



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

A Contribuição de Bombas de Efluxo para a Resistência em *Arcobacter butzleri*

Ana Luísa Cota Mateiro da Silva

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

Orientador: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Coorientador: Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

Covilhã, junho de 2017

Agradecimentos

No término desta longa caminhada, várias são as pessoas às quais tenho de agradecer por me terem dado alicerces fundamentais para conseguir concluir esta etapa.

Começar por agradecer à Universidade da Beira Interior, que me acolheu ao longo dos seis anos de percurso académico, ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde e ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge por terem proporcionado a execução deste trabalho.

À Doutora Susana Ferreira pela excelente orientação, partilha de conhecimentos, tempo dispensado e paciência que teve ao longo destes meses de trabalho conjunto.

Agradecer também a orientação à Doutora Mónica Oleastro, todo o seu tempo dispensado, ajuda e preocupação para que o trabalho se desenvolvesse da melhor forma.

À Professora Doutora Fernanda Domingues por todo o apoio prestado no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doutor Ângelo Luís pela ajuda prestada, não esquecendo o encorajamento e constante preocupação.

Às minhas colegas de laboratório, pela constante animação que proporcionaram nas longas horas de trabalho no laboratório, pela amizade e pela ajuda que nunca me negaram.

A todos os amigos que levo da faculdade, que tornaram esta caminhada mais colorida. Em especial às minhas colegas de casa e padrinhos.

O meu maior agradecimento dirijo-o à minha família, em especial à minha mãe que sempre me encorajou e fez todos os esforços que lhe foram possíveis para me permitir seguir os meus sonhos.

Por fim, ao David por todo o apoio que me deu no desenvolvimento deste trabalho, pela amizade inesgotável, pelo companheirismo e todo o amor que me dedicou ao longo dos anos.

A todos, bem-haja!

Resumo

O género *Arcobacter* é constituído por 26 espécies reconhecidas até ao momento, de entre as quais *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são consideradas agentes patogénicos emergentes associados a enterites e bacteremias em humanos. *A. butzleri* é a espécie mais frequentemente encontrada em amostras humanas, ambientais e alimentares, pertencendo à lista de microrganismos considerados como perigosos para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos. Em paralelo, as elevadas taxas de resistência em *A. butzleri* têm vindo a aumentar, o que pode colocar em causa o tratamento de infeções graves ou mesmo levar a disseminação de resistência. Assim, considerando que a investigação em torno dos mecanismos de resistência desta bactéria é escassa, mas relevante, o objetivo deste trabalho passou pela avaliação do papel de bombas de efluxo na resistência a antimicrobianos por *A. butzleri* e estudo da relevância de um sistema de efluxo putativo da superfamília *Resistance-Nodulation-cell-Division* (RND).

De forma a avaliar o papel do efluxo na resistência em *A. butzleri*, neste trabalho começou por se determinar o efeito de inibidores de bombas de efluxo (EPI) na resistência a antimicrobianos, através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de antibióticos, sais biliares e um desinfetante na ausência e presença de EPIs em cinco estirpes de *A. butzleri*. Seguidamente, através de análise *in silico* caracterizou-se a bomba de efluxo putativa do tipo CmeABC pertencente à superfamília RND. Por forma a compreender qual o seu papel na resistência de *A. butzleri* construiu-se um mutante por inativação do gene tipo *cmeB* da bomba de efluxo tipo CmeABC. Para a construção do mutante utilizou-se o método de transformação natural por mutagénesis insercional, através de aplicação de DNA transformante contendo uma cassette de resistência à canamicina flanqueada por regiões integrantes do gene tipo *cmeB* da estirpe parental. Após a confirmação da mutação, comparou-se a influência da inativação do gene nas CMI a antimicrobianos das estirpes parentais e respetivas mutantes, bem como as alterações sofridas a nível de acumulação de brometo de etídio (EtBr).

Com base nos resultados deste trabalho, pôde verificar-se que algumas das estirpes estudadas apresentaram um perfil de multirresistência, sendo que todas elas apresentavam resistência à cefotaxima. Por outro lado, nenhuma estirpe demonstrou resistência à gentamicina. A utilização de EPIs demonstra ter efeito, baixando os valores da CMI a alguns compostos. O PA β N, que é um inibidor de sistemas de efluxo do tipo RND, mostrou ser o inibidor globalmente mais eficaz. Estes resultados, sugerem que as bombas de efluxo RND terão um papel relevante na resistência de *A. butzleri* a antimicrobianos como a eritromicina, o Irgasan e em alguns casos a sais biliares. A análise *in silico* realçou a existência de uma bomba de efluxo putativa do tipo CmeABC em *A. butzleri* que apresenta uma identidade elevada com outros sistemas RND. Através da comparação entre a CMI das estirpes parentais e respetivas mutantes, verificou-se que efetivamente a bomba de efluxo tipo CmeABC tem um papel na resistência de *A. butzleri*

à ciprofloxacina, β -lactâmicos e eritromicina. Por sua vez, os ensaios de acumulação de EtBr confirmaram uma correlação entre a inativação do gene *cmeB* e o aumento da acumulação de EtBr, verificando-se que o gene *cmeB*, e por consequência a bomba de efluxo do tipo CmeABC, tem um papel no efluxo de compostos.

Em suma, este trabalho demonstra o papel global das bombas de efluxo na resistência a antibióticos, sais biliares e desinfetante e a existência de uma bomba de efluxo tipo CmeABC funcional com papel na resistência de *A. butzleri* a alguns antimicrobianos.

Palavras-chave

Arcobacter butzleri, resistência, antibióticos, sais biliares, desinfetante, bombas de efluxo, inibidores de bombas de efluxo

Abstract

The genus *Arcobacter* consists of 26 species recognized so far, among them *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii* are considered as emergent pathogens associated with human enteritis and bacteremia. *A. butzleri* is the most frequently found on human, environmental and food samples, and it pertains to the list of microorganisms considered to be a serious hazard to human health by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Simultaneously, the high resistance rates in *A. butzleri* have been increasing, which may jeopardize the treatment of serious infections or even lead to the spread of resistance. Regarding this, and considering that the research on the resistance mechanisms of this bacterium is scarce but relevant, the focus of this investigation was to evaluate the efflux pumps role on the resistance mechanisms of *A. butzleri* against antimicrobials, and study the relevance of a putative efflux system of the RND superfamily.

To evaluate the efflux pump role on the resistance mechanism of *A. butzleri*, it was first assessed the effect of the efflux pump inhibitors on antimicrobial resistance, through determination of the minimum inhibitory concentration of antibiotics, bile salts and a disinfectant in the presence and absence of EPIs in five strains of *A. butzleri*. Subsequently, *in silico* analysis was used to characterize the putative efflux pump CmeABC, belonging to the superfamily RND. Aiming to understand its role on the resistance mechanism of *A. butzleri*, a mutant strain was created containing an inactivated *cmeB* gene from the efflux pump CmeABC. The mutant was constructed by natural transformation through insertional mutagenesis, inserting transforming DNA containing a kanamycin resistance cassette flanked by upstream and downstream regions of *cmeB* gene from the native strain. After confirmation of the mutation, the minimum inhibitory concentration of antimicrobials of the native and respective mutant strains were compared, as well as changes on the accumulation of EtBr.

Considering the obtained results, it was observed a multidrug resistance profile of some strains, with all strains being resistant to cefotaxime. On the other hand, none of the strains were resistant to gentamicin. The use of EPIs is effective, lowering the minimum inhibitory concentration values to some compounds. The PABN, which is an inhibitor of RND efflux systems, demonstrated to be the most effective inhibitor. These results suggest that the RND efflux pumps could play an important role on the resistance of *A. butzleri* against antimicrobials such as erythromycin, Irgasan, and in some cases bile salts. The *in silico* analysis shows the existence of a putative efflux pump CmeABC in *A. butzleri*, which presents a high identity with other RND systems. By comparing the minimum inhibitory concentration of the parent strains to their respective mutant strains, it was possible to confirm that the efflux pump CmeABC has a role on the *A. butzleri* resistance against ciprofloxacin, β -lactams and erythromycin. Indeed, EtBr accumulation assays confirmed a correlation between the inactivation of the *cmeB* gene

and increase in EtBr accumulation, showing that the *cmeB* gene, and consequently the efflux pump CmeABC, has a role on the efflux of compounds.

In sum, this work demonstrates that the efflux pumps play a global role on the resistance against antibiotics, bile salts and disinfectant, and demonstrates the existence of an efflux pump CmeABC with a functional role on the resistance mechanisms of *A. butzleri* against some antimicrobials.

