



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências da Saúde

**Contribuição de mutações genéticas no gene *gyrA*
para a resistência a fluoroquinolonas por
*Arcobacter butzleri***

Ana Rita Martins Alves

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Coorientadores: Prof. Doutora Fernanda da Conceição Domingues e
Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

Covilhã, outubro de 2018

Aos meus pais, irmã, avós, tios e primos.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora Doutora Susana Ferreira pela oportunidade que me deu para trabalhar e aprender com ela. Muito obrigada por toda a paciência que teve comigo, toda ajuda e conselhos que me deu e todo o conhecimento que partilhou comigo durante este ano. Às minhas coorientadoras, Doutora Fernanda Domingues e Doutora Mónica Oleastro obrigada por toda a ajuda e apoio que me prestaram durante o realizar desta dissertação.

Obrigado à Universidade da Beira Interior e ao Centro de investigação de Ciências da Saúde (CICS-UBI) pela oportunidade e condições prestadas para a realização deste trabalho, bem como ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge pela colaboração neste projeto.

Aos meus colegas de laboratório de Microbiologia I, Ângelo, Joana e Marina, um muito obrigado porque trabalhar com alegria é sempre mais fácil, obrigado por toda a força, ajuda e gargalhadas que partilhamos.

Um agradecimento muito especial às minhas meninas da salinha Carla, Dalinda, Diana, Jane, Marina e Marta, por tudo o que vivi com elas este ano. Obrigado a todas e cada uma de vocês pela ajuda, pelas gargalhadas, as conversas, os jantares, as noitadas, os cafés, os concelhos mas principalmente obrigada por estarem lá sempre, pelo apoio, por não me deixarem ir abaixo nunca e por me fazerem ver sempre o lado positivo das coisas. Uma grande amizade não se mede na quantidade de anos em que dura, mas sim nos momentos vividos. Este ano foi apenas o início da grande aventura que é a nossa amizade. Vou levar-vos para sempre no meu coração, obrigada por tudo família salinha.

A todos os meus colegas e amigos do CICS-UBI entreajuda e simpatia em todos os momentos durante o trabalho laboratorial. Em especial às meninas do andar de baixo, Cátia e Rita, pela amizade e apoio muito obrigada.

Obrigada Catarina, a melhor amiga que podia ter que sempre esteve comigo e que me compreende como ninguém.

Aos meus queridos pais Cila e Rui por me apoiarem todos os dias e me puxarem sempre para a frente, obrigada pela paciência, amor, ajuda que me deram sempre bem como os sermões que precisei de ouvir para poder ver tudo de outra perspetiva e pelo esforço que fizeram durante todo o ano. Obrigado por serem os melhores pais do mundo. A minha irmã, Inês, muito obrigada por estares sempre comigo mesmo estando longe. Obrigada aos meus queridos avós paternos, tios e primos pelo constante apoio, motivação e confiança. Aos meus avós maternos e padrinho Jorge que mesmo não estando fisicamente comigo sei que estiveram e vão estar sempre comigo. Um enorme obrigado a minha família que sei que têm muito orgulho em mim.

Resumo

Arcobacter butzleri é considerado o quarto agente de *Campylobacter-like organism* isolado a partir de amostras diarreicas em humanos. As fluoroquinolonas são normalmente utilizadas na primeira linha de tratamento de infecções severas causadas por *Arcobacter* spp.. A elevada frequência de resistência a esta classe de antibióticos observada em *A. butzleri* poderá constituir uma grande preocupação para a saúde pública. Assim, este trabalho tem como objetivo avaliar os mecanismos de resistência às fluoroquinolonas em *A. butzleri*, tendo como foco a contribuição de mutações espontâneas, bem como na sua diversidade, e no papel das bombas de efluxo. Inicialmente procedeu-se à determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de estirpes suscetíveis a três fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina). Através do ensaio de flutuação foi determinada uma taxa média de mutação espontânea de $2.34 \times 10^{-9} \pm 1.72 \times 10^{-9}$ para todas as estirpes de *A. butzleri* estudadas. Posteriormente, os mutantes foram avaliados pela determinação da concentração mínima inibitória e pela análise das mutações presentes na região determinante de resistência às quinolonas (RDRQ) dos genes *gyrA* e *gyrB* através da amplificação e sequenciação destas regiões. Todos os mutantes avaliados apresentaram resistência às fluoroquinolonas, tendo sido identificadas três mutações pontuais, uma já descrita para esta resistência em *A. butzleri*, a mutação Thr85Ile (C254T), e duas novas mutações nunca descritas em *A. Butzleri*, Asp89Asn e Asp89Gli (G265A e A266G respetivamente) na RDRQ da *gyrA*, associada à resistência, mas sem correlação com o valor de CMI. A influência do gene *gyrB* na resistência às fluoroquinolonas em *A. butzleri* foi também estudada, porém não foi verificada. Quando não foi observada relação entre resistência e mutação pontual no gene *gyrA*, os resultados sugerem um contributo das bombas de efluxo na resistência às fluoroquinolonas por parte de membros de *A. butzleri*. A transformação de uma estirpe suscetível permitiu validar o papel da mutação C254T na RDRQ do gene *gyrA*. Verificou-se ainda que a presença desta mutação, espontânea ou por transformação, parece não afetar a robustez de *A. butzleri*. Assim, os resultados sugerem que as mutações encontradas nos codões 85 e 89 da RDRQ da *gyrA* bem como a ação das bombas de efluxo estão na base da resistência às fluoroquinolonas.

Palavras-chave

Arcobacter butzleri, DNA girase, Fluoroquinolonas, Mutações *gyrA*, Resistência

Abstract

Arcobacter butzleri is the fourth *Campylobacter*-like organism found in human diarrhoeal disease samples. The first line treatment for severe infections by *Arcobacter* spp. is based in the use of fluoroquinolones. The high frequency of resistance to this class of antibiotics found in *A. butzleri* strains could raise a significant public health concern. Thus, this work aimed to evaluate the mechanisms of resistance to fluoroquinolone in *A. butzleri*, with focus in the contribution of spontaneous mutations and their diversity, also in the contribution of efflux pumps. Firstly, the minimal inhibitory concentration (MIC) of the susceptible strains to three fluoroquinolones (ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin) was determined. The spontaneous mutation rate was then calculated by a fluctuation assay procedure, where all the tested *A. butzleri* strains had an average rate of around $2.34 \times 10^{-9} \pm 1.72 \times 10^{-9}$. After, the MIC for *A. butzleri* mutants derived from this assay was determined, followed by the analysis of target mutations in the quinolone resistance determining region (QRDR) of *gyrA* and *gyrB* through amplification and sequencing of these regions. The mutants were confirmed to be fluoroquinolone-resistant, where three different single point mutations were identified in QRDR of *gyrA*, one previously described to *A. butzleri* the mutation Thr85Ile (C254T), and two new mutations correlated with the fluoroquinolone resistance in *A. butzleri* Asp89Asn and Asp89Gln (G265A and A266G respectively); however with no direct correlation with the MIC value was found. The influence of *gyrB* in fluoroquinolone-resistance in *A. butzleri* was not confirmed. Nonetheless, for the cases where no point mutation was found in the *gyrA* gene, the obtained results suggest an influence of efflux pumps to fluoroquinolone-resistance. The role of C254T point mutation in *gyrA* QRDR was validated by transformation of a susceptible strain. The presence of this mutation, either arising spontaneously or by transformation, does not seem to have a cost to the fitness of *A. butzleri*. In sum, the results propose the mutations found in codons 85 and 89 of QRDR of *gyrA*, as well as, the action of efflux pumps as mechanisms behind the fluoroquinolone resistance in *A. butzleri* strains.

Keywords

Arcobacter butzleri, DNA gyrase, Fluoroquinolones, *gyrA* Mutations, Resistance

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. Género <i>Arcobacter</i>	1
1.2. <i>Arcobacter butzleri</i>	2
1.3. <i>Arcobacter butzleri</i> como agente patogénico	2
1.4. Vias de Transmissão de <i>Arcobacter butzleri</i>	3
1.4.1. Transmissão através do contacto pessoa-a-pessoa	3
1.4.2. Transmissão através do contacto com animais domésticos e selvagens	4
1.4.3. Transmissão através da ingestão de águas contaminadas	4
1.4.4. Transmissão através da ingestão de alimentos contaminados.....	5
1.5. Resistência a antibióticos	6
1.5.1. Resistência de <i>Arcobacter</i> spp. a antibióticos	7
1.6. Mecanismos de resistência a antibióticos	8
1.6.1. Resistência devida à inativação do fármaco.....	9
1.6.2. Resistência através da alteração do alvo	10
1.6.3. Resistência através da limitação do acesso ao alvo por parte do fármaco	11
1.7. Quinolonas	12
Capítulo 2 - Objetivos.....	17
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	19
3.1. Estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i>	19
3.2. Determinação de concentração mínima inibitória (CMI) para <i>Arcobacter butzleri</i>	19
3.3. Determinação da frequência de mutação espontânea em <i>Arcobacter butzleri</i>	20
3.4. Determinação da taxa de mutação espontânea em <i>Arcobacter butzleri</i>	21
3.5. Amplificação dos fragmentos de DNA.....	23
3.6. Sequenciação da região determinante de resistência às quinolonas dos genes <i>gyrA</i> e <i>gyrB</i>	24
3.7. Transformação natural	25
3.8. Avaliação da robustez das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> com resistência às fluoroquinolonas	26
3.8.1. Curva de crescimento.....	26
3.8.2. Ensaio de competição.....	27
3.8.3. Capacidade de formação de biofilmes.....	28
3.9. Avaliação fenotípica da expressão de bombas de efluxo dos mutantes	28
Capítulo 4 - Resultados e Discussão	31
4.1. Frequência de mutação espontânea em <i>Arcobacter butzleri</i>	31
4.2. Taxa de mutação espontânea de <i>Arcobacter butzleri</i>	34
4.3. Avaliação das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> resistentes a fluoroquinolonas.....	39
4.4. Avaliação fenotípica da expressão das bombas de efluxo.....	45

4.5.	Transformação de estirpes suscetíveis de <i>Arcobacter butzleri</i>	47
4.6.	Avaliação da robustez das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> com resistência às fluoroquinolonas	49
4.6.1.	Curva de crescimento	50
4.6.2.	Testes de competição	51
4.6.3.	Capacidade de formação de biofilmes.....	53
Capítulo 5 -	Conclusões e Perspetivas Futuras	55
Capítulo 6 -	Referências Bibliográficas	57
Anexo I.....		71
Anexo II		73
Anexo III		75
Anexo IV		77

Lista de Figuras

Figura 1 - Mecanismos de resistência a antibióticos em bactérias. A - alteração da molécula do antibiótico pela adição de grupos funcionais ou ligandos; B - destruição enzimática do antibiótico; C - alteração do alvo celular do antibiótico; D - modificação do alvo por alteração de grupos funcionais; E - efluxo do antibiótico; F - diminuição da permeabilidade da célula ao antibiótico. Figura baseada em (Blair *et al.*, 2015; Kashef & Hamblin, 2017) .

Figura 2 - Mecanismo de ação da classe de antibióticos quinolonas no seu alvo intracelular, a enzima DNA girase, o que provoca a inibição da síntese de DNA e do crescimento celular. Imagem adaptada de (Drlica & Zhao, 1997).

Figura 3 - Frequência de mutação espontânea da estirpe bacteriana de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 sob diferentes condições de atmosfera e temperatura (A) - DO_{620nm} de 0,6 (B) - DO_{620nm} de 6 com uma frequência de mutação espontânea de 1×10^{-10} como limite de detecção. Os resultados apresentados resultam da realização independente do ensaio seis vezes. As análises estatísticas foram realizadas com os testes *two-way* e *one-way* ANOVA.

Figura 4 - Representação tridimensional da projeção da proteína DNA girase da espécie *Arcobacter butzleri* através da plataforma SWISS-MODEL com o mapeamento local das mutações descritas com associação à resistência às fluoroquinolonas.

Figura 5 - Alinhamento da região específica da sequência onde ocorreram mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas de dois mutantes com a sua estirpe parental. A azul está representada a mutação da posição 254 (Thr85Ile); A cor-de-laranja está assinalada a mutação da posição 265 (Asp89Asn); Verde corresponde à mutação verificada na posição 266 (Asp89Gli). A - Mutantes e estirpe parental de *Arcobacter butzleri* CR113-2; B - Mutantes e estirpe parental de *Arcobacter butzleri* AB22/11; C - Mutantes e estirpe parental de *Arcobacter butzleri* 2003-1426; D - Mutantes e estirpe parental de *Arcobacter butzleri* DQ40A1.

Figura 6 -Ensaio da avaliação acumulação de brometo de etídio através da medição da fluorescência emitida pelo mesmo ao longo do tempo. O ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente, sendo que os valores apresentados correspondem à média dos valores obtidos.

Figura 7 - Curva de crescimento de quatro estirpes de *Arcobacter butzleri*, DQ40A1 (estirpe parental), 851 (estirpe *Arcobacter butzleri* DQ40A1 transformada com fragmento de DNA com mutação na posição 254 da RDRQ da *gyrA*), DQcip3 (estirpe com mutação espontânea na posição 254 da RDRQ do gene *gyrA*, usado como material genético dador para a transformação) e DQmox2 (estirpe com mutação espontânea na posição 254 da RDRQ da *gyrA*). Resultados obtidos

correspondem a média±desvio padrão resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *one-way* ANOVA.

Figura 8 - Custo relativo de três estirpes de *Arcobacter butzleri* resistentes às fluoroquinolonas associada à mutação C254T (Thr85Ile), provenientes, duas de mutações espontâneas (*Arcobacter butzleri* DQcip3 e *Arcobacter butzleri* DQmox2), e uma de transformação natural (*Arcobacter butzleri* 851) de uma estirpe suscetível aos mesmos antibióticos. Os resultados apresentados são provenientes da média±desvio padrão de pelo menos três ensaios realizados de forma independente. Análise estatística pelo teste *one-way* ANOVA.

Figura 9 - Formação de biofilmes de três estirpes de *Arcobacter butzleri* mutantes resistentes às fluoroquinolonas em comparação com a estirpe parental *Arcobacter butzleri* DQ40A1. Absorvância apresentada como média±desvio padrão, resultante de pelo menos três ensaios independentes, para cada estirpe de *Arcobacter butzleri* mutante e parental. A análise estatística foi realizada com o teste *one-way* ANOVA.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Estirpes de *Arcobacter butzleri* usadas durante o trabalho laboratorial, bem como a sua origem e referência.

Tabela 2 - Lista de *primers* utilizados nas reações de PCR, com informação da sua sequência, gene para o qual foi desenhado bem como a sua referência.

Tabela 3 - Concentração mínima inibitória de três fluoroquinolonas de gerações distintas (Ciprofloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina) para as quatro estirpes de *Arcobacter butzleri* parentais usadas ao longo do trabalho.

Tabela 4 - Valores da taxa de mutação espontânea para as quatro estirpes de *Arcobacter butzleri* em estudo, bem como os valores de UFC/mL ao tempo 0 (N_0) e no final (N_T), e ainda valor de m e o nome do método mais adequado utilizado para o seu cálculo.

Tabela 5 - Concentração mínima inibitória de ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina para mutantes selecionados dos ensaios de flutuação, bem como o seu aumento face à respetiva estirpe *Arcobacter butzleri* parental, e mutação ocorrida na zona RDRQ dos genes *gyrA* e *gyrB*.

Tabela 6 - Frequência de transformação da estirpe *Arcobacter butzleri* DQ40A1 com três fragmentos de DNA diferentes provenientes do ensaio de flutuação.

Tabela 7 - Concentração mínima inibitória da estirpe de *Arcobacter butzleri* selecionada do ensaio de transformação (*Arcobacter butzleri* 851) e da estirpe parental correspondente (*Arcobacter butzleri* DQ40A1) para três fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina), bem como a mutação no gene da *gyrA* associada a essa resistência.

Lista de Acrónimos

ABC	Do inglês “ <i>ATP-binding Cassette</i> ”
BA	Do inglês “ <i>Blood Agar</i> ”
BHI	Do inglês “ <i>Brain Heart Infusion</i> ”
CIP	Ciprofloxacina
CMI	Concentração Mínima Inibitória
DNA	Do inglês “ <i>Deoxyribonucleic Acid</i> ”
DO	Densidade Ótica
LEV	Levofloxacina
MATE	Do inglês “ <i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i> ”
MFS	Do inglês “ <i>Major Facilitator Superfamily</i> ”
MOX	Moxifloxacina
PCR	Do inglês “ <i>Polymerase Chain Reaction</i> ”
PBS	Do inglês “ <i>Phosphate-Buffered Saline</i> ”
RDRQ	Região Determinante de Resistência às Quinolonas
RND	Do inglês “ <i>Resistance Nodulation Division</i> ”
RPM	Rotações Por Minuto
SMR	Do inglês “ <i>Small Multidrug Resistance</i> ”
TSA	Do inglês “ <i>Tryptic Soy Agar</i> ”
TSB	Do inglês “ <i>Tryptic Soy Broth</i> ”
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

Comunicações Científicas

Comunicação oral de parte deste trabalho de Mestrado

- Alves A.R., Oleastro M., Domingues F., Ferreira S. “Contribution of *gyrA* gene mutations in *Arcobacter butzleri* fluoroquinolone resistance”, XIII Annual CICS-UBI Symposium, Covilhã, Portugal- 5-6 de julho 2018.

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Género *Arcobacter*

Arcobacter é um género de bactérias pertencente à família *Campylobacteraceae*, proposto pela primeira vez em 1991 por Vandamme (Vandamme & De Ley, 1991; Vandamme *et al.*, 1991), que compreende mais dois géneros, *Campylobacter* e *Sulfurospirillum* (Ferreira *et al.*, 2016; Lastovica *et al.*, 2013). Bactérias atualmente incluídas no género *Arcobacter* foram isoladas pela primeira vez por Ellis *et al.* (1977), no Reino Unido, em Belfast, a partir de fezes de bovinos e porcos (Ferreira *et al.*, 2017; Snelling *et al.*, 2006), tendo sido descritas como aerotolerantes. Porém, a designação *Arcobacter* só foi introduzida mais tarde, em 1991, com o intuito de reclassificar microrganismos aerotolerantes semelhantes entre si, pertencentes, até então, ao género *Campylobacter*. Assim, as espécies *Campylobacter cryaerophila* e *Campylobacter nitrofigilis* passaram a ser denominadas *Arcobacter cryaerophilus* e *Arcobacter nitrofigilis*, respetivamente (Collado & Figueras, 2011; Ferreira *et al.*, 2017; Kiehlbauch *et al.*, 1991).

As bactérias do género *Arcobacter* são caracterizadas pela sua morfologia em forma de “S” ou em espiral, por serem bactérias de Gram-negativo com motilidade via um único flagelo em uma ou ambas as extremidades, por não formarem esporos, e pela sua capacidade de formar colónias sem pigmentação (Adesiji *et al.*, 2014; Debruyne *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2006; Lastovica *et al.*, 2013; Lehner *et al.*, 2005; Vandamme & De Ley, 1991; Vandamme *et al.*, 1992b; Vandamme *et al.*, 1991). Estes microrganismos são ainda caracterizados pela sua baixa percentagem de G+C que normalmente está compreendida entre 24,6 e 35 mol% (Debruyne *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2017).

Arcobacter diferencia-se dos restantes géneros incluídos na família *Campylobacteraceae* pela sua capacidade de crescimento e sobrevivência num largo intervalo de temperaturas, compreendidas entre 15 °C e 42 °C, e tolerância a condições atmosféricas de aerobiose (Ferreira *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2006; Kjeldgaard *et al.*, 2009; Lastovica *et al.*, 2013; Lehner *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 2008; Vandamme *et al.*, 1992b). Em geral, as bactérias pertencentes a este género crescem sob diferentes condições atmosféricas, tais como aerobiose, microaerofilia e/ou anaerobiose, no entanto, a espécie *A. anaerophilus* é considerada a exceção do género devido à ausência de flagelo e ao facto de anaerobiose ser a sua única forma de respiração (Debruyne *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2006; Lastovica *et al.*, 2013; Lehner *et al.*, 2005; Sasi Jyothsna *et al.*, 2013).

Incluído na classe *Epsilonproteobacteria*, *Arcobacter* spp. está amplamente distribuído na natureza como, por exemplo, em plantas, animais, humanos e na água (Debruyne *et al.*, 2008). Algumas espécies são encontradas em produtos alimentícios de várias origens, nomeadamente de origem animal como bovinos, suínos ou de aves de capoeira, sendo esta última a principal fonte de isolamento de *Arcobacter* (Ferreira *et al.*, 2013; Ho *et al.*, 2006). Para além disso,

este microrganismo tem sido associado a diversas infecções bacterianas em humanos e animais por via da patogenicidade que algumas das espécies pertencentes ao género *Arcobacter* apresentam, salientando-se *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* (Ferreira *et al.*, 2017; Ho *et al.*, 2006).

Até à data, são conhecidas 27 espécies pertencentes ao género *Arcobacter* (Diéguez *et al.*, 2018; Pérez-Cataluña *et al.*, 2018; Tanaka *et al.*, 2017; Vicente-Martins *et al.*, 2018).

1.2. *Arcobacter butzleri*

A espécie *Arcobacter butzleri* foi isolada pela primeira vez por Kiehlbauch e seus colaboradores em 1991 a partir de humanos e animais diagnosticados com doença diarreica, sendo então denominada por *Campylobacter butzleri* (Kiehlbauch *et al.*, 1991). Mais tarde, esta espécie foi renomeada e designada como *Arcobacter butzleri* (Vandamme *et al.*, 1992b). Esta espécie tem sido descrita em vários estudos como o quarto *Campylobacter-like organism* mais frequente em amostras de fezes diarreicas humanas (Bücker *et al.*, 2009; Collado & Figueras, 2011; Ferreira *et al.*, 2014; Ho *et al.*, 2006; Prouzet-Mauléon *et al.*, 2006; Vandenberg *et al.*, 2004). *A. butzleri* tem sido associado a bacteriemia, diarreia persistente e aquosa, dores abdominais, náuseas e vômitos no ser humano, e ainda abortos em animais domésticos (Adesiji *et al.*, 2014; Debruyne *et al.*, 2008; Vandamme *et al.*, 1992a; Vandenberg *et al.*, 2004; Wesley & Miller, 2010).

A. butzleri tem a capacidade de sobreviver em diversas condições de stress, como por exemplo em cadáveres de animais e ambiente de matadouro e ainda nas tubagens de distribuição de água (Collado & Figueras, 2011; Ferreira *et al.*, 2013; Lemay *et al.*, 2002). Esta capacidade parece resultar da capacidade que esta bactéria tem em aderir às superfícies e formar biofilmes que fornecem às células uma matriz exopolissacarídica protetora, o que faz com que as células sejam dificilmente eliminadas, tornando-se assim uma preocupação a nível da saúde pública (Ferreira *et al.*, 2013; Kjeldgaard *et al.*, 2009).

1.3. *Arcobacter butzleri* como agente patogénico

Algumas das espécies de *Arcobacter* têm sido associadas a doenças autolimitadas desencadeadas por infecções no trato intestinal, sendo consideradas como enteropatogéneos emergentes em humanos e animais, nomeadamente *A. butzleri* (Adesiji *et al.*, 2014; Collado & Figueras, 2011). Estes microrganismos correlacionam-se ainda com doenças diarreicas prolongadas e também infecções sistémicas, tais como bacteremia, que ocorre quando existe uma entrada de bactérias no sistema sanguíneo (Adesiji *et al.*, 2014).

A capacidade de adesão e invasão de células tanto humanas como animais está associada com algumas espécies incluídas no género *Arcobacter* (Ho *et al.*, 2006; Levican *et al.*, 2014; Wesley

& Miller, 2010), com diversos trabalhos a sugerir *A. butzleri* como capaz de adesão celular, e implicado em efeitos citotóxicos. Este efeito está correlacionado com a apoptose e comprometimento da função das células intestinais, mecanismos que estão muito associados a doenças diarreicas (Bücker *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2006; Musmanno *et al.*, 1997; Wesley & Miller, 2010). Numa pesquisa realizada em 2005, onde foram estudadas 18 estirpes de *A. butzleri*, Lehner e os seus colaboradores demonstraram que algumas destas estirpes são potencialmente virulentas e ainda que 17 das 18 estirpes testadas apresentam efeitos citotóxicos para as células epiteliais dos rins (Vero), e células epiteliais do ovário (CHO) (Lehner *et al.*, 2005). Esta patogenicidade, aliada à presença de *A. butzleri* em alimentos e águas consumidos no dia-a-dia, leva a que esta espécie seja considerada um agente patogénico com alguma relevância.

1.4. Vias de Transmissão de *Arcobacter butzleri*

Como referido anteriormente, os microrganismos pertencentes ao género *Arcobacter* têm a capacidade de crescer numa vasta gama de temperatura, o que lhes permite sobreviver quando sujeitos a temperaturas de processamento e armazenamento de alimentos. Isto, aliado à sua tolerância a altas concentrações de cloreto de sódio (NaCl), comparativamente a membros do género *Campylobacter*, e à sua facilidade de adesão a diferentes superfícies, promove a persistência e sobrevivência destes microrganismos em alimentos e na água (Collado & Figueras, 2011; D'Sa & Harrison, 2005; Lemay *et al.*, 2002).

Os microrganismos que pertencem ao género *Arcobacter* podem infetar os seres humanos e animais por diversas vias de transmissão, tais como transmissão pessoa-a-pessoa, transmissão por contacto com animais (domésticos e/ou selvagens), e transmissão por ingestão de alimentos e águas contaminados (Collado & Figueras, 2011).

1.4.1. Transmissão através do contacto pessoa-a-pessoa

A transmissão de *A. butzleri* através do contacto pessoa-a-pessoa foi sugerida por Vandamme *et al.* (1992a) num estudo de um surto que ocorreu numa escola italiana em 1983. Neste caso, 10 crianças da mesma escola de diferentes anos (cinco crianças da pré-primária, duas do primeiro ano da primária e três do terceiro ano da primária) e uma professora da mesma escola apresentaram sintomas, tais como dores abdominais e falta de resposta aos medicamentos usados. Alguns casos apresentaram ainda episódios ocasionais de vômito, mas com ausência de diarreia e febre (Collado & Figueras, 2011; Vandamme *et al.*, 1992a). O período em que os casos ocorreram, bem como o facto de os microrganismos isolados de todos os pacientes incluídos no estudo pertencerem ao mesmo genótipo de *A. butzleri*, levaram os autores a proporem a hipótese de transmissão pessoa-a-pessoa, como uma potencial via de transmissão desta bactéria (Vandamme *et al.*, 1992a).

