



AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA E (COLISTINA) EM CEPA CLÍNICA DE *ACINETOBACTER BAUMANNII*

João Pedro Mendonça Alexandrino¹; Renato Lemos Pereira^{2,3}; Marcelo Henrique Soller Ramada³

¹Medicina - Universidade Católica de Brasília;

²Diretoria Técnica de Ensino e Pesquisa, Hospital das Forças Armadas;

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia - Universidade Católica de Brasília.

E-mail: joao.alexandrino@a.ucb.br; renato.pereira@a.ucb.br; marcelo.ramada@p.ucb.br.

RESUMO

A resistência à colistina em *Acinetobacter baumannii* representa ameaça terapêutica crítica, sendo este antimicrobiano o último recurso contra isolados multirresistentes. Este estudo investigou o impacto da exposição contínua a concentrações subinibitórias ($\frac{1}{4}$ da CIM) de colistina sobre uma cepa clínica de *A.baumannii*, avaliando a indução de resistência ao longo de 1.000 gerações bacterianas. Seis linhagens derivadas de um ancestral comum (CIM 0,312 μ M) foram propagadas: três em meio com colistina e três controles sem antimicrobiano. A CIM foi determinada por microdiluição em caldo segundo o protocolo CLSI. Após 1.000 gerações, apenas uma linhagem exposta desenvolveu resistência estável (CIM 10 μ M), enquanto os controles preservaram a suscetibilidade nativa. Os resultados sugerem que a subdosagem atua como filtro seletivo de mutantes estocásticos de baixa frequência, alertando para os riscos de regimes posológicos subótimos em ambiente hospitalar.

Palavras-chave: acinetobacter baumannii; Colistina; Resistência a antimicrobianos

INTRODUÇÃO

A disseminação global de patógenos bacterianos multirresistentes (MDR) constitui uma das mais graves ameaças contemporâneas à saúde pública mundial, limitando as opções de intervenção terapêutica eficazes e elevando de forma expressiva os índices de morbimortalidade hospitalar. O uso indiscriminado ou sob esquemas posológicos subterapêuticos de antibióticos acelera a seleção de cepas refratárias, forçando a reintrodução na prática médica de compostos de última linha, como as polimixinas — notadamente a polimixina E (colistina) —, peptídeos catiônicos essenciais para o manejo de infecções graves causadas por bactérias gram-negativas não fermentadoras (Mwangi et al., 2019).

Dentre esses agentes patogênicos, destaca-se *Acinetobacter baumannii*, um cocobacilo gram-negativo, aeróbio estrito, pertencente à classe Gammaproteobacteria e família Moraxellaceae, amplamente reconhecido por sua capacidade de persistir em superfícies inanimadas e constituir biofilmes densos em dispositivos médicos invasivos (Gedefie et al., 2023). Clinicamente, *A. baumannii* está associado a surtos de pneumonias associadas à ventilação mecânica e bacteremias secundárias em unidades de terapia intensiva, com taxas de letalidade variando entre 45% e 60%, podendo ultrapassar 80% em infecções causadas por isolados pan-resistentes (Magill et al., 2018).

Os determinantes moleculares clássicos de resistência à colistina envolvem a neutralização da carga negativa do lipídio A da membrana externa, decorrente de mutações nos sistemas reguladores de dois componentes pmrA/pmrB, ou pela perda total de lipopolissacarídeos (LPS) induzida por inativação dos genes da via lpxACD, além de modificações de permeabilidade e bombas de efluxo (Bostanghadiri et al., 2024). Não obstante a caracterização desses mecanismos finais, permanece uma lacuna de conhecimento acerca da dinâmica evolutiva intra-hospitalar: como a exposição prolongada



e contínua a subdosagens antimicrobianas — cenário comum em tecidos com penetração farmacológica deficiente — direciona o acúmulo gradual de adaptações fenotípicas ao longo de centenas de gerações bacterianas.

OBJETIVO

Investigar o impacto da exposição contínua a concentrações subinibitórias de polimixina E (colistina) sobre uma cepa clínica de *Acinetobacter baumannii*, avaliando a indução de resistência sob regime de pressão seletiva cumulativa ao longo de 1.000 gerações bacterianas.

MÉTODO

Foi utilizado o isolado clínico multirresistente de *Acinetobacter baumannii* 3321216, proveniente do HRAN (Brasília/DF) e pertencente ao biobanco da UCB. O antibiótico teste foi sulfato de colistina (Sigma-Aldrich), e os cultivos foram realizados em caldo e ágar Mueller-Hinton II cátion-ajustado (CAMHB).