Keywords

Arcobacter butzleri, resistance, antibiotics, bile salts, disinfectant, efflux pumps, inhibitors of efflux pumps

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1. O género <i>Arcobacter</i>	1
1.2. Características gerais do género <i>Arcobacter</i>	3
1.3. Patogenicidade de <i>Arcobacter</i>	3
1.4. Vias de transmissão	5
1.4.1. Consumo de alimentos contaminados.....	5
1.4.2. Consumo de águas contaminadas	6
1.4.3. Transmissão por contacto com animais domésticos	7
1.4.4. Transmissão pessoa-pessoa	7
1.5. Distribuição de <i>Arcobacter</i> spp.	7
1.5.1. <i>Arcobacter</i> spp. em alimentos	8
1.5.2. <i>Arcobacter</i> spp. no meio ambiente	9
1.5.3. <i>Arcobacter</i> spp. em humanos	9
1.6. Resistência de <i>Arcobacter butzleri</i> a antibióticos.....	9
1.7. Mecanismos de resistência a antibióticos	12
1.7.1. Resistência devido à modificação do alvo.....	13
1.7.2. Resistência devido à inativação do fármaco.....	14
1.7.3. Resistência devido à alteração da permeabilidade.....	15
1.7.4. Resistência devido ao efluxo do fármaco	15
1.8. Bombas de efluxo.....	16
Capítulo 2 - Objetivos	21
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	23
3.1. Estirpes bacterianas de <i>A. butzleri</i>	23
3.2. Armazenamento e preparação das estirpes.....	23
3.3. Agentes antimicrobianos	23
3.4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de antimicrobianos em <i>A. butzleri</i>	24
3.5. Avaliação do efeito de inibidores de bombas de efluxo na ação de antimicrobianos em <i>A. butzleri</i>	25
3.6. Construção de mutantes de efluxo de <i>A. butzleri</i>	26
3.6.1. Extração de DNA genómico	26
3.6.2. Obtenção do fragmento de DNA transformante.....	26
3.6.2.1. Extração do plasmídeo pUC18-K2 de <i>Escherichia coli</i>	26
3.6.2.2. Digestão do plasmídeo pUC18-K2.....	27
3.6.2.3. Purificação da cassete <i>aphA-3</i>	27
3.6.2.4. Construção dos fragmentos hibridizantes com a cassete <i>aphA-3</i>	28
3.6.2.5. Ligação dos fragmentos hibridizantes com a cassete <i>aphA-3</i>	29
3.7. Transformação natural de <i>A. butzleri</i>	30
3.8. Verificação da mutagénese	31
3.8.1. Confirmação da inserção do fragmento	31
3.8.2. Confirmação da expressão do gene	32
3.8.2.1. Isolamento de RNA total	32
3.8.2.2. Síntese de cDNA	32
3.8.2.3. Determinação da expressão genética de <i>cmeABC</i>	32
3.9. Determinação das curvas de crescimento das estirpes naturalmente mutáveis e respetivos mutantes	33
3.10. Ensaio de acumulação de Brometo de Etídio.....	33
3.11. Análise bioinformática do gene tipo <i>cmeB</i> e previsão da estrutura da proteína tipo <i>CmeABC</i> de <i>A. butzleri</i>	34

Capítulo 4 - Resultados e Discussão	35
4.1. Suscetibilidade de <i>A. butzleri</i> aos antimicrobianos	35
4.2. Análise in silico do transportador de membrana RND tipo CmeABC.....	45
4.3. O papel da bomba de efluxo tipo CmeABC	47
4.3.1. Construção de mutantes	47
4.3.2. Confirmação da expressão do gene	50
4.3.3. Efeito da inativação do gene <i>cmeB</i> no crescimento de <i>A. butzleri</i>	51
4.3.4. Comparação da concentração mínima inibitória entre as estirpes parentais e mutantes	52
4.3.5. Ensaio de acumulação de brometo de etídio	54
Capítulo 5 - Conclusões	59
Capítulo 6 - Perspetivas futuras	61
Bibliografia	63
Anexo I	77
Anexo II	79
Anexo III	83

Lista de Figuras

- Figura 1** - Representação dos mecanismos de resistência a antibióticos (adaptado de (Allen et al., 2010)). 13
- Figura 2** - Ilustração esquemática dos principais tipos de bombas de efluxo bacterianas. NorA de *Staphylococcus aureus*, um membro da superfamília MFS; EmrE de *Escherichia coli*, um membro da superfamília SMR; NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, um membro da família MATE; AcrAB-TolC de *Escherichia coli*, um membro da superfamília RND; LmrA de *Lactococcus lactis*, um membro da superfamília ABC (Kumar and Schweizer, 2005). 17
- Figura 3** - Representação da digestão da cassette *aphA-3* com os locais de corte pelas enzimas KpnI e BamHI 27
- Figura 4** - Representação da amplificação das extremidades de DNA homólogo de aproximadamente 400 pb a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop com um adaptador de aproximadamente 20 pb na extremidade 3' (verde), resultando nos fragmentos A e B respectivamente. 28
- Figura 5** - Representação da união da cassette de canamicina com regiões a jusante do codão de iniciação (A) e a montante do codão stop (B) do gene tipo *cmeB*. 29
- Figura 6** - Representação da inserção do fragmento de PCR contendo uma cassette de canamicina flanqueada por regiões a jusante do codão de iniciação (A) e a montante do codão stop (B) do gene tipo *cmeB* de *Arcobacter butzleri*. 31
- Figura 7** - Previsão da estrutura das proteínas codificadas pelo operão tipo *cmeABC* de *Arcobacter butzleri*. A: proteína CmeA; B: proteína CmeB; C: proteína CmeC. A previsão foi obtida através da análise pelo software Protean (DNASTAR, Inc) usando sequências consenso. 47
- Figura 8** - Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos da digestão do plasmídeo pUC18K2 com as enzimas de restrição BamHI e KpnI. M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1-4: produto da digestão do plasmídeo pUC18-K2. A seta representa a localização da cassette de resistência à canamicina, *aphA-3*. 48
- Figura 9** - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes aos fragmentos de hibridização com a cassette e respectiva cassette. M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1 e 2: produtos de PCR correspondentes aos fragmentos hibridizantes com a cassette relativos ao PCR A e B, respectivamente; 3: cassette *aphA-3*. 49

Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose representativa do fragmento obtido por junção dos fragmentos de hibridização e a cassete <i>aphA-3</i> . M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1: fragmento obtido por junção dos fragmentos de hibridização dos PCR A e B e a cassete <i>aphA-3</i> ; Poço 2: controlo negativo do PCR.....	49
Figura 11 - Representação da eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do fragmento de DNA transformante, do gDNA das estirpes naturalmente mutáveis e respetivas mutantes (A - DQ40A1, B - CR113-2), usando o par de oligonucleótidos iniciadores <i>cmeB_A1</i> e <i>cmeB_B2</i> . M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 2: fragmento de DNA transformante usado; 3: fragmento amplificado a partir do gDNA da estirpe parental; 3-6: fragmento amplificado a partir do gDNA da estirpe mutante; 7: controlo negativo).	50
Figura 12 - Eletroforese dos produtos de RT-PCR para verificação da expressão do gene tipo <i>cmeB</i> . M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 2: amplificação do cDNA da estirpe CR113-2; 3: amplificação do cDNA da estirpe CR113-2Δ <i>cmeB</i> ; 4: amplificação do cDNA da estirpe DQ40A1; 5: amplificação do cDNA da estirpe DQ40A1Δ <i>cmeB</i> ; 6: controlo negativo).	51
Figura 13 - Perfil de crescimento das estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> CR113-2, CR113-2Δ <i>cmeB</i> , DQ40A1 e DQ40A1Δ <i>cmeB</i>	52
Figura 14 - Otimização da concentração de brometo de etídio a utilizar nos ensaios de acumulação de EtBr	56
Figura 15 - Acumulação de brometo de etídio pelas estirpes parentais e respetivas mutantes (A - estirpe CR113-2 e respetiva mutante; B - estirpe DQ40A1 e respetiva mutante). Os dados apresentados representam a média de três ensaios com uma concentração de brometo de etídio de 1 µg/mL.....	57
Figura 16 - Efeito do CCCP na acumulação de brometo de etídio pelas estirpes naturalmente transformáveis e respetivas mutantes. Os dados apresentados representam a média de três ensaios com uma concentração de EtBr de 1 µg/mL e 20 µg/mL de CCCP (A - estirpe CR113-2 e respetiva mutante; B - estirpe DQ40A1 e respetiva mutante).....	58