Mais tarde, em 1995, foi relatado um caso de infecção neonatal, em que a criança nasceu após 29 semanas de gestação e a qual foi diagnosticada com bacteremia neonatal provocada por *A. butzleri*, propondo-se assim, a transmissão vertical como uma possível via de transmissão desta bactéria (Collado & Figueras, 2011; On *et al.*, 1995).

1.4.2. Transmissão através do contacto com animais domésticos e selvagens

Alguns estudos comprovaram a presença de *A. butzleri* em amostras de fezes e saliva de diversos animais (Collado & Figueras, 2011; Fera *et al.*, 2009; Fernández *et al.*, 2007). Particularmente foi encontrada a presença desta espécie em amostras de saliva de gato (Fera *et al.*, 2009) e de fezes de cão, boi, pelicano, pardal, galinha, pato e peru (Fernández *et al.*, 2007). Apontando assim o contacto com fezes e fluidos de origem animal como outra possível via de transmissão de infecções bacterianas provocadas por *A. butzleri* (Collado & Figueras, 2011).

1.4.3. Transmissão através da ingestão de águas contaminadas

Devido às suas propriedades de adesão a variadas superfícies, o género *Arcobacter* tem a capacidade de sobreviver em diversos ambientes que podem funcionar como uma fonte de contaminação para animais e para o ser humano. A presença de microrganismos deste género em ambientes aquáticos como oceanos/mares, rios, lagos, reservatórios de água, águas subterrâneas e esgotos foram referidas por diversos autores (Collado *et al.*, 2008; Fera *et al.*, 2004; Jacob *et al.*, 1998; Maugeri *et al.*, 2000; Musmanno *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 1999; Stampi *et al.*, 1993), que a consideram uma importante fonte de transmissão destes microrganismos, tanto para animais como para o Homem (Collado *et al.*, 2008).

A espécie *A. butzleri* é indicada como a espécie mais prevalente nos ambientes aquáticos (Collado *et al.*, 2008; Fera *et al.*, 2004; Jacob *et al.*, 1998; Musmanno *et al.*, 1997; Rice *et al.*, 1999). De acordo com o estudo realizado por Rice e seus colaboradores, esta espécie é sensível a tratamentos com cloro, sendo, por isso, um possível tratamento para a descontaminação das águas, e justificando o facto de esta bactéria não ser isolada a partir de águas cloradas (Rice *et al.*, 1999). Contudo, a facilidade de adesão desta bactéria às superfícies de vários materiais como aço inoxidável, cobre e plástico (Assanta *et al.*, 2002) constituem uma grande preocupação, uma vez que as bactérias aderidas às superfícies possuem maior resistência a tratamentos, quando comparadas com as bactérias não aderidas (Herson *et al.*, 1987).

De modo a fortalecer a relevância deste tipo de transmissão, é de salientar o surto de infecções por *Arcobacter* spp. ocorrido em 2004 em Ohio, Estados Unidos da América, devido à contaminação de águas. Neste caso foi relatada uma situação de contaminação massiva da água, que levou a diversos casos de pessoas diagnosticadas com doenças gastrointestinais. Após investigações promovidas pelos departamentos de saúde de Ottawa e Ohio foi confirmada a presença de *Arcobacter* spp. nas amostras de água recolhidas, não tendo, no entanto, sido feita uma identificação ao nível de espécie (Fong *et al.*, 2007). *A. butzleri* foi já, por mais do que

uma vez, isolado a partir de reservas de água potável (Jacob *et al.*, 1998; Rice *et al.*, 1999), nomeadamente em 1999, um estudo conduzido por Rice e seus colaboradores detetaram a presença de *A. butzleri* em amostras retiradas de um lago usado por campistas, os quais desencadearam dores abdominais, um dos sintomas correlacionado com infeções por *A. butzleri* (Rice *et al.*, 1999). Isto indica o consumo de águas contaminadas como uma potencial via de transmissão de elevada importância.

1.4.4. Transmissão através da ingestão de alimentos contaminados

O consumo de alimentos contaminados com microrganismos do género *Arcobacter* é outra das potenciais vias de transmissão dessas bactérias e que tem sido apontada como muito relevante. Isto deve-se à presença muito frequente desta bactéria em alimentos de origem animal, sendo encontrado essencialmente em aves de capoeira, porco e vaca (Ho *et al.*, 2006). Mas também em géneros alimentícios que são consumidos crus ou sujeitos a baixo processamento térmico, como é o caso de vegetais e mariscos (González & Ferrús, 2011; Hausdorf *et al.*, 2013; Morejón *et al.*, 2017).

Uma preocupação relacionada com este tipo de transmissão é a possível ocorrência de surtos de doenças gastrointestinais desencadeadas por infeções causadas por *A. butzleri*. Em 2008 em Winsconson nos Estados Unidos da América, foi reportado um surto de doença diarreica num conjunto de pacientes, convidados de um casamento. Após investigação e análises aos convidados do casamento bem como da refeição servida no mesmo, concluiu-se que a infeção por *A. butzleri* foi uma das possíveis causas para o surto, uma vez que esta bactéria foi encontrada nos alimentos testados bem como em quatro dos pacientes (Lappi *et al.*, 2013). A relevância da transmissão por consumo de alimentos é salientada pela presença destes microrganismos em vários tipos de produtos alimentares consumidos no dia-a-dia.

O isolamento de *A. butzleri* a partir de amostras de origem animal é descrito em diversos estudos um pouco por todo o mundo (Hsu & Lee, 2015). Particularmente, estes microrganismos já foram isolados a partir de carcaças e órgãos internos de aves de capoeira (González *et al.*, 2007; Pejchalá *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2007; Villalobos *et al.*, 2013), carcaças e fezes de gado bovino (Duffy & Fegan, 2012; Merga *et al.*, 2013, 2011), fezes de búfalo (Piva *et al.*, 2013), e ainda a partir de fezes de ovelhas (Merga *et al.*, 2011), mas também de produtos como leite cru (Ferreira *et al.*, 2017; Giacometti *et al.*, 2015).

Recentemente, num estudo realizado por Morejón e seus colaboradores, foram isoladas três espécies de *Arcobacter* a partir de amostras de marisco, nomeadamente *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. defluvii*, onde a espécie *A. butzleri* foi a mais frequente nas amostras analisadas (Morejón *et al.*, 2017). Em outros estudos foi, também, relatada a presença deste género em alimentos vegetais, tais como alface (González & Ferrús, 2011) e espinafres (Hausdorf *et al.*, 2013). Estes estudos indicam também uma grande preocupação ao nível da saúde pública uma vez que estes alimentos são maioritariamente consumidos quando se encontram mal confeccionados ou mesmo crus.

1.5. Resistência a antibióticos

Com a descoberta da penicilina, uma substância capaz de inibir o crescimento bacteriano, em 1929 por Alexander Fleming, a medicina entrou numa nova era (Fleming, 1929; Sengupta *et al.*, 2013). Devido a esta descoberta, houve a necessidade de classificar substâncias como a penicilina, as quais têm capacidade de inibir o crescimento bacteriano, assim em 1947 este género de substâncias foram classificadas como Antibióticos estando definidas, segundo Selman Waksma, como “*Substâncias químicas, produzidas por microrganismos, que têm a capacidade de inibir o crescimento e destruir bactérias e outros microrganismos*” (Waksman, 1947).

Os antibióticos são medicamentos muito usados em diversos tratamentos médicos, tais como a tratamento de infeções ou em tratamentos de cirurgias invasivas, o que tem melhorado significativamente a saúde pública, levando à diminuição da mortalidade e ao consequente aumento da esperança média de vida da população (Blair *et al.*, 2015). Contudo, o vasto uso destes medicamentos, quer em tratamentos clínicos quer no tratamento veterinário, levou a um aumento da quantidade de bactérias multirresistentes a nível global (Andersson & Hughes, 2014; Blair *et al.*, 2015; Houf *et al.*, 2004; MacLean *et al.*, 2010; Ventola, 2015). Isto conduz à diminuição da eficácia dos antibióticos, que juntamente com a falta de desenvolvimento de novos medicamentos instiga um aumento acentuado de infeções que ficam sem tratamento (MacLean *et al.*, 2010; Ventola, 2015). Outra possível explicação para o aparecimento de cada vez mais estirpes bacterianas resistentes a antibióticos é o uso dos mesmos, ainda que em quantidades menores, na agricultura que leva à possível transmissão dessas estirpes resistentes para Humanos e animais (Andersson & Hughes, 2014). Esta resistência a antibióticos por parte de bactérias patogénicas é considerada, nos dias de hoje, uma das principais ameaças à saúde mundial e segurança alimentar, pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2017).

As bactérias podem apresentar resistência a fármacos por mecanismos intrínsecos ao próprio microrganismo, ou por adquirirem essa característica, por via de mutações genéticas no seu genoma ou por transferência de material genético de outras bactérias (Blair *et al.*, 2015; Munita & Arias, 2016).

Resistência intrínseca a um antibiótico, por parte de uma bactéria, ocorre quando esta possui características estruturais ou funcionais que não permitem a sua suscetibilidade à molécula antimicrobiana. Esta capacidade que as bactérias têm, ao serem naturalmente resistentes a diferentes classes de antibióticos, é abundante na natureza e está relacionada com a incapacidade de alcançar o alvo intracelular, extrusão do fármaco, ou pela incapacidade da molécula em atravessar a membrana externa (Blair *et al.*, 2015; Cox & Wright, 2013). As bactérias de Gram-negativo são resistentes intrinsecamente a diversos antibióticos, tais como a daptomicina ou a vancomicina devido à estrutura da sua membrana externa, que os impede de alcançarem o espaço periplasmático (Blair *et al.*, 2015). A extrusão de forma ativa do fármaco do interior da célula é outro mecanismo de resistência intrínseca, tal como a destruição do fármaco pela produção de enzimas com essa capacidade (Li *et al.*, 2007). A

simples inexistência de alvo intracelular suscetível ao antibiótico é uma forma intrínseca de resistência, uma vez que, para a ação antimicrobiana é necessária a ligação do fármaco ao seu alvo (Blair *et al.*, 2015).

As bactérias podem também, ao longo do tempo, sofrer alterações de forma a se adaptarem às condições a que são expostas, um exemplo disso é a sua capacidade de adquirir resistência a alguns antibióticos. Isto pode ocorrer por via de mutações no seu genoma, modificando os genes dos alvos dos antibióticos, ou por transferência de material genético proveniente de outras bactérias resistentes (Blair *et al.*, 2015; Van Hoek *et al.*, 2011). A resistência adquirida relaciona-se, normalmente, com a alteração enzimática do alvo intracelular ou do próprio fármaco, o impedimento da entrada do fármaco na célula ou da sua baixa concentração intracelular (Blair *et al.*, 2015; Van Hoek *et al.*, 2011). A transferência horizontal de genes é uma via viável pela qual as células adquirem resistência a diversos antibióticos. Este processo consiste na transferência de material genético de um microrganismo para outro por uma via diferente da reprodução, e tem vindo a ganhar cada vez maior importância, pois tem sido apontada como uma das causas para a origem de mutações que levam à resistência a antibióticos (Blair *et al.*, 2015; Munita & Arias, 2016). Este processo pode assim levar ao aparecimento de novas estirpes resistentes a diversos agentes antimicrobianos por norma usados no tratamento de infeções bacterianas, resultando numa vantagem seletiva destas novas estirpes resistentes em relação às estirpes suscetíveis (Munita & Arias, 2016; Thomas & Nielsen, 2005). Este tipo de partilha de material genético pode ocorrer por três vias: transformação, transdução ou conjugação (Munita & Arias, 2016; Thomas & Nielsen, 2005). O método de transformação natural bacteriana é o mais simples das três, porém é o mais difícil de ocorrer naturalmente, devido a nem todas as bactérias serem naturalmente competentes, ou seja, serem capazes de ser transformadas naturalmente. Em ambientes hospitalares a conjugação bacteriana é o mais passível de ocorrer (Munita & Arias, 2016).

1.5.1. Resistência de *Arcobacter* spp. a antibióticos

Em infeções provocadas por microrganismos da família *Campylobacteraceae*, como *Campylobacter* e *Arcobacter*, os antibióticos recomendados para utilização como primeira linha de tratamento são os macrólidos, como a eritromicina, e as fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, devido à suscetibilidade descrita para estes microrganismos a estes compostos antimicrobianos (Houf *et al.*, 2004; Luber *et al.*, 2003; Vandenberg *et al.*, 2006). Porém algumas espécies, como *A. butzleri*, podem demonstrar resistência a antibióticos da classe das fluoroquinolonas devido a uma mutação que ocorre na região determinante de resistência a quinolonas (RDRQ) do gene que codifica para a DNA girase A (Abdelbaqi *et al.*, 2007; Collado & Figueras, 2011).

O isolamento de *A. butzleri* resistente à ciprofloxacina a partir de amostras de variadas origens tem sido referido por diversos autores, o que representa uma grande preocupação, uma vez que infeções provocadas por este tipo de microrganismos patogénicos serão assim mais

difícilmente tratadas com os antibióticos convencionais. Num estudo realizado por Morejón e colaboradores demonstrou-se que 12% das estirpes de *A. butzleri* isoladas de amostras de marisco eram resistentes a duas fluoroquinolonas de diferentes gerações (levofloxacina e ciprofloxacina) (Morejón *et al.*, 2017). Em outros estudos foram relatadas percentagens de resistência à ciprofloxacina mais elevadas, nomeadamente, numa pesquisa realizada em matadouros portugueses, onde de entre os 43 isolados de *A. butzleri* obtidos, 55,8% eram resistentes à ciprofloxacina (Ferreira *et al.*, 2013). Em 2013, Shah e seus colaboradores realizaram um estudo em diversas quintas na Malásia, onde de entre todas as amostras recolhidas foram identificados 20 isolados de *Arcobacter* spp., sendo 45% desses identificados como *A. butzleri*, e 33,4% desses exibiram resistência à ciprofloxacina (Shah *et al.*, 2013). Noutro estudo realizado no mesmo ano, Villalobos e coautores avaliaram a presença de microrganismos em órgãos internos de galinhas na Costa Rica, onde 66,7% das amostras com *Arcobacter* spp. foram identificadas como *A. butzleri* e 25% dessas apresentaram resistência à ciprofloxacina (Villalobos *et al.*, 2013). Mais recentemente, uma investigação em diversos estabelecimentos de comércio de alimentos a retalho em Portugal, observou-se que 27,7% das 30 amostras positivas para *A. butzleri* eram resistentes à ciprofloxacina (Vicente-Martins *et al.*, 2018).

1.6. Mecanismos de resistência a antibióticos

Como já foi referido anteriormente, as bactérias podem ser naturalmente resistentes a antibióticos ou podem adquirir, essa resistência através de mutações no seu genoma ou por transferência horizontal de genes (Blair *et al.*, 2015; Munita & Arias, 2016; Van Hoek *et al.*, 2011).

Os mecanismos que estão na origem da resistência a antibióticos estão relacionados com a ação da molécula antimicrobiana, limitando-a pela alteração do alvo ou prevenindo o seu acesso, mas também pela eliminação, inativação enzimática da molécula antimicrobiana, ou pela diminuição da sua entrada na célula, mecanismos representados na Figura 1 (Blair *et al.*, 2015; Munita & Arias, 2016; Van Hoek *et al.*, 2011).

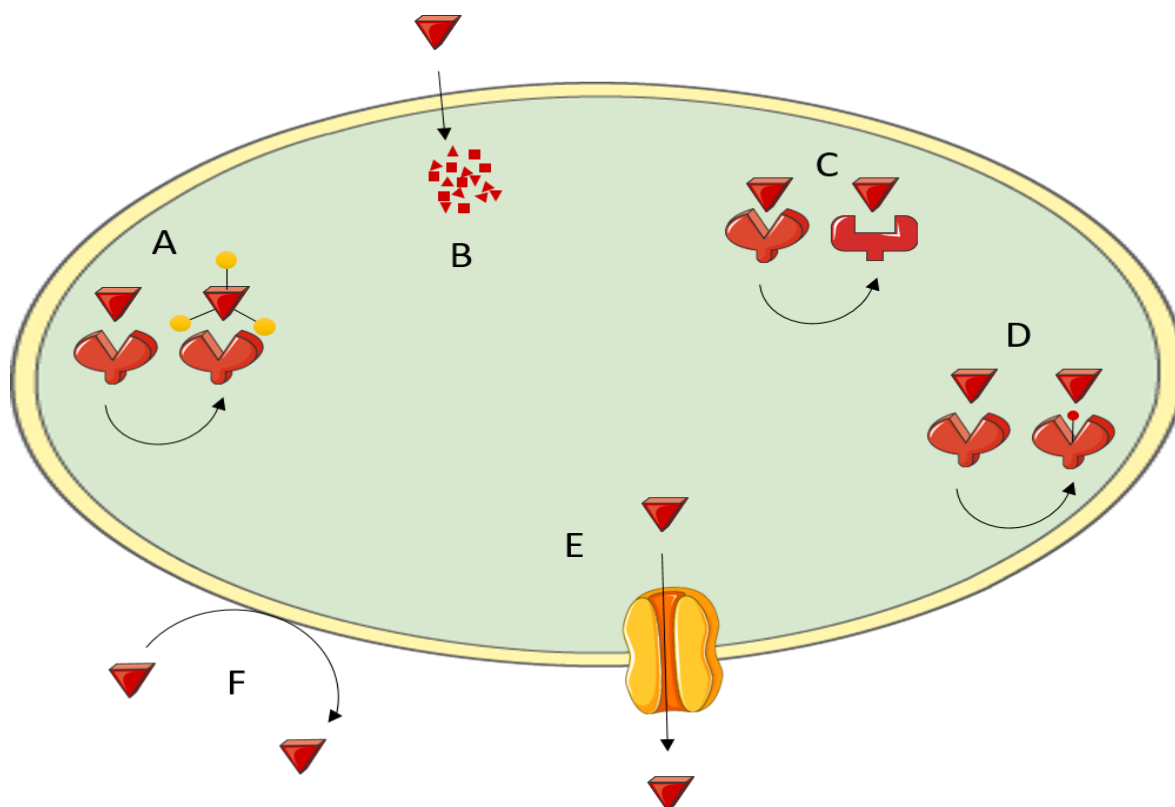


Figura 1 - Mecanismos de resistência a antibióticos em bactérias. A - alteração da molécula do antibiótico pela adição de grupos funcionais ou ligandos; B - destruição enzimática do antibiótico; C - alteração do alvo celular do antibiótico; D - modificação do alvo por alteração de grupos funcionais; E - efluxo do antibiótico; F - diminuição da permeabilidade da célula ao antibiótico. Figura baseada em (Blair *et al.*, 2015; Kashef & Hamblin, 2017).

1.6.1. Resistência devida à inativação do fármaco

A inativação e destruição das moléculas de fármaco através de modificação enzimática do mesmo (Figura 1A e B) é um dos métodos que as células desenvolveram como mecanismo de resistência a fármacos e outras moléculas antimicrobianas (Blair *et al.*, 2015; Munita & Arias, 2016).

A destruição ou alteração do fármaco pode envolver, por exemplo reações de hidrólise, oxidação-redução ou ainda transferência de grupos funcionais, provocando uma impossibilidade de ligação entre a molécula e o seu alvo celular. Estas reações são catalisadas por muitas enzimas produzidas pelas próprias bactérias (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008; Munita & Arias, 2016; Puglia & Gualerzi, 2017). As principais enzimas hidrolíticas pertencem aos grupos das amidases, esterases ou epoxidases (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008; Puglia & Gualerzi, 2017). As amidases estão associadas à quebra do anel presente na estrutura química de antibióticos, como os β -lactâmicos (ex: penicilina). As esterases estão envolvidas na abertura do anel de antibióticos, como os macrólidos (ex: eritromicina), através da quebra da ligação éster. As epoxidases atacam o carbono do anel epóxido, quebrando-o em antibióticos, como a

fosfomicina (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008; Puglia & Gualerzi, 2017). Este é um mecanismo descrito como envolvido na resistência a aminoglicosídeos, como a canamicina, e β -lactâmicos, como a penicilina, em bactérias do gênero *Campylobacter* (Iovine, 2013).

A inativação do fármaco pode ocorrer ainda por reações de oxidação-redução, por via da oxidação da molécula antimicrobiana (Dzidic *et al.*, 2008), ou pela transferência de grupos funcionais para ou da molécula, mediada por enzimas transferases, tais como grupos acilo, fosfato, hidroxilo ou amida (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008). Este é um dos potenciais mecanismos de resistência ao antibiótico cloranfenicol, por parte de *Arcobacter* spp. e *Campylobacter* spp., onde ocorre a acetilação do fármaco em questão, pela ação de enzimas cloranfenicol acetiltransferases, impedindo assim a ação farmacológica e a consequente resistência a esse fármaco (Miller *et al.*, 2007; Van Hoek *et al.*, 2011). Em *A. butzleri* a resistência a antibióticos β -lactâmicos poderá também ser explicada por este mecanismo, uma vez que, no seu genoma estão presentes genes que codificam três β -lactamases potencialmente associadas à destruição desta classe de fármacos (Miller *et al.*, 2007).

1.6.2. Resistência através da alteração do alvo

O mecanismo de ação dos antibióticos é mediado pela sua ligação com grande afinidade ao seu alvo celular. Mas se este alvo for modificado, levando à redução ou eliminação da afinidade com o antibiótico, este não se liga, não exercendo a sua atividade antimicrobiana (Figura 1C e D) (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008; Munita & Arias, 2016; Puglia & Gualerzi, 2017; Spratt, 1994). A modificação do alvo é devida, normalmente, a mutações pontuais no gene que codifica a expressão desse mesmo alvo, alterações enzimáticas no local de ligação fármaco-alvo ou ainda substituição do alvo (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008; Munita & Arias, 2016; Puglia & Gualerzi, 2017; Spratt, 1994).

A alteração do alvo celular do fármaco devido à ocorrência de mutações pontuais em genes cromossômicos é o principal mecanismo de resistência encontrado em muitas bactérias resistentes a antibióticos, como é o caso das fluoroquinolonas. Neste caso a mutação ocorrida leva à alteração da(s) subunidade(s) das enzimas DNA girase e topoisomerases IV, o que impede a ligação de moléculas como as fluoroquinolonas a estas (Dever & Terence, 1991; Munita & Arias, 2016). A resistência à fluoroquinolona ciprofloxacina por parte de bactérias incluídas nos gêneros *Arcobacter* spp. e *Campylobacter* spp., é um exemplo de resistência adquirida por alteração do alvo celular, uma vez que ambos os gêneros são naturalmente suscetíveis a esta classe de antibióticos, porém uma mutação que ocorre no gene da subunidade A da enzima DNA girase promove a alteração do alvo intracelular, o que resulta em resistência (Abdelbaqi *et al.*, 2007; Blair *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2003).

Os alvos podem ainda ser modificados, sem ocorrência de alterações no genoma da bactéria, mas por proteção do alvo abrangendo modificações enzimáticas que levam à adição de novos grupos funcionais no alvo. A resistência a macrólidos em bactérias como *C. jejuni* e *H. pylori* pode ocorrer por este tipo de mecanismos, em que uma metilação, por parte da enzima

codificada pelo gene *erm* (do inglês “*erythromycin ribossomal methylation*”), do alvo ribossomal impede a ligação antibiótico-alvo (Blair *et al.*, 2015; Munita & Arias, 2016). Este mecanismo é também encontrado na resistência a outros antibióticos como a tetraciclina e penicilina por parte de bactérias do género *Campylobacter* e *Helicobacter* (Iovine, 2013; Nishizawa & Suzuki, 2014).

A substituição do alvo celular ao qual o antibiótico se liga é uma das estratégias celulares que permite à célula manter a sua funcionalidade bioquímica sem sofrer o efeito antimicrobiano do antibiótico (Munita & Arias, 2016). Este mecanismo é característico da resistência à meticilina em *S. aureus*, onde o alvo do antibiótico, uma PBP (do inglês “*Penicillin binding protein*”), é substituída por uma PBP exógena denominada PBP2a (Munita & Arias, 2016; Stapleton & Taylor, 2007).

1.6.3. Resistência através da limitação do acesso ao alvo por parte do fármaco

A limitação do acesso ao alvo celular do antibiótico é outro exemplo de mecanismo de resistência a fármacos. Este mecanismo tem como princípio base impedir que a molécula antimicrobiana tenha a capacidade de alcançar o seu alvo, através do aumento do efluxo do fármaco (Figura 1E) ou da redução da permeabilidade celular ao antibiótico (Figura 1F) (Blair *et al.*, 2015; Munita & Arias, 2016).

Este tipo de mecanismo é de grande importância para bactérias de Gram-negativo de modo a defenderem-se do efeito de antibióticos mais hidrofílicos, uma vez que a sua entrada na célula é realizada por difusão pela membrana celular através de porinas que atravessam a membrana externa. Fluoroquinolonas ou β -lactâmicos são exemplos deste tipo de antibióticos, onde alterações na permeabilidade celular afetam a sua entrada na célula (Blair *et al.*, 2015; Munita & Arias, 2016; Pagès *et al.*, 2008). A permeabilidade celular pode ser regulada por diferentes métodos, entre eles, uma alteração do tipo de proteínas transmembranares (porinas) expressas pela célula, ou diminuição da sua expressão ou ainda a inibição funcional das mesmas (Blair *et al.*, 2015). A diminuição da permeabilidade da membrana celular às moléculas do fármaco é um exemplo de mecanismo de resistência que ocorre em bactérias do género *Campylobacter* a β -lactâmicos e tetraciclina (Iovine, 2013).

O aumento da extrusão das moléculas antimicrobianas de forma ativa através de um sistema celular, denominado de bombas de efluxo é outro mecanismo desenvolvido pela célula para limitar o acesso do antibiótico ao seu alvo intracelular (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008; Munita & Arias, 2016; Puglia & Gualerzi, 2017). Estas bombas de efluxo podem ser divididas em cinco diferentes famílias e apresentam diferenças estruturais entre si, bem como nos fármacos que excretam e fontes de energia que podem ter. Estas bombas podem então ser classificadas como RND (do inglês “*Resistance Nodulation Division*”), MFS (do inglês “*Major Facilitator Superfamily*”), SMR (do inglês “*Small Multidrug Resistance*”), MATE (do inglês “*Multidrug and Toxic Compound Extrusion*”) e ABC (do inglês “*ATP-binding Cassette*”) (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008; Munita & Arias, 2016; Piddock, 2006; Puglia & Gualerzi, 2017).

Nos dias de hoje são conhecidos diversos casos de resistência a antibióticos por via deste mecanismo, sendo que o primeiro caso foi relatado em 1980 por McMurry *et al.* (1980) para a resistência à tetraciclina em *E. coli* (McMurry *et al.*, 1980). As fluoroquinolonas e cloranfenicol são alguns dos antibióticos reconhecidos como sendo bombeados para o meio extracelular em bactérias de Gram-negativo por este mecanismo (Munita & Arias, 2016). Este é um mecanismo que influencia a resistência a alguns antibióticos, como fluoroquinolonas, macrólidos ou ainda tetraciclina por parte de bactérias incluídas no gênero *Campylobacter* (Iovine, 2013). Existem, ainda, estudos que indicam a possibilidade de alguns sistemas de efluxo poderem ter influência na suscetibilidade a antibióticos em microrganismos da espécie *H. pylori* (Amsterdam *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008).