Culturas com 5×10^5 UFC/mL foram incubadas a 37 °C sob agitação (120 rpm) por 24h, em microplacas de 96 poços e tubos de ensaio. A densidade óptica (600 nm) foi monitorada em intervalos seriados e modelada pela equação modificada de Gompertz (GraphPad Prism 10.5.0), obtendo-se densidade assintótica máxima, taxa de crescimento específico e duração da fase exponencial. Ao final, determinou-se UFC/mL, tempo de duplicação e número de gerações.

Solução-estoque de ~8,62 mM preparada a partir de 139,3 mg de pó em 10 mL de água Milli-Q, filtrada em membrana PVDF 0,22 µm, alíquotada e armazenada a -20 °C protegida da luz.

Microdiluição em caldo conforme protocolo CLSI M07-A10, com diluições seriadas de colistina (0,078–10 µM), inóculo de 5×10^5 células/mL, controles de esterilidade e crescimento, incubação a 37 °C por 24h em triplicata técnica. Turbidez indicou crescimento; limpidez indicou inibição.

A cepa clínica 3321216 foi exposta diariamente a $\frac{1}{4}$ da CIM basal de colistina em 2 mL de caldo MHCA, com inóculo de 5×10^5 UFC/mL, incubados a 37 °C/120 rpm por 24h. A cada ciclo, a passagem diária seguia um esquema de diluição em duas etapas: 50 µL do cultivo anterior ($\sim 10^9$ UFC/mL) eram diluídos em 2 mL de salina 0,9% ($\rightarrow 10^8$ UFC/mL), e então 10 µL dessa suspensão eram transferidos para novo tubo com 2 mL de meio + colistina, atingindo a concentração final de 5×10^5 UFC/mL. O processo foi repetido continuamente até completar 1.000 gerações. Alíquotas diárias foram armazenadas em glicerol 20% a -80 °C para acesso a diferentes momentos evolutivos.

A unidade experimental foi a linhagem biológica independente ($n = 3$ por condição). As triplicatas técnicas foram utilizadas para determinação da CIM e não foram consideradas unidades experimentais independentes, evitando pseudoreplicação. Como todas as linhagens derivaram do mesmo ancestral, a variação fenotípica de cada trajetória evolutiva foi calculada em relação ao ancestral comum, por meio do fold-change (CIM final/CIM ancestral) e de sua transformação em $\log_2$. Os resultados foram apresentados individualmente e resumidos pela mediana e amplitude, considerando o pequeno número de réplicas biológicas e a natureza discreta da CIM.

RESULTADOS

A caracterização cinética da cepa clínica de *Acinetobacter baumannii* 3321216 revelou um comportamento reprodutível, em relação aos parâmetros biométricos extraídos, o valor de densidade óptica máxima alcançou média de 1,055 nas placas de 96 poços e 1,126 nos tubos de ensaio. A constante de velocidade de crescimento situou-se em 0,2953 em placa e 0,3249 em tubo,



correspondendo a uma duração média da fase log de 3,386 horas e 3,078 horas, respectivamente. A quantificação direta revelou que o inóculo basal de 10^5 UFC/mL progrediu para 10^9 UFC/mL ao término de 24 horas, perfazendo um total de 13,02 gerações celulares por ciclo diário e um tempo médio de duplicação de 34,64 minutos.

Seis linhagens de *Acinetobacter baumannii* derivadas de um ancestral comum (CIM inicial para colistina = $0,312 \mu\text{M}$) foram mantidas por 1.000 gerações. Três linhagens biológicas independentes foram mantidas em MHCA sem colistina (CC1, CC2 e CC3), enquanto três linhagens independentes foram expostas continuamente a $0,078 \mu\text{M}$ de colistina ($\frac{1}{4}$ da CIM ancestral; Ccol1, Ccol2 e Ccol3). Cada valor de CIM corresponde ao resultado consolidado de uma análise em triplicata técnica.

Tabela 1

Variação da CIM em relação ao ancestral comum

Condição	Linhagem	CIM ancestral (μM)	CIM após 1.000 gerações (μM)	Fold-change	$\log_2$ fold-change
Controle	CC1	0,312	0,156	0,5×	-1
Controle	CC2	0,312	0,078	0,25×	-2
Controle	CC3	0,312	0,156	0,5×	-1
Controle	Ccol1	0,312	1,25	4×	+2
Controle	Ccol2	0,312	10	32×	+5
Controle	Ccol3	0,312	0,625	2×	+1

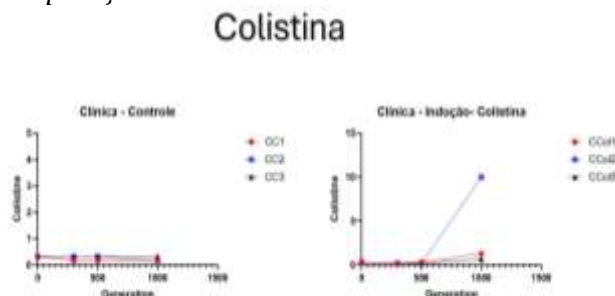
Nota: Resumo por condição: controles, mediana do $\log_2$ fold-change = -1 (amplitude: -2 a -1); linhagens expostas à colistina, mediana = +2 (amplitude: +1 a +5).