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Identificação e origem das cinco estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> utilizadas.	23
Tabela 2 - Compostos usados na avaliação da resistência de <i>Arcobacter butzleri</i>	24
Tabela 3 - Sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados para as reações de PCR descritas no ponto 3.6.2.4..	29
Tabela 4 - Sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados para as reações de RT-PCR descritos no ponto 3.8.2.3..	33
Tabela 5 - Concentração mínima inibitória dos antibióticos testados contra as estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> em estudo.	36
Tabela 6 - Concentração mínima inibitória dos inibidores de bombas de efluxo testados contra as estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> em estudo.	38
Tabela 7 - Concentração mínima inibitória dos antibióticos testados na presença de inibidores de bombas de efluxo contra as estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> estudadas.	39
Tabela 8 - Concentração mínima inibitória dos sais biliares na ausência e presença de inibidores de bombas de efluxo para as diversas estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> estudadas.	43
Tabela 9 - Concentração mínima inibitória do Irgasan na ausência e presença de inibidores de bombas de efluxo para as diversas estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> estudadas	44
Tabela 10 - Concentração mínima inibitória dos antibióticos para as estirpes parentais e respectivas mutantes de <i>Arcobacter butzleri</i>	53
Tabela 11 - Concentração mínima inibitória dos sais biliares para as estirpes naturalmente transformáveis e respectivas mutantes de <i>Arcobacter butzleri</i>	54
Tabela 12 - Concentração mínima inibitória do Irgasan para as estirpes naturalmente transformáveis e respectivas mutantes de <i>Arcobacter butzleri</i>	54
Tabela 13 - Concentração mínima inibitória do brometo de etídio para as estirpes de <i>Arcobacter butzleri</i> em estudo.	55

Lista de Acrónimos

ABC	<i>“Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette”</i>
AMP	Ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato (do inglês <i>“adenosine triphosphate”</i>)
BA	<i>“Blood Agar”</i>
CASFM	<i>“Comité de l’antibiogramme de la Société Française de Microbiologie”</i>
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
cDNA	DNA complementar
CHL	Cloranfenicol (do inglês <i>“chloramphenicol”</i>)
CIP	Ciprofloxacina
CMI	Concentração mínima inibitória
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotidos fosfatados
EPI	Inibidor de bombas de efluxo (do inglês <i>“efflux pump inhibitors”</i>)
ERY	Eritromicina (do inglês <i>“erythromycin”</i>)
EtBr	Brometo de etídio (do inglês <i>“ethidium bromide”</i>)
EUCAST	<i>“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”</i>
gDNA	DNA genómico
GEN	Gentamicina
GTP	Trifosfato de guanosina (do inglês <i>“Guanosine triphosphate”</i>)
ICMSF	<i>“International Commission on Microbiological Specifications for Foods”</i>
KAN	Canamicina (do inglês <i>“kanamycin”</i>)
LB	<i>Luria-Bertani</i>
MATE	<i>“Multidrug and Toxic Compound Extrusion”</i>
MFS	<i>“Major Facilitator superfamily”</i>
NARMS	<i>“National Antimicrobial Resistance Monitoring System”</i>
NCBI	<i>“National Center for Biotechnology Information”</i>
NMP	1-(1-naftilmetil)-piperazina
PA β N	Fenil-arginina- β -naftilamida (do inglês <i>“Phenylalanine-arginine β-naphthylamide”</i>)
PBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>“Phosphate buffered saline”</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>“Polimerase Chain reaction”</i>)
QRDR	Região determinante de resistência a quinolonas (do inglês <i>“Quinolone resistance determining region”</i>)

RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>“Resistance-nodulation-cell-division”</i>
rRNA	RNA ribossômico
RT-PCR	Transcriptase reversa-Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>“Reverse transcription - polymerase chain reaction”</i>)
SB	Sais biliares
CS	Colato de sódio
DS	Desoxicolato de sódio
SMR	<i>“Small Multidrug Resistance”</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TB	<i>“Terrific Broth”</i>
TET	Tetraciclina
TSA	<i>“Tryptic Soy Agar”</i>
TSB	<i>“Tryptic Soy Broth”</i>
UFC	Unidades formadoras de colônias
UV	Ultravioleta

Capítulo 1 - Introdução

1.1. O género *Arcobacter*

Até ao momento o género *Arcobacter* compreende 26 espécies reconhecidas, isoladas de diversas origens tais como o meio ambiente, animais e seres humanos (Houf et al., 2009; Park et al., 2016; Diéguez et al., 2017; Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017; Figueras et al., 2017). Estima-se que este número aumente, uma vez que a análise de sequências em bancos de dados públicos sugere a existência de potenciais novas espécies de *Arcobacter*, ainda que algumas das sequências sejam de microrganismos não cultiváveis (Miller et al., 2007).

Em 1997, Ellis e seus colaboradores descreveram pela primeira vez a presença de um microrganismo espiralado em fetos de bovinos e suínos, sendo que estes isolados foram classificados como *Campylobacter* aerotolerante (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017). Em 1983 foi isolada a partir de raízes de *Spartina alterniflora Loisel* uma nova espécie de *Campylobacter* - *Campylobacter nitrofigilis* - tendo como particular característica a capacidade de fixar azoto (McClung, Patriquin and David, 1983). Dois anos depois, é reconhecido *Campylobacter cryaerophila*, uma espécie aerotolerante associada a aborto em animais (Neill et al., 1985).

Kiehlbauch *et al.* (1991) verificaram que alguns dos isolados associados a *Campylobacter cryaerophila* não se enquadravam no seu perfil, tendo estes isolados sido previamente recolhidos a partir de animais de diversos continentes, e principalmente de humanos com doenças diarreicas. Surge então a necessidade de criar uma nova espécie que as abrangesse - *Campylobacter butzleri* (Kiehlbauch et al., 1991). Vandamme e os seus colaboradores (1991) após uma análise de um grupo de estirpes de *Campylobacter* spp. e organismos relacionados propõem a constituição do género *Arcobacter* para acomodar duas espécies aerotolerantes até então pertencentes ao género *Campylobacter*: *Campylobacter nitrofigilis* e *Campylobacter cryaerophila* (Vandamme et al., 1991). O género *Arcobacter* passa a integrar as renomeadas *Arcobacter nitrofigilis* e *Arcobacter cryaerophilus*. Em 1992, a espécie *Campylobacter butzleri* é também integrada no género *Arcobacter* (Vandamme, Vancanneyt, et al., 1992). No mesmo ano é ainda introduzida uma nova espécie, *Arcobacter skirrowii* (Vandamme, Vancanneyt, et al., 1992), isolada predominantemente de fluidos prepuciais de touros, de fetos abortados de bovinos, suínos e ovinos e ainda de fezes diarreicas (Vandamme, Vancanneyt, et al., 1992; Collado and Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016).

Desde o início do século XXI, 22 novas espécies foram incluídas no género *Arcobacter*. Houf *et al.* (2005) isolaram *Arcobacter cibarius* a partir de carcaças de frango. Ainda no mesmo ano Donachie *et al.* (2005) recuperaram a partir de uma lagoa hipersalina *Arcobacter halophilus*, caracterizando-se esta como uma bactéria halófila obrigatória (Donachie et al., 2005).

Arcobacter mytili foi isolado de mexilhões e água salobra, tendo como particular característica não hidrolisar acetato de indoxilo (Collado et al., 2009). Também *Arcobacter thereius* foi isolada a partir de abortos de porcos e cloaca de patos (Houf et al., 2009) e *Arcobacter marinus* de água do mar, estrelas do mar, e algas marinhas (Kim, Hwang and Cho, 2010). Em 2011 foram reconhecidas quatro novas espécies, entre elas *Arcobacter trophiarum* isolado a partir de amostras fecais de porcos de engorda (De Smet et al., 2011), *Arcobacter defluvii* isolado de amostras de esgotos (Collado et al., 2011), *Arcobacter molluscorum* recuperado de mexilhões e ostras (Figueras, Collado, et al., 2011), sendo esta a segunda espécie do género que não hidrolisa acetato de indoxilo (Collado and Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016), e ainda *Arcobacter ellisii* também isolada a partir de mexilhões (Figueras, Levican, et al., 2011).

Em 2012 foram isolados a partir de moluscos *Arcobacter bivalviorum* (Levican et al., 2012) e *Arcobacter venerupis* (Levican et al., 2012). Já em 2013, foram isolados *Arcobacter cloacae* a em mexilhões (Levican, Collado and Figueras, 2013), *Arcobacter suis* de carne de porco (Levican, Collado and Figueras, 2013) e *Arcobacter anaerophilus* de sedimentos estuarinos, sendo esta última espécie um organismo anaeróbico obrigatório e que não possui flagelos (Sasi Jyothsna et al., 2013). Com o reconhecimento da espécie *Arcobacter anaerophilus* foi sugerida a introdução de modificações à descrição do género *Arcobacter*, de modo a que permita a inclusão de novas espécies anaeróbicas obrigatórias e que não apresentem motilidade ou apresentem diferentes características fenotípicas (Sasi Jyothsna et al., 2013).

