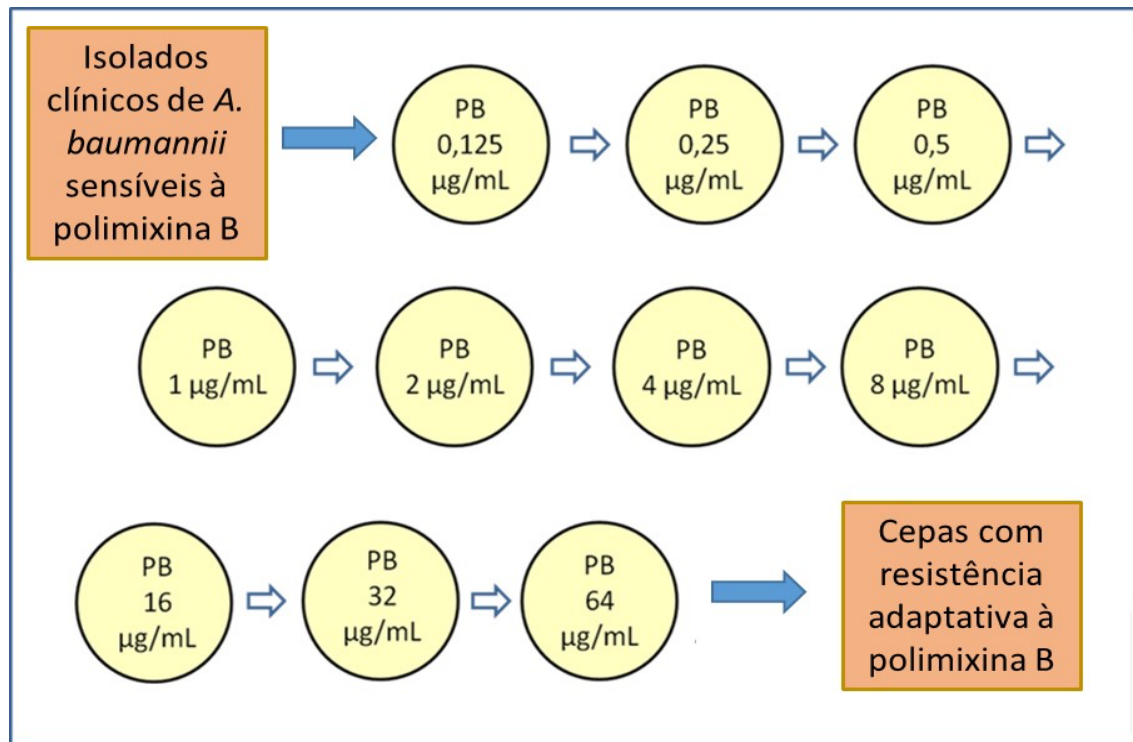


FIGURA 1. Desenho esquemático das passagens de subcultivos na presença de concentrações crescentes de sulfato de polimixina B para a indução de resistência à mesma, nos isolados de *A. baumannii*.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados clínicos de *A. baumannii*, antes e depois da indução de resistência à polimixina B, foi determinado pela metodologia de microdiluição em caldo, conforme recomendado pelo BrCast, 2021, para os seguintes antimicrobianos: polimixina B (0,125 – 128 µg/mL), imipenem (0,25 – 128 µg/mL) e meropenem (0,125 – 64 µg/mL). Os sais dos antimicrobianos foram obtidos da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Soluções estoque dos antimicrobianos foram preparadas em uma concentração 20 vezes superior à última concentração testada na placa, de acordo com as recomendações do BrCast, 2021. As soluções de uso de cada antimicrobiano foram preparadas a partir de uma diluição 1:10 da solução estoque, seguida de diluições seriadas até a obtenção da menor concentração.

As placas foram preparadas com os antimicrobianos 2 vezes concentrados, para que atingissem a concentração necessária após a adição do mesmo volume de inóculo. A partir da maior concentração, foram realizadas diluições seriadas até a menor concentração do range da placa de microdiluição (Figura 2). Cem microlitros de cada diluição foram dispensados em microplaca de 96 poços com fundo em U. Em todas as placas foram adicionados seis isolados

testes e duas cepas ATCC, um controle de esterilidade e um controle de crescimento para cada isolado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	C+	C-
B	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	C+	C-
C	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	C+	C-
D	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	C+	C-
E	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	C+	C-
F	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	C+	C-
G	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	C+	C-
H	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	C+	C-

FIGURA 2. Modelo esquemático de placa de microdiluição em caldo.

O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina 0,85% até atingir uma turbidez correspondente à escala 0,5 de McFarland (1.5×10^8) e diluído em caldo Mueller-Hinton cátion ajustado, para a concentração de 2.5×10^5 para obtenção de um volume final de 15 mL. Cem microlitros do inóculo bacteriano foi dispensado nas placas de microdiluição e assim, sua diluição e as concentrações dos antimicrobianos caíram pela metade ao final do teste. Foram utilizadas como controle de qualidade as cepas ATCC 25.922 de *E. coli* e ATCC 27.853 de *P. aeruginosa*.

