



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Faculdade de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BRUNA KERN DONAMORE

**INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES DE CULTIVO NA FORMAÇÃO DE
CÉLULAS *PERSISTERS* EM *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

Porto Alegre

2016

BRUNA KERN DONAMORE

**INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES DE CULTIVO NA FORMAÇÃO DE
CÉLULAS *PERSISTERS* EM *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira

Porto Alegre

2016

Ficha Catalográfica

D676i Donamore, Bruna Kern

Influência de condições de cultivo na formação de células persisters em *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* / Bruna Kern Donamore . – 2016.
79 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira.

1. Complexo ACB. 2. Infecções associadas à assistência em saúde. 3. Persistência. 4. Disponibilidade de oxigênio. 5. Fontes de nutriente. I. Oliveira, Sílvia Dias de. II. Título.

BRUNA KERN DONAMORE

**INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES DE CULTIVO NA FORMAÇÃO DE
CÉLULAS *PERSISTERS* EM *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Aprovado em: 31 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA:

Beatriz Meurer Moreira

Cristiano Valim Bizarro

Rodrigo da Silva Galhardo

Porto Alegre

2016

Agradecimentos

À Profa. Dra. Sílvia Dias de Oliveira agradeço pela oportunidade dada para trabalhar e por ter dividido comigo conhecimentos e experiências que contribuíram muito para meu crescimento profissional e pessoal. Agradeço, também, pelos incentivos dados em momentos que foram críticos e pela confiança, carinho e compreensão para comigo.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira pelas ideias e conselhos, que foram muito importantes para o melhor desenvolvimento e para finalização deste trabalho.

À minha mãe e irmã, Suzana e Gabriela, por todo apoio e compreensão nestes conturbados dois anos.

Ao Lucas pela compreensão, companheirismo, carinho e por ter feito todo possível para que eu conseguisse concluir esta etapa com sucesso.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Imunologia e Microbiologia. Especialmente para Belisa, Stephanie, Bruna e Claudia, pelos conselhos, carinho e cuidado, os quais foram vitais dentro e fora da PUCRS.

Resumo

Os patógenos oportunistas do complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* são responsáveis por diversas enfermidades, acometendo principalmente pacientes de unidades de tratamento intensivo e imunocomprometidos. Estas bactérias podem ainda apresentar o fenótipo de persistência, onde uma pequena população de bactérias suscetíveis sobrevive após o tratamento com elevadas concentrações de antimicrobianos - podendo essa fração de células sobreviventes ser afetada pelas condições ambientais presentes no meio. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da disponibilidade de oxigênio e da presença de galactose, citrato de sódio e sangue de carneiro na formação destas células frente à exposição ao meropenem e à tobramicina. Para isto, 10 isolados clínicos, cedidos pelo Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS, tiveram sua suscetibilidade caracterizada quanto à concentração inibitória mínima (CIM) de tobramicina e de meropenem. A influência das diferentes condições ambientais foi analisada ao expor culturas de fase exponencial tardia ao meropenem e à tobramicina por 48 h na presença de citrato de sódio, galactose ou sangue de carneiro; ou em uma condição aerada ou estática. Para todas as observações, alíquotas foram removidas em tempos determinados, seguidas de diluições decimais seriadas e semeadura pela técnica da gota em ágar nutriente, para estimar a fração de células sobreviventes. A condição aerada promoveu uma diminuição na fração de células *persisters* - independente do antimicrobiano utilizado -, e também verificamos que concentrações superiores a 10X a CIM de tobramicina proporcionaram níveis ainda menores destas células após 48 h de tratamento. Quanto à presença de diferentes fontes de nutrientes, foi observado que a presença de citrato de sódio no tratamento de 48 h com meropenem proporcionou uma menor fração de células sobreviventes comparado a quando este mesmo antimicrobiano estava associado à galactose; enquanto a exposição à tobramicina na presença de galactose promoveu uma menor formação de células *persisters* nas primeiras 6 h de tratamento. O sangue de carneiro, entretanto, não afetou a fração de células sobreviventes após 48 h de tratamento, independente do antimicrobiano utilizado. Pôde-se ainda constatar uma notável heterogeneidade no comportamento de todos os 10 isolados utilizados no estudo, independente das condições as quais foram expostos. Desta forma, é possível que as condições avaliadas nos experimentos tenham influenciado a formação células

persists através da maior produção de espécies reativas de oxigênio, e por disponibilizar mais alvos para a ação dos antimicrobianos ao estimular o crescimento bacteriano.

Palavras-chave: complexo ACB; infecções associadas à assistência em saúde; persistência; disponibilidade de oxigênio; fontes de nutriente; meropenem; tobramicina.

Abstract

Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex opportunistic human pathogens are responsible for several diseases affecting specially intensive care units and immunocompromised patients. These bacteria may also present the persistence phenotype, where a small population of susceptible bacteria survives after a high antimicrobial concentration treatment – which the fraction of surviving cells may be affected by environmental conditions present in the medium. Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of oxygen availability and galactose, sodium citrate and sheep blood presence in the formation of these cells upon meropenem and tobramycin exposure. For this, 10 clinical isolates, sent by the Clinical Pathology Laboratory of São Lucas Hospital, had their susceptibility characterized regarding the minimum inhibitory concentration (MIC) to tobramycin and meropenem. The influence of different environmental conditions was analyzed by exposing late exponential-phase cultures to meropenem and tobramycin for 48 h in the presence of sodium citrate, galactose and sheep blood; or in aerated or static condition. For all evaluations, aliquots were removed at determined time points, followed by serial decimal dilutions and drop plating technique on nutrient agar, to estimate the fraction of surviving cells. Aerated condition promoted a reduction of persister cells fraction – independent of antimicrobial used –, and, in addition, concentrations of tobramycin higher than 10X MIC provided even lower levels of these cells after 48 h of treatment. Regarding the presence of different sources of nutrients, it was observed that sodium citrate presence in 48 h of meropenem treatment promoted lower fraction of surviving cells when compared to this same antibiotic associated with galactose; whereas tobramycin exposure in the presence of galactose provided a reduced formation of persister cells in the first 6 h of treatment. Sheep blood, however, did not affect the fraction of surviving cells after 48 h of treatment, independently of the antimicrobial used. A remarkable heterogeneity in the behavior of all 10 isolates used in the study was present, regardless the conditions that have been exposed. Thus, it is possible that the conditions imposed in the experiments have influenced in the formation of persister cells by enhanced production of reactive oxygen species, and through the availability of more targets for antibiotic action by the bacterial growth stimulation.