A baixa concentração de fármaco dentro das células, quer pela diminuição da permeabilidade da célula a essas moléculas quer pela extrusão ativa do fármaco por parte das bombas de efluxo poderá estar na base da resistência por parte de *A. butzleri* a quinolonas hidrofóbicas, tais como o ácido nalidíxico ou ácido oxolínico. Esta possibilidade foi proposta por Miller e seus colaboradores em 2007 uma vez que, esta espécie apresentou suscetibilidade a quinolonas hidrofílicas, tais como a ciprofloxacina e através do estudo do seu genoma, não foram encontradas quaisquer mutações já associadas, previamente, à resistência às quinolonas (Miller *et al.*, 2007).

1.7. Quinolonas

As quinolonas são agentes antibacterianos sintéticos, derivados de quinina, de grande importância devido ao seu vasto uso no tratamento de diversas doenças, como infecções bacterianas do trato intestinal, pele e outros tecidos, doenças sexualmente transmissíveis ou ainda pneumonia adquirida em ambientes hospitalares, entre outras (Ullah & Ali, 2017).

A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, foi descrita para uso médico e inicialmente aplicada no tratamento de várias doenças como infecções ao nível do trato urinário, infecções gastrointestinais, infecções do trato respiratório, entre outras (Fàbrega *et al.*, 2009; Suh & Lorber, 1995). Estes agentes antimicrobianos estão distribuídos por quatro gerações, e são classificados de acordo com as suas alterações químicas, quando comparadas com a estrutura química da primeira quinolona. O ácido nalidíxico, juntamente com cinoxacina e o ácido oxolínico, constituem a primeira geração de quinolonas, as quais estão descritas para o tratamento de infecções provocadas por bactérias de Gram-negativo (Fàbrega *et al.*, 2009; Lee & Kanatani, 1999).

Com o passar dos anos surgiu a necessidade de melhorar os antibióticos existentes no mercado, tanto na sua eficácia como no seu espectro antimicrobiano. Para este fim foram realizadas alterações na estrutura química das moléculas, aparecendo assim três novas gerações de quinolonas denominadas por fluoroquinolonas, devido à adição de fluor ao anel principal da estrutura das quinolonas (Fàbrega *et al.*, 2009; Lee & Kanatani, 1999; Redgrave *et al.*, 2014).

A segunda geração de quinolonas, correspondente à primeira geração de fluoroquinolonas, caracteriza-se pela adição de um átomo de fluor na posição seis do principal anel carbonado da quinolona e pela sua melhorada eficácia em bactérias de Gram-negativo aeróbias. Esta compreende os antibióticos ciprofloxacina, enoxacina, lemfloxacina, ofloxacina e norfloxacina, sendo a ciprofloxacina uma das fluoroquinolonas mais usadas em diversos tratamentos de doenças tanto de foro clínico como de foro veterinário nos dias de hoje (Fàbrega *et al.*, 2009; Lee & Kanatani, 1999; Scheld, 2003). Posteriormente surgiu uma terceira geração de quinolonas (segunda geração de fluoroquinolonas) que engloba uma nova categoria de antibióticos eficazes perante microrganismos de Gram-negativo aeróbios, porém com baixa eficácia em organismos anaeróbios e algum efeito face bactérias de Gram-positivo. Esta geração abrange antibióticos como levofloxacina, sparfloxacina e ainda grepafloxacina (Fàbrega *et al.*, 2009; Lee & Kanatani, 1999; Scheld, 2003). A última e mais recente geração de quinolonas (terceira geração de fluoroquinolonas) é caracterizada pela sua ação eficaz perante bactérias de Gram-negativo aeróbias e anaeróbias, e melhoria na eficácia em microrganismos de Gram-positivo. Nesta geração incluem-se antibióticos como a moxifloxacina, gatifloxacina, trovafloxacina ou ainda a cinofloxacina (Fàbrega *et al.*, 2009; Lee & Kanatani, 1999; Scheld, 2003).

As quinolonas em geral são dos antibióticos mais largamente utilizados para o tratamento de diversas infeções. Segundo um estudo realizado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC), *European Food Safety Authority* (EFSA) e *European Medicines Agency* (EMA), a Roménia é o país europeu com maior consumo destes antibióticos na população humana, enquanto que o Reino Unido possui o menor consumo destes agentes antimicrobianos em humanos (ECDC, EFSA & EMA, 2017). Em Portugal, o consumo de quinolonas e fluoroquinolonas apresenta valores mais elevados para animais produtores de alimentos para consumo do que para humanos. É ainda de salientar que Portugal é o 9º país europeu com maior consumo destes antibióticos em humanos dentro dos 29 países estudados (ECDC; EFSA & EMA, 2017).

O mecanismo de ação das quinolonas (Figura 2) envolve a inibição da síntese de DNA, devido à inibição das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, o que leva à morte celular da bactéria (Dever & Terence, 1991; Fàbrega *et al.*, 2009).

A DNA girase é uma enzima tetramérica composta por duas subunidades A e duas subunidades B (A₂B₂), codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respetivamente. Esta enzima é uma das duas topoisomerases de tipo II, e está envolvida no processo que antecede a replicação do DNA, em que ocorre o desenrolamento das cadeias superenroladas de DNA (Dever & Terence, 1991; Fàbrega *et al.*, 2009; Pourahmad Jaktaji & Mohiti, 2010). Esta enzima foi descrita em 1976 num estudo realizado por Gallert e seus colaboradores onde foi definida como uma enzima dependente de ATP capaz de separar cadeias duplas superenroladas de DNA circular e introduzir nelas superenrolamento negativo bem como relaxar cadeias de DNA superenrolado negativamente (Gellert *et al.*, 1976; Reece & Maxwell, 1991). Esta enzima tem a função de

desenrolar e enrolar as cadeias de DNA, através da quebra e formação das pontes de hidrogénio estabelecidas entre as bases. Esta funcionalidade tem gasto de energia pela hidrólise de ATP das bactérias, e é essencial aos processos de replicação, transcrição, recombinação ou reparação do DNA (Champoux, 2001; Pourahmad Jaktaji & Mohiti, 2010). As duas subunidades desta enzima caracterizam-se por terem funções diferentes neste processo, onde a subunidade A (94 kDa) codificada pelo gene *gyrA* é responsável pela interação com o DNA, onde procede à clivagem da sua dupla hélice superenrolada e posterior religação e enrolamento das cadeias de DNA sobre si mesmas. A subunidade B (90 kDa), codificada pelo gene *gyrB*, possui um sítio ativo da ATPase, enzima que catalisa a hidrólise do ATP, de modo a facilitar a passagem das cadeias de DNA pela enzima DNA girase, com gasto de energia (Champoux, 2001; Champoux, 2001; Gellert *et al.*, 1976; Noble & Maxwell, 2002; Nöllmann *et al.*, 2007; Pantel *et al.*, 2012; Reece & Maxwell, 1991). O domínio C-terminal da subunidade B pensa-se também que pode estar envolvido na clivagem do DNA (Noble & Maxwell, 2002).

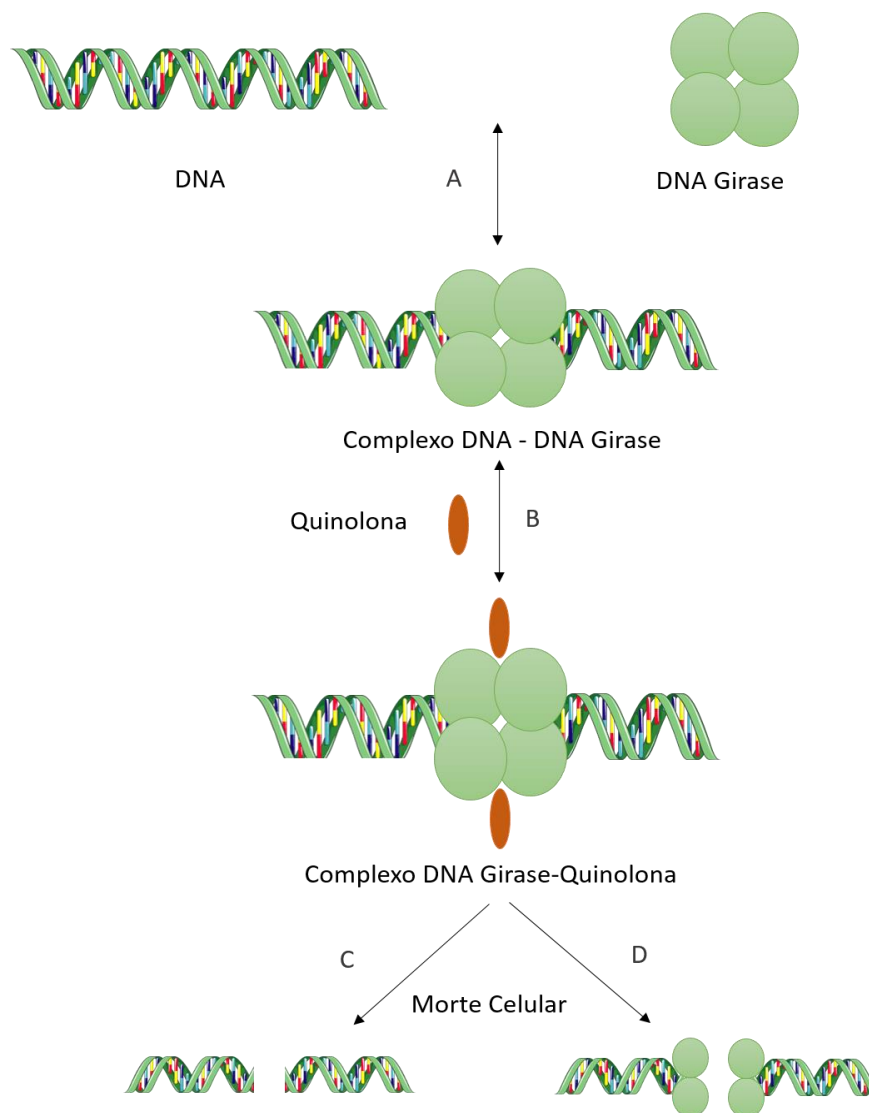


Figura 2 - Mecanismo de ação da classe de antibióticos quinolonas no seu alvo intracelular, a enzima DNA girase, o que provoca a inibição da síntese de DNA e do crescimento celular. Imagem adaptada de Drlica & Zhao (1997).

A Figura 2 representa o mecanismo de ação destes antibióticos, onde ocorre numa primeira fase a interação entre a enzima DNA girase e o DNA levando à formação de um complexo clivado (Figura 2A). Posteriormente ocorre a ligação da quinolonas ao complexo DNA-DNA girase, mais especificamente à subunidade A da enzima DNA girase (Figura 2B), e a consequente quebra letal da cadeia dupla de DNA (Figura 2C) ou dissociação das subunidades da enzima DNA girase, devido a altas concentrações de quinolonas, com consequente quebra letal das cadeias duplas de DNA (Figura 2D).

Cada vez mais existem estirpes bacterianas resistentes a antibióticos incluindo as quinolonas, esta resistência passa, normalmente, pela ocorrência de mutações pontuais na região determinante de resistência às quinolonas do gene da DNA girase, mais especificamente na subunidade A da mesma, que promovem alterações no alvo (Jacoby, 2005). Esta modificação no gene leva a uma alteração do aminoácido expresso, que por consequência leva à alteração na enzima DNA girase A, alvo de ação das quinolonas (Dever & Terence, 1991; Fàbrega *et al.*, 2009; Hooper & Jacoby, 2015; Lee & Kanatani, 1999; Rice, 2012). Para além deste mecanismo, normalmente associado à resistência à ciprofloxacina, existem alguns estudos que propõem a possibilidade de a resistência a esta classe de antibióticos, poder ser devida a mutações ocorridas no gene *gyrB* ou ainda pela ação de bombas de efluxo, que procedem à extrusão do fármaco de forma ativa. Em *M. tuberculosis* foram já encontradas mutações no gene *gyrB* que levam a uma transição a nível do DNA e alteração dos aminoácidos codificados, associadas à resistência a fluoroquinolonas (Aubry *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2011; Pantel *et al.*, 2012; Veziris *et al.*, 2007). Também em *H. pylori* foi já relacionada uma mutação no gene *gyrB* com resistência a fluoroquinolonas, por si só ou de forma associada com mutações no gene *gyrA* (Miyachi *et al.*, 2006; Rimbara *et al.*, 2012). A extrusão do fármaco de forma ativa de modo a diminuir a concentração intracelular do mesmo é outro mecanismo possível pelo qual pode ocorrer resistência às fluoroquinolonas (Ge & McDermott, 2005; Luo *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2007; Pumbwe *et al.*, 2004; Van Hoek *et al.*, 2011). Em 2007, Miller e os seus colaboradores, num estudo do genoma total de uma estirpe de *A. butzleri*, verificaram que esta apresentava resistência para quinolonas hidrofóbicas, como é exemplo o ácido nalidíxico, porém esta não conseguia ser explicada pela mutação no gene *gyrA* normalmente associada a este tipo de resistência. Por isto os autores propuseram a existência de uma bomba de efluxo capaz de enviar o fármaco para meio extracelular, de forma ativa, como explicação para a resistência encontrada (Miller *et al.*, 2007). Em membros do género *Campylobacter* a resistência às fluoroquinolonas foi já associada à extrusão de forma ativa através de bombas de efluxo. Esta extrusão pode ocorrer simultaneamente com a mutação no gene *gyrA* agindo de forma sinérgica no aumento da resistência a fluoroquinolonas (Ge & McDermott, 2005; Luo *et al.*, 2003), no entanto, foi já relatada a influência exclusiva das bombas de efluxo na diminuição da acumulação do fármaco dentro da célula (Pumbwe *et al.*, 2004).

Em *Arcobacter spp.*, à semelhança de microrganismos de outros géneros próximos, como *Campylobacter*, existe uma associação entre a presença de mutações pontuais na região RDRQ

presente no gene *gyrA*, e a ocorrência de resistência a fluoroquinolonas (Abdelbaqi *et al.*, 2007; Morejón *et al.*, 2017; Van den Abeele *et al.*, 2016). É nesta região, mais precisamente na posição 254, codão 85, que ocorre uma mutação pontual já previamente associada à resistência a ciprofloxacina por parte das estirpes de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* (Abdelbaqi *et al.*, 2007). Esta mutação baseia-se na alteração de uma única base, ocorrendo a transição de uma citosina por uma timina, que leva à alteração de aminoácido, de uma treonina para uma isoleucina (Abdelbaqi *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2016; Morejón *et al.*, 2017). Mais recentemente foi descrita uma outra mutação associada à resistência à ciprofloxacina, onde ocorre a transição de um ácido aspártico para uma tirosina, no codão 89, porém esta mutação foi induzida laboratorialmente, através de pressão seletiva, e não foi ainda descrita como ocorrendo naturalmente em isolados de *Arcobacter* spp. (Ferreira *et al.*, 2018). Várias mutações no gene *gyrA* têm sido descritas com associação à resistência às quinolonas, nomeadamente em algumas espécies do género *Campylobacter* foram já reportadas outras mutações, para além da mutação Thr86Ile, porém não conferindo à bactéria um elevado nível de resistência, tais como Asp90Asn, Thr86Lys, Thr86Ala Thr86Val e Asp90Tyr (Wieczorek & Osek, 2013).

As mutações na região determinante de resistência às quinolonas levam a uma diminuição da afinidade da molécula para com o seu alvo, a enzima DNA girase, levando à resistência do organismo a este fármaco. Assim a enzima continua funcional catalisando o processo de desenrolamento das cadeias superenroladas de DNA, que antecede os processos de replicação DNA (Jacoby, 2005; Wieczorek & Osek, 2013).

A resistência a antibióticos por parte de bactérias patogénicas é um problema global que cada vez mais constitui uma grande preocupação ao nível da saúde pública mundial. De modo a tentar combater o problema de resistência aos antibióticos, é necessário perceber melhor os mecanismos intracelulares e moleculares que originam essa resistência.

Capítulo 2 - Objetivos

O aumento da resistência aos antibióticos por parte de bactérias patogênicas é um problema cada vez maior a nível mundial e é considerado com uma das principais ameaças à saúde pública pela Organização Mundial de Saúde. Assim, é importante estudar os mecanismos que conferem resistência bacteriana aos antibióticos e desta forma desenvolver métodos eficazes de detecção de bactérias resistentes, o que poderá ajudar na prevenção e tratamento das infeções. *A. butzleri* é considerado um enteropatogéneo emergente que embora esteja normalmente associado com doença autolimitada, em casos de maior gravidade pode haver necessidade de recorrer-se ao uso de antibióticos, como as fluoroquinolonas, para o seu tratamento. O isolamento de estirpes de *A. butzleri* resistentes a fluoroquinolonas tem sido reportado a partir de amostras de diversas origens, em alguns casos com elevada frequência de resistência. A resistência a fluoroquinolonas em *A. butzleri* é associada a mutações pontuais no gene que codifica a enzima DNA girase, alvo intracelular da ação das fluoroquinolonas, porém pouco se sabe acerca da diversidade de mutações pontuais associadas a esta resistência bem como a sua influência na robustez bacteriana. Assim, este trabalho teve como objetivo geral a avaliação da contribuição de mutações pontuais para a resistência a fluoroquinolonas por parte de membros da espécie *A. butzleri* bem como a diversidade das mesmas. Para tal, foram definidos para este estudo os seguintes objetivos específicos:

- Determinar a taxa de mutação espontânea da espécie *A. butzleri*;
- Avaliar as mutações que surgem de forma espontânea e de que forma interferem na suscetibilidade de *A. butzleri* a antibióticos da classe das fluoroquinolonas;
- Determinar que outros mecanismos, tais como as bombas de efluxo, poderão estar associados à resistência de *A. butzleri* a fluoroquinolonas;
- Construir estirpes de *A. butzleri* portadoras de mutações pontuais no gene da DNA girase;
- Compreender a influência das mutações que levam à resistência às fluoroquinolonas na robustez de *A. butzleri*.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Estirpes de *Arcobacter butzleri*

Para a realização de todas as tarefas referidas foram utilizadas quatro estirpes suscetíveis à ciprofloxacina, pertencentes à espécie *A. butzleri*, provenientes de origens distintas, nomeadamente DQ40A1, CR113-2, AB22/11 e 2003-1426 representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Estirpes de *Arcobacter butzleri* usadas durante o trabalho laboratorial, bem como a sua origem e referência.

Estirpe	Origem	Referência
<i>A. butzleri</i> AB22/11	Superfície de Matadouro	(Ferreira <i>et al.</i> , 2013)
<i>A. butzleri</i> CR113-2	Vegetais prontos para consumo	(Vicente-Martins <i>et al.</i> , 2018)
<i>A. butzleri</i> DQ40A1	Superfície de um equipamento de uma queijaria	(Ferreira, <i>et al.</i> , 2017)
<i>A. butzleri</i> 2003-1426	Fezes diarreicas de origem humana	(Ferreira <i>et al.</i> , 2014)

3.2. Determinação de concentração mínima inibitória (CMI) para *Arcobacter butzleri*

Para avaliar a suscetibilidade de um microrganismo a um determinado antimicrobiano é necessário determinar a concentração mínima inibitória (CMI) desta (Ge *et al.*, 2013). A concentração mínima inibitória define-se como sendo a menor concentração para a qual o antibiótico ou antimicrobiano em estudo não permite crescimento visível do microrganismo. Este é um parâmetro fundamental na determinação da suscetibilidade de microrganismos a novos antibióticos e antimicrobianos em estudo (Andrews, 2001).

Neste trabalho foi determinada a CMI para quatro estirpes de *A. butzleri* (DQ40A1, CR113-2, AB22/11 e 2003-1426) a três fluoroquinolonas de três gerações diferentes, ciprofloxacina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América), levofloxacina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América) e moxifloxacina (Sigma-Aldrich, Estados Unidos da América), levofloxacina e moxifloxacina, através do método de microdiluição descrito em Ferreira e seus colaboradores (2018).

Para tal, as estirpes foram previamente colocadas a crescer em placas de *Tryptic Soy Agar* (TSA) (Merck, Alemanha) durante 24 horas em aerobiose a 30 °C. Para a realização de diluições

sucessivas numa microplaca de 96 poços foram colocados 50 µL de meio *Tryptic Soy Broth* (TSB) (Merck, Alemanha) em cada poço, posteriormente foram adicionados 50 µL das soluções de cada antibiótico com as concentrações iniciais desejadas, nos respetivos poços e realizadas diluições sucessivas de 1:2 (2 - 0,015 µg/mL). Após isto foi adicionado 50 µL de inóculo diluído de 1:100 em meio TSB resultante de uma suspensão celular preparada por suspensão direta de colónias em solução salina de NaCl (Fisher Chemical, Estados Unidos da América) a 0,85% (p/v) e ajustada a uma turbidez de ~0,5 McFarland. Por fim a microplaca de 96 poços foi incubada a 30 °C por 48 h. Os ensaios foram realizados pelo menos duas vezes de forma independente. Posteriormente foi determinada a CMI por observação a olho nu da turbidez dos poços e subsequente verificação do resultado através da avaliação da densidade ótica a um comprimento de onda de 620 nm (DO_{620nm}), usando-se para tal fim um leitor de microplacas EZ Read 400 (biochrom, Reino Unido). Considerou-se a ausência de crescimento para $DO_{620nm} \leq 0,05$.

3.3. Determinação da frequência de mutação espontânea em *Arcobacter butzleri*

A frequência de mutação espontânea é definida como sendo a fração de mutantes presentes numa cultura de células (Pope *et al.*, 2008) e foi determinada de acordo com o descrito previamente por Haas e seus colaboradores (Haas *et al.*, 1990) com algumas modificações. Este ensaio foi realizado com o objetivo principal de estabelecer quais as condições ótimas a utilizar em todos os ensaios subsequentes, para isso foi utilizada uma estirpe de *A. butzleri* sob diferentes condições de crescimento.

Assim, a estirpe *A. butzleri* DQ40A1 foi previamente colocada a crescer durante 24 horas em placas de TSA sob quatro diferentes condições, 30 °C ou 37 °C sob condições de aerobiose ou microaerofilia, esta última obtida através de incubação das placas numa jarra com uma mistura composta por 80% N₂, 7,1% CO₂, 3,6% H₂ e 6% O₂ através do auxílio do equipamento de geração de atmosfera, Anoxomat Mark II (Advanced Instruments, Holanda) A biomassa foi recolhida e suspensa numa solução de NaCl a 0,85%, centrifugada a 8000 ×g durante 3 minutos à temperatura ambiente, onde o sobrenadante foi descartado e o depósito celular suspenso em solução salina a uma DO_{620nm} de 0,6 ou 6, correspondente a aproximadamente 10⁹ e 10¹⁰ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL, respetivamente. De seguida foram inoculados 100 µL da suspensão celular em placas de TSA suplementadas com ciprofloxacina com uma concentração correspondente a 4× CMI. As placas foram incubadas sob diferentes condições, nomeadamente, em aerobiose a 30 °C, aerobiose a 37 °C, microaerofilia a 30 °C e microaerofilia a 37 °C. Procedeu-se ainda à determinação das células cultiváveis pela técnica de “*drop-plate*” onde 10 µL de diluições decimais realizadas em solução salina, correspondentes a 10⁻⁵ a 10⁻¹¹, foram aplicadas numa placa de TSA, e incubadas nas mesmas condições referidas anteriormente. As colónias formadas foram contadas após 48 horas e durante os 5 dias

posteriores. A frequência de mutação espontânea corresponde à razão das UFC/mL obtidas por contagem das placas com meio seletivo com antibiótico e as UFC/mL totais, contadas em meio não seletivo sem antibiótico.

3.4. Determinação da taxa de mutação espontânea em *Arcobacter butzleri*

A taxa de mutação espontânea (μ) define-se como a probabilidade das células adquirirem uma mutação sem a intervenção de agentes exógenos ao longo da sua vida. Para o cálculo deste parâmetro um dos métodos mais utilizados é a realização de ensaios de flutuação (Rosche & Foster, 2000; Foster, 2006). Este tipo de ensaios foi introduzido pela primeira vez num estudo desenvolvido por Luria e Delbrück (Luria & Delbrück, 1943), e são realizados através da análise da distribuição de mutantes em diversas culturas paralelas, o que permitirá o cálculo da taxa de mutação espontânea (Pope *et al.*, 2008; Foster, 2006; Rosche & Foster, 2000). Para a realização deste método é necessário garantir alguns parâmetros, nomeadamente: o inóculo inicial não pode possuir mutações pré-existentes provenientes da pré-cultura; o inóculo inicial deve apresentar um baixo número de células (aproximadamente 1×10^4 UFC/mL), e deve ocorrer um aumento de pelo menos 1000x no número de células que possui o inóculo final quando comparado o inóculo inicial ($N_t > 1000 \times N_0$) (Foster, 2006; Pope *et al.*, 2008; Rosche & Foster, 2000).

De modo a garantir estes parâmetros foram realizadas três culturas paralelas para cada estirpe em estudo, após a execução de uma pré-cultura em meio líquido durante 18 horas a 30 °C e 100rpm num incubador orbital (ARALAB, Portugal) com uma DO_{620nm} inicial de 0,001.

Com vista a garantir o tamanho do inóculo inicial do ensaio, após crescimento da pré-cultura foram determinadas as UFC/mL da mesma de modo a estabelecer qual a diluição mais apropriada, e a obter um inóculo inicial com aproximadamente 10^4 UFC/mL em todas as culturas paralelas num volume de 5 mL de meio TSB. Essa diluição foi ainda confirmada pela determinação das UFC/mL ao tempo zero da cultura subsequente.

A não existência de mutações pré-existentes no inóculo inicial foi verificada após inoculação de 30 μ L da cultura inicial já diluída corretamente em placas de TSA suplementadas com os antibióticos ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina em concentrações correspondentes a pelo menos 4x CMI destes para as estirpes em estudo.

O crescimento das células foi controlado ao longo do ensaio pela determinação das UFC/mL das culturas paralelas às 0, 24 e 48 horas de modo a verificar a validade do parâmetro $N_t > 1000 \times N_0$.