Nos últimos anos observou-se um crescente aumento das publicações e pesquisas acerca do género *Arcobacter* (Hsu and Lee, 2015), tornando-se notório o incremento do interesse da comunidade científica por este microrganismo.

Em 2015 foram reconhecidas quatro novas espécies: *Arcobacter ebronensis* e *Arcobacter aquinarinus* isolados a partir de mexilhões e água do mar respetivamente (Levican et al., 2015); *Arcobacter lanthieri* a partir de suínos e estrume de gado leiteiro (Whiteduck-Léveillé et al., 2015), e *Arcobacter pacificus* também de água do mar (Zhang et al., 2016). Em 2016 foram reconhecidos *Arcobacter faecis* isolado a partir de amostras de uma fossa séptica de resíduos humanos (Whiteduck-Léveillé et al., 2016) e *Arcobacter acticola*, isolado de água do mar (Park et al., 2016).

No presente ano, foi já reconhecido *Arcobacter lekithochrous*, isolado a partir de larvas de vieiras (*Pecten maximus*) e água do mar em incubadoras na Noruega. Esta espécie distingue-se das restantes pela sua necessidade de sais marinhos para se desenvolver (Diéguez et al., 2017). Isolados bacterianos de fígado e rim de um feto de leitão abortado, previamente identificados como *A. thereius*, apresentaram diferenças significativas no gene *rRNA 16S*, dando por último, origem à nova espécie *Arcobacter porcinus* (Figueras et al., 2017).

1.2. Características gerais do género *Arcobacter*

O género *Arcobacter* é um dos três géneros integrantes da família *Campylobacteriaceae*, à qual se juntam os géneros *Campylobacter* e *Sulfurospirillum*, incluídos na classe das *Epsilonproteobacteria* (Miller et al., 2007; Madigan et al., 2014).

As bactérias do género *Arcobacter* caracterizam-se por serem bacilos gram-negativos não esporulados, com 0,2-0,9 µm de largura por 0,5-3,6 µm de comprimento, apresentando motilidade através de um único flagelo polar (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017). Têm como características gerais diferenciadoras do género *Campylobacter*, a capacidade de crescimento num intervalo de temperaturas entre 15-30°C e sobre condições de aerobiose. A espécie *A. anaerophilus* apresenta-se como uma exceção, sendo que para além de não apresentar flagelo é ainda um anaeróbio obrigatório (Ferreira et al., 2016). No que se refere ao pH, sabe-se que o género *Arcobacter* consegue sobreviver num intervalo de pH de 5,5 a 8,0, sendo que, de uma forma geral o seu crescimento ótimo ocorre entre os 6,0 e os 7,5, variando ligeiramente de acordo com as espécies em causa (Cervenka, 2007). Todas as espécies até ao momento reconhecidas à exceção de *A. pacificus* são positivas para o teste da oxidase (Zhang et al., 2016), mas a enzima catalase está ausente em algumas delas (Ferreira et al., 2016). Têm ainda como particular característica o facto de possuírem baixa percentagem molar de G + C no DNA variando de 24,6 a 35% (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017).

Tratando-se de uma bactéria gram-negativa possui um envelope celular de constituição complexa. Este é composto por uma membrana externa, uma camada de peptidoglicano e uma membrana interna. Contrariamente ao que acontece nas bactérias gram-positivas, a camada de peptidoglicano é pouco abundante (Willey, Sherwood and Woolverton, 2008; Silhavy, Kahne and Walker, 2010; Madigan et al., 2014). Na membrana externa podem encontrar-se diversos tipos de *aparatus* e proteínas tais como o flagelo, adesinas, porinas e bombas de efluxo que bombeiam moléculas tóxicas para o exterior da célula bacteriana. As bombas de fluxo têm um papel relevante na resistência de diversas bactérias patogénicas a antibióticos e outros agentes antimicrobianos (Willey, Sherwood and Woolverton, 2008; Silhavy, Kahne and Walker, 2010).

1.3. Patogenicidade de *Arcobacter*

Das espécies reconhecidas até ao momento, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são as que mais se destacam no que diz respeito à sua associação a doenças humanas (Ferreira, Queiroz, et al., 2014). *A. butzleri* é a espécie encontrada com maior frequência em casos clínicos, estando associada a enterites com uma sintomatologia de diarreia persistente, a cólicas abdominais e a bacteriemias (Vandamme, Pugina, et al., 1992; Vandenberg et al., 2004).

A. cryaerophilus tem sido identificada, embora nem sempre seja isolada de indivíduos com sintomas clínicos associados (Houf and Stephan, 2007).

Uma real avaliação do papel de *Arcobacter* spp. é dificultada em parte pelas semelhanças deste microrganismo com *Campylobacter* spp., sendo por vezes confundidos derivado às características que partilham (Houf and Stephan, 2007; Figueras et al., 2014). Dado isto, pouco se sabe sobre a patogenicidade de *Arcobacter* spp., nomeadamente de mecanismos associados ao processo de infeção. No entanto, diversos ensaios *in vitro* de adesão e invasão em culturas de células humanas e animais têm demonstrado que várias espécies de *Arcobacter* podem aderir e invadir células eucariotas e também produzir toxinas que danificam as células hospedeiras. Por sua vez os ensaios realizados *in vivo* para determinar o potencial patogénico de *Arcobacter* spp. são escassos (Ferreira et al., 2016).

A adesão é considerado um fator de virulência essencial para que haja uma colonização bem-sucedida, estabelecimento, seguido de multiplicação intracelular e disseminação para outros tecidos, levando a uma consequente indução da doença pela maioria dos patógenos microbianos (Houf and Stephan, 2007; Ferreira et al., 2016). Em 2006, num estudo de Houf *et al.* sobre a adesão celular de algumas espécies de *Arcobacter*, verificou-se que quatro a sete estirpes apresentaram adesão a pelo menos uma das linhas celulares usadas como modelo. Este facto era até então uma incógnita (Houf and Stephan, 2007). Numa revisão feita em 2011 por Collado e coautores, em que foram tomados em consideração os estudos de adesão, invasão e citotoxicidade realizados até à data em diversas linhas celulares humanas e animais, foram observadas percentagens de 56% (55/59), 20% (9/44) e 85% (164/194) de adesão, invasão e citotoxicidade, respetivamente. Verificou-se assim que os fatores de virulência mais prevalentes eram a adesão e citotoxicidade celular (Collado and Figueras, 2011).

Com a publicação do genoma de *A. butzleri* RM 4018 foi verificada a presença de vários genes de virulência putativos. Nove genes putativos (*cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *hecA*, *hecB*, *irgA*) têm recebido especial atenção, devido à sua homologia com genes associados à patogenicidade noutros microrganismos (Doudah et al., 2012; Ferreira et al., 2016). Em *Campylobacter* spp., o gene *ciaB* codifica uma proteína de invasão, que é injetada diretamente no citoplasma das células hospedeiras através de um sistema de secreção. Em *C. jejuni*, o gene *cj1349* codifica proteínas que permitem a adesão às células hospedeiras por ligação específica à fibronectina, e o gene *cadF* codifica uma proteína que induz a internalização de células bacterianas pela ativação de GTPases. Além disso, existem homólogos do gene *irgA* o qual codifica uma proteína de membrana externa com regulação de ferro em *Vibrio cholerae* e o gene *hecA*, que codifica uma hemaglutinina filamentosa uropatogénica em *Escherichia coli*. É de notar ainda que apesar de alguns genes serem homólogos aos fatores de virulência de *C. jejuni*, nem todos os genes presentes em *C. jejuni* se encontram igualmente em *A. butzleri* (Miller et al., 2007).

Doudidah *et al.* (2012) desenvolveram um ensaio de PCR para detetar os nove genes de virulência putativos acima referidos e avaliaram a sua presença em 319 estirpes humanas e animais de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*. Os nove genes foram encontrados em 26 dos 182 isolados de *A. butzleri*, em contraste nem as estirpes de *A. cryaerophilus* nem *A. skirrowii* transportaram todos os nove genes, sugerindo um comportamento patogénico diferente ou uma associação com maior heterogeneidade do genoma (Doudidah *et al.*, 2012).