Keywords: ACB complex; healthcare-associated infections; persistence; oxygen availability; nutrient sources; meropenem; tobramycin.

LISTA DE ABREVIACOES

ACB – *Acinetobacter calcoaceticus* – *Acinetobacter baumannii*

CAT – catalase

ERO – espécies reativas de oxigênio

ERN – espécies reativas de nitrogênio

QS – *quorum sensing*

SOD – superóxido dismutase

TA – toxina-antitoxina

 M - micromolar

Sumário

Capítulo 111
1.1 Introdução	12
1.2 Objetivos.....	19
1.2.1 Objetivo Geral	19
1.2.2 Objetivos Específicos	19
Capítulo 2	20
2.1 Artigo Científico 1	22
Capítulo 3	45
3.1 Artigo Científico 2	46
Capítulo 4	67
4.1 Considerações Finais	68
Referências Bibliográficas.....	72

Capítulo 1

Introdução

Objetivos

1.1 Introdução

As bactérias pertencentes ao gênero *Acinetobacter* são aeróbias estritas, não fermentam açúcares, nem possuem mobilidade, são catalase positivas e oxidase negativas e ainda podem ser visualizadas no microscópio na forma de pares de cocobacilos Gram negativos [1]. Este gênero possui 43 espécies [2] e pode ser isolado de amostras de solo, água e de humanos, onde possuem relevância clínica [1], sendo *A. baumannii* e *A. calcoaceticus* as mais implicadas em infecções associadas à assistência em saúde [3]. As espécies *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. baumannii*, *A. pittii* (anteriormente denominada como genoespécie 3) e *A. nosocomialis* (anteriormente denominada como genoespécie 13TU) possuem uma alta similaridade genética e fenotípica, sendo referidas conjuntamente como complexo *A. calcoaceticus* – *A. baumannii* (ACB) [4]. As espécies deste complexo estão geralmente associadas a infecções respiratórias, sepse, contaminação de cateter e infecções de feridas operatórias em queimados, acometendo especialmente pacientes internados em Unidades de Tratamento Intensivo e imunocomprometidos [5,6].

O gênero *Acinetobacter* tem atraído muito interesse, uma vez que possui capacidade de aquisição e transmissão de múltiplos mecanismos de resistência a antimicrobianos, por meio de diversas estratégias, como: transferência de elementos genéticos móveis, deleções mediadas por sequências de inserção e mobilização de transposons ou de sequências de inserção [7]. Estas características juntamente à utilização de agentes antimicrobianos de amplo espectro, e consequente pressão seletiva do meio, tornam este um táxon multirresistente de grande relevância para instalações hospitalares [8,9]. O complexo ACB é, ainda, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade, que têm sido relatadas em hospitais e instituições de cuidados de longa duração, gerando uma crescente preocupação para a comunidade médica [10–12]. *A. baumannii*, em especial, tem apresentado resistência a diversas classes de fármacos antimicrobianos, como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e polimixinas [13,14]. Essa bactéria foi responsabilizada, apenas no primeiro semestre de 2011, por 34,5% dos casos de pneumonia, 17,3% das bacteremias e 10,6% de infecções de sítio cirúrgico em hospitais na região Sul do Brasil [15], tendo sido relatada uma elevada incidência de cepas multirresistentes em 12 hospitais públicos na cidade de Porto Alegre [16].

Para o tratamento de infecções por *A. baumannii*, os carbapenêmicos – antimicrobianos de amplo espectro com atividade independente da disponibilidade de oxigênio, como imipenem/cilastatina e meropenem –, eram considerados os principais fármacos de escolha. Eles atuam introduzindo um grupamento de radical acila em proteínas de ligação à penicilina – envolvidas na formação do peptidoglicano –, enfraquecendo o peptidoglicano e culminando no rompimento da parede celular em decorrência da pressão osmótica [17]. A resistência a estes fármacos, todavia, tem sido cada vez mais descrita e está relacionada à maior taxa de mortalidade – o que pode ser devido ao tratamento antibiótico empírico inadequado utilizado em casos graves [18,19], além da facilidade de aquisição de mecanismos de resistência [13,20,21]. Dessa forma, outros fármacos como colistina, polimixina B, tigeciclina e tobramicina – os quais apresentaram resultados satisfatórios em estudos realizados – têm sido utilizados nos tratamentos antimicrobianos [12,22], embora casos de resistência aos mesmos já tenham sido relatados [13,21,23].

Em casos de pneumonias associadas à ventilação, a colistina e a tobramicina podem, ainda, ser utilizadas em associação a outros fármacos, como um tratamento adjuvante na forma aerolizada. Esta estratégia de tratamento permite uma maior penetração e disponibilidade destes fármacos nas vias aéreas inferiores, além de potencializarem a ação antimicrobiana, proporcionando melhores desfechos clínicos [24]. A tobramicina atua na síntese proteica, levando à produção de proteínas aberrantes, conseqüentemente, desestabilizando a integridade da membrana celular bacteriana, e a uma produção aumentada de espécies reativas de oxigênio [25].