Após a garantia dos parâmetros necessários à realização deste ensaio, o mesmo foi efetuado em pelo menos 20 culturas paralelas para cada estirpe em estudo. Assim, inicialmente foi realizada uma pré-cultura num erlenmeyer de 50 mL com um volume de 10 mL de TSB, iniciada

com uma DO620nm de 0,001 sob condições de aerobiose, 30 °C e 100rpm, após crescimento prévio das estirpes em placas de TSA durante 24 horas em aerobiose a 30 °C. Depois de 18 horas de crescimento foi realizada uma diluição de 1:20000 da pré-cultura em cada um dos tubos, para um volume final de 5 mL de TSB. As UFC/mL totais foram determinadas pelo método “drop plate” por aplicação em placa de TSA de 10 µL das diluições correspondentes a 10⁰ a 10⁻³, provenientes das culturas de três tubos independentes escolhidos de forma aleatória, e incubados durante 48 horas em aerobiose a 30 °C. Após 48 horas de crescimento das culturas paralelas sob as mesmas condições, referidas anteriormente, procedeu-se à determinação das UFC/mL, bem como à inoculação de placas de meio seletivo. Para isto foram plaqueadas, à semelhança do que foi realizado às 0 horas, triplicados de 10 µL das diluições equivalentes a 10⁻³ a 10⁻⁹ de três tubos escolhidos aleatoriamente. Foram ainda inoculados 500 µL, através da técnica do espalhamento em placa, de cada uma das culturas em placas de TSA seletivas, suplementadas com antibióticos ciprofloxacina (4x CMI), levofloxacina (4x CMI) e moxifloxacina (6x CMI). Os resultados foram observados após 72 horas através da contagem das UFC nas placas de meio seletivo e não seletivo.

A distribuição das colónias tanto nas placas com meio seletivo como não seletivo foi utilizada para o cálculo da taxa de mutação espontânea. Este parâmetro foi determinado de acordo com o método da mediana, descrito por Lea e Coulson (1949), onde a distribuição dos mutantes nas placas com meio seletivo é utilizada para determinar o número de mutações por cultura, *m*. Este, de acordo com o modelo utilizado tem de se encontrar dentro de um intervalo específico que varia de 1,5 a 15, e é calculado de acordo com a Equação 1. No caso do parâmetro *m* se encontrar fora deste intervalo específico, foi utilizado o método *p*0. Este método é aconselhável para valores de *m* mais pequenos que variem entre 0,3 e 2,3, que é calculado através das equações (2) e (3) (Pope *et al.*, 2008). Neste método é necessário a realização de um elevado número de culturas paralelas, de modo a uniformizar a distribuição dos mutantes (Foster, 2006; Rosche & Foster, 2000). O número de culturas paralelas escolhidas para representar a população bacteriana foi estabelecido com base na sua dependência do valor de *m*, de acordo com Rosche e Foster (2000). A taxa de mutação espontânea foi então determinada pela razão entre esse parâmetro *m* pelo número de UFC/mL totais do ensaio (Lea & Coulson, 1949; Pope *et al.*, 2008).

$$\frac{\text{Valor mediano de colónias mutantes}}{m} - \ln(m) = 1,24 \quad \text{Equação 1}$$

$$p0 = \frac{\text{Número de culturas sem mutantes}}{\text{Número total de culturas}} \quad \text{Equação 2}$$

$$m = -\ln(p0) \quad \text{Equação 3}$$

Para ensaios posteriores foram selecionadas pelo menos três colônias de cada estirpe de placas com meio seletivo aleatoriamente selecionadas de entre de cada um dos três antibióticos. Estas colônias foram então sujeitas a amplificação da sua biomassa, a qual foi realizada pela passagem das colônias selecionadas para novas placas de TSA, seguindo-se crescimento durante 24 horas em aerobiose a 30 °C. Esta biomassa foi transferida, novamente, para novas placas de TSA e sujeita a crescimento em aerobiose a 30 °C durante 48 horas. De seguida procedeu-se ao armazenamento de parte biomassa em água ultrapura estéril para extração de DNA e posteriores reações em cadeia da polimerase (PCR - do inglês “*polymerase chain reaction*”), as estirpes foram também congeladas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Liofilchem, Itália) suplementado com 20% de glicerol para uso posterior. As colônias selecionadas foram ainda sujeitas a uma nova determinação da concentração mínima inibitória das três fluoroquinolonas em estudo de acordo com a metodologia já descrita no ponto 3.3..

3.5. Amplificação dos fragmentos de DNA

A reação de PCR foi realizada com o principal objetivo de amplificar um fragmento de DNA correspondente à RDRQ dos genes *gyrA* e *gyrB*. Numa primeira fase esta amplificação foi usada de modo a obter um fragmento de DNA para sequenciação, e posteriormente para transformar uma estirpe suscetível à ciprofloxacina com fragmento de DNA com as mutações em estudo. A extração do DNA dos mutantes selecionados no ensaio de flutuação foi efetuada através da técnica de fervura. Ou seja, foi feita uma suspensão celular em água ultrapura estéril a qual foi submetida a uma temperatura de 100 °C durante 10 minutos. Em seguida, procedeu-se à centrifugação da suspensão celular a 12000 ×g durante 3 minutos e armazenou-se o sobrenadante que foi usado como *template* para a reação de PCR. A RDRQ do gene *gyrA* foi amplificada por PCR, assim preparou-se a mistura reacional contendo a enzima Dream Taq polimerase a 2,5 U (Thermo Fisher Scientific, Estado Unidos da América), 1,25 µL de tampão Dream Taq buffer (10×) (Thermo Fisher Scientific, Estado Unidos da América), 0,2 mM de desoxiribonucleotidos (NZYtech, Portugal), 0,5 µM de cada um dos *primers* apresentados na Tabela 2, 2,5 µL de *template* diluído de 1:10 e por fim, água para completar um volume final de 12,5 µL. A mistura reacional utilizada para a realização da reação de amplificação do fragmento do gene *gyrB* foi preparada da mesma forma que o descrito anteriormente para a *gyrA*.

Para a amplificação dos fragmentos dos genes *gyrA* e *gyrB* foi utilizado um termociclador (T100 Thermal Cycler, BIO-RAD, Estado Unidos da América) onde se realizou um programa com cinco passos iniciando-se a desnaturação do DNA a 95 °C por três minutos, seguindo-se 35 ciclos de três passos: desnaturação a 95 °C por 30 segundos, hibridização a 58 °C (*gyrA*) ou 57 °C (*gyrB*) por 30 segundos e, ainda, um passo de extensão a 72 °C durante 30 segundos. No final dos 35 ciclos procedeu-se a um passo final de extensão a 72 °C durante 10 minutos. Após término das reações realizou-se uma eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA

(TAE), utilizando Midori Green (NIPPON Genetics, Alemanha) como corante do gel, e procedeu-se à corrida a 120 volts, durante 40 minutos, de modo a separar os fragmentos de acordo com os seus tamanhos. Os produtos amplificados foram visualizados no gel através de exposição a luz ultravioleta, com o auxílio de um equipamento transluminador UVITEC Cambridge (UVITEC, Reino Unido).

Tabela 2 - Lista de *primers* utilizados nas reações de PCR, com informação da sua sequência, gene para o qual foi desenhado bem como a sua referência.

<i>Primer</i>	Sequência	Gene	Referência
F-QRDR	TGGATTAAAGCCAGTTCATAGAAG	<i>gyrA</i>	(Abdelbaqi <i>et al.</i> , 2007)
R2-QRDR	TCATMGWATCATCATAATTTGGWAC		
<i>gyrB</i> _QRDR_F	GCTGCACGTGGAAGAGAAG	<i>gyrB</i>	Este estudo
<i>gyrB</i> _QRDR_R	TCTATAAAGTGGCGGTTGAGC		

M-A ou C; W-A ou T

3.6. Sequenciação da região determinante de resistência às quinolonas dos genes *gyrA* e *gyrB*

A sequenciação do fragmento de DNA correspondente à RDRQ dos genes *gyrA* e *gyrB* das estirpes nativas e dos mutantes obtidos no ensaio de flutuação teve como principal objetivo verificar a ocorrência de mutações nessa região específica que se correlacionassem com a resistência às fluoroquinolonas.

De modo a executar este método procedeu-se previamente à purificação dos produtos de PCR, por utilização do reagente ExoSAP-IT™ (GEHealthcare, Estados Unidos da América), que executa a purificação através da hidrólise dos *primers* e nucleótidos em excesso. Esta purificação baseou-se na mistura de 5 µL do produto de PCR com 2 µL do reagente comercial e dois passos posteriores de incubação durante 15 minutos cada, o primeiro a 37 °C e um segundo a 80 °C. Após a obtenção dos produtos de PCR purificados estes foram sequenciados usando os *primers* descritos na tabela 2. Para isto foi realizada uma mistura reacional para sequenciação constituída por Tampão de sequenciação 5x (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América), 0,7 µL Big dye (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos da América), *primer* a 0,5 µM, 1 µL de fragmento de DNA a sequenciar, previamente purificado, e água de modo a perfazer um volume final de 10 µL. Esta reação teve início com um primeiro passo de desnaturação a 96 °C durante 30 segundos, seguido de 25 ciclos constituídos por três fases: um passo de desnaturação a 96 °C durante 10 segundos, um passo de hibridização do *primer* a 50 °C durante

cinco segundos e um último passo de extensão a 60 °C durante quatro minutos. No término dessa reação as amostras foram sujeitas a sequenciação de Sanger por utilização de um sequenciador automático Genetic Analyzer ABI-Prism3130 xl (PE Applied Biosystems, Estados Unidos da América). A análise dos resultados das sequenciações de cada uma das amostras foi realizada com a utilização do programa informático FinchTV e o alinhamento das mesmas foi realizado através da utilização da ferramenta informática Clustal Omega (EMBL-EBI, Reino Unido). Através da ferramenta informática EMBOSS Transeq (EMBL-EBI, Reino Unido) procedeu-se também à conversão da sequência de ácidos nucleicos em sequência de aminoácidos, com o objetivo de desenhar a estrutura a três dimensões da proteína DNA girase e mapear as mutações surgidas, através da plataforma digital SWISS-MODEL (Swiss Institute of Bioinformatics, Suíça).

3.7. Transformação natural

A transformação da estirpe parental suscetível às fluoroquinolonas, *A. butzleri* DQ40A1, foi realizada de modo a confirmar a relação fenótipo-genótipo estabelecida anteriormente pela correlação entre a resistência às fluoroquinolonas e as mutações que surgiram na RDRQ do gene *gyrA*. Para a transformação foi utilizado como material genético dador o fragmento correspondente à RDRQ de *gyrA* amplificado pela reação de PCR, usando como *template* o DNA de mutantes selecionados no ensaio de flutuação. Para isso foi inicialmente extraído o DNA genómico dos mutantes selecionados, através de um kit de extração (Vivantis, Malásia). Posteriormente, com o objetivo de amplificar o fragmento desejado foi realizada uma reação de PCR como descrita anteriormente, mas com um volume final de 50 µL, em que foram utilizados os *primers* para *gyrA* apresentados na tabela 2 (Abdelbaqi *et al.*, 2007). De seguida procedeu-se à purificação dos produtos de PCR obtidos através de um kit de purificação de produtos de PCR por colunas (Bioron GmbH, Alemanha), bem como a sua quantificação através de um nanoespectrofotómetro (IMPLEN, Alemanha).

O ensaio de transformação foi então realizado de acordo com o previamente descrito, com algumas modificações (Silva, 2017). Primeiramente, procedeu-se ao crescimento da estirpe de *A. butzleri* DQ40A1 em placa de meio *Blood agar base* suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado (BA do inglês “*Blood agar*”), sob uma atmosfera de microaerofilia a 30 °C durante 24 horas. De seguida, foi realizada uma suspensão celular da cultura anterior em meio TSB e foram inoculados 200 µL dessa suspensão numa nova placa de BA e incubada nas mesmas condições durante quatro horas. Ao fim desse período de incubação foi adicionado à placa já inoculada 1 µg do fragmento de PCR purificado ou um volume igual de água como controlo negativo, e foi novamente incubada a 30 °C em microaerofilia durante oito horas. Após incubação, a biomassa correspondente ao crescimento da região onde foi colocado o material genético e de controlo foram transferidas separadamente para uma nova placa de meio BA e sujeitas a uma nova incubação por 18 horas nas mesmas condições atmosféricas e de temperatura. Para proceder à seleção dos transformantes ao fim das 18 horas de incubação foi

realizada uma suspensão celular em 500 µL de tampão fosfato salino (PBS do inglês “Phosphate-Buffered Saline”) da biomassa correspondente ao ensaio e ao controle. De seguida, foram plaqueados 100 µL dessa suspensão bem como das diluições correspondentes a 10^{-1} e 10^{-2} em placas de BA suplementadas com 4 µg/mL de ciprofloxacina. De modo a determinar as UFC/mL totais foram ainda realizadas diluições decimais sucessivas e plaqueadas em placas de BA, as correspondentes às diluições 10^{-4} a 10^{-9} , de acordo com o método *drop-plate*. Todas as placas foram incubadas sob condições de microaerofilia a 30 °C durante cinco dias. No final desse tempo de incubação as placas foram observadas e contadas as colónias correspondentes aos transformantes e à determinação das UFC/mL totais. Das placas com meio seletivo foram selecionadas pelo menos cinco colónias transformadas, a biomassa foi amplificada, e armazenada quer em água ultrapura estéril, para serem sujeitas a um novo ensaio de sequenciação, com a finalidade de confirmar a transformação, como em BHI com 20% de glicerol para manutenção da cultura. A frequência de transformação foi também calculada através do rácio do número de transformantes por mililitro por UFC/mL totais e por micrograma de DNA.

3.8. Avaliação da robustez das estirpes de *Arcobacter butzleri* com resistência às fluoroquinolonas

A robustez das bactérias define-se como sendo a aptidão do microrganismo para sobreviver no meio ambiente e pode ser avaliada de formas distintas (Mellata *et al.*, 2012; Wiser & Lenski, 2015). Neste trabalho esta característica foi avaliada nas estirpes de *A. butzleri* portadoras de mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas. Assim, foram estudadas estirpes com mutação na posição 254 da RDRQ do gene *gyrA* obtidas nos ensaios de determinação de taxa de mutação espontânea e de transformação, em comparação com a estirpe nativa.

Para tal foram realizados três ensaios distintos, inicialmente traçou-se a curva de crescimento das estirpes para verificar se a presença de mutações influencia comparativamente o crescimento dos mutantes em relação à estirpe parental. Um ensaio de competição, em que a estirpe mutada foi colocada a crescer em competição com a estirpe parental. E ainda foi executado um outro ensaio de modo a avaliar a capacidade de formação de biofilmes das estirpes mutadas comparativamente com a estirpe parental.

3.8.1. Curva de crescimento

A cinética de crescimento das bactérias é constituída por quatro fases principais. Uma inicialmente denominada fase lag onde as bactérias se encontram num período de adaptação às condições ambientais, uma fase logarítmica (log) onde ocorre o crescimento exponencial das bactérias. Uma terceira fase estacionária em que o crescimento das bactérias se mantém contante ao longo do tempo e por fim uma fase de morte celular onde a taxa de morte é superior à taxa de crescimento (Amagu Echiegu, 2015). Esta cinética pode ser alterada por consequência da presença de mutações no genoma relacionadas com a resistência

antimicrobiana. Assim, foi realizado um ensaio que teve como principal objetivo a investigação da influência das mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas no crescimento das bactérias. Para isto foi elaborado um ensaio de acordo com o protocolo previamente descrito por Ferreira *et al.* (2018), em que foram avaliadas duas estirpes que adquiriram uma mutação pontual na posição 254 da RDRQ de *gyrA* de forma espontânea, e numa que adquiriu a mesma mutação através da transformação natural da estirpe suscetível DQ40A1. Estas três estirpes mutantes foram comparadas com a respetiva estirpe parental (*A. butzleri* DQ40A1). Com isto todas as estirpes foram sujeitas a um crescimento prévio em meio sólido TSA durante 24 horas sob uma atmosfera de aerobiose a 30 °C. De seguida foi realizada uma pré-cultura com uma DO_{620nm} inicial de 0,05 para cada estirpe em 10 mL de meio líquido TSB num erlenmeyer de 50 mL durante aproximadamente 17 horas a 30 °C e 100 RPM. Após esse crescimento procedeu-se à diluição da pré-cultura para uma DO_{620nm} de 0,02 numa nova cultura de 20 mL TSB num erlenmeyer de 100 mL e incubada durante 24 horas a 30 °C numa atmosfera de aerobiose e 100 RPM. Amostras foram recolhidas às 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 24 horas de crescimento e lida a sua densidade ótica a um comprimento de onda de 620 nm. O ensaio foi realizado três vezes de forma independente.

3.8.2. Ensaio de competição

Os ensaios de competição são, normalmente, realizados com o intuito de estimar de que forma as estirpes mutantes, quando em competição com as estirpes parentais, podem competir e melhorar a sua aptidão em termos de sobrevivência (Morgan & Steiglitz, 2003). Com o objetivo de avaliar a influência da presença das mutações, na capacidade das bactérias em sobreviverem e crescerem no meio ambiente com a presença de microrganismos suscetíveis, foi realizado o ensaio de competição de acordo com o previamente descrito por Ferreira e seus colaboradores (Ferreira *et al.*, 2018).

Para tal, após crescimento prévio das estirpes em placas de TSA durante 24 horas sob condições de aerobiose a 30 °C, foi realizada uma pré-cultura das estirpes em estudo separadamente durante aproximadamente 17 horas em 10 mL de meio líquido TSB num erlenmeyer de 50 mL sob condições de aerobiose 30 °C e 100 RPM. Após esse crescimento em meio líquido as estirpes foram colocadas a crescer em competição, onde 200 µL de cada uma das pré-culturas (estirpe parental e mutante) foram adicionados a 20 mL de TSB, num erlenmeyer de 100 mL. Esta cultura foi incubada nas mesmas condições das pré-culturas. De seguida, foram recolhidas amostras às 0 e 24 horas de modo a proceder-se à determinação das UFC/mL totais (nativa e mutante) e da estirpe mutante. Para isto foram plaqueados triplicados de 10 µL das diluições correspondentes a 10^{-1} a 10^{-4} às 0 horas, e de 10^{-3} a 10^{-8} às 24 horas da cultura celular em competição, em placas de TSA de modo a se determinarem as UFC/mL totais e em placas de TSA seletivas suplementadas com ciprofloxacina a 4 µg/mL e 1 µg/mL, de modo a serem determinadas as UFC/mL da estirpe mutante. As colónias foram contadas após 48 h de crescimento. O ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente e os resultados apresentados na forma

de robustez relativa através da razão do parâmetro malthusiano do mutante pelo parental, representado pela equação 4 (Ferreira *et al.*, 2018; Wisser & Lenski, 2015).

$$\text{Custo relativo} = \frac{\ln\left(\frac{UFC/mL_{24h}}{UFC/mL_{0h}}\right)_{Resistentes}}{\ln\left(\frac{UFC/mL_{24h}}{UFC/mL_{0h}}\right)_{Suscetíveis}} \quad \text{Equação 4}$$

3.8.3. Capacidade de formação de biofilmes

Como já foi referido anteriormente membros da espécie *A. butzleri* têm a capacidade de formar biofilmes de modo a sobreviverem a ambientes e situações de stress. Com o objetivo de analisar se a presença de mutações associadas à resistência a fluoroquinolonas tem influência na capacidade de formação de biofilmes, procedeu-se a esta avaliação de acordo com o descrito previamente (Ferreira *et al.*, 2018). Após cultura das bactérias em meio TSA durante 24 horas a 30 °C sob condições de aerobiose, foi realizada uma pré-cultura durante aproximadamente 17 horas em 10 mL meio TSB num erlenmeyer de 50 mL sob condições de aerobiose a 30 °C e 100 RPM. Após este período, as células foram recolhidas por centrifugação e o depósito celular suspenso em TSB para uma DO_{620nm} de 0,2. De seguida, 100 µL dessa suspensão celular foi adicionada numa microplaca de 96 poços em nove replicados e incubada a 30 °C em condições de aerobiose durante 48 h. A coloração dos biofilmes foi realizada através da adição de 25 µL de uma solução de violeta de cristal a 1% (p/v) em etanol absoluto, à suspensão celular e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. No fim desse período o conteúdo dos poços foi removido e estes foram lavados cinco vezes com água destilada. No final, a descoloração foi efetuada através da adição de 150 µL de uma solução de metanol a 30% (v/v) e ácido acético a 10% (v/v). 100 µL dessa solução foram transferidos para uma nova microplaca de 96 poços e foi lida a absorvância a um comprimento de onda de 570 nm.

3.9. Avaliação fenotípica da expressão de bombas de efluxo dos mutantes

A influência de mecanismos como as bombas de efluxo na resistência a antibióticos pode ser estimada fenotipicamente, através da avaliação da acumulação intracelular de uma molécula com emissão de fluorescência (Martins, 2013). Assim, a acumulação de brometo de etídio foi testada na estirpe parental bem como os mutantes obtidos no ponto 3.5. para os quais não foram encontradas mutações na região RDRQ dos genes *gyrA* e *gyrB*. O ensaio foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Ferreira *et al.* (2014) com modificações, em que todas as estirpes foram previamente sujeitas a um crescimento em placas de TSA durante 24 horas a 30 °C em condições de aerobiose. Após este crescimento prévio, as estirpes foram colocadas a crescer num erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de meio líquido TSB com uma DO_{620nm} inicial de

0,02 até atingirem meio da fase exponencial. Posteriormente as células foram centrifugadas e lavadas uma vez com uma solução de PBS (pH 7,2) e ressuspendidas na mesma solução a uma DO_{620nm} aproximadamente de 0,2. Esta suspensão celular foi colocada em triplicado numa placa Greiner black adequada para leitura de fluorescência num volume de 98 μ L e incubada 10 minutos a 30 °C. Imediatamente antes da leitura foi adicionado uma solução de brometo de etídio (100 μ g/mL) numa concentração final de 2 μ g/mL à suspensão celular. Na mesma placa foram ainda colocados três controlos, um de autofluorescência celular, que consiste na suspensão celular; um controlo negativo só com o tampão usado para suspensão celular e um controlo do fluorocromo, constituído por um volume de 98 μ L de PBS e 2 μ L de brometo de etídio (100 μ g/mL). A fluorescência das amostras foi lida durante 30 minutos, com uma leitura a cada minuto, com excitação a 530 nm e emissão a 600 nm a uma temperatura constante de 30 °C, usando um fluorímetro Spectra Max Gemini Em (Molecular Devices, Estados Unidos da América). O ensaio foi realizado três vezes de forma independente.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1. Frequência de mutação espontânea em *Arcobacter butzleri*

As bactérias podem adquirir resistência a diversos antibióticos através de transferência horizontal de genes ou por desenvolvimento de mutações espontâneas. A pressão seletiva exercida por antibióticos presentes no meio onde estas se encontram pode desencadear, de forma geral, o aparecimento destas mutações espontâneas. Estas podem ocorrer em resultado de diversos mecanismos intracelulares, como por exemplo a introdução de erros durante processos de replicação, reparação ou recombinação do DNA, bem como pela ocorrência de danos nas cadeias de DNA, ou ainda, pela adição ou deleção de bases (Rosche & Foster, 2000; Foster, 2006). Estas mutações cromossômicas estão, muitas vezes, na base da resistência adquirida por parte das bactérias a diversas classes de antibióticos (Blair *et al.*, 2015). Mutações pontuais têm sido associadas ao desenvolvimento de resistência a vários antibióticos como a ciprofloxacina em diversas bactérias, como por exemplo em *Campylobacter* spp., *H. pylori* ou ainda *E. coli* (Pourahmad Jaktaji & Mohiti, 2010; Wang *et al.*, 2001; Wieczorek & Osek, 2013). A resistência à ciprofloxacina foi previamente descrita em *A. butzleri*, sendo frequentemente associada à mutação Thr85Ile (C254T) no gene *gyrA* que codifica para uma alteração de aminoácidos de uma treonina para uma isoleucina (Ferreira *et al.*, 2018). Neste trabalho foi determinada a frequência com que as mutações espontâneas que conferem resistência às fluoroquinolonas ocorrem em *A. butzleri*.

Previamente foi necessária a confirmação da suscetibilidade de todas as estirpes bacterianas parentais usadas, a qual foi avaliada pela determinação da CMI através da técnica de microdiluição como descrito em Ferreira *et al.* (2018). Os resultados encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Concentração mínima inibitória de três fluoroquinolonas de gerações distintas (Ciprofloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina) para as quatro estirpes de *Arcobacter butzleri* parentais usadas ao longo do trabalho.

Estirpe de <i>A. butzleri</i>	CMIs (µg/mL)		
	CIP	LEV	MOX
DQ40A1	0,06	0,125	0,06
CR113-2	0,06	0,125	0,25
AB22/11	0,125	1	1
2003-1426	0,125	1	1

CIP: Ciprofloxacina; LEV: Levofloxacina; MOX: Moxifloxacina

Pela análise dos resultados e comparação dos mesmos com os pontos de corte para estes antibióticos ($CIP \leq 1 \mu\text{g/mL}$; $LEV \leq 1 \mu\text{g/mL}$; $MOX \leq 1 \mu\text{g/mL}$) é possível perceber que a suscetibilidade foi confirmada para as quatro estirpes de *A. butzleri* testadas. É de salientar que não existem pontos de corte de suscetibilidade e resistência a antibióticos para o género *Arcobacter*, onde normalmente são utilizados os pontos de corte para géneros próximos, como é o caso de *Campylobacter* ou *Helicobacter*. Neste estudo os pontos de corte utilizados foram os descritos para *Campylobacter* (Ge *et al.*, 2013; Vicente *et al.*, 2008).

Nos resultados obtidos é demonstrado valores de CMI superiores para os antibióticos levofloxacina e moxifloxacina em deterioramento dos apresentados para a ciprofloxacina. Isto é, a concentração de levofloxacina e moxifloxacina necessária para que não haja crescimento bacteriano das estirpes estudadas de *A. butzleri* é superior comparativamente à concentração necessária de ciprofloxacina para o mesmo fim. Estes resultados apresentam-se de certa forma contrários aos expectáveis, uma vez que a levofloxacina e a moxifloxacina são fluoroquinolonas de gerações superiores à da ciprofloxacina, e por isso mais eficazes na sua ação antimicrobiana (Fàbrega *et al.*, 2009; Lee & Kanatani, 1999; Scheld, 2003).

Com o intuito de estabelecer as condições mais adequadas para a realização dos ensaios de flutuação subsequentes, usou-se a estirpe *A. butzleri* DQ40A1. Para tal, avaliou-se a frequência de transformação espontânea para esta estirpe em quatro condições. Por definição a frequência de mutação espontânea corresponde à regularidade com que, numa cultura, ocorre uma mutação no genoma do microrganismo, sem qualquer estímulo exterior que leve à ocorrência da mesma (Blair *et al.*, 2015). Assim, foi realizada uma suspensão celular com densidades óticas finais de 0,6 e 6 e plaqueadas em placas com meio com antibiótico com 4x CMI, e placas com meio não seletivo para determinação das UFC/mL e posteriormente incubadas nas quatro condições distintas. Após cinco dias, procedeu-se à contagem das colónias distribuídas tanto nas placas com meio seletivo como nas placas com meio não seletivo, os resultados foram registados e encontram-se representados na Figura 3.