Num outro estudo, a presença dos genes associados a virulência, *ciaB*, *cadF*, *cj1349*, *hecA* e *irgA*, foi relacionada com a capacidade de adesão e invasão de 16 das 17 espécies identificadas até então, a células intestinais humanas Caco-2. Todas as espécies de *Arcobacter* exceto *A. bivalviorum* e uma estirpe de *Arcobacter sp.* aderiram, sendo a maioria das espécies invasivas, e destacando-se *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. butzleri* e *A. defluvii* como as mais invasivas. Todas as estirpes com capacidade de invasão celular foram positivas para a presença do gene do fator de virulência putativo *ciaB*. As espécies que demonstraram maior capacidade invasiva foram as que apresentaram a presença de mais genes de virulência, nomeadamente a espécie *A. butzleri* contendo os fatores *cadF*, *cj1349*, *irgA* e *hecA*. Estes resultados indicam que muitas espécies de *Arcobacter* são potenciais patogénicos de seres humanos e animais, em particular *A. butzleri* (Levican *et al.*, 2013).

É possível constatar que existem muitas diferenças entre estudos relativamente à patogenicidade de *Arcobacter* spp. Este facto pode ser devido à diversidade de origem das estirpes, ou à utilização de diferentes linhagens celulares, pelo que este tema deve ser mais aprofundado (Collado and Figueras, 2011). Contudo, é consensual que *A. butzleri* é a espécie que mais se salienta devido aos genes de virulência que possui, e à sua elevada prevalência e associação à doença em humanos e animais.

1.4. Vias de transmissão

As vias de transmissão de *Arcobacter* a humanos não estão totalmente clarificadas, mas o consumo de alimentos e águas contaminadas tem sido apontado como uma das principais vias (González *et al.*, 2012). O contacto com animais domésticos e a transmissão pessoa-a-pessoa são outras das vias de transmissão sugeridas (González *et al.*, 2012).

1.4.1. Consumo de alimentos contaminados

Quanto à transmissão de *Arcobacter* spp. ao ser humano através de alimentos, são os de origem animal os que originam um maior número de investigações. Têm sido relatadas altas prevalências deste microrganismo no trato intestinal e nas fezes de animais, como por exemplo de quintas, bem como em carne vendida a retalho (Collado and Figueras, 2011). Estas últimas parecem ter origem na contaminação cruzada através do contacto das carcaças com as fezes

dos animais durante o processo de abate (Van Driessche and Houf, 2007). Os mariscos são outra potencial fonte de contaminação, o que pode ter algum impacto na saúde pública considerando que o marisco é muitas vezes consumido mal cozido (Maugeri et al., 2000). Um papel semelhante terão os vegetais. Hausdorf *et al.* (2013) isolaram *A. butzleri* e outras espécies de *Arcobacter* a partir de espinafres, nomeadamente nas diversas etapas do seu processamento (Hausdorf et al., 2013). Noutros estudos, a presença de *Arcobacter* spp. foi detetada em alfaces (González and Ferrús, 2011), acelgas e couve (González, Morejón and Ferrús, 2017). A presença de *Arcobacter* spp. em produtos prontos a comer sugere este tipo de alimento como outra das fontes de transmissão para humanos. Os alimentos prontos a comer são geralmente considerados como seguros, contudo, os dados de prevalência de *Arcobacter* spp. neste tipo de produto indicam que esta não é uma regra geral (Teague et al., 2010; Mottola et al., 2016). A presença de *A. butzleri* nestes alimentos foi já detetada em diversos casos e nos mais variados alimentos, tais como queijo (Giacometti et al., 2013), vegetais pré cortados prontos a consumir (espinafres, rúcula e valeriana) (Mottola et al., 2016) e em refeições de restaurantes (Teague et al., 2010). Num estudo realizado em restaurantes da Tailândia o risco de exposição a *A. butzleri*, foi estimado em 13% por refeição consumida, aumentando para 75% quando 10 refeições são consumidas (Teague et al., 2010). Apesar da vasta distribuição destas bactérias em alimentos, somente um estudo estabeleceu uma relação entre este agente patogénico e um surto de origem alimentar, sugerindo *A. butzleri* como o agente causador de um surto associado ao consumo de frango assado num casamento (Lappi et al., 2013).

1.4.2. Consumo de águas contaminadas

Tal como descrito anteriormente, a água é uma das possíveis fontes de contaminação por *Arcobacter* spp., tanto para animais como para humanos. São diversos os ambientes aquíferos onde esta bactéria já foi encontrada, tais como reservatórios de água para consumo (Jacob, Lior and Feuerpfeil, 1993; Assanta et al., 2002), rios (Collado et al., 2010), lagos (Maugeri et al., 2000), lençóis freáticos (Rice et al., 1999), água do mar e plâncton (Fera et al., 2004). A contaminação destas águas através de fezes é uma das hipóteses apontadas como explicação para a presença da bactéria. Esta hipótese é apoiada por estudos que revelam que águas contaminadas por fezes apresentam maior contaminação por *Arcobacter* spp. (Collado et al., 2008). Em contraste, num estudo sobre as águas de uma estação de tratamento na bacia do rio Llobregat, em Espanha, levado a cabo por Collado e co-autores, concluiu-se que os processos de tratamento executados em estações de tratamento de águas residuais podem ser eficazes na eliminação de *Arcobacter* spp. em águas para consumo (Collado et al., 2010). No entanto, já foram determinados alguns surtos associados à contaminação de água potável. O primeiro caso, decorreu num acampamento de escuteiros em que 81% das pessoas presentes foram afetadas, apresentando sintomas como náuseas, vômitos, cólicas abdominais e diarreia aparentemente provocado por *A. butzleri* presente na água potável (Rice et al., 1999). Também um surto de gastroenterites associado a contaminação do sistema de água potável decorreu na

Eslovénia, onde *A. cryaerophilus* foi um dos microrganismos isolados a partir de fezes de entre os casos reportados (Kopilović et al., 2008).

1.4.3. Transmissão por contacto com animais domésticos

Os animais domésticos tais como cães e gatos têm sido descritos como possíveis portadores de *Arcobacter* spp., o que, pela sua proximidade diária com o ser humano, torna o contacto com estes animais outra potencial via de transmissão. Num estudo realizado por Fera *et al.* foram detetadas altas prevalências de *A. butzleri* (77,6%) e *A. cryaerophilus* (34,1%) em fezes e esfregaços orais de gatos de estimação, podendo ser um indicativo da disseminação das espécies de *Arcobacter* pelo habitat do animal e consequente transmissão ao ser humano (Fera et al., 2009). Mas não foi só em gatos que estas evidências foram reportadas. Num estudo feito em 2007 em que cães e gatos domésticos foram analisados, também os cães demonstraram ser portadores de *A. cryaerophilus* nas fezes e boca, ou de *A. butzleri* nas fezes. Portanto, é de salientar uma vez mais que o contacto do humano com as fezes ou com a saliva de animais domésticos constitui um perigo para a sua saúde. Pode concluir-se que além do consumo de alimentos e água contaminada, o contato com animais domésticos é outra potencial via de infeção por *Arcobacter* spp. (Houf et al., 2008).

1.4.4. Transmissão pessoa-pessoa

A transmissão pessoa-a-pessoa foi sugerida pela primeira vez aquando do desencadear de um surto de cólicas abdominais numa escola italiana, onde todas as estirpes de *A. butzleri* isoladas a partir de amostras fecais das dez crianças infetadas demonstraram ter o mesmo fenótipo e genótipo, sugerindo uma relação epidemiológica. Nenhum outro habitante da zona foi contaminado, nem outras crianças que usavam o mesmo refeitório. A sucessão de casos ao longo do tempo, em adição ao facto de não terem sido infetadas outras crianças ou habitantes, leva a sofrer que este seria um caso de transmissão pessoa-a-pessoa (Vandamme, Pugina, et al., 1992).

Também um caso de estudo que reporta a infeção de um neonato com *A. butzleri* sugere a transmissão da infeção entre mãe e filho através da placenta (On, Stacey and Smyth, 1995; Collado and Figueras, 2011), demonstrando uma vez mais que a o contacto pessoa-a-pessoa, incluindo a transmissão vertical, é uma possível via de transmissão de *A. butzleri*.

1.5. Distribuição de *Arcobacter* spp.

Tal como descrito anteriormente, as espécies conhecidas de *Arcobacter* são provenientes das mais variadas fontes, tais como água, alimentos, animais e ambiente. *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são as espécies do género *Arcobacter* mais recorrentemente

encontradas, sendo descritas como patogênicas para animais e humanos (Collado and Figueras, 2011).

1.5.1. *Arcobacter* spp. em alimentos

É na alimentação que se focam grande parte dos estudos elaborados, dada a elevada prevalência que se faz sentir neste meio e dado que o consumo de alimentos contaminados é visto como uma das mais prováveis fontes de transmissão de *Arcobacter* a humanos (Hsu and Lee, 2015). A prevalência de *Arcobacter* spp. tem sido demonstrada em diversos alimentos, encontrando-se as espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* na lista de microrganismos considerados como um perigo grave para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002).