A leitura das placas de microdiluição foi realizada visualmente. Foi considerada a CIM a primeira concentração a inibir completamente o crescimento bacteriano. Os resultados foram interpretados de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCast, 2021 (<http://brcast.org.br/documentos/>) e pelo CLSI, 2021.

PCR para OXA carbapenemases

Os isolados foram submetidos à PCR para detecção das seguintes OXAs-carbapenemase: OXA-51, OXA-23, OXA-24/40, OXA-72, OXA-143 e OXA-234, de acordo com protocolo descrito por Higgins et al. (2013). A PCR foi realizada em Termociclador Applied Biosystems e o gel de agarose foi corado com brometo de etídio e analisado sob luz ultravioleta.

Quantificação relativa da transcrição gênica de AdeB por PCR em tempo real

Os isolados clínicos de *A. baumannii* foram cultivados em 20 mL de Caldo LB na presença e ausência de 4 µg/mL de sulfato de polimixina B (Sigma-Aldrich, St Louis, MO,

USA) a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob agitação, até atingir uma absorbância de 0,5 a 0,6 a um comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro BioMate 5 ThermoSpectronic (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), correspondente à fase exponencial de crescimento. Um mililitro da cultura foi adicionado a 1 mL de RNA Protect Bacteria Reagent (Qiagen, Hilden, Alemanha), homogeneizado por completo em vórtex e incubado por 5 minutos em temperatura ambiente. Transcorrido esse período, foi realizada uma centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm em temperatura ambiente. Esse processo foi realizado por duas vezes. O sedimento resultante foi ressuspenso em 400 μL de lisozima a 15 mg/mL e, então, o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. Para retirada de resíduos de DNA bacteriano foi realizado um tratamento com RNase Free-DNase Set (Qiagen, Hilden, Alemanha) durante a extração do RNA.

O RNA total foi quantificado no aparelho NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences) verificando a integridade do extrato, por meio da razão 260/280, acima de 1,8.

A reação de transcriptase reversa foi realizada utilizando o RNA total de cada amostra, a uma concentração final de 30 ng/mL, utilizando High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi incubada por 10 minutos a 25°C , seguido por 120 minutos a 37°C , em termociclador (Eppendorf). O cDNA foi armazenado em freezer -80°C até sua utilização.

O cDNA preparado a partir da extração de RNA total das amostras de *A. baumannii*, sensíveis e resistentes à polimixina, foi submetido à reação de PCR em tempo real utilizando sequências de oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen, Eragny, France) previamente descritos: adeA F: 5'GGATTATGGCGACAGAAGGA3' e adeB R: 5' AATACTGCCCAATACCAG3' (Pereira, 2009).

As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata utilizando 12,5 μL de Platinum SyBR Green qPCR com ROX (Invitrogen, Eragny, France), adicionado de 0,25 μL de cada oligonucleotídeo iniciador a uma concentração de 10 μM . À mistura, foi adicionado 2 μL de cDNA para obtenção de um volume final de 25 μL . A reação de PCR foi realizada no equipamento Real Time 7500 (Applied Biosystems, Warrington, United Kingdom).

Para determinação da eficiência de cada oligonucleotídeo foi realizada uma curva de desnaturação (“melting curve”) utilizando um extrato de DNA a partir de um inóculo bacteriano do isolado sensível, na escala 0,5 de McFarland. Desse inóculo inicial foi realizada uma diluição seriada de 1:10 até a diluição de 10^{-8} . Todas as reações de qRT-PCR foram realizadas em triplicata, o gene ribossomal 16S foi utilizado como gene de referência da transcrição dos genes alvo e a cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizada para a normalização da reação.

A eficiência das reações de amplificação dos genes estudados foi determinada de acordo com a fórmula $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$, onde “slope” representa a inclinação da reta no gráfico de regressão linear das médias dos valores de C_t observadas nas 3 replicatas das reações de qRT-PCR. C_t (“Ciclo Threshold”) e foi considerado o ciclo em que foi detectada a fluorescência durante a amplificação da reação de qRT-PCR, acima do limite basal de fluorescência observada no início da reação.

A análise da expressão foi realizada utilizando o software SDS v 2.0 (Applied Biosystems, Warrington, Reino Unido) pelo método C_t comparativo (ΔC_t), onde a expressão normalizada (EN) é calculada de acordo com a fórmula $\Delta C_t = C_{t_{\text{gene alvo}}} - C_{t_{\text{gene endógeno}}}$. Para a correção do cálculo da RQ, a eficiência da reação de cada gene foi calculada utilizando o modelo matemático descrito por Pfaffl *et al.* (2001), utilizando o software SDS v 2,0.

A transcrição relativa de cada gene alvo para os isolados clínicos induzidos de *A. baumannii* foi calculada em relação à transcrição apresentada pelos isolados clínicos correspondentes, a partir da diferença entre o ΔC_t de cada gene alvo na amostra referência e o ΔC_t de cada gene na amostra a ser testada. Dessa forma, o valor de RQ indica quantas vezes

um gene é transcrito em uma amostra em relação à expressão quantificada na amostra usada como referência, utilizando a fórmula $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$.