Fonte: Autores (2026).

Após 1.000 gerações, as três linhagens controle apresentaram CIMs de 0,156, 0,078 e 0,156 μM , correspondendo a variações de 0,5×, 0,25× e 0,5× em relação à CIM ancestral. Em contraste, as linhagens submetidas à exposição subinibitória apresentaram CIMs finais de 1,25, 10 e 0,625 μM , correspondendo a aumentos aproximados de 4×, 32× e 2×, respectivamente. Em escala $\log_2$, as linhagens controle apresentaram variações de -1, -2 e -1, enquanto as linhagens expostas apresentaram +2, +5 e +1. A mediana do $\log_2$ fold-change foi -1 no grupo controle e +2 no grupo exposto. Descritivamente, todas as linhagens submetidas à colistina evoluíram em direção ao aumento da CIM, enquanto nenhuma das linhagens controle apresentou aumento em relação ao ancestral comum. A magnitude distinta da resposta entre Ccol1, Ccol2 e Ccol3 indica trajetórias evolutivas independentes sob a mesma pressão seletiva.

Figura 1

Comparação CIM entre clínica controle e clínica indução.





Nota: O eixo Y apresenta os valores de concentração de colistina expressos em micromolar (μM); o eixo X representa o número de gerações.

Fonte: Autores (2026).

Durante o monitoramento periódico do perfil de resistência ao longo das 1.000 gerações, observou-se que apenas uma linhagem derivada adquiriu resistência estável, com a CIM elevando-se progressivamente até atingir 10 μM . As linhagens controle, mantidas em meio isento de antimicrobiano pelo mesmo período, não apresentaram alteração nos valores de CIM, preservando a suscetibilidade nativa.

CONCLUSÃO

O presente estudo estabeleceu que a pressão seletiva sustentada por 1.000 gerações em concentração subinibitória ($\frac{1}{4}$ da CIM = 0,078 μM) resultou no surgimento de resistência em apenas uma linhagem isolada, sugerindo um evento mutacional espontâneo de baixa frequência intrínseca sob condições de subdosagem. As culturas controle propagadas em meio isento de antimicrobiano mantiveram os valores originais de CIM inalterados ao longo de 1.000 gerações, demonstrando que a resistência observada pode ter derivado exclusivamente da pressão seletiva exercida pelo fármaco. A exposição prolongada à concentração subinibitória de colistina foi associada a uma mudança fenotípica consistente em direção ao aumento da CIM nas três linhagens independentes de *A. baumannii*. Os achados alertam criticamente para os riscos terapêuticos associados a regimes posológicos subótimos de colistina em ambiente hospitalar, cuja permanência em tecidos corporais pode acelerar a seleção de clones resistentes em patógenos oportunistas. Torna-se necessário o desenvolvimento de estudos complementares com um número maior de gerações, a fim de confirmar se a baixa frequência de indução de resistência observada constitui um padrão consistente ou um fenômeno dependente do contexto genético da cepa avaliada.

REFERÊNCIAS

- Bostanghadiri, N., Sameni, F., Hashemi, A., Razavi, S., & Darban-Sarokhalil, D. (2024). Prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: A systematic review and meta-analysis. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 13(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s13756-024-01382-7>
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Gedefie, A., Demsis, W., Biadglegne, F., & Alemayehu, E. (2023). Prevalence of biofilm producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*, 18(11), e0287211. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0287211>
- Magill, S. S., O'Leary, E., Janelle, S. J., Thompson, D. L., Dumyati, G., Nadle, J., Wilson, L. E., Kainer, M. A., Lynfield, R., Greissman, S., Ray, S. M., Beldavs, Z., Gross, C., Bamberg, W., Sievers, M., Higgins, C., Stover, V., & Edwards, J. R. (2018). Changes in prevalence of health care-associated infections in U.S. hospitals. *The New England Journal of Medicine*, 379(18), 1732–1744. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801550>
- Mwangi, J., Hao, X., Lai, R., & Zhang, Z. Y. (2019). Antimicrobial peptides: New hope in the war against multidrug resistance. *Zoological Research*, 40(6), 488–505. <https://doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2019.062>

Financiamento: Universidade Católica de Brasília.