Diversos estudos demonstram a presença desta bactéria durante os processos de produção, criação e cultivo de produtos e mesmo durante o seu processamento. De forma geral é nas aves de capoeira que se regista a maior prevalência média de *Arcobacter* spp., com taxas entre 3,3 e 100%. Seguidamente, a carne de porco registando prevalências entre 0 e 52,9% e também a carne bovina entre 0 e 37% (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017). A contaminação dos produtos cárneos pode ocorrer através do contacto entre as carcaças e as fezes dos animais durante o processo de abate (Collado and Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016), bem como no desmanche e manipulação durante a venda a retalho (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017).

Nos países industrializados, como referido anteriormente, o consumo e manipulação de alimentos contaminados de origem animal crus ou mal cozinhados, têm sido indicados como importantes vias de transmissão de *Arcobacter* para os seres humanos (Ferreira et al., 2016). A prevalência deste género bacteriano nos mariscos demonstra ser significativa, atingindo taxas entre 34 e 73,3% (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017). Também nos lacticínios há relatos de prevalência de *Arcobacter* nomeadamente em leite cru (Scullion, Harrington and Madden, 2006; Pianta et al., 2007; Shah et al., 2012; Nieva-Echevarria et al., 2013) e produtos lácteos (Giacometti et al., 2013). A presença desta bactéria pode prolongar-se ao longo do processamento e armazenamento, como sugerido pela capacidade de sobrevivência de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* em leite de vaca ultrapasteurizado, pasteurizado e cru quando armazenado a 4 ou 10 °C (Giacometti et al., 2014).

O uso de lodo e estrume de animais nas práticas agrícolas pode estar na origem de contaminações das águas dos solos e subterrâneas, e consequentemente dos alimentos aí produzidos (Ferreira, Oleastro and Domingues, 2017). Esta poderá ser assim uma prática responsável pela introdução de *Arcobacter* spp. na cadeia alimentar, nomeadamente nos legumes, onde *Arcobacter* spp. foi encontrado, particularmente em espinafres (Hausdorf et al., 2013) e alfaces (González and Ferrús, 2011). Estes casos podem ter implicações significativas para a saúde pública dado que são alimentos consumidos em larga escala em todo o mundo.

1.5.2. *Arcobacter* spp. no meio ambiente

Tal como referido anteriormente, *Arcobacter* spp. encontra-se distribuído em diversos ambientes, sendo que é na água que se têm encontrado grande parte das espécies a nível ambiental. Os membros deste género foram recuperados de vários tipos de águas em diversos países, tais como Espanha, África do Sul, Turquia, EUA e Reino Unido (Collado and Figueras, 2011). Com base nos dados disponíveis, a média ponderada da prevalência de *Arcobacter* spp. nos diferentes ambientes aquíferos é a seguinte: 91,0% em águas residuais, 87,1% em lagos e rios, 75,2% em praias de recreio, 43,8% em água subterrânea, 17,6% em água de mar e 3,2% em água potável (Hsu and Lee, 2015). Num estudo de caso *Arcobacter* spp. foram isolados de todas as amostras de esgoto não tratadas, recolhidas de nove instalações de tratamento de águas residuais no Reino Unido. Este estudo reforça a ideia de que *A. butzleri* é encontrado frequentemente no esgoto doméstico (Merga et al., 2014), apontando o esgoto como um ecossistema favorável para o desenvolvimento deste microrganismo.

1.5.3. *Arcobacter* spp. em humanos

As espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* são comumente associadas a enterites (Fernández, Krause and Villanueva, 2004; Figueras et al., 2014) e bacteriemias (On, Stacey and Smyth, 1995; Hsueh et al., 1997), e a sua prevalência em fezes humanas isoladas por métodos de cultura tem variado entre os 0,1 e 3% (Ferreira et al., 2016). Estes resultados são concordantes com a prevalência observada em estudos realizados em Portugal. Na análise de amostras diarreicas de pacientes portugueses foi detetada a presença, por métodos moleculares, de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* em 1,3 e 0,3% das amostras, respetivamente (Ferreira, Júlio, et al., 2014).

Num outro caso de estudo levado a cabo por Van den Abeele *et al.* (2014) foram examinadas amostras fecais de 6774 pacientes com enterite, recolhidas na Bélgica entre 2008 e 2013. Dessas amostras, 86 eram positivas para *Arcobacter* spp., constituindo o quarto grupo de patógenos mais comumente isolado de amostras fecais de pacientes com doença entérica aguda (Van den Abeele et al., 2014). Vários estudos são concordantes com este resultado e salientam a prevalência considerável de *A. butzleri* em amostras diarreicas humanas (Vandenberg et al., 2004; Prouzet-Mauléon et al., 2006; Samie et al., 2007; Collado et al., 2013; Ferreira, Júlio, et al., 2014).

1.6. Resistência de *Arcobacter butzleri* a antibióticos

A Era Moderna dos antibióticos começou em 1928 com a descoberta da penicilina por Alexandre Fleming. O termo antibiótico foi descrito mais tarde em 1942 por Waksman, como uma substância produzida por microrganismos capaz de inibir o crescimento de outros microrganismos (Ventola, 2015). Esta foi provavelmente uma das maiores conquistas científicas

do século XX e desde o início da prescrição de antibióticos na década de 1940 que foram salvas milhões de vidas, ponderando-se mesmo estar no caminho certo para a erradicação de algumas doenças (Kumar and Schweizer, 2005; Ventola, 2015). No entanto, o uso recorrente de antibióticos tem promovido o aparecimento de agentes patogênicos resistentes aos mesmos (Kumar and Schweizer, 2005; Ventola, 2015), incluindo estirpes resistentes a múltiplos fármacos (Kumar and Schweizer, 2005), levando à necessidade de aprofundar a investigação relativa aos mecanismos envolvidos na resistência microbiana.

A pressão seletiva proveniente do uso indiscriminado de antibióticos na população humana e o uso de antibióticos na pecuária para o tratamento e promoção do crescimento, têm culminado num aumento das infeções por microrganismos resistentes a antibióticos (Iovine, 2013). Elevadas taxas de resistência e multirresistências a antibióticos têm sido observadas em diversos microrganismos, nomeadamente em *Arcobacter* spp. (Kabeya et al., 2004; Son et al., 2007). O uso de antibióticos na promoção do crescimento animal é um caso de preocupação, uma vez que há evidências de que os padrões de resistência observados em aves de capoeira podem prever padrões de resistência em humanos. Os animais são submetidos a pequenas dosagens de antibiótico durante largos períodos de tempo, podendo levar a uma aquisição de resistência, nomeadamente às fluoroquinolonas (Iovine, 2013). Desta forma, para a obtenção de melhores resultados aquando da utilização de antibióticos para o tratamento de doenças provocadas por *Arcobacter* spp., torna-se essencial e urgente a investigação sobre o potencial de resistência deste microrganismo a antimicrobianos utilizados tanto na terapêutica humana como veterinária.

À semelhança de *Campylobacter* spp., a maioria dos casos de enterites e bacteriemias causadas por *Arcobacter* spp. acabam por ser autolimitados, contudo em algumas situações existe necessidade de tratamento dessa infeção (Collado and Figueras, 2011). Para *Arcobacter* spp. não existe ainda uma posologia estabelecida devido aos poucos estudos de suscetibilidade aos antibióticos realizados até então, ainda assim, é já possível destacar a capacidade de resistência deste género a diversas classes de antibióticos a partir dos estudos efetuados. A estreita quantidade de estudos é limitada a três espécies, nomeadamente *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (Ferreira et al., 2016).

Entre os diversos antimicrobianos sugeridos para o tratamento, as cefalosporinas e combinações desta classe de antibióticos têm sido consensuais nos diversos casos de estudo como tratamento de bacteremias por *Arcobacter* spp.. Para infeções intestinais, não existe ainda uma escolha amplamente aceite, no entanto, tem-se vindo a notar o uso mais frequente de quinolonas, tetraciclina ou mesmo um antibiótico β -lactâmico combinado com um inibidor de β -lactamase (Ferreira et al., 2015).