RESULTADOS

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Todos os isolados de *A. baumannii* foram originalmente sensíveis à polimixina B, com CIMs variando de 0,125 a 0,5 µg/mL. Após a indução *in vitro* de resistência à polimixina B, todos os isolados passaram da categoria de sensível para resistente à polimixina B, com CIMs variando de 4 a >128 ug/mL (Figura 3). Foi observado um aumento de, ao menos, 4 logs após a indução, sendo que 11 das 16 amostras, apresentaram CIMs > 32 ug/mL, considerada uma CIM elevada quando levando em consideração fatores clínicos.

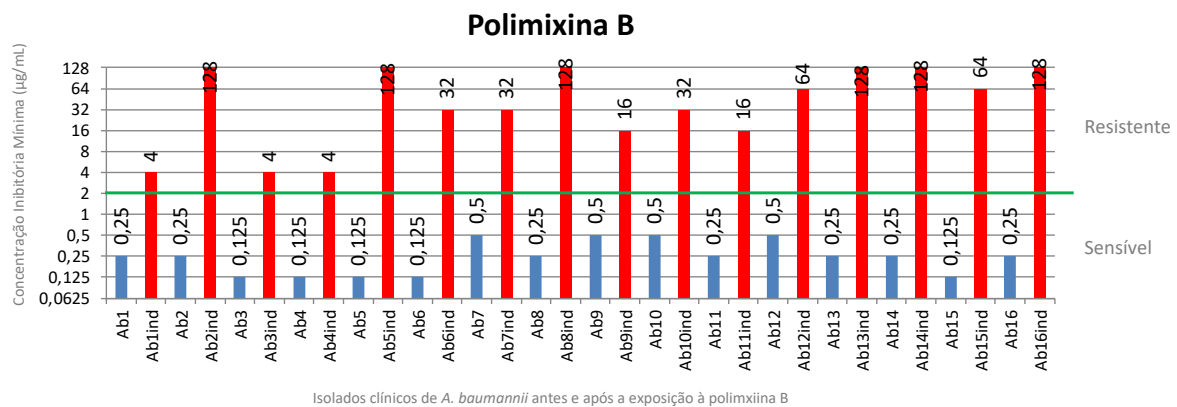


FIGURA 3. Teste de sensibilidade à polimixina B resultante da indução de resistência. Colunas azuis representam o isolado clínico original. Colunas vermelhas representam as cepas bacterianas após o processo de indução *in vitro* da resistência à polimixina B. A linha horizontal verde corresponde ao ponto de corte para resistência (>2 µg/mL), de acordo com BrCast 2021.

Associado a isso, foi observada uma redução expressiva das CIMs para os antibióticos da classe dos beta-lactâmicos, em todos os isolados que apresentavam resistência para tais. Quatro isolados apresentaram, inicialmente, elevadas CIMs para ampicilina/sulbactam (de 32 a 256). Após a exposição à polimixina B e suas CIMs reduziram em 5 logs, atingindo a categoria de sensível (Figura 4).

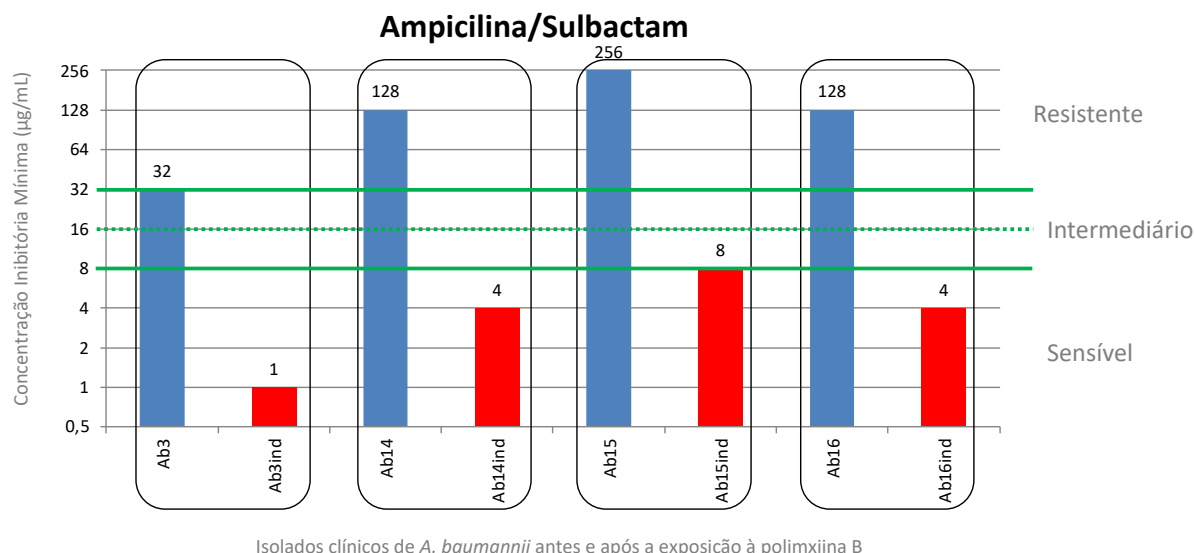


FIGURA 4. Teste de sensibilidade à ampicilina com sulbactam, antes e após a indução de resistência à polimixina B. Colunas azuis representam os isolados clínicos originais. Colunas vermelhas representam as cepas bacterianas resultantes da indução *in vitro* à resistência à polimixina B. Linhas horizontais verdes contínuas correspondem aos pontos de corte para categoria de sensível e resistente, de acordo com CLSI, 2021.