A resistência aos antimicrobianos é de grande importância no tratamento de enfermidades, sendo esta conhecida e estudada há muitas décadas [26–29] – com o seu primeiro relato realizado por Abraham e Chain em 1940 [30]. Há, no entanto, outro fenômeno que foi, por um longo período de tempo, negligenciado pelos pesquisadores – a persistência. As células bacterianas com este fenótipo, também conhecidas como *persisters*, constituem uma subpopulação de bactérias não replicantes, que são capazes de sobreviver ao tratamento com antimicrobianos aos quais são geneticamente suscetíveis, retornando ao crescimento após a remoção dos mesmos [31]. Bigger foi o responsável por esta descoberta em 1944, ao constatar que uma fração muito pequena (inferior a 0,001% da população inicial) de cepas de *Staphylococcus aureus* (anteriormente chamado de *Staphylococcus pyogenes aureus*) expostas a altas doses de penicilina sobreviveu ao tratamento [31]. A persistência bacteriana tem despertado cada

vez mais interesse, sendo identificada em todos os microrganismos já pesquisados até então, como, por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, complexo *Burkholderia cepacia*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* [32–38].

Estudos sugerem uma possível relação entre a falha na terapia com antimicrobianos e a presença de células *persisters* [33,36], tendo em vista que a não efetividade do fármaco em eliminar esta população leva à permanência de células *persisters* no organismo do hospedeiro. Isto vem a ser preocupante, uma vez que as mesmas estão envolvidas na recidiva de doenças crônicas como a tuberculose, complicações clínicas em quadros de fibrose cística, infecções recorrentes do trato urinário e candidose [36,39–41]. Levin & Rozen (2006), através de modelos matemáticos, sugeriram ainda que, além de causarem recalcitrâncias, estes reservatórios com fenótipo tolerante poderiam adquirir mecanismos de resistência, promovendo a geração de populações mutantes resistentes [42].

Evidências também apontaram uma possível uma relação entre resistência e persistência em *E. coli*, onde a ação da bomba de efluxo AcrAB-TolC diminuiu a concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) culminando em uma população sobrevivente maior [43]. Além deste relato, cepas de *P. aeruginosa* resistentes à fosfomicina tratadas com ofloxacina apresentaram uma menor fração de células *persisters*, o que foi associado com a superexpressão do gene de resistência *fosA* – que bloqueia a ação de um substrato desconhecido indutor de persistência – e com a inativação do gene *glpT* – impedindo que GlpT transporte a substância supracitada para o interior celular e a conseqüente indução do fenótipo de persistência [44]. Outros estudos ainda indicaram que a utilização de profilaxia antimicrobiana poderia contribuir para o desenvolvimento de tolerância a múltiplos fármacos, enquanto a exposição prolongada aos antimicrobianos levaria a uma seleção de mutantes altamente persistentes em *P. aeruginosa* [33,41].

Os estudos já realizados ainda não foram capazes de elucidar completamente os mecanismos que as células utilizam para desenvolver o fenótipo de persistência, acredita-se, porém, que uma série destes esteja associada, trabalhando sobrepostos, independente e/ou paralelamente [45,46]. Os sistemas toxina-antitoxina (TA) são um dos mais estudados fatores relacionados à formação de *persisters*, sendo descritos em importantes patógenos como *E. coli*, *Salmonella Typhimurium* e *M. tuberculosis* [47–49]. Estes sistemas são compostos por toxinas, caracterizadas como proteínas estáveis, e

por antitoxinas, que podem ser RNAs ou proteínas instáveis; eles ainda se apresentam divididos em cinco classes, conforme a origem da antitoxina e a natureza da interação toxina-antitoxina, estando a segunda classe mais associada à formação de células *persisters*. Nos sistemas TA tipo II, a toxina forma um complexo inativo com a antitoxina, onde a degradação da antitoxina via proteólise acarretará em menores quantidades dessa, permitindo que a toxina atue sobre os seus alvos celulares. [46]. Essa ação culmina na morte ou inibição do crescimento e propagação celular, em decorrência da inibição da tradução [48,50–52], inibição da replicação de DNA e da clivagem de regiões específicas de RNA fita simples [50–52].

Embora seja reconhecida a importância dos sistemas TA, existem muitos outros possíveis fatores relacionados à formação de células *persisters*. O mecanismo de resposta ao estresse é um destes, uma vez que foi observado que a deleção do gene *rpoS* codificante para um fator sigma, bem como dos genes que são por este controlados, acarretou em uma maior formação de *persisters* em *E. coli* [53]; outro estudo em biofilmes de *P. aeruginosa* verificou, entretanto, que cepas mutantes, com deleção de *rpoS*, quando expostas à ciprofloxacina obtiveram uma redução de 2.9 log de células sobreviventes em comparação à cepa selvagem [54]. Essas células tolerantes além de serem formadas estocasticamente durante a multiplicação celular, podem ser induzidas pela ausência de nutrientes, ou, ainda, através da exposição a fatores de estresse no ambiente do hospedeiro, como estresse oxidativo, variações de temperatura e pH, e a antimicrobianos [35,36,55–58].

Relatos indicam, ainda, que a produção de ERO, a modulação de enzimas antioxidantes e o sistema regulatório *quorum sensing* (QS) podem influenciar na persistência [35,59,60]. A importância da modulação na produção de enzimas antioxidantes – como catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) –, já foi observada em *A. baumannii*, onde a associação com piocianina estimulou a produção dessas e culminou em maiores taxas de sobrevivência; e no complexo *Burkholderia cepacia*, no qual cepas que tiveram a ação de SOD inibida ou que eram incapazes de produzir de CAT, quando expostas à tobramicina, obtiveram menor proteção contra ERO e menor formação de células *persisters* [35,59]. Em *A. baumannii*, o sistema regulatório de QS parece estar relacionado à expressão de CAT e SOD, uma vez que, uma cepa mutante – não produtora da molécula sinal 3-OH-C₁₂ homoserina lactona – ao ser exposta a esta molécula sinal, apresentou maior atividade CAT e SOD, demonstrando que essas enzimas dependem do sistema QS para atuar; este mesmo estudo verificou, também,

que ao adicionar ácido salicílico – conhecido por inibir o QS [61] –, as atividades dessas enzimas foram reduzidas [59]. Outro estudo em *Streptococcus mutans* também verificou a importância desse sistema em uma cepa mutante – incapaz de responder ao estímulo da molécula sinal –, onde não houve a formação de células *persisters* após indução pelo estresse provocado através do pH ácido, privação de aminoácidos e estresse oxidativo [60].