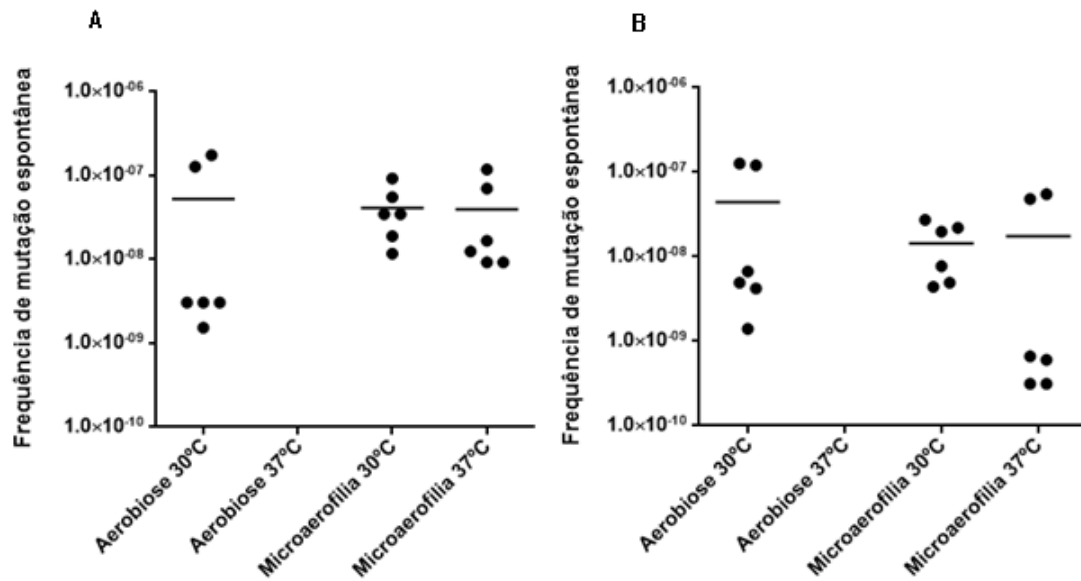


Figura 3 - Frequência de mutação espontânea da estirpe bacteriana de *Arcobacter butzleri* DQ40A1 sob diferentes condições de atmosfera e temperatura (A) - DO_{620nm} de 0,6 (B) - DO_{620nm} de 6 com uma frequência de mutação espontânea de 1×10^{-10} como limite de detecção. Os resultados apresentados resultam da realização independente do ensaio seis vezes. As análises estatísticas foram realizadas com os testes *two-way* e *one-way* ANOVA.

Os resultados obtidos neste ensaio indicam, numa primeira fase que a DO_{620nm} inicial do ensaio, 0,6 (Figura 3A) ou 6 (Figura 3B), ou seja, a concentração celular a que este se inicia, não apresenta diferença significativa nos valores de frequência com que ocorre uma mutação de forma espontânea no genoma das bactérias da espécie *A. butzleri*, de acordo com teste estatístico realizado *two-way* ANOVA ($p > 0,05$). Porém a diferença entre cada uma das condições testadas é mais visível quando o ensaio foi iniciado com uma concentração celular inicial superior. Os valores de frequência de mutação espontânea encontram-se num intervalo de ordem de grandeza que varia entre 10^{-7} a 10^{-10} , valores similares aos apresentados em estudos de algumas estirpes incluídas nas espécies *C. jejuni*, *C. coli* (Hänninen & Hannula, 2007) e *H. pylori* (Björkholm *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Após análise dos resultados obtidos neste trabalho observou-se que nas quatro condições testadas e independentemente da densidade ótica à qual se iniciou o ensaio, quando a estirpe de *A. butzleri* em estudo é incubada numa atmosfera de aerobiose a 37°C não surgiam mutantes nas condições usadas, com os resultados a encontrarem-se abaixo do limite de detecção do ensaio. Assim, esta condição foi considerada como não aplicável para a realização dos ensaios subsequentes. Os resultados obtidos para cada uma das densidades óticas testadas foram comparados entre si através do teste estatístico *one-way* ANOVA. Quando foi utilizada uma atmosfera de microaerofilia para a realização dos ensaios, em ambas as densidades óticas, não foi observada uma diferença significativa entre as duas temperaturas testadas (30 °C e 37 °C). Na comparação dos resultados onde o ensaio foi realizado à temperatura de 30 °C denota-se que embora ocorra uma pequena

diferença, o ensaio sob uma atmosfera de aerobiose apresentou-se mais promissor, apesar de não haver diferença significativa, independentemente da densidade ótica à qual se iniciou o ensaio. Assim, estabeleceu-se o uso de uma atmosfera de aerobiose à temperatura de 30 °C como condições para a realização dos ensaios seguintes. Esta temperatura bem como a atmosfera de aerobiose foram já descritas como boas opções para o crescimento de bactérias da espécie *A. butzleri* (Ferreira *et al.*, 2017; Vandamme *et al.*, 2008).

4.2. Taxa de mutação espontânea de *Arcobacter butzleri*

A probabilidade com que as bactérias adquirem uma mutação no seu genoma sem qualquer estímulo exógeno durante o tempo de vida define-se como taxa de mutação espontânea, μ . A maior parte das mutações ocorridas de forma espontânea no genoma das bactérias sucedem durante o processo de replicação do DNA, no entanto, a sua repercussão a nível fenotípico depende da diversidade genética de cada microrganismo (Foster, 2001; Foster, 2006; Rosche & Foster, 2000). A taxa de mutação espontânea é um parâmetro preferencialmente utilizado para estudar o desenvolvimento de mutações espontâneas em detrimento da frequência de mutação espontânea, uma vez que fornece uma maior informação a nível biológico e a sua determinação tem maior precisão e reprodutibilidade. Uma das informações úteis fornecida por este parâmetro é a probabilidade com que uma mutação ocorre de forma espontânea no genoma da bactéria, porque quanto maior o valor de taxa de mutação espontânea maior é essa probabilidade (Drake, 2001; Foster, 2006; Rosche & Foster, 2000). Ao nível de bactérias da espécie *A. butzleri* não há informação sobre este parâmetro. Para o cálculo desta taxa podem ser realizados dois tipos de ensaios, testes de acumulação de mutantes ou testes de flutuação. Como o ensaio de acumulação de mutantes requer um número muito elevado de células bem como um longo período de tempo entre a recolha das amostras, é por isso mais vezes utilizado o ensaio de flutuação para este fim (Foster, 2006; Gerrish, 2008; Pope *et al.*, 2008; Rosche & Foster, 2000). Assim, foi realizado o ensaio de flutuação para a determinação da taxa de mutação espontânea em *A. butzleri*. O ensaio foi então realizado com o principal objetivo de se determinar qual a probabilidade de ocorrer uma mutação espontânea no genoma de quatro estirpes de *A. butzleri* ao longo do seu tempo de vida. Mas também obterem-se colónias dessas mesmas estirpes resistentes a três fluoroquinolonas de gerações diferentes. Para tal foi realizado o teste de flutuação, que estima, a partir da distribuição do número de mutantes de diversas culturas paralelas, o número de mutações que uma célula acumula durante a sua vida (Foster, 2006).

Para o cálculo da taxa de mutação espontânea (μ) é necessário proceder-se, previamente, à determinação do número de mutações ocorridas por cultura, m , resultados apresentados na Tabela 4. Este parâmetro é utilizado para a estimativa da taxa de mutação espontânea através da divisão de m pelo número total de células cultiváveis presentes na cultura (Rosche & Foster, 2000; Foster, 2006). O valor deste parâmetro pode ser calculado através de diversos modelos

matemáticos, que têm vindo a ser propostos ao longo dos anos. Neste estudo foram utilizados dois métodos para determinação do parâmetro m , o modelo de Lea e Coulson e o modelo de $p0$. Preferencialmente foi usado o método descrito por Lea e Coulson em 1949 (Gerrish, 2008; Lea & Coulson, 1949), dado que este é dos modelos mais vulgarmente usados, pois veio resolver através da utilização do valor de mediana, o problema de sobrestimação do parâmetro m e consequente imprecisão da taxa de mutação espontânea, que o método usando o valor médio dos mutantes, primeiramente proposto em 1943 por Luria e Delbrück provocava (Luria & Delbrück, 1943; Pope *et al.*, 2008; Rosche & Foster, 2000). No caso do parâmetro m se encontrar fora do intervalo específico determinado para o modelo de Lea e Coulson, foi utilizado o método $p0$.

Para a realização deste ensaio é necessário o cumprimento de alguns parâmetros preliminares, nomeadamente teve de se garantir que o inóculo inicial não possuía mutações pré-existentes, que continha um baixo número de células, e após incubação ocorria um aumento de pelo menos 1000x no número de células relativamente ao N_0 . Todos os parâmetros foram verificados e ajustados em ensaios preliminares com três culturas paralelas. Assim, a partir do plaqueamento de 30 μL de cada cultura paralela inicial em placas com meio seletivo foi verificada a não existência de mutações pré-existentes, uma vez que após 72 horas de crescimento não se obtiveram colónias. Através do método “*drop plate*” foram determinadas as UFC/mL do inóculo inicial e da cultura após 24 e 48 horas, onde se verificou que após diluição a partir da pré-cultura para preparação das culturas paralelas, estas possuíam uma densidade celular de aproximadamente 10^4 UFC/mL no início do ensaio. Após 48 horas de crescimento as células tinham um crescimento superior a $1000x N_0$, uma vez que na contagem de células cultiváveis foi de aproximadamente 10^9 UFC/mL, tendo sido selecionado por isto o tempo final do ensaio de 48 horas em deterioramento das 24 horas de modo a respeitar o parâmetro do crescimento superior a $1000x N_0$.

Na análise dos resultados da contagem da distribuição das colónias nas placas com meio seletivo e não seletivo, o parâmetro m foi calculado através da utilização do valor mediano da distribuição dos mutantes nas placas com meio seletivo, pelo auxílio da equação (1) de acordo com o método de Lea e Coulson em 11 dos 12 ensaios (quatro estirpes e três antibióticos para a seleção dos mutantes resistentes para cada uma). Num dos ensaios para determinação da taxa de mutação espontânea, o valor de m calculado através deste método encontrava-se fora do intervalo específico, tendo sido necessário recorrer-se a outro método. Foi então selecionada a metodologia de $p0$, um método simples e muito usado, em que é necessária a realização de um maior número de culturas paralelas para que o nível de precisão seja aceitável (Rosche & Foster, 2000). Neste, o valor de m é calculado a partir do negativo do logaritmo neperiano da razão do número de culturas sem mutantes pelo número de culturas totais usando as equações (2) e (3) (Subsecção 3.4.). Posteriormente a taxa de mutação espontânea, para ambos os modelos, foi calculada pela divisão deste parâmetro pelo valor de N_T , número total de células cultiváveis do ensaio.

Para as quatro estirpes de *A. butzleri* estudadas os valores de taxa de mutação espontânea apresentados na Tabela 4 encontraram-se na ordem de 10^{-9} , valores similares aos já descritos para outras bactérias como *A. baumannii* ou *H. pylori* (Karami-Zarandi *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2001). Assim, estas bactérias estão classificadas como tendo uma taxa de mutação espontânea baixa, uma vez que estão dentro do intervalo descrito para tal de 10^{-9} - 10^{-10} (Pathak & Temin, 1990). Este parâmetro pode ainda fornecer informações da forma como cada bactéria sofre mutações, ou seja, a sua mutabilidade. Quanto maior é o valor de taxa de mutação maior é a hipermutabilidade da estirpe em causa (Dzidic *et al.*, 2008). Os valores de taxa de mutação espontânea para todas as estirpes de *A. butzleri* testadas neste estudo encontram-se na ordem de grandeza 10^{-9} , valor referenciado para hipomutabilidade nas bactérias em geral (Galán *et al.*, 2007; Pathak & Temin, 1990). Com isto conclui-se que *A. butzleri* é um microrganismo fracamente mutável *in vitro*.

Tabela 4 - Valores da taxa de mutação espontânea para as quatro estirpes de *Arcobacter butzleri* em estudo, bem como os valores de UFC/mL ao tempo 0 (N_0) e no final (N_T), e ainda valor de m e o nome do método mais adequado utilizado para o seu cálculo.

Estirpes	Antibiótico usado na seleção	Número de culturas	Número de culturas sem mutantes	Jackpots	Média	Mediana	Método para m	N_0 ($\times 10^4$)	N_T ($\times 10^9$)	m	Taxa de Mutação Espontânea (μ) (10^{-9})
DQ40A1	Ciprofloxacina	30	11	0	3,43	1	P_0	2,86	1,83	1	0,55
	Levofloxacina	20	0	0	54,9	17,5	<i>Lea-Coulson Median</i>	2,86	1,83	5,82	3,18
	Moxifloxacina	20	2	0	4,4	2,5	<i>Lea-Coulson Median</i>	2,86	1,83	1,51	0,82
2003-1426	Ciprofloxacina	20	0	0	37,5	4	<i>Lea-Coulson Median</i>	21,4	4	9,68	2,42
	Levofloxacina	20	0	0	62,4	55	<i>Lea-Coulson Median</i>	21,4	4	15,35	3,84
	Moxifloxacina	20	0	0	31,3	5,5	<i>Lea-Coulson Median</i>	21,4	4	7,98	2
AB22/11	Ciprofloxacina	20	2	0	12	8	<i>Lea-Coulson Median</i>	1,81	2,79	3,29	1,18
	Levofloxacina	20	0	0	72,05	27	<i>Lea-Coulson Median</i>	1,81	2,79	8,1	2,9
	Moxifloxacina	20	1	0	6,1	3	<i>Lea-Coulson Median</i>	1,81	2,79	1,7	0,61
CR113-2	Ciprofloxacina	20	2	0	19,4	34	<i>Lea-Coulson Median</i>	6,16	3,68	2,04	0,56
	Levofloxacina	20	0	1	153,1	61	<i>Lea-Coulson Median</i>	6,16	3,68	14,13	3,842
	Moxifloxacina	20	7	0	19,85	26,5	<i>Lea-Coulson Median</i>	6,16	3,68	2,53	0,67

Na análise dos resultados apresentados na tabela 4 é de salientar que, para todas as diferentes estirpes estudadas, quando foi utilizada a levofloxacinina como antibiótico presente nas placas com meio seletivo, μ apresentou os valores ligeiramente mais elevados, comparativamente com os outros dois antibióticos utilizados. Considerando que a levofloxacinina é uma fluoroquinolona de geração superior à ciprofloxacina, seriam expectáveis valores mais elevados para esta última. Isto devido à descrita proporcionalidade entre as gerações das fluoroquinolonas e a sua eficácia, ou seja, fluoroquinolonas de gerações superiores têm uma maior e melhorada eficácia relativamente às pertencentes a gerações inferiores (Fàbrega *et al.*, 2009; Lee & Kanatani, 1999; Scheld, 2003). No entanto, este pressuposto, em que fluoroquinolonas de gerações superiores usadas para seleção promovem uma maior taxa de mutação espontânea não é verificável para a moxifloxacina, uma vez que apresenta valores inferiores aos da levofloxacinina e, em duas estirpes, aos valores correspondentes à ciprofloxacina. Mas estes valores poderão ter outra explicação uma vez que a concentração de moxifloxacina utilizada foi superior à usada para as restantes fluoroquinolonas (CIP: 4xCMI; LEV: 4xCMI; MOX: 6xCMI). Este ajuste de concentração para 6xCMI no caso da moxifloxacina foi necessário de modo a uniformizar a quantidade de colónias mutantes surgidas nas placas com meio seletivo. Esta necessidade deveu-se ao resultado de ensaios preliminares onde, com a utilização de 4xCMI das estirpes para a moxifloxacina observavam-se 10 vezes mais colónias do que para as placas com ciprofloxacina e levofloxacinina. Esta modificação pode suportar a hipótese de que a taxa de mutação espontânea é tanto maior quanto mais elevada a geração de fluoroquinolona utilizada para seleção dos mutantes resistentes. Este acontecimento pode eventualmente ter a sua explicação com base na estrutura química das fluoroquinolonas. Esta hipótese é sugerida uma vez que a adição de grupos funcionais às moléculas pode ter como consequência a alteração de parâmetros que influenciam a entrada e saída das moléculas antimicrobianas da célula, tais como a hidrofobicidade (Takenouchi *et al.*, 1996). Esta explicação é proposta uma vez que as mutações espontâneas ocorrem de forma independente da fluoroquinolona utilizada para seleção dos mutantes. Com isto conclui-se que as diferenças, embora pequenas, pois todos os valores se encontram na mesma ordem de grandeza (10^{-9}) na taxa de mutação espontânea, podem derivar de mecanismos subjacentes de entrada e extrusão do antibiótico. Os valores deste parâmetro encontram-se dentro do intervalo dos valores referenciados para outras bactérias (Björkholm *et al.*, 2001; Karami-Zarandi *et al.*, 2017; Puglia & Gualerzi, 2017), e são considerados como baixa taxa de mutação (Pathak & Temin, 1990).

A realização do ensaio de flutuação, para além do cálculo da taxa de mutação espontânea, teve como objetivo também obterem-se mutantes de *A. butzleri* resistentes às fluoroquinolonas para os ensaios subsequentes, e determinar quais as mutações espontâneas passíveis de ocorrer correlacionadas com essa resistência. Para isto após seleção e armazenamento das colónias resistentes, procedeu-se à realização de pelo menos 4 passagens em placas com meio não seletivo da biomassa das colónias. Isto foi realizado com o intuito de garantir que a resistência aparente das colónias mutantes não era devido a uma adaptação temporária das células às

condições, por parte do microrganismo. Só após estas passagens foi determinada a CMI para cada mutante, e foi realizada a sequenciação das zonas RDRQ dos genes *gyrA* e *gyrB*.

4.3. Avaliação das estirpes de *Arcobacter butzleri* resistentes a fluoroquinolonas

A resistência adquirida aos antibióticos é muitas vezes consequência da ocorrência de mutações em zonas específicas do genoma das bactérias. Estas alterações ocorrem frequentemente durante o processo de replicação do DNA o que promove o aparecimento de células filhas portadoras dessas alterações (Puglia & Gualerzi, 2017; Salimiyan *et al.*, 2018). As mutações podem ser de três tipos, dependendo do efeito que provocam no aminoácido codificado, isto é, pode ocorrer uma mutação que leve à codificação do mesmo aminoácido (mutação silenciosa), ou de aminoácidos diferentes. Quando o aminoácido codificado difere do original pode ocorrer uma mutação *missense*, ou uma mutação *nonsense* quando o codão onde ocorre a mutação se torna num codão STOP ou vice-versa (Najafi & Pezeshki, 2014).

A avaliação de cada um dos mutantes selecionados no ensaio de determinação da taxa de mutação espontânea teve como principal objetivo o estudo de mutações associadas com o fenótipo de resistência às fluoroquinolonas. Para isso, após a seleção de três colônias resistentes provenientes de três placas com meio seletivo de cada antibiótico para cada estirpe do ensaio de determinação da taxa de mutação espontânea, procedeu-se à avaliação da concentração mínima inibitória para cada uma das fluoroquinolonas em estudo e para cada mutante, bem como da sequenciação da região determinante de resistência às quinolonas dos genes *gyrA* e *gyrB*. Na Tabela 5 estão representados os resultados dos valores de CMI para as estirpes parentais e cada um dos mutantes, o aumento desse valor comparando as estirpes suscetíveis e resistentes bem como as mutações ocorridas na RDRQ dos genes *gyrA* e *gyrB*, com representação da alteração de aminoácidos codificados e da substituição nucleotídica.

Tabela 5 - Concentração mínima inibitória de ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina para mutantes selecionados dos ensaios de flutuação, bem como o seu aumento face à respetiva estirpe *Arcobacter butzleri* parental, e mutação ocorrida na zona RDRQ dos genes *gyrA* e *gyrB*.

Estirpes de <i>A. butzleri</i>	CMI (µg/mL)			Mutação		
	CIP (Aumento)	LEV (Aumento)	MOX (Aumento)	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>
				Alteração do aminoácido	Substituição nucleotídica	Substituição nucleotídica **
CR113-2 (wt)	0,06 (NA)	0,125 (NA)	0,25 (NA)	NA	NA	NA
CRCip6	4 (64x)	8 (64x)	16 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
CRCip12	4 (64x)	8 (64x)	16 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
CRCip17	8 (128x)	8 (64x)	16 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
CRLev5	4 (64x)	8 (64x)	16 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
CRLev9	4 (64x)	16 (128x)	16 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
CRLev18	4 (64x)	16 (128x)	16 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
CRMox7	8 (128x)	8 (64x)	16 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
CRMox12	4 (64x)	8 (64x)	16 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
CRMox17	4 (64x)	16 (128x)	32 (128x)	Thr85Ile	C254T	-
DQ40A1 (wt)	0,06 (NA)	0,125 (NA)	0,06 (NA)	NA		NA
DQCip3	4 (64x)	8 (64x)	8 (128x)	Thr85Ile	C254T	-
DQCip17	4 (64x)	8 (64x)	8 (128x)	Asp89Asn	G265A	-
DQCip19	8 (128x)	8 (64x)	8 (128x)	Thr85Ile	C254T	-
DQLev2	4 (64x)	8 (64x)	8 (128x)	Thr85Ile	C254T	-
DQlev6	4 (64x)	16 (128x)	8 (128x)	-	-	-
DQLev14	8 (128x)	32 (256x)	16 (256x)	-	-	-
DQMox2	4 (64x)	8 (64x)	16 (256x)	Thr85Ile	C254T	-
DQMox5	4 (64x)	4 (32x)	8 (128x)	Asp89Asn	G265A	-
DQMox12	8 (128x)	16 (128x)	8 (128x)	-	-	-
AB22/11 (wt)	0,125 (NA)	1 (NA)	1 (NA)	NA		NA
AB22Cip9	32 (256x)	64 (64x)	32 (32x)	Asp89Gli	A266G	-
AB22Cip13	32 (256x)	64 (64x)	32 (32x)	Thr85Ile	C254T	-
AB22Cip16	16 (128x)	64 (64x)	32 (32x)	Thr85Ile	C254T	-
AB22Lev6	32 (256x)	128 (128x)	32 (32x)	Thr85Ile	C254T	-
AB22Lev8	32 (256x)	128 (128x)	32 (32x)	Thr85Ile	C254T	-
AB22Lev10	32 (256x)	64 (64x)	32 (32x)	Asp89Gli	A266G	-
AB22Mox5	32 (256x)	256 (256x)	32 (32x)	Thr85Ile	C254T	-
AB22Mox7	32 (256x)	128 (128x)	64 (64x)	Thr85Ile	C254T	-
AB22Mox20	32 (256x)	64 (64x)	64 (64x)	Thr85Ile	C254T	-

wt - "wild type"; NA - Não Aplicável

*Alterações de nucleótidos que promoveram mutações silenciosas, ou seja, não ocorreu alteração do aminoácido codificado

**Foram apenas encontradas diferenças nos nucleótidos da sequência dos mutantes provenientes da estirpe 2003-1426, porém essas alterações não resultaram em nenhuma alteração de aminoácidos.

Tabela 5 (continuação) - Concentração mínima inibitória de ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina para mutantes selecionados dos ensaios de flutuação, bem como o seu aumento face à estirpe de *Arcobacter butzleri* parental correspondente, e mutação ocorrida na zona RDRQ dos genes *gyrA* e *gyrB*.

Estirpes de <i>A. butzleri</i>	CMI (µg/mL)			Mutação		
	CIP (Aumento)	LEV (Aumento)	MOX (Aumento)	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>
				Alteração do aminoácido	Substituição nucleotídica	Substituição nucleotídica **
2003-1426 (wt)	0,125 (NA)	1 (NA)	1 (NA)	NA		NA
2003Cip1	32 (256x)	128 (128x)	64 (64x)	Thr85Ile	C254T; C177T*; T216A*	T1146C
2003Cip14	64 (512x)	128 (128x)	64 (64x)	Thr85Ile	C254T; C177T*; T216A*	G1251A
2003Cip15	32 (256x)	128 (128x)	64 (64x)	Thr85Ile	C254T; C177T*; T216A*	A1278G
2003Lev1	16 (128x)	64 (64x)	32 (32x)	Thr85Ile	C254T; C177T*; T216A*	C1330T
2003Lev7	16 (128x)	64 (64x)	32 (32x)	Asp89Asn	G265A; C177T*; T216A*	T1386A
2003Lev18	32 (256x)	128 (128x)	64 (64x)	Thr85Ile	C254T; C177T*; T216A*	C1470T
2003Mox2	32 (256x)	128 (128x)	32 (32x)	Thr85Ile	C254T; C177T*; T216A*	T1473C
2003Mox14	32 (256x)	128 (128x)	64 (64x)	Thr85Ile	C254T; C177T*; T216A*	G1482A
2003Mox18	32 (256x)	128 (128x)	64 (64x)	Thr85Ile	C254T; C177T*; T216A*	G1548A

wt - "wild type"; NA - Não Aplicável

*Alterações de nucleótidos que promoveram mutações silenciosas, ou seja, não ocorreu alteração do aminoácido codificado

**Foram apenas encontradas diferenças nos nucleótidos da sequência dos mutantes provenientes da estirpe 2003-1426, porém essas alterações não resultaram em nenhuma alteração de aminoácidos

Os valores de CMI dos mutantes foram analisados e comparados com os resultados do mesmo parâmetro, determinado previamente, para as quatro estirpes parentais estudadas apresentadas na Tabela 3. Após a análise dos valores de CMI de todos os mutantes foi possível observar o fenótipo de resistência em todos, isto porque todos igualaram ou ultrapassaram o ponto de corte para a resistência aos antibióticos (CIP \geq 4 µg/mL; LEV \geq 4 µg/mL; MOX \geq 4 µg/mL) (Ge *et al.*, 2013; Vicente *et al.*, 2008). Em todos os mutantes analisados foi observado um aumento em pelo menos 32x o valor de CMI relativamente ao valor para as respectivas estirpes parentais. Com o intuito de tentar estabelecer uma relação entre o fenótipo de resistência e genótipo, procedeu-se à sequenciação da RDRQ do gene *gyrA*, enzima com associação à resistência às quinolonas, previamente descrita. As sequências para essa região

específica dos mutantes foram analisadas e alinhadas com as da respectiva estirpe parental estando apresentadas nos anexos I, II, III e IV. Após análise desses resultados, concluiu-se que, em todos os mutantes à exceção de três, a resistência antimicrobiana demonstrada na determinação da CMI está associada a uma única mutação pontual na RDRQ do gene *gyrA* (C254T, G265A ou A266G). No geral foram encontradas três mutações pontuais distintas na zona RDRQ do gene *gyrA*, com localização nas posições nucleotídicas 254, 265 e 266. Estas mutações foram mapeadas na estrutura tridimensional da proteína DNA girase projetada pelo sistema informático SWISS-MODEL, representado na Figura 4.