Quando avaliados os antibióticos do grupo das cefalosporinas, foi observada redução das CIM para cefotaxima, ceftazidima e cefepime, para todos os isolados, inclusive para os que já apresentavam CIMs na categoria de sensibilidade (Figura 5).

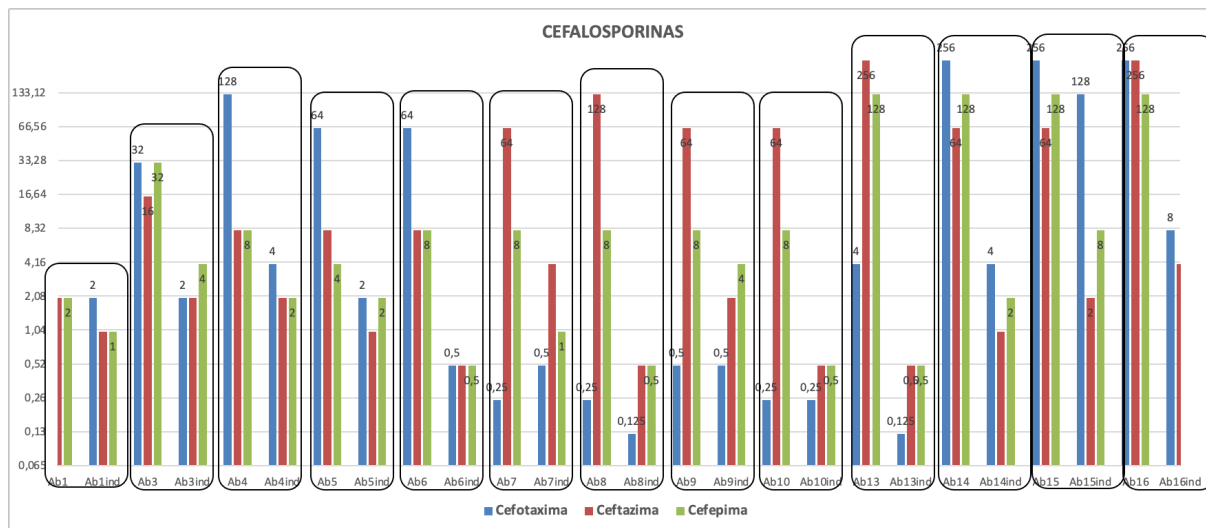


FIGURA 5. Teste de sensibilidade aos antibióticos beta-lactâmicos da classe das cefalosporinas. Colunas azuis representam os isolados clínicos originais. Colunas vermelhas representam as cepas bacterianas resultantes da indução *in vitro* à resistência à polimixina B.

Três dos 16 isolados foram resistentes aos antibióticos carbapenêmicos, mas tiveram suas CIMs reduzidas para a categoria de sensibilidade, tanto para imipenem, quanto para meropenem. (Figura 6), após a indução de resistência à polimixina B.