As espécies reativas de oxigênio podem, ainda, ter a produção aumentada em decorrência da disponibilidade de oxigênio no ambiente, apresentando uma geração diretamente proporcional à concentração de oxigênio presente [62]. Em *Mycobacterium smegmatis*, o tratamento antimicrobiano associado à elevada saturação de oxigênio dissolvido pode ocasionar o aumento de ERO, sugerindo que a morte da população de *persisters* ocorre em decorrência desses radicais hidroxila tóxicos livres no meio [38]. A disponibilidade de oxigênio pode, também, influenciar no desenvolvimento desse fenótipo, visto que, em condições aeróbias e anaeróbias, a ação de fármacos antimicrobianos e desinfetantes em *P. aeruginosa* pode ser potencializada, respectivamente [63]. Outros estudos observaram que, em *P. aeruginosa* e *M. tuberculosis*, níveis reduzidos de oxigênio, e a consequente diminuição da atividade metabólica, promoveram o aumento na taxa de sobrevivência [38,64]; enquanto a maior disponibilidade de oxigênio resultou em maior morte de células *persisters* frente aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* [65,66]. Mais recentemente, experimentos com *Burkholderia pseudomallei*, causadora da melioidose, ainda mostraram que a introdução de oxigênio leva à redução da fração de células tolerantes [67].

A formação de células *persisters* também pode variar de acordo com a fonte de carbono disponível no ambiente. Estudos constataram que, a combinação de determinadas fontes de carbono e antimicrobianos influenciam no desenvolvimento das células *persisters* [34,68]. Foi observado que, em *E. coli*, a utilização de uma fonte de carbono secundária, como succinato e fumarato, após a exaustão da primeira – no caso, glicose –, favoreceu a formação de células *persisters* quando estas foram expostas ao tratamento com ofloxacina ou ampicilina, se comparada a uma situação onde a bactéria utilizou apenas uma única fonte, isto é, não houve essa transição metabólica de uma fonte de carbono primária para outra secundária [68].

A combinação do aminoglicosídeo gentamicina com substratos primários da glicólise (glicose, frutose ou manitol), bem como com o piruvato, promoveram a diminuição da fração de *persisters* em *E. coli*, tendo a mesma potencialização observada

em *S. aureus* ao associar frutose com este fármaco; sendo essas associações ainda capazes de reduzir a viabilidade de biofilmes maduros destes microrganismos. A utilização de outros substratos – participantes de processos metabólicos posteriores à glicólise – mostrou pouca potencialização, assim como a associação dos metabólitos com ampicilina ou ofloxacina. Isto ocorre, pois apenas substratos específicos (glicose, manitol, frutose e piruvato) induziram, nas células *persisters* de *E. coli* e *S. aureus*, um aumento da força próton-motriz, a qual é indispensável para captação de aminoglicosídeo e, conseqüentemente, para a morte bacteriana [69].

Além de carboidratos e fontes complexas de nutrientes, outro fator essencial para a sobrevivência bacteriana é o ferro. Este composto participa de diversos processos biológicos primordiais como o ciclo do ácido tricloroacético, fixação de nitrogênio, metanogênese, fotossíntese, cadeia de transporte de elétrons, produção e consumo de H₂, redução de peróxido de hidrogênio, síntese de aminoácidos e nucleosídeos, regulação gênica e biossíntese de DNA [70,71]. Um estudo realizado em *P. aeruginosa* relatou diminuição de aproximadamente dois logs na fração de células *persisters*, ao realizar tratamento com ciprofloxacina e tobramicina em um meio livre de ferro, quando comparado a outro que possuía o composto [66]. Em contraste, foi observado que, em *A. baumannii*, a presença de 20 µM de ferro proporcionou um aumento, de aproximadamente quatro vezes, na expressão do gene *luxI/R*, relacionado ao sistema QS, culminando em uma maior produção da molécula sinal 3-OH-C₁₂ homoserina lactona; o que poderia, de acordo com outro estudo também em *A. baumannii*, aumentar a produção de CAT e SOD e, assim, promover o aumento da fração de células *persisters* [59,72].

O conjunto de múltiplos fatores envolvidos na formação e regulação do fenótipo de persistência tem atraído cada vez mais atenção, uma vez que a compreensão destes pode levar ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para erradicação ou melhor manutenção em situações onde é constatada a tolerância a múltiplas drogas. O papel das células *persisters* nas infecções recalcitrantes e sua relação com a falha de terapias antimicrobianas é causa de grande preocupação, tanto por proporcionar aumento na morbidade e mortalidade dos pacientes, quanto por gerar maior gasto econômico para o sistema de saúde. Neste contexto, se faz necessária a investigação da possível relação entre desenvolvimento de células *persisters* pelo complexo ACB e condições distintas que podem estar presentes *in vivo* – cujos achados podem,

futuramente, beneficiar a compreensão dos mecanismos que proporcionam a formação dessas células tolerantes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a formação de células *persisters* quando cultivadas em meios suplementados com diferentes fontes de carbono ou sangue de carneiro, com e sem aeração, frente à exposição ao meropenem ou à tobramicina.

1.2.2 Objetivos Específicos

1.2.2.1 Verificar a influência da aeração na formação de células *persisters* a partir de isolados clínicos de *A. calcoaceticus-baumannii* frente à exposição ao meropenem ou à tobramicina;

1.2.2.2 Avaliar o desenvolvimento de células *persisters* a partir de isolados clínicos de *A. calcoaceticus-baumannii*, quando cultivados com suplementação de fontes de carbono diferentes, frente à exposição ao meropenem ou à tobramicina;

1.2.2.3 Analisar a influência da adição de sangue de carneiro na formação de células *persisters* a partir de isolados clínicos de *A. calcoaceticus-baumannii* frente à exposição ao meropenem ou à tobramicina.