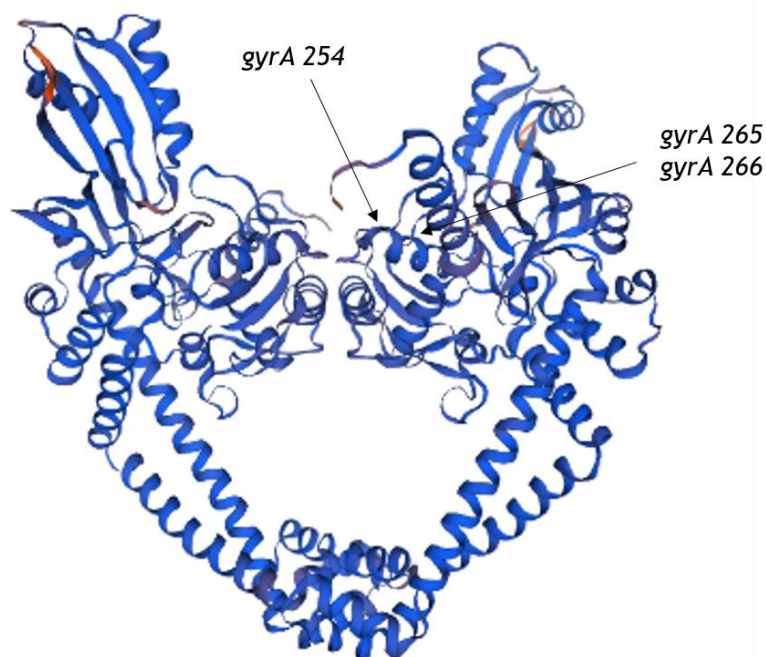


Figura 4 - Representação tridimensional da projeção da proteína DNA girase da espécie *Arcobacter butzleri* através da plataforma SWISS-MODEL com o mapeamento local das mutações descritas com associação à resistência às fluoroquinolonas.

A mutação preferencialmente encontrada nos mutantes desta investigação ocorreu na posição 254 (codão 85), tendo sido encontrada em 28 mutantes dos 36 analisados, como está apresentado na Tabela 3. Esta mutação caracteriza-se pela alteração de uma única base na posição 254, onde ocorre a transição da base citosina para uma timina (C254T), o que leva à substituição de uma treonina por uma isoleucina (Thr85Ile). Esta alteração de aminoácido tem como consequência a resistência antimicrobiana às fluoroquinolonas, o que poderá ser explicado pela modificação das características físico-químicas, onde a isoleucina apresenta uma maior hidrofobicidade e menor polaridade, o que pode provocar uma perda de afinidade do antibiótico para com a sua enzima alvo, a DNA girase (Jiang *et al.*, 2006; Saint-Jean *et al.*,

2018; WHO, 2018). A associação desta mutação com a resistência à ciprofloxacina já foi anteriormente descrita, tanto para *Arcobacter* spp. como para microrganismos próximos como *C. jejuni* e *C. coli*. (Abdelbaqi *et al.*, 2007; Wiczorek & Osek, 2013). Embora esta mutação seja partilhada por estes microrganismos, é de salientar que o codão e posição onde se localizam em cada género são distintos (Abdelbaqi *et al.*, 2007).

Este estudo vem relacionar a mutação Thr85Ile (C254T) com a resistência não só à ciprofloxacina, mas também à levofloxacina e moxifloxacina, fluoroquinolonas de gerações mais recentes, e confirma a associação das mutações descritas para a resistência à ciprofloxacina com a resistência às fluoroquinolonas no geral, como já foi referido em estudos anteriores (Alfredson & Korolik, 2007; Smith & Fratamico, 2010).

Duas outras mutações responsáveis pelo desenvolvimento da resistência às fluoroquinolonas foram encontradas nas posições 265 e 266 correspondentes ao codão 89. A mutação ocorrida na posição 265 ocorre na primeira base do codão 89 e baseia-se na substituição de uma guanina por uma adenina (G265A), o que provoca uma alteração no aminoácido codificado de um ácido aspártico para uma asparagina (Asp89Asn). Nesta mutação o aminoácido que passa a ser codificado, asparagina, apresenta um ligeiro aumento na hidrofobicidade e neutralização na carga total em comparação com o ácido aspártico. Estas alterações poderão estar na base da resistência uma vez que a modificação das características físico-químicas pode estar relacionada com a perda de afinidade do antibiótico para com o seu alvo intracelular (Jiang *et al.*, 2006; Saint-Jean *et al.*, 2018; WHO, 2018). Esta alteração nucleotídica foi já relatada como tendo influência na resistência à ciprofloxacina nas espécies *C. jejuni* e *C. coli* (Changkwanyeu *et al.*, 2016; Hänninen & Hannula, 2007), contudo nunca foi associada com a espécie *A. butzleri*.

A terceira mutação encontrada neste estudo ocorre, também no codão 89, no entanto na sua posição intermédia, onde sucede uma alteração de uma alanina para uma guanina (A266G). Como consequência, ocorre a permutação do aminoácido codificado, onde a glicina toma o lugar do ácido aspártico (Asp89Gli). À semelhança das outras duas mutações encontradas, o aminoácido que passa a ser codificado tem características diferentes do original, nomeadamente apresenta uma maior hidrofobicidade, neutralização da carga e não polaridade comparativamente com o original, o que pode promover a perda de afinidade da fluoroquinolona para com a DNA girase (Jiang *et al.*, 2006; Saint-Jean *et al.*, 2018; WHO, 2018). Esta mutação, ao contrário das outras duas mutações encontradas, não foi, até ao momento, descrita como associada à resistência às fluoroquinolonas nem em espécies pertencentes ao género *Arcobacter* nem em microrganismos próximos, tais como membros pertencentes ao género *Campylobacter*.

Nos resultados apresentados na tabela 5 é verificado que em todos os mutantes derivados da estirpe parental *A. butzleri* CR113-2 apenas ocorreu o surgimento da mutação mais frequente, localizada na posição 254 (Thr85Ile), alteração ilustrada na Figura 5A. Nas estirpes resultantes das colónias resistentes de *A. butzleri* AB22/11 foi encontrada, ou a substituição Thr85Ile

(C254T), ou a transição Asp89Gli (A266G), demonstradas na Figura 5B, sendo esta última descrita pela primeira vez, neste estudo em associação à resistência a fluoroquinolonas. Na estirpe *A. butzleri* 2003-1426, foram encontradas as mutações responsáveis pelas substituições de aminoácidos Thr85Ile (C254T) e Asp89Asn (G265A), ilustradas nos exemplos da Figura 5C. Quando analisados os mutantes provenientes da estirpe parental *A. butzleri* DQ40A1, verificou-se que estas mesmas substituições foram as associadas ao caráter resistente dos microrganismos, exemplos apresentados na Figura 5D. Para além disso três dos clones analisados não apresentaram qualquer mutação no gene *gyrA* (Tabela 5 e Anexo I).

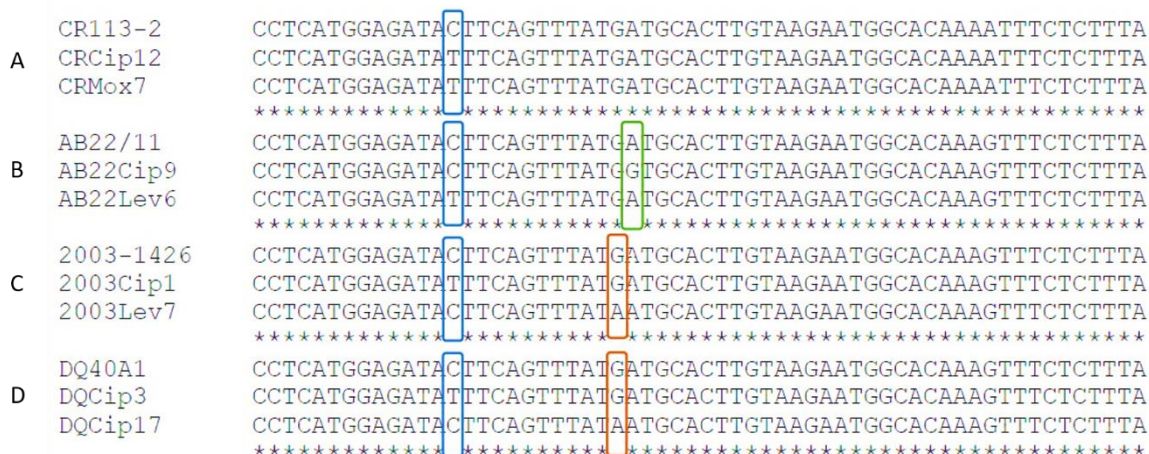


Figura 5 - Alinhamento da região específica da sequência onde ocorreram mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas de dois mutantes com a sua estirpe parental. A azul está representada a posição 254 (Thr85Ile); A cor-de-laranja está assinalada a mutação da posição 265 (Asp89Asn); Verde corresponde à mutação verificada na posição 266 (Asp89Gli). A - Mutantes e estirpe parental de *Arcobacter butzleri* CR113-2; B - Mutantes e estirpe parental de *Arcobacter butzleri* AB22/11; C - Mutantes e estirpe parental de *Arcobacter butzleri* 2003-1426; D - Mutantes e estirpe parental de *Arcobacter butzleri* DQ40A1.

Pela análise do alinhamento das sequências dos mutantes com as estirpes parentais correspondentes foram ainda observadas mutações de caráter silencioso uma vez que, apesar da alteração de nucleótido, o aminoácido codificado foi mantido, não interferindo assim na resistência aos antibióticos. Estas mutações silenciosas foram encontradas nas posições 177 e 216 nos mutantes da estirpe *A. butzleri* 2003-1426. Por comparação dos valores de CMI verificou-se que não há uma relação direta entre a mutação e o nível de resistência apresentado.

Com o intuito de tentar perceber se a ocorrência de mutações no gene *gyrB* pode ter influência nos níveis de resistência apresentados, e justificar a resistência observada nas três estirpes que não apresentaram mutações na RDRQ do gene *gyrA*, foram desenhados *primers* para amplificação da RDRQ do gene *gyrB* e posterior sequenciação. Esta hipótese foi investigada uma

vez que a contribuição de mutações neste gene foi já referenciada como um mecanismo adjacente na resistência às fluoroquinolonas para bactérias das espécies *M. tuberculosis* e *H. pylori* (Aubry *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2011; Miyachi *et al.*, 2006; Veziris *et al.*, 2007; Pantel *et al.*, 2012; Rimbara *et al.*, 2012).

No presente estudo, no que diz respeito aos mutantes provenientes da estirpe *A. butzleri* 2003-1426 foram também encontradas alterações nucleotídicas de caráter silencioso, ou seja, o aminoácido codificado não é alterado. Por isto conclui-se que não foram observadas mutações na RDRQ do gene *gyrB*, que conduzam a uma alteração do perfil fenotípico, para nenhum dos mutantes, constatando-se que os níveis de resistência apresentados não são dependentes das mutações ocorridas na RDRQ deste gene.

De forma geral, pela observação e análise dos valores de CMI e pelo aumento verificado nos mutantes (Tabela 5) conclui-se que os níveis de aumento para cada antibiótico não diferem significativamente entre si. Porém, as variações de resistência observadas entre mutantes da mesma estirpe podem ser explicadas por sinergismos com outros mecanismos de resistência, por exemplo, por mutações ocorridas em zonas do genoma da bactéria não analisadas. É de salientar ainda que a diferença mais significativa no aumento do valor de CMI ocorre quando o mutante *A. butzleri* 2003Cip14 (aumento em 512x) é comparado com alguns mutantes provenientes da estirpe *A. butzleri* DQ40A1, como por exemplo *A. butzleri* DQLev2 (aumento em 64x). Esta diferença pode ser explicada não só por outros mecanismos que podem estar a contribuir para a resistência apresentada, mas também por um papel da diversidade genética de cada estirpe.

Pela análise de todos os resultados foram encontrados três mutantes provenientes da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 que pela determinação da CMI demonstraram ser resistentes às três fluoroquinolonas testadas, contudo não foi encontrada qualquer mutação, nos genes tanto da subunidade A como da subunidade B da enzima DNA girase. Estes resultados propõem assim, a existência de outro mecanismo que permitiu à célula adquirir a resistência exibida.

4.4. Avaliação fenotípica da expressão das bombas de efluxo

A resistência a vários antibióticos tem sido associada às bombas de efluxo presentes na membrana celular que são responsáveis pela extrusão de forma ativa das moléculas antimicrobianas da célula, impedindo assim que o fármaco alcance o seu alvo intracelular (Blair *et al.*, 2015; Dzidic *et al.*, 2008; Munita & Arias, 2016; Puglia & Gualerzi, 2017). Este mecanismo, embora com menor frequência, tem sido também associado à resistência às fluoroquinolonas em diversos microrganismos (Ge & McDermott, 2005; Iovine, 2013; Luo *et al.*, 2003; Munita & Arias, 2016; Pumbwe *et al.*, 2004). Em microrganismos próximos de *Arcobacter*, como *Campylobacter* e *Helicobacter* foram já relatados casos em que o funcionamento das bombas de efluxo presente na bactéria são o único mecanismo responsável pelo fenótipo de resistência (Pumbwe *et al.*, 2004). Porém também há estudos que referem que o fenótipo de

resistência pode ser causado devido à contribuição das bombas de efluxo em sinergismo com outros mecanismos (Ge & McDermott, 2005; Luo *et al.*, 2003).

A existência de três mutantes sem qualquer mutação nos genes *gyrA* e *gyrB*, nas estirpes de *A. butzleri* estudadas sugere a hipótese da existência de um outro mecanismo celular causador do fenótipo de resistência às fluoroquinolonas, possivelmente com contribuição de bombas de efluxo descrita previamente (Silva, 2017). Assim, foi realizado um ensaio de acumulação de brometo de etídio com o intuito de avaliar a expressão fenotípica das bombas de efluxo nos três mutantes e respetiva estirpe parental (Figura 6). Para este fim foi utilizado o fluorocromo brometo de etídio como substrato, que ao passar pela membrana plasmática e entrar nas células se acumula no seu interior (Ferreira *et al.*, 2014; Martins, 2013). A fluorescência emitida pelo fluorocromo presente no interior da célula permite entender o papel que as bombas de efluxo desempenham na entrada e permanência de moléculas no seu interior, fornecendo assim informação sobre o funcionamento das mesmas. Esta informação é conseguida uma vez que valores elevados de fluorescência indicam uma elevada acumulação de brometo de etídio dentro da célula. Quando este valor sofre um aumento ou decréscimo significativo é correlacionado com a diminuição ou aumento do funcionamento das bombas de efluxo, respetivamente (Gill *et al.*, 1999).

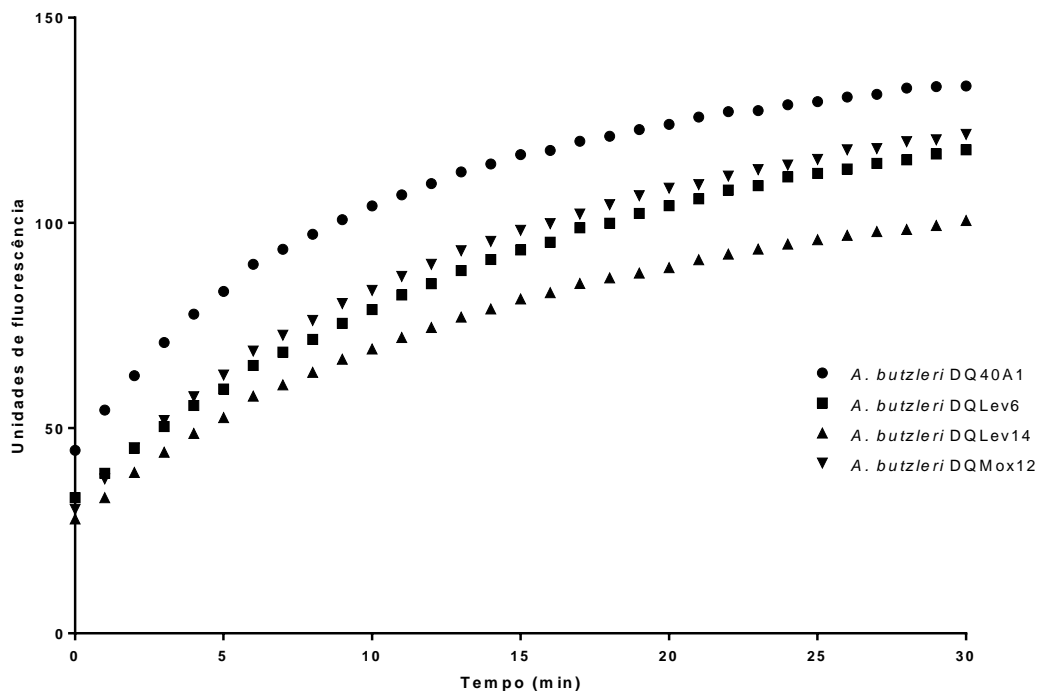


Figura 6 -Ensaio da avaliação acumulação de brometo de etídio através da medição da fluorescência emitida pelo mesmo ao longo do tempo. O ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente, sendo que os valores apresentados correspondem à média dos valores obtidos.

Pela análise dos resultados representados na **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** onde todos os três mutantes apresentam valores de fluorescência inferiores aos apresentados pela respectiva estirpe parental (*A. butzleri* DQ40A1), é sugerido o papel das bombas de efluxo como implicado na resistência aos antibióticos estudados. Quando comparados com a estirpe parental, todos os mutantes apresentaram menor acumulação de brometo de etídio no seu interior, o que é visível através da fluorescência emitida por este fluorocromo. Na análise dos mutantes entre si é denotado que a estirpe mutante *A. butzleri* DQlev14 apresenta uma diferença maior na fluorescência do que os outros dois mutantes em relação à estirpe parental *A. butzleri* DQ40A1. Esta ligeira diferença entre estirpes é eventualmente explicada pela possível ocorrência de mutações secundárias, não estudadas, que poderão participar na compensação da resistência apresentada (Melnik *et al.*, 2015), uma vez que o valor de CMI de cada uma é muito semelhante.

Quando sujeitas a alguns fatores ambientais e agentes antimicrobianos as células têm a capacidade de apresentarem resistência temporária, como uma forma de sobrevivência e de se adaptarem às características do meio onde se encontram. Porém esta resistência dissipa-se quando o efeito desses fatores é retirado (Fernández *et al.*, 2011; Salimiyan Rizi *et al.*, 2018). O facto de todos os mutantes terem sido sujeitos previamente a pelo menos 4 passagens em meio não seletivo anula a hipótese de ocorrência de mecanismos que promovem resistência temporária (Fernández *et al.*, 2011; Salimiyan Rizi *et al.*, 2018). Conclui-se assim, que a resistência apresentada é de carácter permanente e ocorre eventualmente devido a uma possível mutação num gene regulador de mecanismos de resistência não analisado, como por exemplo as bombas de efluxo. Estes resultados vêm então sugerir a ação das bombas de efluxo como um mecanismo pelo qual *A. butzleri* apresenta resistência a fluoroquinolonas.

4.5. Transformação de estirpes suscetíveis de *Arcobacter butzleri*

A transformação bacteriana é uma das formas de transferência horizontal de genes em que as bactérias competentes para isso têm a capacidade de incorporar, no seu genoma, DNA extracelular presente no meio ambiente. Este tipo de transformação traduz, por exemplo, o mecanismo que ocorre entre as bactérias suscetíveis que podem incorporar DNA de bactérias resistentes a agentes antimicrobianos (Wackernagel, 1994). Esta forma de transformação já foi descrita para microrganismos inseridos na espécie *A. butzleri* (Silva, 2017).

Neste trabalho esta metodologia foi utilizada de modo a transformar a estirpe suscetível de *A. butzleri* DQ40A1 com fragmentos de DNA com as três mutações encontradas na avaliação da sequenciação dos mutantes provenientes do ensaio de flutuação. Após a realização deste ensaio os resultados foram observados e a frequência de mutação espontânea calculada através da razão do número de transformantes por mililitro por UFC/mL totais e micrograma de DNA, e os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Frequência de transformação da estirpe *Arcobacter butzleri* DQ40A1 com três fragmentos de DNA diferentes provenientes do ensaio de flutuação.

Mutação encontrada no fragmento de DNA usado para transformação (alteração nucleotídica)	Frequência de transformação (\pm desvio padrão)
Thr85Ile (C254T)	$9,82 \times 10^{-06} \pm 6,4 \times 10^{-06}$
Asp89Asn (G265A)	$1,72 \times 10^{-08} \pm 1,5 \times 10^{-08}$
Asp89Gli (A266G)	$2,69 \times 10^{-08} \pm 2,5 \times 10^{-08}$

Após análise dos resultados verificou-se que a maior frequência de transformação é alcançada quando se usou o fragmento de DNA contendo a mutação Thr85Ile para a transformação, sendo este valor quase 1000 vezes superior ao calculado para a transformação com as outras duas mutações. Este resultado vem suportar a informação de que a mutação ocorrida na posição 254 é a mais prevalente na natureza, sendo a única já descrita para *A. butzleri*, de entre as três mutações encontradas (Abdelbaqi *et al.*, 2007; Alfredson & Korolik, 2007; Smith & Fratamico, 2010).

Com o intuito de confirmar a transformação das estirpes para a realização dos ensaios subsequentes para avaliação da sua robustez, foi realizada a sequenciação dos mesmos pela metodologia descrita anteriormente no ponto 3.6.. Após análise desses resultados verificou-se que apenas a transformação com o fragmento de DNA com a mutação Thr85Ile foi 100% confirmada. Isto porque todos os transformados com as outras duas mutações para além de possuírem a mutação desejada adquiriram também mutações espontâneas em outras zonas da RDRQ da *gyrA*. Estas mutações não desejadas são eventualmente resultado de mutações espontâneas ocorridas durante o protocolo de transformação, porém a causa e tempo em que ocorrem não foram possíveis de detetar.

Após seleção dos transformados e confirmação dessa transformação através da sequenciação, foi determinada a CMI para as três fluoroquinolonas estudadas ao longo este trabalho. Os resultados da CMI da estirpe selecionada na transformação natural comparativamente com a estirpe parental correspondente estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração mínima inibitória da estirpe de *Arcobacter butzleri* selecionada do ensaio de transformação (*Arcobacter butzleri* 851) e da estirpe parental correspondente (*Arcobacter butzleri* DQ40A1) para três fluoroquinolonas (ciprofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina), bem como a mutação no gene da *gyrA* associada a essa resistência.

Estirpe	Mutação no gene da <i>gyrA</i>	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
		CIP	LEV	MOX
<i>A. butzleri</i> DQ40A1 (wt)	NA	0,06	0,125	0,06
<i>A. butzleri</i> 851	Thr85Ile (C254T)	16	32	32

Pela análise dos resultados e da comparação dos mesmos com a estirpe parental e com os pontos de corte para a resistência às fluoroquinolonas utilizados neste estudo (CIP \geq 4 $\mu\text{g/mL}$; LEV \geq 4 $\mu\text{g/mL}$; MOX \geq 4 $\mu\text{g/mL}$) (Ge & McDermott, 2005; Vicente *et al.*, 2008), foi possível concluir que a estirpe 851 selecionada na transformação natural apresenta resistência às três fluoroquinolonas estudadas. Os valores de CMI desta estirpe *A. butzleri* 851 foram também comparados com os valores do mesmo parâmetro das estirpes portadoras de mutações espontâneas provenientes da mesma estirpe parental (*A. butzleri* DQ40A1) representadas na Tabela 5. Nesta comparação foi possível verificar que *A. butzleri* 851 apresentou níveis fenotípicos de resistência ligeiramente superiores às estirpes portadoras de mutação espontânea. Esta ligeira diferença pode ser explicada pela ocorrência de mutações secundárias em outras zonas do genoma que compensam essa resistência.

4.6. Avaliação da robustez das estirpes de *Arcobacter butzleri* com resistência às fluoroquinolonas

As mutações com associação à resistência antimicrobiana podem influenciar a forma como as bactérias se comportam no meio ambiente em competição com outras (Vogwill & Maclean, 2015), o que pode ser traduzida em custo para a robustez das estirpes. Quando acontece, a mutação tem uma maior probabilidade de se dissipar na ausência de tratamento antimicrobiano. Isto é, quanto menor o custo causado pela mutação à bactéria maior é a probabilidade de estabilidade da mutação (Maharjan & Ferenci, 2017; Melnyk *et al.*, 2015). Contudo uma mutação pode provocar um custo na robustez bacteriana, mas ser compensado pelo desenvolvimento de mutações secundárias que ajudam a neutralizar esse custo para a bactéria (Melnyk *et al.*, 2015).

A avaliação da robustez das estirpes de *A. butzleri* com mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas foi efetuada por três ensaios distintos. Nestes ensaios foi verificada a influência das mutações na cinética de crescimento das bactérias, na sobrevivência das mesmas quando em competição com a estirpe parental e ainda na capacidade das bactérias na formação de biofilmes. Para a realização destes ensaios foram utilizadas três estirpes portadoras de mutação no gene *gyrA* e uma estirpe parental ausente de qualquer mutação. Devido a não ter sido possível usar as estirpes portadoras das três mutações diferentes provenientes do ensaio de transformação, apenas foram testadas mutantes com a mutação C254T. Assim, uma das estirpes usada foi proveniente do ensaio de transformação (*A. butzleri* 851), enquanto as outras duas foram originárias do ensaio de flutuação (*A. butzleri* DQcip3 e *A. butzleri* DQmox2). Estas duas estirpes possuidoras de uma mutação de caráter espontâneo distinguem-se na forma como foram obtidas, pois uma provém de uma placa de seleção com o antibiótico ciprofloxacina e outra de uma placa de seleção com moxifloxacina, sendo que o produto de amplificação da

RDRQ da *gyrA* da estirpe *A. butzleri* DQcip3 foi utilizado como material genético dador para a transformação.