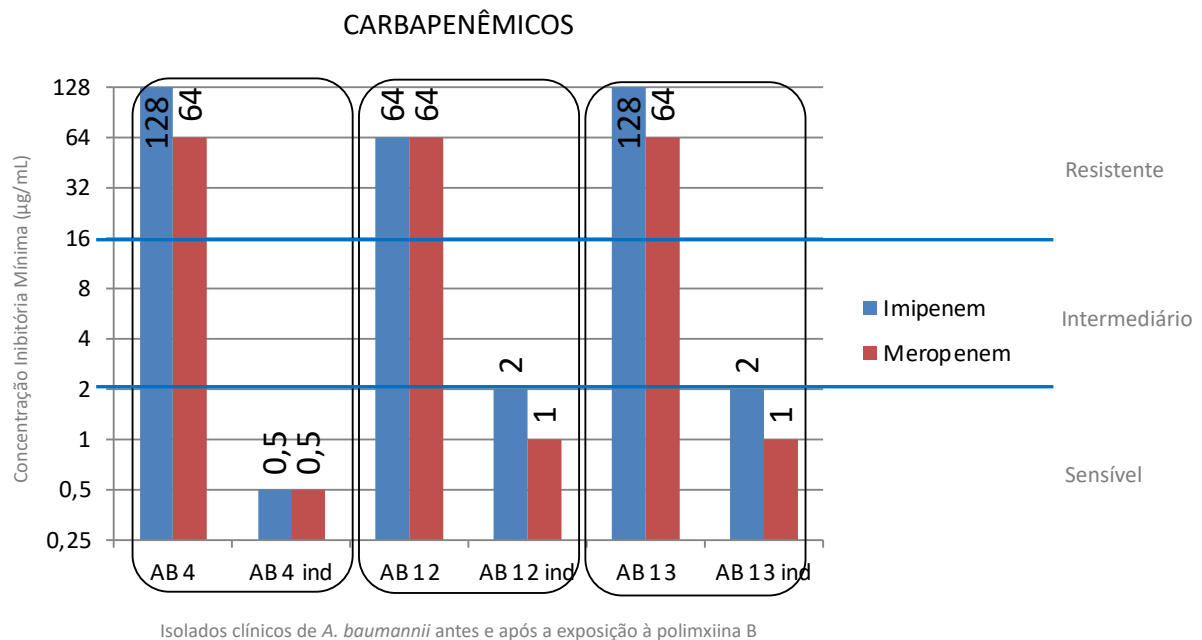


FIGURA 6 Teste de sensibilidade aos antibióticos da classe dos carbapenêmicos, antes e após a indução de resistência à. Coluna azul representa o resultado da CIM para o antibiótico imipenem. Coluna vermelha representa o resultado da CIM para o antibiótico meropenem, AB 4, AB 12 e AB 13 correspondem aos isolados clínicos originais. AB 4 ind, AB 12 ind e AB 13 ind correspondem às cepas bacterianas após a indução *in vitro* de resistência à polimixina B.

Para os antibióticos das outras classes, não foi observada alteração de CIMs após a indução de resistência à polimixina B (Tabela 1).

TABELA 1. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *A. baumannii* antes e após a indução de resistência à polimixina B.

Isolado	Teste de sensibilidade aos antibióticos					
	CIM em ug/mL (categoria de sensibilidade ^b)					
	AMI	GEN	CIP	LEV	MIN	TIGE
Ab1	1 (S)	0.5(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab1ind ^a	2 (S)	0.5(S)	≤0.125(S)	≤0.125(S)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab2	2(S)	1(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	≤0.125(S)	0.5
Ab2ind ^a	≤0.5(S)	0.25(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab3	2(S)	0.5(S)	0.5(S)	≤0.125(S)	0.25(S)	0.25
Ab3ind ^a	≤0.5(S)	≤0.125(S)	0.25(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab4	1(S)	0.5(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	0.125(S)	0.5
Ab4ind ^a	1(S)	0.5(S)	0.25(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab5	1(S)	0.25(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	0.125(S)	≤0.125
Ab5ind ^a	2(S)	0.5(S)	≤0.125(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab6	1(S)	0.25(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	0.25(S)	0.25
Ab6ind ^a	1(S)	0.5(S)	0.25(S)	≤0.125(S)	0.25(S)	0.25
Ab7	0.5(S)	0.5(S)	2(R)	0.25(S)	0.25(S)	0.25
Ab7ind ^a	2(S)	2(S)	2(R)	≤0.125(S)	0.25(S)	≤0.125
Ab8	0.25(S)	1(S)	8(R)	≤0.125(S)	0.125(S)	0.25
Ab8ind ^a	≤0.5(S)	≤0.5(S)	≤0.25(S)	≤0.125(S)	≤0.125(S)	0.25
Ab9	0.5(S)	1(S)	4(R)	0.5(S)	0.5(S)	0.5
Ab9ind ^a	2(S)	2(S)	4(R)	0.25(S)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab10	0.5(S)	1(S)	2(R)	≤0.125(S)	0.25(S)	0.25
Ab10ind ^a	1(S)	1(S)	0.5(S)	≤0.125(S)	0.125(S)	≤0.125
Ab11	0.25(S)	0.5(S)	4(R)	0.25(S)	≤0.125(S)	0.25
Ab11ind ^a	2(S)	2(S)	4(R)	0.5(S)	0.25(S)	≤0.125
Ab12	0.5(S)	4(S)	1(S)	0.5(S)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab12ind ^a	1(S)	1(S)	0.5(S)	≤0.125(S)	0.25(S)	≤0.125
Ab13	0.25(S)	4(S)	64(R)	>64(R)	≤0.125(S)	0.25
Ab13ind ^a	≤0.5(S)	≤0.5(S)	8(R)	8(R)	≤0.125(S)	0.25
Ab14	1(S)	1(S)	64(R)	16(R)	0.5(S)	2
Ab14ind ^a	≤0.5(S)	0.5(S)	16(R)	4(R)	0.25(S)	≤0.125
Ab15	128(R)	16(R)	>64(R)	8(R)	0.5(S)	2
Ab15ine ^a	16(I)	8(R)	16(R)	4(R)	≤0.125(S)	≤0.125
Ab16	128(R)	4(S)	>64(R)	16(R)	0.5(S)	4
Ab16ind ^a	32(R)	2(S)	16(R)	4(R)	≤0.125(S)	2

^aCepas resultantes da indução de resistência à polimixina B.

^bCategoria de sensibilidade interpretada de acordo com os pontos de corte do BrCast, 2021.

Detecção de oxacilinases nos isolados resistentes aos carbapenêmicos

Foi observada a presença do gene plasmidial que codifica a enzima oxacilinase OXA-23 nos 3 isolados resistentes aos carbapenêmicos. Após a indução da resistência às polimixinas, os genes plasmidiais permaneceram detectados nos isolados.

Quantificação da transcrição gênica do gene *adeB*

Todos os isolados clínicos foram submetidos à quantificação da transcrição do gene *adeB*, que compõe do sistema de bomba de efluxo AdeABC, antes e após a indução de resistência à polimixina B.