Capítulo 2

Artigo Científico 1

**Persister cells levels influenced by aeration in *Acinetobacter calcoaceticus-*
*baumannii***

Artigo científico submetido ao periódico científico *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, publicado pela Oxford Academic

Fator de impacto: 4.919 (JCR 2015)

Guia dos autores: https://academic.oup.com/jac/pages/General_Instructions

2017-5-17

ScholarOne Manuscripts

 Journal of Antimicrobial Chemotherapy[# Home](#)[✍ Author](#)[📄 Review](#)

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Journal of Antimicrobial Chemotherapy

Manuscript ID JAC-2017-0762

Title Persister cells levels influenced by aeration in *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

Authors Donamore, Bruna
Gallo, Stephanie
Ferreira, Pedro Maria
Ferreira, Carlos Alexandre
Oliveira, Silvia

Date Submitted 17-May-2017

<https://mc.manuscriptcentral.com/jac>

**Persister cells levels influenced by aeration in *Acinetobacter calcoaceticus-*
*baumannii***

Bruna Kern Donamore¹, Stephanie Wagner Gallo¹, Pedro Maria Abreu Ferreira², Carlos
Alexandre Sanchez Ferreira¹, Sílvia Dias de Oliveira¹

¹PUCRS, Faculdade de Biociências, Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Porto
Alegre, RS, Brazil

²PUCRS, Faculdade de Biociências, Departamento de Biodiversidade e Ecologia, Porto
Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Sílvia Dias de Oliveira, PhD.

Faculdade de Biociências

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Av. Ipiranga 6681, Postal Code 90619-900,

Porto Alegre - Brazil

E-mail: silviadias@pucrs.br

Running title: Aeration influence on *Acinetobacter* persisters

Capítulo 3

Artigo Científico 2

Contribution of nutrient sources to tolerance in *Acinetobacter calcoaceticus*- *baumannii*

Artigo científico a ser submetido ao periódico científico *Future Microbiology*,
publicado pela Future Science Group
Fator de impacto: 3.637 (JCR 2015)

Guia dos autores: <https://www.futuremedicine.com/page/authors.jsp#Guidelines>

**Contribution of nutrient sources to tolerance in *Acinetobacter calcoaceticus-*
*baumannii***

Bruna Kern Donamore¹, Stephanie Wagner Gallo¹, Pedro Maria Abreu Ferreira², Carlos
Alexandre Sanchez Ferreira¹, Sílvia Dias de Oliveira¹

¹PUCRS, Faculdade de Biociências, Laboratório de Imunologia e Microbiologia, Porto
Alegre, RS, Brazil

²PUCRS, Faculdade de Biociências, Departamento de Biodiversidade e Ecologia, Porto
Alegre, RS, Brazil

Corresponding author:

Sílvia Dias de Oliveira, PhD.

Faculdade de Biociências

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Av. Ipiranga 6681, Postal Code 90619-900,

Porto Alegre - Brazil

E-mail: silviadias@pucrs.br

Capítulo 4

Considerações finais

4.1 Considerações finais

A compreensão do fenótipo de tolerância no complexo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* é de extrema importância, visto que este microrganismo é um patógeno oportunista emergente, responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em hospitais e instituições de cuidados de longa duração, representando risco para pacientes de unidades de tratamento intensivo e imunocomprometidos [10–12]. A presença de células persistentes no ambiente hospitalar poderia contribuir de forma significativa para a falha no tratamento de infecções crônicas e recorrentes [73–75]. O fenótipo de persistência que está amplamente disseminado nos isolados nosocomiais do complexo ACB pode estar relacionado ao estresse ocasionado pela pressão seletiva das instalações hospitalares [1]. Além disso, este patógeno ainda dificulta o tratamento de infecções ocasionadas pelo mesmo, uma vez que possui capacidade de aquisição e transmissão de múltiplos mecanismos de resistência a antimicrobianos [7]. Neste contexto, os carbapenêmicos eram considerados a terapia de escolha para o tratamento de infecções causadas pelo complexo ACB, entretanto resistência a estes antimicrobianos vêm aumentando, sendo inclusive relacionada a altas taxas de mortalidade [13,14,18]. Tendo isto em vista, é cada vez mais comum o tratamento dessas infecções com a utilização de fármacos alternativos como polimixina B e tigeciclina, bem como a associação de outros fármacos à colistina e tobramicina na forma aerolizada [12,22,24].

Levando em consideração que são poucos os estudos que abordam o fenótipo de tolerância em *Acinetobacter* [32,59], e os diversos possíveis mecanismos envolvidos na formação e regulação do fenótipo, o atual estudo possui uma relevância bastante significativa. Sendo assim, este trabalho se propôs a avaliar o efeito da maior disponibilidade de oxigênio na formação de células *persisters*, bem como avaliar a

formação dessas células em meios acrescidos com diferentes fontes de nutrientes. Para tanto, a fração de células *persisters* dos isolados nosocomiais do complexo ACB obtidos de diferentes materiais clínicos foi avaliada em condição estática e aerada frente ao tratamento com meropenem e tobramicina.

Constatamos que a maior disponibilidade de oxigênio no meio promoveu uma redução de, aproximadamente, 25 vezes na fração de células sobreviventes durante o tratamento com tobramicina e meropenem – o que vêm a ser relevante, tendo em vista que a tobramicina pode ser administrada de forma inalatória como tratamento adjuvante para casos de pneumonias associadas à ventilação [24,64,66,69]. Levando em consideração os resultados obtidos, pode-se sugerir que a maior disponibilidade de oxigênio estimulou a multiplicação celular, culminando na maior disponibilidade de alvos para ação dos antimicrobianos. Além disso, também observamos que, ao elevar a concentração de tobramicina em condição aerada, houve uma diminuição na formação de células *persisters*, o que corrobora com outros estudos da área [34,35,76]; sendo este primeiro trabalho que associa concentração de antimicrobiano aumentada e aeração no complexo ACB [25,76].