A aplicação de antibióticos na prática clínica, nem sempre tem sido concordante com os valores de taxas de resistência apresentados para este microrganismo. Num estudo realizado por

Vandenberg e os seus colaboradores, 30,1% das estirpes de *Campylobacter* e organismos relacionados isoladas a partir de pacientes foram identificados como *A. butzleri* e demonstraram uma elevada taxa de suscetibilidade às quinolonas, sendo que 96,7% eram suscetíveis à ciprofloxacina e 82% ao ácido nalidíxico. Desses isolados, 78,7% eram suscetíveis igualmente à ampicilina e eritromicina. Todos apresentaram suscetibilidade à gentamicina e tetraciclina, no entanto, foi observada multirresistência em 6,2% dos isolados de *A. butzleri* à ampicilina, eritromicina e ácido nalidíxico. Os resultados levaram os autores a sugerir que as fluoroquinolonas poderiam ser utilizadas no tratamento da enterite grave causada por *Arcobacter* spp. (Vandenberg et al., 2006). No trabalho de Son et al. (2007), a tetraciclina foi também proposta como um antibiótico adequado para o tratamento de *Arcobacter* spp., juntamente com os aminoglicosídeos. Neste estudo, todas as estirpes de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* demonstraram suscetibilidade à ciprofloxacina, tetraciclina e gentamicina, e os isolados de *A. butzleri* foram particularmente resistentes à clindamicina (90%), azitromicina (81,4%) e ácido nalidíxico (23,6%) (Son et al., 2007).

Até 2012 foram raras as observações de resistência à ciprofloxacina em *A. butzleri* e *A. cryaerophilus*, apresentando taxas de resistência entre 0 e 4,4% (Atabay and Aydin, 2001; Houf et al., 2004; Otth et al., 2004; Vandenberg et al., 2006; Son et al., 2007). Foram também descritas baixas taxas de resistência a outras fluoroquinolonas em isolados de carcaças de frango vendidas ao retalho, com todos os isolados analisados demonstrando suscetibilidade às fluoroquinolonas danofloxacina e enrofloxacina (Atabay and Aydin, 2001). Entretanto, alguns estudos de Portugal, Costa Rica, Paquistão e Malásia indicam que 12,5 a 55,8% dos isolados de *Arcobacter* spp. de origem animal, aquática ou ambiental seriam resistentes à ciprofloxacina (Shah et al., 2012, 2013; Ferreira et al., 2013; Villalobos et al., 2013). Na Malásia e na Turquia foram observadas também resistências a outras quinolonas, nomeadamente danofloxacina e enrofloxacina (Abay et al., 2012; Shah et al., 2012). Fera et al. (2003) testaram a suscetibilidade de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* isolados a partir de ambiente salobro, relatando uma baixa suscetibilidade às fluoroquinolonas. Todos os isolados mostraram ser resistentes a uma ou mais classes de antibióticos como penicilinas, macrólidos, cloranfenicol, trimetoprim e vancomicina. De uma forma geral, os carbapenemos apresentaram resultados que os indicam também como uma boa escolha no tratamento de infeções por *Arcobacter* spp. (Fera et al., 2003).

Globalmente, para os macrólidos tem sido apresentada uma grande amplitude de taxas de resistência em *Arcobacter* spp., variando de 0 a 100% no que toca à taxa de resistência à eritromicina e azitromicina. Também para o cloranfenicol se observaram diferenças significativas entre os estudos (Ferreira et al., 2016).

Quanto aos aminoglicosídeos gentamicina e canamicina, apenas um estudo revelou altas taxas de resistência. Scanlon et al. (2013) descreveram uma elevada percentagem de resistência à gentamicina e canamicina (80%) para isolados de *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* a partir de

suínos (Scanlon et al., 2013). De notar que a resistência à gentamicina, estreptomicina, amicacina e neomicina não foi relatada para amostras humanas (Kiehlbauch et al., 1991; Houf et al., 2004; Vandenberg et al., 2006; Abay et al., 2012; Kayman et al., 2012).

Pode observar-se uma elevada taxa de resistência à ampicilina em *A. butzleri* e menos comumente em *A. cryaerophilus* para isolados animais e humanos (Kiehlbauch, Baker and Wachsmuth, 1992; Vandenberg et al., 2006; Scanlon et al., 2013; Villalobos et al., 2013).

Para a obtenção destes resultados, diferentes testes de suscetibilidade antimicrobiana foram utilizados para determinar a percentagem de resistência a antibióticos. Assim, a grande heterogeneidade das taxas de resistência pode em parte ser devida à falta de padronização para os testes de suscetibilidade antimicrobiana de *Arcobacter* spp. e ausência de pontos de corte estabelecidos, levando a que cada autor utilize um critério diferente (Ferreira et al., 2016), embora não se possam excluir diferenças regionais.

No geral, relativamente ao tratamento de infeções provocadas por *Arcobacter*, são as fluoroquinolonas e a tetraciclina, os antimicrobianos mais sugeridos para o seu tratamento dada a ainda baixa taxa de resistência observada para estes antibióticos, contudo, deve considerar-se que algumas estirpes são resistentes (Collado and Figueras, 2011). A resistência à eritromicina e ciprofloxacina demonstrada em alguns casos de estudo é uma ocorrência preocupante, visto que estes dois antimicrobianos são geralmente prescritos para o tratamento de infeções com *Campylobacteraceae* em seres humanos (Houf et al., 2004).

1.7. Mecanismos de resistência a antibióticos

A resistência aos antibióticos é um problema atualmente bem conhecido que tem posto em causa a utilização dos mesmos no tratamento de algumas infeções. Esta pode dever-se a alguns dos diversos mecanismos de ação que as bactérias contêm, denominados de mecanismos de resistência. Entre eles encontram-se modificação do alvo, inativação do fármaco, alteração da permeabilidade e efluxo do fármaco (Kumar and Schweizer, 2005; Poole, 2007), tal como é possível observar pela figura 1. Os elementos genéticos responsáveis pela resistência podem ser cromossomais ou encontrar-se em elementos extracromossomais móveis, tais como plasmídeos, transposões e integrões (Kumar and Schweizer, 2005; Poole, 2007).

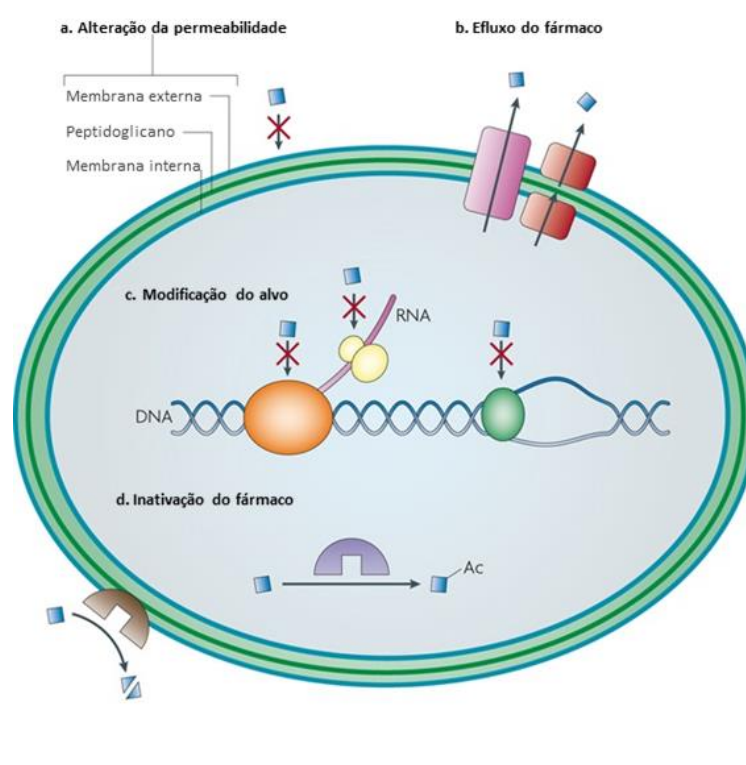


Figura 1 - Representação dos mecanismos de resistência a antibióticos (adaptado de Allen *et al.*, 2010).

1.7.1. Resistência devido à modificação do alvo

A alteração na composição de aminoácidos e da conformação da proteína alvo pode conduzir à diminuição da afinidade do fármaco para o alvo, ou de um pró-fármaco para a enzima que converte o pró-fármaco em fármaco ativo, resultando numa possível resistência (Brunton, Chabner and Knollmann, 2007). Este é um dos mecanismos de resistência descrito para macrólidos, usados como primeira linha no tratamento de infecções por *Campylobacter* spp.. Em *A. butzleri*, a resistência a este antibiótico está principalmente associada a mutações pontuais na região codificadora da peptidil-transferase no domínio V do gene *rRNA 23S* (componente da subunidade 50S), o alvo específico dos macrólidos. Desta forma, a mutação altera o ponto de ancoragem principal dos macrólidos levando a uma perturbação da ligação do fármaco ao seu local inibitório sobre o ribossoma bacteriano e a uma consequente resistência (Gibreel and Taylor, 2006).