Após a exposição dos isolados clínicos às concentrações subótimas de polimixina B, todos os isolados avaliados neste estudo apresentaram redução de 1 a 2 vezes na transcrição do gene *adeB*, conforme observado na Figura 7.

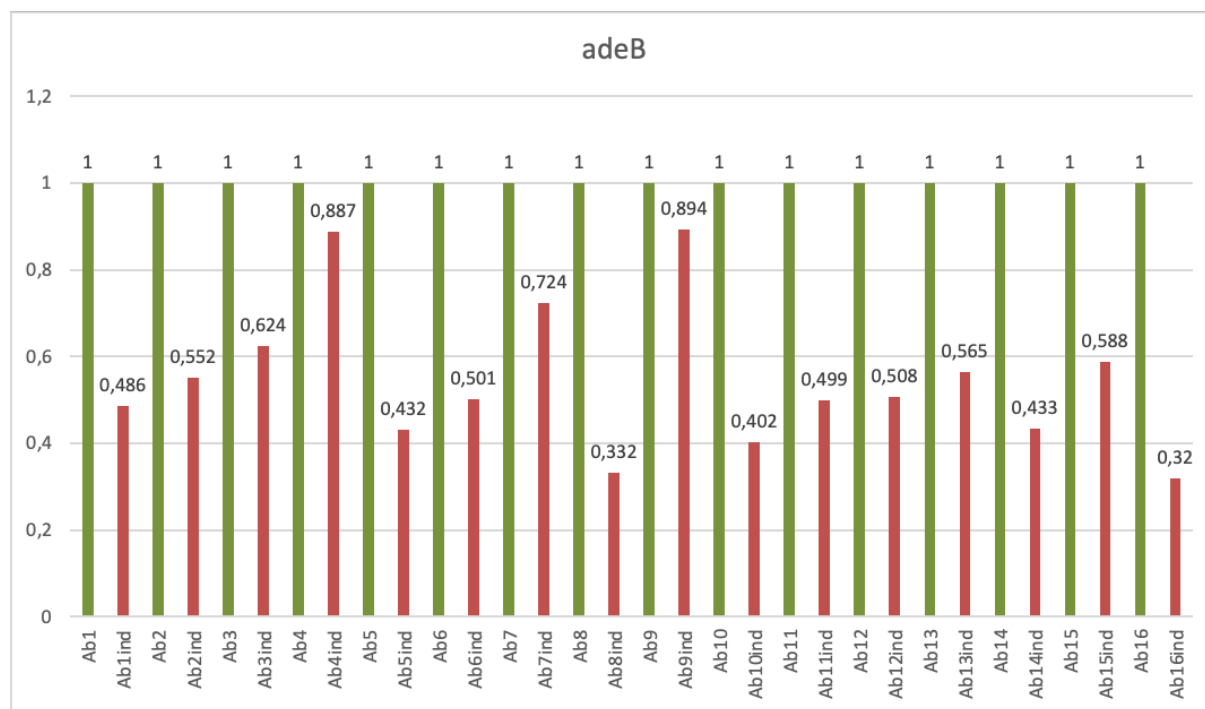


FIGURA 7. Quantificação da transcrição do gene *adeB*. Colunas verdes representam os isolados clínicos originais. Colunas vermelhas representam as cepas bacterianas resultantes da indução *in vitro* à resistência à polimixina B.

DISCUSSÃO

A. baumannii é um patógeno de grande importância clínica, classificado pela OMS como um dos patógenos crítico para resistência aos antibióticos (OMS, 2017). Responsável por altas taxas de mortalidade em ambiente hospitalar, essa espécie é o quarto patógeno - segundo entre os Gram-negativos – causador de infecções de corrente sanguínea em pacientes internados em UTI no Brasil (ANVISA, 2016). *A. baumannii* é um patógeno Gram-negativo pertencente ao grupo das bactérias não fermentadoras de glicose, que apresentam, dentre várias características, uma origem ambiental, que lhe confere resistência intrínseca à grande parte dos antibióticos disponíveis clinicamente, tornando os beta-lactâmicos a principal opção

terapêutica. Associado a isso, sua grande capacidade de sobrevivência em ambientes inóspitos, como o ambiente hospitalar, contribui para que *A. baumannii* adquira diferentes mecanismos de resistência (VILA et al., 2007). O resultado disso é que, de acordo com relatório da ANVISA (2016), essa espécie apresenta em torno de 80% de resistência aos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, quando isolados de pacientes internados em UTI no Brasil, o que acarreta elevadas taxas de mortalidade atribuídas.

Para os isolados que apresentam resistência aos beta-lactâmicos, as polimixinas são as únicas opções terapêuticas (GIRARDELLO et al., 2012). No entanto, é comum observarmos o surgimento de resistência a esse antibiótico, durante seu uso terapêutico, devido a doses subótimas que, com frequência são administradas, devido à nefrotoxicidade apresentada por essas drogas (ZAVASCKI et al., 2017). Em nosso estudo, foi observada a indução de resistência à polimixina B após exposição a doses subinibitórias dessa droga, atingindo CIMs muito elevadas.