Foi também avaliada a formação das células tolerantes em meios com galactose, citrato de sódio e sangue de carneiro frente à exposição ao meropenem e à tobramicina. Observamos que, ao utilizar galactose como fonte única de nutriente presente no meio – a qual é uma fonte de carbono primária (anterior a glicólise) –, houve uma menor formação de células *persisters* até as 6 h quando exposta à tobramicina; ao passo que o uso de uma fonte de carbono secundária (aqui representada pelo citrato de sódio), não promoveu o mesmo efeito. Desta forma, pode-se sugerir que a utilização de uma fonte de carbono primária influencia na potencialização desse aminoglicosídeo, mas não promove o mesmo efeito ao usar um β -lactâmico (meropenem); o que corrobora com outro estudo já realizado em *E. coli* e *S. aureus* com estas duas classe de

antimicrobianos [69]. Por outro lado, a associação do meropenem com citrato de sódio apresentou uma redução na formação de células *persisters* após 48 h de tratamento, em comparação a quando foi combinado com galactose.

Ao utilizar o sangue de carneiro, que é uma fonte de nutriente mais complexo que as anteriores, não foi observada uma redução significativa de células tolerantes; embora a associação da mesma ao tratamento com meropenem tenha promovido redução de aproximadamente 10 vezes na fração de células *persisters*, quando comparada à combinação entre galactose e meropenem. Entretanto, este comportamento não foi observado se compararmos a meios acrescidos de citrato de sódio ou galactose expostos à tobramicina; ou citrato de sódio frente ao meropenem. É provável que o aumento da disponibilidade de ferro, em decorrência da suplementação com sangue de carneiro, tenha acarretado em uma série de fatores relacionados à regulação do sistema de *quorum sensing* e à produção de enzimas antioxidantes, que promoveriam a maior formação de células *persisters*.

A formação deste fenótipo ocorreu de forma heterogênea nos dez isolados nosocomiais do complexo ACB frente às condições testadas neste estudo, como já relatado em outro estudo em *A. baumannii* que expôs cultivos em fase estacionária a altas concentrações de polimixina B e tobramicina [32]. A presença desta variação representa uma maior dificuldade para a erradicação destas células *in vivo*, tornando-se um desafio terapêutico.

Os resultados obtidos nesse estudo fortalecem a necessidade de melhor compreender os mecanismos envolvidos na formação deste fenótipo, bem como a importância de saber as condições que promoveriam a erradicação do mesmo. Tendo isto em vista, – uma vez que determinadas combinações entre antimicrobianos e fontes de nutriente e a maior oxigenação (que poderia ser obtida através de administração

aerolizada) –, os dados obtidos são úteis para o desenvolvimento de novos fármacos ou estratégias terapêuticas para a erradicação das células tolerantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:538–82. doi:10.1128/CMR.00058-07.
- [2] Euzéby JP. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the internet. [s.d.]. <http://www.bacterio.net/acinetobacter.html> (acessado 30 de julho de 2014).
- [3] Lee Y-T, Kuo S-C, Yang S-P, Lin Y-T, Chiang D-H, Tseng F-C, et al. Bacteremic nosocomial pneumonia caused by *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis*: a single or two distinct clinical entities? *Clin Microbiol Infect* 2013;19:640–5. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03988.x.
- [4] Nemec A, Krizova L, Maixnerova M, van der Reijden TJKK, Deschaght P, Passet V, et al. Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Ac. Res Microbiol* 2011;162:393–404. doi:10.1016/j.resmic.2011.02.006.
- [5] Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 2007;5:939–51. doi:10.1038/nrmicro1789.
- [6] Mendoza-Olazarán S, Camacho-Ortiz A, Martínez-Reséndez MF, Llaca-Díaz JM, Pérez-Rodríguez E, Garza-González E. Influence of whole-body washing of critically ill patients with chlorhexidine on *Acinetobacter baumannii* isolates. *Am J Infect Control* 2014;42:874–8. doi:10.1016/j.ajic.2014.04.009.
- [7] Li H, Liu F, Zhang Y, Wang X, Zhao C, Chen H, et al. Evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* revealed through whole-genome sequencing and comparative genomic analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1168–76. doi:10.1128/AAC.04609-14.
- [8] Chan M-C, Chiu S-K, Hsueh P-R, Wang N-C, Wang C-C, Fang C-T. Risk factors for healthcare-associated extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections: a case-control study. *PLoS One* 2014;9:e85973. doi:10.1371/journal.pone.0085973.
- [9] Lee H-Y, Chen C-L, Wu S-R, Huang C-W, Chiu C-H. Risk factors and outcome

- analysis of acinetobacter baumannii complex bacteremia in critical patients. *Crit Care Med* 2014;42:1081–8. doi:10.1097/CCM.0000000000000125.
- [10] Perez F, Ponce-Terashima R, Adams MD, Bonomo RA. Are we closing in on an “elusive enemy”? The current status of our battle with *Acinetobacter baumannii*. *Virulence* 2011;2:86–90. doi:10.4161/viru.2.2.15748.
- [11] Martins N, Picão RC, Adams-Sapper S, Riley LW, Moreira BM. Association of class 1 and 2 integrons with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* international clones and *Acinetobacter nosocomialis* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:698–701. doi:10.1128/AAC.02415-14.
- [12] Davis JS, McMillan M, Swaminathan A, Kelly JA, Piera KE, Baird RW, et al. A 16-year prospective study of community-onset bacteremic acinetobacter pneumonia: Low mortality with appropriate initial empirical antibiotic protocols. *Chest* 2014;146:1038–45.
- [13] Potron A, Poirel L, Nordmann P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:568–85. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001.
- [14] Perez F, Hujer AM, Hujer KM, Decker BK, Rather PN, Bonomo RA. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3471–84. doi:10.1128/AAC.01464-06.
- [15] Toledo PVM, Arend LN, Pilonetto M, Costa Oliveira JC, Luhm KR. Surveillance programme for multidrug-resistant bacteria in healthcare-associated infections: An urban perspective in South Brazil. *J Hosp Infect* 2012;80:351–3. doi:10.1016/j.jhin.2012.01.010.
- [16] Martins AF, Kuchenbecker RS, Pilger KO, Pagano M, Barth AL. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control* 2012;40:108–12. doi:10.1016/j.ajic.2011.03.010.
- [17] Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:4943–60. doi:10.1128/AAC.00296-11.
- [18] Lemos E V, de la Hoz FP, Einarson TR, McGhan WF, Quevedo E, Castañeda C, et al. Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect*