4.6.1. Curva de crescimento

O crescimento bacteriano de cada espécie pode ser afetado por diversos fatores ambientais bem como pela resistência adquirida a agentes antimicrobianos (Pope *et al.*, 2010; Amagu Echiegu, 2015). A realização do ensaio de cinética de crescimento é um dos ensaios descritos para avaliação do custo das mutações na sobrevivência e robustez das bactérias no geral. Estudos previamente descritos relataram tanto a influência como a não influência das mutações no crescimento bacteriano. Nomeadamente, em estirpes incluídas nas espécies *C. coli* e *C. jejuni* o custo da resistência às fluoroquinolonas na cinética de crescimento foi já relatado, porém em estudos realizados em *A. butzleri* não demonstraram essa mesma influência (Björkholm *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2018; Pope *et al.*, 2010). Neste estudo foi avaliada a influência da mutação ocorrida na posição 254 da RDRQ da *gyrA* encontrada nos mutantes resultantes do ensaio de flutuação, bem como da transformação de uma estirpe parental com fragmento de DNA contendo essa mesma mutação, na cinética de crescimento das estirpes. Para isto as estirpes foram colocadas a crescer em meio líquido e lida a DO_{620nm} às 0, 2, 4, 6, 8, 10, e 24 horas de crescimento, e os resultados apresentados na Figura 7.

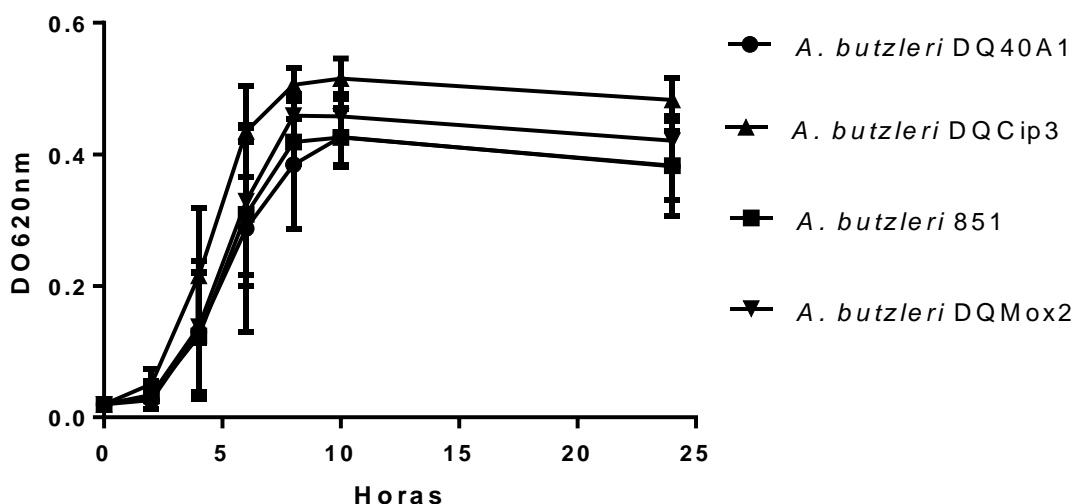


Figura 7 - Curva de crescimento de quatro estirpes de *Arcobacter butzleri*, DQ40A1 (estirpe parental), 851 (estirpe transformada com fragmento de DNA com mutação na posição 254 da RDRQ da *gyrA*), DQCip3 (estirpe com mutação espontânea na posição 254 da RDRQ do gene *gyrA*, usado como material genético dador para a transformação) e DQMox2 (estirpe com mutação espontânea na posição 254 da RDRQ da *gyrA*). Resultados obtidos correspondem a média \pm desvio padrão resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *one-way* ANOVA.

Pela análise dos resultados apresentados é verificável que todas as estirpes apresentam o mesmo comportamento, e pela realização do teste estatístico *one-way* ANOVA nenhum dos mutantes apresentou diferença estatística significativa ($p > 0,05$) quando comparada com a estirpe parental. Nas primeiras seis horas de crescimento é possível observar que as estirpes *A. butzleri* 851 e *A. butzleri* DQMox2 apresentam-se sobrepostas com o perfil da estirpe parental *A. butzleri* DQ40A1, porém a estirpe *A. butzleri* DQCip3 apesar de se apresentar uma curva de crescimento próxima das restantes apresenta valores de densidade ótica ligeiramente superiores aos das restantes estirpes. Este comportamento prolonga-se até ao final da análise. Estes resultados vêm de encontro ao já descrito para esta espécie por Ferreira e seus colaboradores (Ferreira *et al.*, 2018). Assim, é possível concluir que a presença da mutação na posição 254 da RDRQ da *gyrA* associada à resistência às fluoroquinolonas não apresenta influência para o crescimento de bactérias da espécie *A. butzleri*.

4.6.2. Testes de competição

A avaliação do custo das mutações na sobrevivência das bactérias aquando em competição com outras é outro ensaio largamente usado para determinar o custo da resistência na robustez das bactérias em geral. Este ensaio *in vitro* traduz de certa forma o que ocorre no meio ambiente, em que os microrganismos competem entre si pelos nutrientes e fatores necessários ao seu crescimento (Pope *et al.*, 2010). A influência das mutações neste tipo de ensaios fornece informação acerca da sobrevivência das estirpes resistentes no meio ambiente em competição com outras bactérias (Vogwill & Maclean, 2015). Este ensaio já foi descrito para avaliação do custo associado à resistência às fluoroquinolonas em *A. butzleri* e *S. pneumoniae*, em que membros desta última espécie apresentaram resultados que indicam um custo na robustez bacteriana quando possuem mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas (Rozen *et al.*, 2007). Contudo, em ensaios similares em *A. butzleri* esse custo não foi observado (Ferreira *et al.*, 2018). Assim com o intuito de determinar a influência da resistência às fluoroquinolonas na competição com outras estirpes foi realizado um ensaio em que duas estirpes (resistente e suscetível) foram colocadas a crescer em competição numa proporção 1:1 durante 24 horas. As UFC/mL foram determinadas às 0 e 24 horas e os resultados apresentados na forma de custo relativo representados na Figura 8.

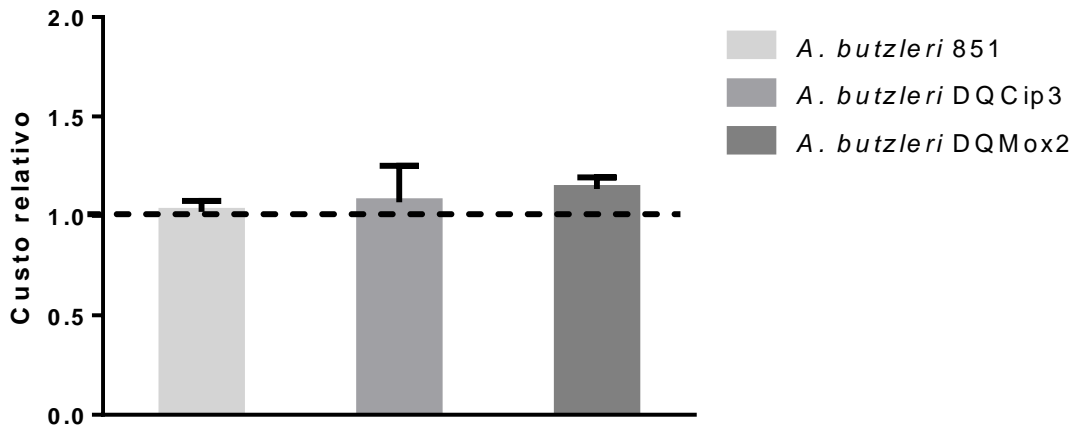


Figura 8 - Custo relativo de três estirpes de *Arcobacter butzleri* resistentes às fluoroquinolonas associada à mutação C254T (Thr85Ile), provenientes, duas de mutações espontâneas (*Arcobacter butzleri* DQCip3 e *Arcobacter butzleri* DQMox2), e uma de transformação natural (*Arcobacter butzleri* 851) de uma estirpe suscetível aos mesmos antibióticos. Os resultados apresentados são provenientes da média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios realizados de forma independente. Análise estatística pelo teste *one-way* ANOVA.

O custo relativo é fornecido pela razão entre o logaritmo neperiano das UFC/mL resistentes às 24 horas sobre UFC/mL resistentes às 0 horas, e o logaritmo neperiano das UFC/mL suscetíveis às 24 horas sobre UFC/mL suscetíveis às 0 horas. É considerado que não ocorre qualquer custo na robustez bacteriana, quando o valor de custo relativo é de 1, sendo que quando este valor é superior ou inferior, é considerado que ocorreu um aumento ou decréscimo no custo, respectivamente (Ferreira *et al.*, 2018). Pela análise dos resultados apresentados para as três estirpes de *A. butzleri* estudadas é denotado pela visualização do gráfico que nenhuma das estirpes em estudo apresentou custo significativo na sua robustez aquando em competição com a sua estirpe parental. Este resultado foi confirmado pela realização da análise estatística pelo teste *one-way* ANOVA, onde nenhuma das estirpes apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) comparativamente ao valor fixo de 1. De modo a tentar compreender se a origem das mutações (espontânea ou por transformação) influencia a robustez da estirpe, procedeu-se à comparação dos resultados de cada estirpe entre si. Na análise e comparação visual do gráfico é verificada uma ligeira diferença entre cada uma, porém nenhuma se traduz em custo relativo significativo ($p > 0,05$). Resultados similares têm sido associados à ocorrência de mutações secundárias compensatórias do custo provocado pelas mutações associadas à resistência antimicrobiana (Maharjan & Ferenci, 2017; Melnyk *et al.*, 2015), no entanto a estirpe *A. butzleri* 851 que foi transformada com a mutação de interesse possui um perfil semelhante. Estes dados indicam que a robustez de *A. butzleri* pode não ser afetada por mutações pontuais. Esta não influência das mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas na robustez de estirpes de *A. butzleri* já foi referida por Ferreira *et al.* (2018). Assim sugere-se que a presença da mutação aqui estudada (Thr85Ile) com associação à resistência às fluoroquinolonas não influenciará a maneira

como *A. butzleri* sobrevive num meio ambiente em competição com outras bactérias suscetíveis.

4.6.3. Capacidade de formação de biofilmes

A capacidade de formar biofilmes é um mecanismo de proteção celular que algumas bactérias possuem com o objetivo de se protegerem e sobreviverem a ambientes de adversos. Esta capacidade capacita estas bactérias de uma vantagem na sobrevivência no meio ambiente perante outras bactérias que não possuam essa característica (Ferreira *et al.*, 2013; Kjeldgaard *et al.*, 2009). O estudo da influência da resistência às fluoroquinolonas nesta capacidade é outra metodologia de avaliação da robustez das bactérias. Esta habilidade é característica de membros da espécie *A. butzleri* e a sua determinação foi já referida como uma metodologia útil para estabelecer uma correlação entre a resistência às fluoroquinolonas e a sua influência na sua sobrevivência (Ferreira *et al.*, 2018). Com este mesmo objetivo foi realizado um ensaio em que as estirpes foram sujeitas a um crescimento durante 48 horas e no final desse período os biofilmes foram revelados através do método do violeta de cristal, sendo que os resultados se encontram apresentados na Figura 9.

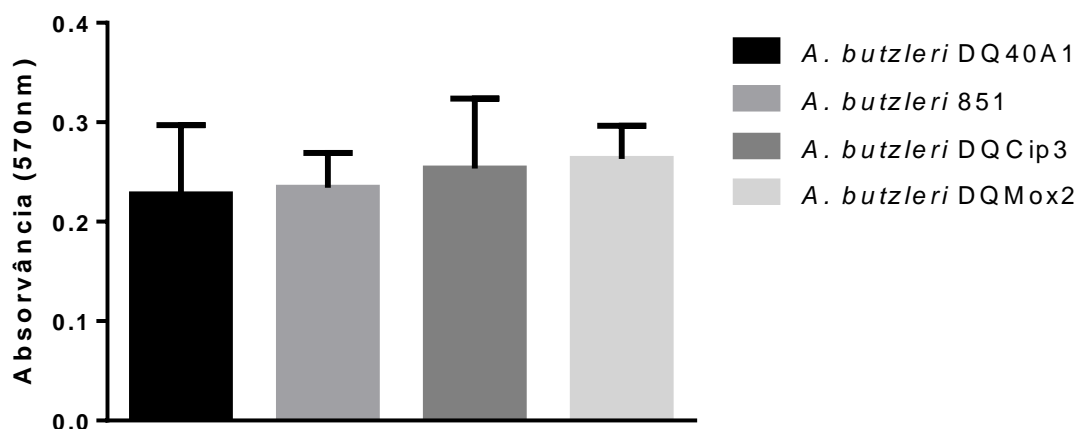


Figura 9 - Formação de biofilmes de três estirpes de *Arcobacter butzleri* mutantes resistentes às fluoroquinolonas em comparação com a estirpe parental *Arcobacter butzleri* DQ40A1. Absorvância apresentada como média±desvio padrão, resultante de pelo menos três ensaios independentes, para cada estirpe de *Arcobacter butzleri* mutante e parental. A análise estatística pelo teste one-way ANOVA.

Pela análise dos resultados é possível observar que a diferença na formação de biofilmes para a estirpe parental, *A. butzleri* DQ40A1, não difere significativamente da absorvância lida para as estirpes mutantes resistentes ($p > 0,05$). Tal como já foi referido em estudos prévios, mutações associadas à resistência às fluoroquinolonas não tem influência na capacidade de formação de biofilmes em *A. butzleri* (Ferreira *et al.*, 2018). Assim conclui-se que a mutação Thr85Ile associada à resistência às fluoroquinolonas não apresenta para a bactéria qualquer custo ao nível da formação de biofilmes.

Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas Futuras

A. butzleri é uma bactéria incluída na família *Campylobacteraceae*, sendo considerada como um enteropatogéneo emergente e o quarto *Campylobacter-like organism* presente em fezes de natureza diarreia persistente e aquosa. As doenças desencadeadas por infeções por esta espécie são normalmente autolimitadas, porém em situações de maior gravidade é necessário o uso de antibióticos, normalmente as fluoroquinolonas. O isolamento de *A. butzleri* resistente às fluoroquinolonas representa uma preocupação em termos de saúde pública. A resistência às fluoroquinolonas nesta espécie passa normalmente por uma mutação pontual na região determinante de resistência às quinolonas do gene da DNA girase A, porém pode também ser consequência de outros mecanismos ainda não estudados. Assim, este estudo focou-se na avaliação da contribuição de mutações pontuais na resistência às fluoroquinolonas em *A. butzleri*, bem como a diversidade dessas mutações, e de outros mecanismos putativos.

Pela determinação da taxa de mutação espontânea de quatro estirpes de *A. butzleri*, através de um ensaio de flutuação em condições de aerobiose a 30°C, verificou-se que esta se encontrava numa ordem de grandeza de 10^{-9} , para as quatro estirpes avaliadas, independentemente da fluoroquinolona utilizada na seleção das colónias resistentes. Pela sequenciação da RDRQ da *gyrA* foram verificadas três mutações distintas nas posições 254, 265 e 266 que apresentaram associação à resistência às três fluoroquinolonas testadas, sendo que a última nunca antes tinha sido referenciada quer para *Arcobacter* quer para microrganismos próximos. Todas estas mutações demonstraram estabilidade ao longo do tempo. Com o intuito de perceber que outros mecanismos poderão estar na explicação do fenótipo de resistência às fluoroquinolonas foi sequenciada a RDRQ do gene da *gyrB* porém nenhuma mutação foi encontrada, concluindo-se assim que esta subunidade não demonstra ter influência na resistência às fluoroquinolonas em *A. butzleri*. No entanto, pela avaliação da expressão fenotípica das bombas de efluxo os resultados sugere-se a contribuição desta maquinaria celular para a resistência às fluoroquinolonas em *A. butzleri*.

De modo a estudar a resistência adquirida por via da transferência horizontal de genes procedeu-se à transformação natural de uma estirpe competente suscetível às fluoroquinolonas (DQ40A1) com fragmentos de DNA com as mutações encontradas anteriormente. Assim, verificou-se que as estirpes transformadas com o fragmento de DNA com a mutação associada à transição Thr85Ile apresentaram uma frequência de transformação quase 1000x superior às transformadas com as outras duas mutações, o que salienta a abundância da mutação C254T (Thr85Ile) em detrimento das mutações Asp89Asn e Asp89Gli. A influência da mutação associada à transição Thr85Ile na robustez das estirpes foi estudada verificando-se que não tem qualquer influência na forma como sobrevivem no meio ambiente quer as bactérias que adquiriram

mutação de forma espontânea, quer a que adquiriu a mutação através de transferência horizontal de genes.

Com este trabalho foi então concluído que a resistência às fluoroquinolonas na espécie *A. butzleri* poder ser devida tanto à presença de mutações na região determinante de resistência às quinolonas do gene da *gyrA* como à contribuição das bombas de efluxo. Para além da mutação já previamente descrita por diversos autores ocorrida na posição 254 (Thr85Ile) foram associadas à resistência às fluoroquinolonas mais duas mutações nas posições 265 (Asp89Asn) e 266 (Asp89Gli) da RDRQ da *gyrA*. A mutação da posição 254 (Thr85Ile) não aparenta ter qualquer influência na robustez bacteriana.

São, no entanto, necessários mais estudos de modo a compreender melhor os outros mecanismos subjacentes à resistência às fluoroquinolonas em *A. butzleri*. Assim, seria importante em trabalhos futuros:

- Transformar estirpes bacterianas de *A. butzleri* suscetíveis às fluoroquinolonas com fragmentos de DNA com as outras duas mutações Asp89Asn e Asp89Gli (G265A e A266G) na ausência de mutações espontâneas durante o protocolo de transformação;
- Determinar a influência da presença destas mutações, quer de carácter espontâneo quer por transformação bacteriana, na robustez das estirpes;
- Aprofundar os estudos sobre o funcionamento das bombas de efluxo, bem como do papel dos seus genes reguladores, avaliando potenciais mutações que possam ocorrer de forma espontânea que possam influenciar a expressão destes sistemas.

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

Abdelbaqi, K., Ménard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P. & Mégraud, F. (2007) 'Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates', *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49, pp. 337-345.

Adesiji, Y. O., Oloke, J. K., Emikpe, B. O. & Coker, A. O. (2014) 'Arcobacter, an emerging opportunistic food borne pathogen- A review', *African journal of medicine and medical sciences*, 43 suppl, pp. 5-11.

Alfredson, D. A. & Korolik, V. (2007) 'Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *FEMS Microbiology Letters*, 277, pp. 123-132.

Amagu Echiegu, E. (2015) 'Kinetic models for anaerobic fermentation processes - A review', *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 11, pp. 132-148.

Amsterdam, K. Van, Bart, A. & Ende, A. Van Der (2005) 'A *Helicobacter pylori* TolC Efflux Pump Confers Resistance to Metronidazole', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, pp. 1477-1482.

Andersson, D. I. & Hughes, D. (2014) 'Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics', *Nature Reviews Microbiology*, 12, pp. 465-478.

Andrews, J. M. & Andrews, J. M. (2001) 'Determination of minimum inhibitory concentrations', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48, pp. 5-16.

Assanta, M. A., Roy, D., Lemay, E. & Montpetit, D. (2002) 'Attachment of *Arcobacter butzleri*, a New Waterborne Pathogen, to Water Distribution Pipe Surfaces', *Journal of food protection*, 65, pp. 1240-1247.

Aubry, A., Veziris, N., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V. & Fisher, L. M. (2006) 'Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and-hypersusceptible clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of mutant enzymes', *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, pp. 104-112.

Björkholm, B., Sjölund, M., Falk, P. G., Berg, O. G., Engstrand, L. & Andersson, D. I. (2001) 'Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, pp. 14607-14612.

Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. & Piddock, L. J. V (2015) 'Molecular mechanisms of antibiotic resistance', *Nature Reviews Microbiology*, 13, pp. 42-51.

Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M. & Schulzke, J. (2009) 'Arcobacter butzleri Induces Barrier Dysfunction in Intestinal HT-29/B6 Cells', *The Journal of Infectious Diseases*, 200, pp. 756-764.

- Champoux, J. J. (2001) 'DNA Topoisomerases: Structure , Function , & Mechanism', *Annual review of biochemistry*, 70, pp. 369-413.
- Changkwaneyun, R., Yamaguchi, T., Kongsoi, S., Changkaew, K., Yokoyama, K., Kim, H., Suthienkul, O., Usui, M., Tamura, Y., Nakajima, C. & Suzuki, Y. (2016) 'Impact of mutations in DNA gyrase genes on quinolone resistance in *Campylobacter jejuni*', *Drug Testing and Analysis*, 8, pp. 1071-1076.
- Collado, L. & Figueras, M. J. (2011) 'Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*', *Clinical Microbiology Reviews*, 24, pp. 174-192.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J. & Figueras, M. J. (2008) 'Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution', *Environmental Microbiology*, 10, pp. 1635-1640.
- Collin, F., Karkare, S. & Maxwell, A. (2011) 'Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, pp. 479-497.
- Cox, G. & Wright, G. D. (2013) 'Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions', *International Journal of Medical Microbiology*, 303, pp. 287-292.
- D'Sa, E. M. & Harrison, M. A. (2005) 'Effect of pH, NaCl content, and temperature on growth and survival of *Arcobacter* spp.', *Journal of food protection*, 68, pp. 18-25.
- Debruyne, L., Gevers, D. & Vandamme, P. (2008) 'Taxonomy of the Family *Campylobacteraceae*', in *Campylobacter, Third Edition*, pp. 3-25.
- Dever, L. A. & Terence, S. D. (1991) 'Mechanisms of Bacterial Resistance to Antibiotics', *Archives of Internal Medicine*, 151, pp. 886-895.
- Diéguez, A. L., Pérez-Cataluña, A., Figueras, M. J. & Romalde, J. L. (2018) '*Arcobacter haliotis* Tanaka *et al.* 2017 is a later heterotypic synonym of *Arcobacter lekithochrous* Diéguez *et al.* 2017', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, pp. 5-8.
- Drake, J. W. (2001) 'Mutation Rate', in *Encyclopedia of Genetics*, pp. 1277-1279.
- Drlica, K. & Zhao, X. (1997) 'DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones', *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 61, pp. 377-392.
- Duffy, L. L. & Fegan, N. (2012) 'Prevalence and Concentration of *Arcobacter* spp. on Australian Beef Carcasses', *Journal of Food Protection*, 75, pp. 1479-1482.
- Dzidic, S., Suskovic, J. & Kos, B. (2008) 'Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects', *Food Technology and Biotechnology*, 46, pp. 11-21.
- European Centre for Disease Prevention and Control, European Food Safety and European Medicines Agency (2017) 'ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals', *EFSA Journal*, 15, pp. 1-135.

- Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E. & Vila, J. (2009) 'Mechanism of action of and resistance to quinolones', *Microbial Biotechnology*, 2, pp. 40-61.
- Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D. & Pennisi, M. G. (2009) 'Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in Southern Italy', *Journal of Applied Microbiology*, 106, pp. 1661-1666.
- Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Giannone, M., La Camera, E. & Carbone, M. (2004) 'Detection of *Arcobacter* spp. in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea', *Applied and Environmental Microbiology*, 70, pp. 1271-1276.
- Fernández, H., Vera, F. & Villanueva, M. P. (2007) 'Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile', *Archivos de Medicina Veterinaria*, 39, pp. 163-165.
- Fernández, L., Breidenstein, E. B. M. & Hancock, R. E. W. (2011) 'Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics', *Drug Resistance Updates*, 14, pp. 1-21.
- Ferreira, S., Correia, D. R., Oleastro, M. & Domingues, F. C. (2018) '*Arcobacter butzleri* Ciprofloxacin Resistance: Point Mutations in DNA Gyrase A and Role on Fitness Cost', *Microbial Drug Resistance*, 24, pp. 915-922.
- Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. & Oleastro, M. (2013) 'Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse', *International Journal of Food Microbiology*, 162, pp. 82-88.
- Ferreira, S., Oleastro, M. & Domingues, F. C. (2017) '*Arcobacter* spp. in Food Chain—From Culture to Omics', in *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, pp. 73-117.
- Ferreira, S., Oleastro, M. & Domingues, F. C. (2017) 'Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* sp. in a dairy plant', *Journal of Applied Microbiology*, 123, pp. 1019-1026.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. & Domingues, F. C. (2014) 'Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity', *Microbial Pathogenesis*, 76, pp. 19-25.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. & Domingues, F. C. (2016) 'Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review', *Critical Reviews in Microbiology*, 42, pp. 364-383.
- Ferreira, S., Silva, F., Queiroz, J. A., Oleastro, M. & Domingues, F. C. (2014) 'Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: Activity and effect on cellular functions', *International Journal of Food Microbiology*, 180, pp. 62-68.
- Fleming, A. (1929) 'On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*', *British journal of experimental pathology*, 10, pp. 226-236.
- Fong, T. T., Mansfield, L. S., Wilson, D. L., Schwab, D. J., Molloy, S. L. & Rose, J. B. (2007) 'Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio', *Environmental Health Perspectives*, 115, pp. 856-864.

- Foster, P. L. (2001) 'Mutation, Spontaneous', in *Encyclopedia of Genetics*, p. 1279.
- Foster, P. L. (2006) 'Methods for Determining Spontaneous Mutation Rates', *Methods in Enzymology*, 31, pp. 1713-1723.
- Galán, J. C., Turrientes, M. C., Baquero, M. R., Rodríguez-Alcayna, M., Martínez-Amado, J., Martínez, J. L. & Baquero, F. (2007) 'Mutation rate is reduced by increased dosage of *mutL* gene in *Escherichia coli* K-12', *FEMS Microbiology Letters*, 275, pp. 263-269.
- Ge, B. & McDermott, P. (2005) 'Role of Efflux Pumps and Topoisomerase Mutations in Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49, pp. 3347-3354.
- Ge, B., Wang, F., Sjölund-Karlsson, M. & McDermott, P. F. (2013) 'Antimicrobial resistance in *Campylobacter*: Susceptibility testing methods and resistance trends', *Journal of Microbiological Methods*, 95, pp. 57-67.
- Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H. & Nash, H. A. (1976) 'DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 73, pp. 3872-3876.
- Gerrish, P. (2008) 'A simple formula for obtaining markedly improved mutation rate estimates', *Genetics*, 180, pp. 1773-1778.
- Giacometti, F., Lucchi, A., Di Francesco, A., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I., Stancampiano, L., Manfreda, G., Merialdi, G. & Serraino, A. (2015) '*Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* circulation in a dairy farm and sources of milk contamination', *Applied and Environmental Microbiology*, 81, pp. 5055-5063.
- Gill, M. J., Brenwald, N. P. & Wise, R. (1999) 'Identification of an efflux pump gene, *pmrA*, associated with fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, pp. 187-189.
- González, A., Botella, S., Montes, R. M., Moreno, Y. & Ferrús, M. A. (2007) 'Direct detection and identification of *Arcobacter* species by multiplex PCR in chicken and wastewater samples from Spain', *Journal of Food Protection*, 70, pp. 341-347.
- González, A. & Ferrús, M. A. (2011) 'Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods', *International Journal of Food Microbiology*, 145, pp. 311-314.
- Haas, C. E., Nix, D. E. & Schentag, J. J. (1990) '*In vitro* selection of resistant *Helicobacter pylori*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, pp. 1637-1641.
- Hänninen, M.-L. & Hannula, M. (2007) 'Spontaneous mutation frequency and emergence of ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60, pp. 1251-1257.

- Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., Schlüter, O. & Klocke, M. (2013) 'Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays', *Systematic and Applied Microbiology*, 36, pp. 235-243.
- Herson, D. S., McGonigle, B., Payer, M. A. & Baker, K. H. (1987) 'Attachment as a factor in the protection of *Enterobacter cloacae* from chlorination', *Applied and Environmental Microbiology*, 53, pp. 1178-1180.
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A. & Gaastra, W. (2006) '*Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent!', *Veterinary Microbiology*, 115, pp. 1-13.
- Van Hoek, A. H. A. M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P. & Aarts, H. J. M. (2011) 'Acquired antibiotic resistance genes: An overview', *Frontiers in Microbiology*, 2, pp. 1-27.
- Hooper, D. C. & Jacoby, G. A. (2015) 'Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance', *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 12-31.
- Houf, K., Devriese, L. a, Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.-P., van Hoof, J. & Vandamme, P. (2004) 'Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers', *Microbial drug resistance*, 10, pp. 243-7.
- Hsu, T.-T. D. & Lee, J. (2015) 'Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water', *Zoonoses and Public Health*, 62, pp. 579-589.
- Iovine, N. M. (2013) 'Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*', *Virulence*, 4, pp. 230-240.
- Jacob, J., Woodward, D., Feuerpfeil, I. & M Johnson, W. (1998) 'Isolation of *Arcobacter butzleri* in raw water and drinking water treatment plants in Germany', *International journal of hygiene and environmental medicine*, 201, pp. 189-198.
- Jacoby, G. A. (2005) 'Mechanisms of resistance to quinolones', *Clinical infectious diseases: Infectious Diseases Society of America*, 41, pp. S120-S126.
- Jiang, R., Yang, H., Sun, F. & Chen, T. (2006) 'Searching for interpretable rules for disease mutations: A simulated annealing bump hunting strategy', *BMC Bioinformatics*, 7, p. 417.
- Karami-Zarandi, M., Douraghi, M., Vaziri, B., Adibhesami, H., Rahbar, M. & Yaseri, M. (2017) 'Variable spontaneous mutation rate in clinical strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and differentially expressed proteins in a hypermutator strain', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 800-802, pp. 37-45.
- Kashef, N. & Hamblin, M. R. (2017) 'Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation?', *Drug Resistance Updates*, 31, pp. 31-42.

- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G. & Wachsmuth, I. K. (1991) '*Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness', *Journal of Clinical Microbiology*, 29, pp. 376-385.
- Kim, H., Nakajima, C., Yokoyama, K., Rahim, Z., Kim, Y. U., Oguri, H. & Suzuki, Y. (2011) 'Impact of the E540V amino acid substitution in *GyrB* of *Mycobacterium tuberculosis* on quinolone resistance', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, pp. 3661-3667.
- Kjeldgaard, J., Jørgensen, K. & Ingmer, H. (2009) 'Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*', *International Journal of Food Microbiology*, 131, pp. 256-259.
- Lappi, V., Archer, J. R., Cebelinski, E., Leano, F., Besser, J. M., Klos, R. F., Medus, C., Smith, K. E., Fitzgerald, C. & Davis, J. P. (2013) 'An Outbreak of Foodborne Illness Among Attendees of a Wedding Reception in Wisconsin Likely Caused by *Arcobacter butzleri*', *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, pp. 250-255.
- Lastovica, A. J., On, S. L. W. & Zhang, L. (2013) 'The family *Campylobacteraceae*', in *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria*, pp. 307-335.
- Lea, D. E. & Coulson, C. A. (1949) 'The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations', *Journal of Genetics*, 49, pp. 264-285.
- Lee, M. K. & Kanatani, M. S. (1999) 'Quinolones: which generation for which microbe?', *The Western journal of medicine*, 170, pp. 359-361.
- Lehner, A., Tasara, T. & Stephan, R. (2005) 'Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen', *International Journal of Food Microbiology*, 102, pp. 127-135.
- Levican, A., Collado, L., Yustes, C., Aguilar, C. & Figueras, M. J. (2014) 'Higher water temperature and incubation under aerobic and microaerobic conditions increase the recovery and diversity of *Arcobacter* spp. from shellfish', *Applied and Environmental Microbiology*, 80, pp. 385-391.
- Li, X. Z., Mehrotra, M., Ghimire, S. & Adewoye, L. (2007) 'β-Lactam resistance and β-lactamases in bacteria of animal origin', *Veterinary Microbiology*, 121, pp. 197-214.
- Liu, Z. Q., Zheng, P. Y. & Yang, P. C. (2008) 'Efflux pump gene *hefA* of *Helicobacter pylori* plays an important role in multidrug resistance', *World Journal of Gastroenterology*, 14, pp. 5217-5222.
- Luber, P., Bartelt, E., Genschow, E., Wagner, J. & Hahn, H. (2003) 'Comparison of broth microdilution, E-test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *Journal of Clinical Microbiology*, 41, pp. 1062-1068.
- Luo, N., Sahin, O., Lin, J., Michel, L. O. & Zhang, Q. (2003) 'In vivo selection of *Campylobacter* isolates with high levels of fluoroquinolone resistance associated with *gyrA* mutations and the

function of the CmeABC efflux pump', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47, pp. 390-394.

Luria, S. & Delbrück, M. (1943) 'Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance', *Genetics*, 28, pp. 491-511.

MacLean, R. C., Hall, A. R., Perron, G. G. & Buckling, A. (2010) 'The population genetics of antibiotic resistance: Integrating molecular mechanisms and treatment contexts', *Nature Reviews Genetics*, 11, pp. 405-414.

Maharjan, R. & Ferenci, T. (2017) 'The fitness costs and benefits of antibiotic resistance in drug-free microenvironments encountered in the human body', *Environmental Microbiology Reports*, 9, pp. 635-641.

Martins, M. (2013) 'A Simple Method for Assessment of MDR Bacteria for Over-Expressed Efflux Pumps', *The Open Microbiology Journal*, 7, pp. 72-82.

Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Carbone, M., Caccamo, D. & Fera, M. T. (2000) 'Isolation of *Arcobacter* spp. from a brackish environment', *The New Microbiologica*, 23, pp. 143-149.

McMurry, L., Petrucci, R. E. & Levy, S. B. (1980) 'Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, pp. 3974-3977.

Mellata, M., Maddux, J. T., Nam, T., Thomson, N., Hauser, H., Stevens, M. P., Mukhopadhyay, S., Sarker, S., Crabbé, A., Nickerson, C. A., Santander, J. & Curtiss, R. (2012) 'New Insights into the Bacterial Fitness-Associated Mechanisms Revealed by the Characterization of Large Plasmids of an Avian Pathogenic *E. coli*', *PLoS ONE*, 7, p. e29481.

Melnyk, A. H., Wong, A. & Kassen, R. (2015) 'The fitness costs of antibiotic resistance mutations', *Evolutionary Applications*, 8, pp. 273-283.

Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G. & Williams, N. J. (2011) 'Comparison of *Arcobacter* isolation methods, and diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom', *Applied and Environmental Microbiology*, 77, pp. 1646-1650.

Merga, J. Y., Williams, N. J., Miller, W. G., Leatherbarrow, A. J. H., Bennett, M., Hall, N., Ashelford, K. E. & Winstanley, C. (2013) 'Exploring the Diversity of *Arcobacter butzleri* from Cattle in the UK Using MLST and Whole Genome Sequencing', *PLoS ONE*, 8, p. e55240.

Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M. S. M., Ussery, D. W., Stolz, J. F., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Wang, G., Malek, J. A., Rogosin, A., Stanker, L. H. & Mandrell, R. E. (2007) 'The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*', *PLoS ONE*, 2, p. e1358.

Miyachi, H., Miki, I., Aoyama, N., Shirasaka, D., Matsumoto, Y., Toyoda, M., Mitani, T., Morita, Y., Tamura, T., Kinoshita, S., Okano, Y., Kumagai, S. & Kasuga, M. (2006) 'Primary levofloxacin

- resistance and *gyrA/B* mutations among *Helicobacter pylori* in Japan', *Helicobacter*, 11, pp. 243-249.
- Morejón, I. F. B., González, A. & Ferrús, M. A. (2017) 'Detection, Identification, and Antimicrobial Susceptibility of *Arcobacter* spp. Isolated from Shellfish in Spain', *Foodborne Pathogens and Disease*, 14, pp. 238-243.
- Morgan, J. & Steiglitz, K. (2003) 'Pairwise Competition and the Replicator Equation', *Bulletin of Mathematical Biology*, 65, pp. 1163-1172.
- Munita, J. M. & Arias, C. A. (2016) 'Mechanisms of Antibiotic Resistance', *Microbiology Spectrum*, 4, pp. 1-37.
- Musmanno, R. A., Russi, M., Lior, H. & Figura, N. (1997) 'In Vitro virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples', *The new microbiologica*, 20, pp. 63-68.
- Najafi, M. B. H. & Pezeshki, P. (2014) 'Bacterial Mutation; Types, Mechanisms and Mutant Detection Methods: A Review', *European Scientific Journal, ESJ*, 9, pp. 628-638.
- Nishizawa, T. & Suzuki, H. (2014) 'Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1, pp. 1-7.
- Noble, C. G. & Maxwell, A. (2002) 'The role of *GyrB* in the DNA cleavage-religation reaction of DNA gyrase: A proposed two metal-ion mechanism', *Journal of Molecular Biology*, 318, pp. 361-371.
- Nöllmann, M., Crisona, N. J. & Arimondo, P. B. (2007) 'Thirty years of *Escherichia coli* DNA gyrase: From *in vivo* function to single-molecule mechanism', *Biochimie*, 89, pp. 490-499.
- On, S. L. W., Stacey, A. & Smyth, J. (1995) 'Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia', *Journal of Infection*, 31, pp. 225-227.
- Pagès, J. M., James, C. E. & Winterhalter, M. (2008) 'The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria', *Nature Reviews Microbiology*, 6, pp. 893-903.
- Pantel, A., Petrella, S., Veziris, N., Brossier, F., Bastian, S., Jarlier, V., Mayer, C. & Aubry, A. (2012) 'Extending the definition of the *GyrB* quinolone resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56, pp. 1990-1996.
- Pathak, V. K. & Temin, H. M. (1990) 'Broad spectrum of *in vivo* forward mutations, hypermutations, and mutational hotspots in a retroviral shuttle vector after a single replication cycle: substitutions, frameshifts, and hypermutations.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87, pp. 6019-6023.

- Pejchalá, M., Dostalíková, E., Slámová, M., Brožková, I. & Vytřasová, J. (2008) 'Prevalence and Diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic', *Journal of Food Protection*, 71, pp. 719-727.
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N. & Figueras, M. J. (2018) '*Arcobacter canalis* sp. nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 68, pp. 1258-1264.
- Piddock, L. J. V (2006) 'Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria', *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 19, pp. 382-402.
- Piva, S., Serraino, A., Florio, D., Giacometti, F., Pasquali, F., Manfreda, G. & Zanoni, R. G. (2013) 'Isolation of *Arcobacter* Species in Water Buffaloes (*Bubalus bubalis*)', *Foodborne Pathogens and Disease*, 10, pp. 475-477.
- Pope, C. F., McHugh, T. D. & Gillespie, S. H. (2010) 'Methods to determine fitness in bacteria', in *Antibiotic Resistance Protocols*, pp. 113-121.
- Pope, C. F., O'Sullivan, D. M., McHugh, T. D. & Gillespie, S. H. (2008) 'A practical guide to measuring mutation rates in antibiotic resistance', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, pp. 1209-1214.
- Pourahmad Jaktaji, R. & Mohiti, E. (2010) 'Study of Mutations in the DNA gyrase *gyrA* Gene of *Escherichia coli*', *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR*, 9, pp. 43-8.
- Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A. & Mégraud, F. (2006) '*Arcobacter butzleri*: Underestimated Enteropathogen', *Emerging Infectious Diseases*, 12, pp. 307-309.
- Puglia, A. M. & Gualerzi, C. O. (2017) 'Antibiotic Resistance: Mechanisms and Impact', in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, pp. 1-41.
- Pumbwe, L., Randall, L. P., Woodward, M. J. & Piddock, L. J. V. (2004) 'Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiple-antibiotic-resistant *Campylobacter jejuni*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, pp. 341-347.
- Redgrave, L. S., Sutton, S. B., Webber, M. A. & Piddock, L. J. V (2014) 'Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success', *Trends in Microbiology*, 22, pp. 438-445.
- Reece, R. J. & Maxwell, A. (1991) 'DNA Gyrase: Structure and Function', *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26, pp. 335-375.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H. & Tanner, S. A. (1999) 'Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water', *Letters in Applied Microbiology*, 28, pp. 31-35.
- Rice, L. B. (2012) 'Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β -lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones', *Mayo Clinic Proceedings*, 87, pp. 198-208.

- Rimbara, E., Noguchi, N., Kawai, T. & Sasatsu, M. (2012) 'Fluoroquinolone Resistance in *Helicobacter pylori*: Role of Mutations at Position 87 and 91 of *GyrA* on the Level of Resistance and Identification of a Resistance Conferring Mutation in *GyrB*', *Helicobacter*, 17, pp. 36-42.
- Rosche, W. A. & Foster, P. L. (2000) 'Determining mutation rates in bacterial populations', *Methods*, 20, pp. 4-17.
- Rozen, D. E., McGee, L., Levin, B. R. & Klugman, K. P. (2007) 'Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, pp. 412-416.
- Saint-Jean, K. D., Henderson, K. D., Chrom, C. L., Abiuso, L. E., Renn, L. M. & Caputo, G. A. (2018) 'Effects of Hydrophobic Amino Acid Substitutions on Antimicrobial Peptide Behavior', *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. Springer US, 10, pp. 408-419.
- Salimiyan Rizi, K., Ghazvini, K. & kouhi Noghondar, M. (2018) 'Adaptive Antibiotic Resistance: Overview and Perspectives', *Journal of Infectious Diseases and Therapy*, 6, pp. 1-3.
- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V., Sasikala, C. & Ramana, C. V. (2013) 'Arcobacter anaerophilus sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus Arcobacter', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, pp. 4619-4625.
- Scheld, W. M. (2003) 'Maintaining fluoroquinolone class efficacy: Review of influencing factors', *Emerging Infectious Diseases*, 9, pp. 1-9.
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K. & Grossart, H. P. (2013) 'The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature', *Frontiers in Microbiology*, 4, p. 47.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A. B. & Jafri, N. (2013) 'Prevalence, Distribution and Antibiotic Resistance of Emergent Arcobacter spp. from Clinically Healthy Cattle and Goats', *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, pp. 9-16.
- Silva, A. L. (2017) Contribuição de bombas de efluxo para a resistência em *Arcobacter butzleri*. Tese de Mestrado. Universidade da Beira Interior.
- Smith, J. L. & Fratamico, P. M. (2010) 'Fluoroquinolone Resistance in *Campylobacter*', *Journal of Food Protection*, 73, pp. 1141-1152.
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E. & Dooley, J. S. G. (2006) 'Under the microscope: Arcobacter', *Letters in Applied Microbiology*, 42, pp. 7-14.
- Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J. & Harrison, M. A. (2007) 'Prevalence of Arcobacter and Campylobacter on broiler carcasses during processing', *International Journal of Food Microbiology*, 113, pp. 16-22.
- Spratt, B. (1994) 'Resistance to antibiotics mediated by target alterations', *Science*, 264, pp. 388-393.

- Stampi, S., Varoli, O., Zanetti, F. & de Luca, G. (1993) 'Arcobacter cryaerophilus and thermophilic campylobacters in a sewage treatment plant in Italy: Two secondary treatments compared', *Epidemiology and Infection*, 110, pp. 633-639.
- Stapleton, P. D. & Taylor, P. W. (2007) 'Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Mechanisms and Modulation', *Science Progress*, 85, pp. 1-14.
- Suh, B. & Lorber, B. (1995) 'Quinolones', *Medical Clinics of North America*, 79, pp. 869-894.
- Takenouchi, T., Tabata, F., Iwata, Y., Hanzawa, H., Sugawara, M. & Ohya, S. (1996) 'Hydrophilicity of quinolones is not an exclusive factor for decreased activity in efflux-mediated resistant mutants of *Staphylococcus aureus*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, pp. 1835-1842.
- Tanaka, R., Cleenwerck, I., Mizutani, Y., Iehata, S., Bossier, P. & Vandamme, P. (2017) '*Arcobacter haliotis* sp. nov., isolated from abalone species *Haliotis gigantea*', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, pp. 3050-3056.
- Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. (2005) 'Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria', *Nature Reviews Microbiology*, 3, pp. 711-721.
- Ullah, H. & Ali, S. (2017) 'Classification of Anti-Bacterial Agents and Their Functions', in Kumavath, R. N. B. T.-A. A. (ed.) *Antibacterial Agents*. Rijeka: InTech, pp. 1-16.
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Vanlaere, E. & Houf, K. (2016) 'Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71, pp. 1241-1244.
- Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. & De Ley, J. (1991) 'Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of Generic Descriptions and Proposal of *Arcobacter* gen. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41, pp. 88-103.
- Vandamme, P. & De Ley, J. (1991) 'Proposal for a New Family, *Campylobacteraceae*', *International journal of systematic bacteriology*, 41, pp. 451-455.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H. & Lauwers, S. (1992) 'Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school', *Journal of Clinical Microbiology*, 30, pp. 2335-2337.
- Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., van den Borre, C., Higgins, R. & Hommez, J. (1992) 'Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens', *International journal of systematic bacteriology*, 42, pp. 344-356.

- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G. & Butzler, J. (2004) 'Arcobacter Species in Humans', *Emerging Infectious Diseases*, 10, pp. 1863-1867.
- Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J. P. & Dediste, A. (2006) 'Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, pp. 908-913.
- Ventola, C. L. (2015) 'The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats.', *P & T: A peer-reviewed journal for formulary management*, 40, pp. 277-283.
- Vezeris, N., Martin, C., Brossier, F., Bonnaud, F., Denis, F. & Aubry, A. (2007) 'Treatment failure in a case of extensively drug-resistant tuberculosis associated with selection of a GyrB mutant causing fluoroquinolone resistance', *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 26, pp. 423-425.
- Vicente-Martins, S., Domingues, F. C., Oleastro, M. & Ferreira, S. (2018) 'Arcobacter spp. at retail food from Portugal: Prevalence, genotyping and antibiotics resistance', *Food Control*, 85, pp. 107-112.
- Vicente, A., Barros, R., Florinda, A., Silva, A. & Hanscheid, T. (2008) 'High rates of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* in Portugal - need for surveillance', *Eurosurveillance*. European Centre for Disease Prevention and Control, 13, pp. 17-19.
- Villalobos, E. G., Jaramillo, H. F., Ulate, C. C. & Echandi, M. L. A. (2013) 'Isolation and Identification of Zoonotic Species of Genus *Arcobacter* from Chicken Viscera Obtained from Retail Distributors of the Metropolitan Area of San José, Costa Rica', *Journal of Food Protection*, 76, pp. 879-882.
- Vogwill, T. & Maclean, R. C. (2015) 'The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: A meta-analysis approach', *Evolutionary Applications*, 8, pp. 284-295.
- Wackernagel, M. G. L. W. (1994) 'Bacterial Gene Transfer by Natural genetic transformation in the environment', *Microbiological reviews*, 58, pp. 563-602.
- Waksman, S. A. (1947) 'What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance?', *Mycologia*. Mycological Society of America, 39, pp. 565-569.
- Wang, G., Wilson, T. J. M., Jiang, Q. & Taylor, D. E. (2001) 'Spontaneous mutations that confer antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45, p. 727.
- Wesley, I. V & Miller, W. G. (2010) 'Arcobacter: an Opportunistic Human Food-Borne Pathogen?', in *Emerging Infections 9*. American Society of Microbiology, pp. 185-212.
- WHO (2017) *Antibiotic Resistance*, *World Health Organization*. Available at: <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (Accessed: 10 September 2018).

WHO (2018) *Amino acid properties*, World Health Organization. Available at: <http://p53.iarc.fr/AAProperties.aspx> (Accessed: 16 September 2018).

Wieczorek, K. & Osek, J. (2013) 'Antimicrobial resistance mechanisms among *Campylobacter*', *Biomed Res Int*, 2013, pp. 1-12.

Wiser, M. J. & Lenski, R. E. (2015) 'A comparison of methods to measure fitness in *Escherichia coli*', *PLoS ONE*, 10, p. e0126210.

Anexo I

Alinhamento de parte da sequência correspondente à RDRQ do gene da *gyrA* da estirpe parental *A. butzleri* CR113-2 com as estirpes mutantes provenientes da estirpe *A. butzleri* CR113-2 obtidas no ensaio de flutuação.

```
CR113-2      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRCip6      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRCip12     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRCip17     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRLev5      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRLev9      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRLev18     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRMox7      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRMox12     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
CRMox17     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
*****

CR113-2      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATACCTTCAGTTTATGATGCACT
CRCip6      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
CRCip12     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
CRCip17     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
CRLev5      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
CRLev9      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
CRLev18     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
CRMox7      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
CRMox12     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
CRMox17     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTCAGTTTATGATGCACT
*****

CR113-2      TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRCip6      TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRCip12     TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRCip17     TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRLev5      TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRLev9      TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRLev18     TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRMox7      TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRMox12     TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
CRMox17     TGTAAGAATGGCACAAAATTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTTGATGGACAAGGAAACTTTGG
*****

CR113-2      TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRCip6      TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRCip12     TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRCip17     TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRLev5      TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRLev9      TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRLev18     TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRMox7      TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRMox12     TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
CRMox17     TTCTATCGATGGTGACAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
*****

CR113-2      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRCip6      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRCip12     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRCip17     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRLev5      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRLev9      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRLev18     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRMox7      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRMox12     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
CRMox17     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAACTTT
*****
```


Anexo II

Alinhamento de parte da sequência correspondente à RDRQ do gene da *gyrA* da estirpe parental *A. butzleri* DQ40A1 com as estirpes mutantes provenientes da estirpe *A. butzleri* DQ40A1 obtidas no ensaio de flutuação.

```
DQ40A1      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQCip3      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQLev2      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQMox2      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQCip19     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQCip17     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQMox5      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQLev6      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQCip14     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
DQMox12     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCAAG
*****
```

```
DQ40A1      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATACCTTCAGTTTATGATGCACT
DQCip3      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
DQLev2      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
DQMox2      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
DQCip19     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
DQCip17     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
DQMox5      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
DQLev6      AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
DQCip14     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
DQMox12     AATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCCCTCATGGAGATATTTTCAGTTTATGATGCACT
*****
```

```
DQ40A1      TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQCip3      TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQLev2      TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQMox2      TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQCip19     TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQCip17     TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQMox5      TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQLev6      TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQCip14     TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
DQMox12     TGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCTCCACTTGTGATGGACAAGGAAACTTTGG
*****
```

```
DQ40A1      TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQCip3      TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQLev2      TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQMox2      TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQCip19     TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQCip17     TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQMox5      TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQLev6      TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQCip14     TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
DQMox12     TTCTATCGATGGTGATAATGCAGCGGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACAAGAATTGC
*****
```

```
DQ40A1      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQCip3      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQLev2      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQMox2      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQCip19     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQCip17     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQMox5      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQLev6      TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQCip14     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
DQMox12     TGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
*****
```


Anexo III

Alinhamento de parte da sequência correspondente à RDRQ do gene da *gyrA* da estirpe parental *A. butzleri* AB22/11 com as estirpes mutantes provenientes da estirpe *A. butzleri* AB22/11 obtidas no ensaio de flutuação.

```
AB22Cip13      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22Lev8      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22Lev10     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22/11       AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22Cip9      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22Mox20     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22Cip16     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22Lev6      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22Mox5      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
AB22Mox7      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
*****
```

```
AB22Cip13      AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATATTTCAGTTTATGATG
AB22Lev8      AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATATTTCAGTTTATGATG
AB22Lev10     AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGGTG
AB22/11       AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
AB22Cip9      AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATATTTCAGTTTATGGTG
AB22Mox20     AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATATTTCAGTTTATGATG
AB22Cip16     AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATATTTCAGTTTATGATG
AB22Lev6      AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATATTTCAGTTTATGATG
AB22Mox5      AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATATTTCAGTTTATGATG
AB22Mox7      AGAATTGTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATATTTCAGTTTATGATG
*****
```

```
AB22Cip13      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22Lev8      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22Lev10     CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22/11       CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22Cip9      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22Mox20     CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22Cip16     CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22Lev6      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22Mox5      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
AB22Mox7      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
*****
```

```
AB22Cip13      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22Lev8      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22Lev10     CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22/11       CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22Cip9      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22Mox20     CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22Cip16     CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22Lev6      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22Mox5      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
AB22Mox7      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
*****
```

```
AB22Cip13      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22Lev8      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22Lev10     AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22/11       AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22Cip9      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22Mox20     AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22Cip16     AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22Lev6      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22Mox5      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
AB22Mox7      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
*****
```


Anexo IV

Alinhamento de parte da sequência correspondente à RDRQ do gene da *gyrA* da estirpe parental *A. butzleri* 2003-1426 com as estirpes mutantes provenientes da estirpe *A. butzleri* 2003-1426 obtidas no ensaio de flutuação.

```
2003-1426      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATCACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Lev7      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Cip1      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Cip14     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Lev1      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Mox18     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Cip15     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Lev18     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Mox2      AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
2003Mox14     AATTTTATATGCAATGCACGATTTAAGTATTACTTCAAAAATCTGCCTATAAAAAATCTGCA
*****
```

```
2003-1426      AGAATTGTTGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
2003Lev7      AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATAAATG
2003Cip1      AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
2003Cip14     AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
2003Lev1      AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
2003Mox18     AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
2003Cip15     AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
2003Lev18     AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
2003Mox2      AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
2003Mox14     AGAATTGTTAGGAGATGTTATTGGTAAATATCACCTCATGGAGATACTTCAGTTTATGATG
*****
```

```
2003-1426      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Lev7      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Cip1      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Cip14     CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Lev1      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Mox18     CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Cip15     CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Lev18     CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Mox2      CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
2003Mox14     CACTTGTAAGAATGGCACAAAGTTTCTCTTTAAGAGCACCACCTTGTGTGATGGACAAGGAAA
*****
```

```
2003-1426      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Lev7      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Cip1      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Cip14     CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Lev1      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Mox18     CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Cip15     CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Lev18     CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Mox2      CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
2003Mox14     CTTTGGTTCTATCGATGGTGATAATGCAGCAGCTATGAGATATACAGAAGCTAGAATGACA
*****
```

```
2003-1426      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Lev7      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Cip1      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Cip14     AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Lev1      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Mox18     AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Cip15     AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Lev18     AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Mox2      AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
2003Mox14     AGAATTGCTGAAGAAGTTCTAAGAGATTTAGATAAAGATACAGTAAATTTT
*****
```