Para evitar subdoses, é aconselhado que as polimixinas sejam usadas sempre em associação com um carbapenêmico para infecções por *A. baumannii*, mesmo quando esses isolados apresentarem resistência *in vitro* à essa classe. Sucesso terapêutico já foi descrito com a associação entre essas duas drogas, mas o mecanismo envolvido no sucesso dessa terapia ainda não é conhecido (ZAVASCKI et al., 2017). Nosso estudo mostrou que, após a indução de resistência *in vitro* à polimixina B, todos os isolados avaliados se tornaram resistentes à polimixina B, mas sensíveis aos antibióticos da classe dos beta-lactâmicos.

Com o intuito de avaliar a participação do sistema de bomba de efluxo AdeABC no mecanismo de resistência às polimixinas, a transcrição do gene *adeB* foi quantificada por PCR em tempo real. Nossos resultados não mostraram aumento da transcrição da bomba de efluxo AdeABC quando os isolados se tornaram resistentes à polimixina B; ao contrário disso, uma redução de 1 a 2 vezes foi observada em todos os isolados, após a exposição à polimixina B. O sistema de bomba de efluxo AdeABC é um importante mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos e sua redução de expressão, associada ao uso de subdoses de polimixina B, pode estar envolvido na reversão da resistência para essa classe.

Os resultados observados neste estudo são preliminares e necessitam de mais experimentos para complementação. No entanto, a caracterização de subdoses de polimixina B como fator para reversão da sensibilidade aos antibióticos da classe dos beta-lactâmicos é extremamente importante, não só pelo fato de aumento de opções terapêuticas para esses isolados de *A. baumannii*, mas também para a sugestão de usos de doses menores de polimixina B, que reduziriam os efeitos nefrotóxicos dessa droga.

CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que o sistema de bomba de efluxo AdeABC parece não estar relacionado ao mecanismo de resistência às polimixinas. Por outro lado, a indução de resistência à polimixina B, por uso de concentrações subinibitórias da droga parece reduzir a expressão do sistema de bomba de efluxo AdeABC, que acarreta a reversão da sensibilidade aos beta-lactâmicos, aumentando as opções terapêuticas e reduzindo a nefrotoxicidade de doses maiores de polimixina B.

AGRADECIMENTOS

Gostaríamos de agradecer a professora Raquel Girardello, por ter sido nossa orientadora e ter desempenhado tal função com dedicação e amizade e a professora Glaucia Dehn Mahana, por todos os conselhos, pela ajuda e pela paciência com a qual guiou o nosso aprendizado. Aos colegas de laboratório Brenda Vieira, Natália Rocha e ao Lucas Assoni que foram fundamentais no processo e elaboração deste trabalho de conclusão de curso. À USF, ao CNPq e a FAPESP, pela estrutura e fomento para realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

- Adams MD, Nickel GC, Bajaksouzian S, Lavender H, Murthy AR, Jacobs MR, Bonomo RA. Resistance to colistin in *Acinetobacter baumannii* associated with mutations in the PmrA Arroyo LA; Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock REW. The *pmrCAB* Operon Mediates Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Clinical Isolates through Phosphoethanolamine Modification of Lipid A. *J Agents Chemoter.* 2011; 55(8):3743.
- Arroyo LA; Herrera CM, Fernandez L, Hankins JV, Trent MS, Hancock REW. The *pmrCAB* Operon Mediates Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Clinical Isolates through Phosphoethanolamine Modification of Lipid A. *J Agents Chemoter.* 2011; 55(8):3743.
- Beceiro A, Llobet E, Aranda J, Bengoechea JA, Doumith M, Hornsey M, Dhanji H, Chart H, Bou G, Livermore DM, Woodford N. Phosphoethanolamine modification of lipid A in colistin-resistant variants of *Acinetobacter baumannii* mediated by the *pmrAB* two-component regulatory system. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2011;55(7):3370-9.
- Bergen PJ, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 2006; 50(6):1953-1958.
- Boettger BC, Cayô R, Streling AP, Nodari CS, Almeida LGP, Martins WMBS, Girardello R, Vasconcelos ATR, Gales AC, Pignatari ACC. Dynamic of High-Risk *Acinetobacter baumannii* Major Clones in a Brazilian Tertiary Hospital During a Short Time Period. *Microb Drug Resist.* 2021 Mar;27(3):320-327.
- Borges LFA, Kataguirí LG, Nunes LG, et al. Contaminação nas mãos de profissionais de saúde em diferentes unidades de um Hospital Universitário brasileiro. *Rev Nursing* 2006;100(8):1000-3.
- BrCast. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2021.
- Chan PC, Huang LM, Lin HC, Chang LY, Chen ML, Lu CY, Lee PI, Chen JM, Lee CY, Pan HJ, Wang JT, Chang SC, Chen YC. Control of an outbreak of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007; 28(4):423-9.

Evangelista MP. *Acinetobacter baumannii* em unidades de terapia intensiva com ênfase no seu perfil de sensibilidade: revisão bibliográfica. São Paulo, 2015. Trabalho de Disciplina (Ciências médicas - microbiologia) - Oswaldo Cruz.