- 2014;20:416–23. doi:10.1111/1469-0691.12363.
- [19] Kuo H-Y, Chang K-C, Kuo J-W, Yueh H-W, Liou M-L. Imipenem: a potent inducer of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents* 2012;39:33–8. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.08.016.
- [20] Nigro SJ, Post V, Hall RM. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1504–9. doi:10.1093/jac/dkr163.
- [21] Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, et al. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *MBio* 2014;5:e00963–13. doi:10.1128/mBio.00963-13.
- [22] Yadav R, Landersdorfer CB, Nation RL, Boyce JD, Bulitta JB. Novel approach to optimize synergistic carbapenem-aminoglycoside combinations against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:2286–98. doi:10.1128/AAC.04379-14.
- [23] Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41:11–9. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.09.008.
- [24] Arnold HM, Sawyer AM, Kollef MH. Use of Adjunctive Aerosolized Antimicrobial Therapy in the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* Ventilator-Associated Pneumonia. *Respir Care* 2012;57 :1226–33. doi:10.4187/respcare.01556.
- [25] Jana S, Deb JK. Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;70:140–50. doi:10.1007/s00253-005-0279-0.
- [26] Barber M, Rozwadowska-Dowzenko M. INFECTION BY PENICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI. *Lancet* 1948;252:641–4. doi:10.1016/S0140-6736(48)92166-7.
- [27] Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol* 2010;13:589–94. doi:10.1016/j.mib.2010.08.005.
- [28] Fernandez L, Hancock REW. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev* 2012;25:661–81. doi:10.1128/CMR.00043-12.
- [29] Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ V. Molecular

- mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2014;13:42–51. doi:10.1038/nrmicro3380.
- [30] Abraham E, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 1940;146:837.
- [31] Bigger J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *Lancet* 1944;244:497–500. doi:10.1016/S0140-6736(00)74210-3.
- [32] Barth VC, Rodrigues BÁ, Bonatto GD, Gallo SW, Pagnussatti VE, Ferreira CAS, et al. Heterogeneous persister cells formation in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS One* 2013;8:e84361. doi:10.1371/journal.pone.0084361.
- [33] 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;192:6191–9. doi:10.1128/JB.01651-09.
- [34] Amato SM, Brynildsen MP. Nutrient Transitions Are a Source of Persisters in *Escherichia coli* Biofilms. *PLoS One* 2014;9:e93110. doi:10.1371/journal.pone.0093110.
- [35] Van Acker H, Sass A, Bazzini S, De Roy K, Udine C, Messiaen T, et al. Biofilm-grown *Burkholderia cepacia* complex cells survive antibiotic treatment by avoiding production of reactive oxygen species. *PLoS One* 2013;8:e58943. doi:10.1371/journal.pone.0058943.
- [36] Lafleur MD, Qi Q, Lewis K. Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:39–44. doi:10.1128/AAC.00860-09.
- [37] Ren H, He X, Zou X, Wang G, Li S, Wu Y. Gradual increase in antibiotic concentration affects persistence of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:3267–72. doi:10.1093/jac/dkv251.
- [38] Grant SS, Kaufmann BB, Chand NS, Haseley N, Hung DT. Eradication of bacterial persisters with antibiotic-generated hydroxyl radicals. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:12147–52. doi:10.1073/pnas.1203735109.
- [39] Zhang Y, Yew WW, Barer MR. Targeting persisters for tuberculosis control. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2223–30. doi:10.1128/AAC.06288-11.
- [40] Briers Y, Walmagh M, Grymonprez B, Biebl M, Pirnay J-P, Defraigne V, et al. Art-175 Is a Highly Efficient Antibacterial against Multidrug-Resistant Strains and Persisters of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:3774–84. doi:10.1128/AAC.02668-14.

- [41] Goneau LW, Yeoh NS, MacDonald KW, Cadieux PA, Burton JP, Razvi H, et al. Selective target inactivation rather than global metabolic dormancy causes antibiotic tolerance in uropathogens. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2089–97. doi:10.1128/AAC.02552-13.
- [42] Levin BR, Rozen DE. Non-inherited antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol* 2006;4:556–62. doi:10.1038/nrmicro1445.
- [43] Wu Y, Vulic M, Keren I, Lewis K. Role of Oxidative Stress in Persister Tolerance. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4922–6. doi:10.1128/AAC.00921-12.
- [44] De Groote VN, Fauvart M, Kint CI, Verstraeten N, Jans A, Cornelis P, et al. *Pseudomonas aeruginosa* fosfomycin resistance mechanisms affect non-inherited fluoroquinolone tolerance. *J Med Microbiol* 2011;60:329–36. doi:10.1099/jmm.0.019703-0.
- [45] Lewis K. Persister cells: Molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handb Exp Pharmacol* 2012;211:121–33. doi:10.1007/978-3-642-28951-4-8.
- [46] Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. *Cell* 2014;157:539–48. doi:10.1016/j.cell.2014.02.050.
- [47] Sala A, Bordes P, Genevaux P. Multiple toxin-antitoxin systems in *Mycobacterium tuberculosis*. *Toxins (Basel)* 2014;6:1002–20. doi:10.3390/toxins6031002.
- [48] Wu N, He L, Cui P, Wang W, Yuan Y, Liu S, et al. Ranking of persister genes in the same *Escherichia coli* genetic background demonstrates varying importance of individual persister genes in tolerance to different antibiotics. *Front Microbiol* 2015;6:1003. doi:10.3389/fmicb.2015.01003.
- [49] Silva-Herzog E, McDonald EM, Crooks AL, Detweiler CS. Physiologic Stresses Reveal a *Salmonella* Persister State and TA Family Toxins Modulate Tolerance to These Stresses. *PLoS One* 2015;10:e0141343. doi:10.1371/journal.pone.0141343.
- [50] Jørgensen MG, Pandey DP, Jaskolska M, Gerdes K. HicA of *Escherichia coli* defines a novel family of translation-independent mRNA interferases in bacteria and archaea. *J Bacteriol* 2009;191:1191–9. doi:10.1128/JB.01013-08.
- [51] Zhang J, Zhang Y, Inouye M. Characterization of the Interactions within the mazEF Addiction Module of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2003;278:32300–6. doi:10.1074/jbc.M304767200.

- [52] Tripathi A, Dewan PC, Siddique SA, Varadarajan R. MazF-induced growth inhibition and persister generation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 2014;289:4191–205. doi:10.1074/jbc.M113.510511.
- [53] Hong SH, Wang X, O'Connor HF, Benedik MJ, Wood TK. Bacterial persistence increases as environmental fitness decreases. *Microb Biotechnol* 2012;5:509–22. doi:10.1111/j.1751-7915.2011.00327.x.
- [54] Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of Stress Responses to Antibiotic Tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3838–47. doi:10.1128/AAC.00433-15.
- [55] Maisonneuve E, Castro-Camargo M, Gerdes K. (p)ppGpp controls bacterial persistence by stochastic induction of toxin-antitoxin activity. *Cell* 2013;154:1140–50. doi:10.1016/j.cell.2013.07.048.
- [56] Nguyen D, Joshi-datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Britigan BE, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science* 2011;334:982–6. doi:10.1126/science.1211037.
- [57] Lebeaux D, Chauhan A, Letoffe S, Fischer F, de Reuse H, Beloin C, et al. pH-Mediated Potentiation of Aminoglycosides Kills Bacterial Persisters and Eradicates In Vivo Biofilms. *J Infect Dis* 2014;210:1357–66. doi:10.1093/infdis/jiu286.
- [58] Keren I, Shah D, Spoering A, Kaldalu N, Lewis K. Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004;186:8172–80. doi:10.1128/JB.186.24.8172-8180.2004.
- [59] Bhargava N, Sharma P, Capalash N. Pyocyanin stimulates quorum sensing-mediated tolerance to oxidative stress and increases persister cell populations in *Acinetobacter baumannii*. *Infect Immun* 2014;82:3417–25. doi:10.1128/IAI.01600-14.
- [60] Leung V, Lévesque CM. A stress-inducible quorum-sensing peptide mediates the formation of persister cells with noninherited multidrug tolerance. *J Bacteriol* 2012;194:2265–74. doi:10.1128/JB.06707-11.
- [61] Yang L, Rybtke MT, Jakobsen TH, Hentzer M, Bjarnsholt T, Givskov M, et al. Computer-aided identification of recognized drugs as *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:2432–43. doi:10.1128/AAC.01283-08.

- [62] Imlay JA. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu Rev Biochem* 2008;77:755–76.
doi:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055.
- [63] Kim J, Hahn J-S, Franklin MJ, Stewart PS, Yoon J. Tolerance of dormant and active cells in *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilm to antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2009;63:129–35. doi:10.1093/jac/dkn462.
- [64] Borriello G, Werner E, Roe F, Kim AM, Ehrlich GD, Stewart PS. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2659–64.
doi:10.1128/AAC.48.7.2659-2664.2004.
- [65] Walters MC, Roe F, Bugnicourt A, Franklin MJ, Stewart PS, Iii MCW, et al. Contributions of Antibiotic Penetration, Oxygen Limitation, and Low Metabolic Activity to Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Ciprofloxacin and Tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:317–23.
doi:10.1128/AAC.47.1.317.
- [66] Narten M, Rosin N, Schobert M, Tielen P. Susceptibility of *pseudomonas aeruginosa* urinary tract isolates and influence of urinary tract conditions on antibiotic tolerance. *Curr Microbiol* 2012;64:7–16. doi:10.1007/s00284-011-0026-y.
- [67] Hemsley CM, Luo JX, Andraea CA, Butler CS, Soyer OS, Titball RW. Bacterial Drug Tolerance under Clinical Conditions is Governed by Anaerobic Adaptation, but not Anaerobic Respiration. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;AAC.02793–14 – . doi:10.1128/AAC.02793-14.
- [68] Amato SM, Orman MA, Brynildsen MP. Metabolic control of persister formation in *Escherichia coli*. *Mol Cell* 2013;50:475–87. doi:10.1016/j.molcel.2013.04.002.
- [69] Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 2011;473:216–20.
doi:10.1038/nature10069.
- [70] Wandersman C, Delepelaire P. BACTERIAL IRON SOURCES: From Siderophores to Hemophores. *Annu Rev Microbiol* 2004;58:611–47.
doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123811.
- [71] Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quñones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 2003;27:215–37. doi:10.1016/S0168-6445(03)00055-X.
- [72] Modarresi F, Azizi O, Shakibaie MR, Motamedifar M, Valibeigi B, Mansouri S.

- Effect of iron on expression of efflux pump (adeABC) and quorum sensing (luxI, luxR) genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Apmis* 2015;123:959–68. doi:10.1111/apm.12455.
- [73] El-Saed A, Balkhy HH, Al-Dorzi HM, Khan R, Rishu AH, Arabi YM. *Acinetobacter* is the most common pathogen associated with late-onset and recurrent ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit in Saudi Arabia. *Int J Infect Dis* 2013;17:e696–701. doi:10.1016/j.ijid.2013.02.004.
- [74] Lai C-C, Hsu H-L, Tan C-K, Tsai H-Y, Cheng A, Liu C-Y, et al. Recurrent bacteremia caused by the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. *J Clin Microbiol* 2012;50:2982–6. doi:10.1128/JCM.01194-12.
- [75] Shields RK, Clancy CJ, Gillis LM, Kwak EJ, Silveira FP, Massih RCA, et al. Epidemiology, clinical characteristics and outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infections among solid organ transplant recipients. *PLoS One* 2012;7:e52349. doi:10.1371/journal.pone.0052349.
- [76] Knudsen GM, Ng Y, Gram L. Survival of bactericidal antibiotic treatment by a persister subpopulation of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 2013;79:7390–7. doi:10.1128/AEM.02184-13.