Giannouli M, Cuccurullo S, Crivaro V, Di Popolo A, Bernardo M, Tomasone F, Amato G, Brisse S, Triassi M, Utili R, Zarrilli R. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital in Naples, Italy, shows the emergence of a novel epidemic clone. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1223-30.

Girardello R, Visconde M, Cayô R, Figueiredo RC, Mori MA, Lincopan N, Gales AC. Diversity of polymyxin resistance mechanisms among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017 Jan;87(1):37-44.

Higgins PG, Pérez-Llarena FJ, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 May;57(5):2121-6.

Kyriakidis I, Vasileiou E, Pana ZD, Tragiannidis A. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. *Pathogens.* 2021 Mar 19;10(3):373.

Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins revisited. *Clin Microbiol Rev.* 2008;21(3):449-65.

Lee HC, Lee NY, Chang CM, Chou CY, Wu YH, Wang LR, Ko NY, Liu CC, Ko WC. Outbreak of *Acinetobacter baumannii* bacteremia related to contaminated morphine used for patient-controlled analgesia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28(10):1213-7.

Li J, Nation RL, Turnidge JD, Milne RW, Coulthard K, Rayner CR, Paterson DL. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis.* 2006a; 6(9):589-601. Review.

Marchetti DP. Presença de bombas de efluxo em isolados clínicos e ambientais de *Acinetobacter* spp. Porto Alegre, 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Martins AF. Caracterização Epidemiológica e Molecular de Isolados de *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos na cidade de Porto Alegre. Porto Alegre, 2010. Dissertação (Medicina) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Moffatt JH, Harper M, Harrison P et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4971–7.

Moffatt JH, Harper M, Adler B, Nation RL, Li J, Boyce JD. Insertion sequence IS*Aba11* is involved in colistin resistance and loss of lipopolysaccharide in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):3022-4.

- Obara M, Nakae T. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics in *Acinetobacter calcoaceticus*. J Antimicrob Chemother. 1991;28(6):791-800.
- Park YK, Choi JY, Shin D, Ko KS. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(6):525-30.
- Pereira AS. Determinação da Concentração de Antimicrobiano Capaz de Prevenir o Aparecimento de Mutantes Resistentes em Amostras Clínicas de *Acinetobacter* spp. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2009. 171 pp.
- Pereira DC. Sistema de efluxo MexAB-OprM e MeXY produção de carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosas*: Efeitos na resistência aos carbapenêmicos. Porto Alegre, 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001; 29(9):e45.
- Poole K. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. Curr Pharm Biotechnol. 2002 Jun;3(2):77-98.
- RICAS, Rafaella V.; MARQUES, Thayanny C.; YAMAMOTO, Ana Caroline A. Perfil de resistência de *Acinetobacter baumannii* a antimicrobianos em um hospital universitário de 26 Cuiabá-MT. Infarma – Ciências Farmacêuticas, Brasília, vol. 25, n. 4, p. 178-181, dez. 2013.
- Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TS, Almeida JN Jr, Duarte AJ. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. Braz J Infect Dis. 2017 Jan - Feb;21(1):98-101
- Sato K, Nakae T. Outer membrane permeability of *Acinetobacter calcoaceticus* and its implication in antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 1991;28(1):35-45.
- Simões ASM. Contribuição do efluxo para a aquisição de resistência aos antibióticos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii*. Lisboa, 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Ciências biológicas) - Universidade Nova de Lisboa.
- Skiada A, Markogiannakis A, Plachouras D, Daikos GL. Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Antimicrob Agents. 2011;37:187–193.
- Sousa MIC. Prevalência de infecções por *Acinetobacter baumannii* multirresistente em hospital e maternidade do sistema único de saúde. Uberlândia, 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (ciências biológicas) - universidade federal de uberlândia.
- Sundaramoorthy NS, Sivasubramanian A, Nagarajan S. Simultaneous inhibition of MarR by salicylate and efflux pumps by curcumin sensitizes colistin resistant clinical isolates of Enterobacteriaceae. Microb Pathog. 2020 Nov;148:104445.

Vasconcelos AT, Barth AL, Zavascki AP, Gales AC, Levin AS, Lucarevski BR, Cabral BG, Brasiliense DM, Rossi F, Furtado GH, Carneiro IC, da Silva JO, Ribeiro J, Lima KV, Correa L, Britto MH, Silva MT, da Conceição ML, Moreira M, Martino MD, de Freitas MR, Oliveira MS, Dalben MF, Guzman RD, Cayô R, Morais R, Santos SA, Martins WM. The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Dec;83(4):382-5.

Vieira PB, Simone Ulrich Picoli *Acinetobacter baumannii* Multirresistente: Aspectos Clínicos e Epidemiológicos: Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: Clinical and Epidemiological Aspects. Nova Hamburgo, 2015. Trabalho de Conclusão de Curso (Biomedicina) - Universidade Feevale.

Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(6):1210-5.

Vila-Farrés X, Ferrer-Navarro M, Callarisa AE, Martí S, Espinal P, Gupta S, Rolain JM, Giralt E, Vila J. Loss of LPS is involved in the virulence and resistance to colistin of colistin-resistant *Acinetobacter nosocomialis* mutants selected in vitro. *J Antimicrob Chemother*. 2015;70(11):2981-6.