A resistência a antibióticos através da alteração genética é indicada como o principal motivo das resistências a fluoroquinolonas na maioria das espécies bacterianas, sendo que os genes alvo primários e secundários são a *DNA girase* e *DNA topoisomerase IV*, respetivamente (Aarestrup and Engberg, 2001). Nas espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* foi estudada a relação entre uma mutação do gene da *gyrA* na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR) e a resistência à ciprofloxacina, tendo-se concluído que a resistência a este antibiótico pode ser devida a uma mutação no resíduo 254 do gene *gyrA* originando uma transição de treonina para

isoleucina na posição 85 da proteína correspondente (Abdelbaqi et al., 2007), semelhante ao que acontece em *Campylobacter* spp. (Payot et al., 2006; Alfredson and Korolik, 2007; Iovine, 2013).

Para *C. jejuni* e *C. coli*, está também descrita a resistência à tetraciclina, sendo esta conferida pela presença de um gene que codifica para uma proteína de proteção ribossomal, designado por *tet(O)* (Taylor and Courvalin, 1988; Taylor and Chau, 1996; Aarestrup and Engberg, 2001; Padungton and Kaneene, 2003). Esta proteína atua removendo a tetraciclina do seu local de ligação, o ribossoma. Deste modo a bactéria anula a inibição da fase de alongamento da síntese proteica que seria provocada pelo antibiótico em questão, tornando-se resistente (Alfredson and Korolik, 2007; Iovine, 2013). Apesar das semelhanças partilhadas entre *Campylobacter* spp. e *Arcobacter* spp., este modo de resistência não se encontra descrito em *Arcobacter* spp..

1.7.2. Resistência devido à inativação do fármaco

A produção de enzimas modificadoras de moléculas é outro dos mecanismos que leva à resistência a antibióticos, podendo estas classificar-se em acetiltransferases e hidrolases. Entre os mecanismos que conferem resistência aos antibióticos β -lactâmicos, a produção de β -lactamases capazes de hidrolisar a ligação amida do anel β -lactâmico do antibiótico é o mecanismo mais comum em bactérias gram-negativas, este mecanismo inativa o antibiótico, levando a uma consequente resistência (Ambler, 1980; Wright, 2005). É através deste mecanismo que a maioria das estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* são resistentes a um grande número de agentes antimicrobianos β -lactâmicos (Alfredson and Korolik, 2007), sendo também sugerido como um mecanismo de resistência em *A. butzleri* devido à presença de genes codificantes para β -lactamases no seu genoma (Miller et al., 2007). Quanto à resistência ao cloranfenicol, foi proposto que se possa dever à presença de um gene *cat*, o qual codifica uma O-acetiltransferase de cloranfenicol (Miller et al., 2007).

Em estudos realizados na família *Enterobacteriaceae*, foi demonstrado que a resistência à eritromicina pode ser devida à atividade de enzimas inativadoras de macrólidos de dois tipos: eritromicina esterases (EreA e EreB) e macrólido 2'-fosfotransferases. Genes de resistência a antibióticos da classe dos aminoglicosídeos, que codificam para proteínas aminoglicosídeos fosfotransferases, modificadoras dos antibióticos foram encontrados em *Campylobacter* spp., como é o caso do gene *aphA-1*. Este gene partilha elevada identidade com o gene de resistência à canamicina natural de *E. coli*, o que sugere que este foi adquirido por *Campylobacter* spp. de um membro da mesma família. Também o gene *aphA-3*, um gene que até então apenas tinha sido descrito em gram-positivas, foi identificado em plasmídeos de *C. coli* e *C. jejuni*, indicando que a sua aquisição terá sido feita através de bactérias gram-positivas. Um terceiro gene de fosfotransferase de resistência à canamicina, *aphA-7*, foi também identificado num plasmídeo de *C. jejuni* (Alfredson and Korolik, 2007). A presença destas enzimas modificadoras de macrólidos ou aminoglicosídeos não está descrita em *A. butzleri*.

1.7.3. Resistência devido à alteração da permeabilidade

A membrana externa de bactérias gram-negativas é uma barreira permeável que impede a entrada na célula de grandes moléculas polares, mas permite a entrada de pequenas moléculas polares tais como antibióticos, que entram na célula através de canais proteicos (porinas). A ausência, mutação ou perda de um canal proteico pode diminuir ou impedir a entrada de um fármaco na célula, reduzindo a concentração de fármaco no alvo. Assim, se estivermos na presença de um alvo intracelular, ao haver uma modificação no mecanismo de transporte pode dar-se a ocorrência de resistência (Nikaido, 2001; Brunton, Chabner and Knollmann, 2007). Em *C. jejuni* e *C. coli*, a “*major outer membrane protein*” forma um poro seletivo para cátions, menor que os poros tipicamente encontrados na membrana de *E. coli*. Seria de esperar que este poro, pelo seu reduzido tamanho, limitasse a entrada da maioria dos antibióticos com um peso molecular maior que 360 Da, tal como os macrólidos ou β -lactâmicos. No entanto, este facto é contraditório relativamente aos resultados de suscetibilidade aos macrólidos, os quais são descritos como eficazes no tratamento de *Campylobacter* spp., indicando que este fármaco é capaz de atravessar as membranas. Pensa-se que a entrada dos macrólidos se deva a uma mutação em genes de síntese de lipopolissacarídeos, tornando a membrana relativamente mais hidrofóbica e portanto mais suscetível a antibióticos mais hidrofóbicos, tal como os macrólidos (Iovine, 2013). Quanto a *A. butzleri*, a resistência de algumas estirpes a quinolonas hidrofóbicas, tais como ácido nalidíxico, em que não foram detetadas mutações ao nível de *gyrA*, foi associada a um possível aumento da impermeabilidade ou à atividade das bombas de efluxo. A bicamada fosfolipídica dessas estirpes pode apresentar uma permeabilidade reduzida em relação a quinolonas hidrofóbicas e modificações nos poros, de modo a permitir apenas a passagem de quinolonas hidrofílicas (Miller et al., 2007).

1.7.4. Resistência devido ao efluxo do fármaco

Pode também dar-se o caso de um fármaco, após entrar na célula, acabar por ser expelido. Isto faz com que um microrganismo que até então era suscetível a determinado fármaco demonstre resistência ao mesmo (Nikaido, 2001; Brunton, Chabner and Knollmann, 2007). O efluxo de fármacos é um mecanismo associado à resistência em bactérias gram-positivas e gram-negativas, nomeadamente em *Campylobacter* spp. foi relacionado com a resistência a múltiplos antibióticos, incluindo fluoroquinolonas, eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol e ampicilina, bem como detergentes, corantes (incluindo brometo de etídio), sais biliares e metais pesados (Lin, Michel and Zhang, 2002). O sistema de efluxo mais associado a resistências em *Campylobacter* spp. é o CmeABC, no entanto há outros mecanismos que parecem ter um papel menos relevante em *C. jejuni*, tal como o sistema de efluxo CmeDEF (Payot et al., 2006; Alfredson and Korolik, 2007; Iovine, 2013). O papel de mecanismos de efluxo na resistência em *Arcobacter* spp. não foi ainda estudado

1.8. Bombas de efluxo

No início dos anos 80 foi feita a primeira descrição de transportadores de antibióticos tendo por base um estudo de resistência a tetraciclinas em *E. coli* (Poole, 2007). Posteriormente, outras classes de antibacterianos foram estudadas, entre eles os macrólidos, as fluoroquinolonas, os β -lactâmicos e os aminoglicosídeos (Van Bambeke et al., 2003).

As bombas de efluxo são encontradas em quase todas as espécies bacterianas e apesar de estarem presentes tanto em bactérias gram-negativas como em gram-positivas, a resistência mediada por efluxo em bactérias gram-negativas é um problema mais complexo. Isto deve-se sobretudo à existência de uma membrana externa que dificulta a entrada na célula do antimicrobiano e à capacidade de exportação através de bombas de efluxo que estas têm, diminuindo assim a acumulação intracelular de antimicrobianos (Kumar and Schweizer, 2005). O efluxo para o exterior da célula constitui uma das mais frequentes estratégias de resistência a citotóxicos, expelindo estes compostos através de proteínas membranares. Desta forma as bactérias conseguem diminuir a concentração intracelular dos tóxicos resistindo ao seu efeito (Borges-Walmsley et al., 2003; Van Bambeke et al., 2003). Este papel não é visível apenas na resistência a antibióticos, mas também no mecanismo de adaptação a condições ambientais por alteração da sua expressão e consequente modificação do efluxo (Lin et al., 2005). Quanto aos genes que codificam a classe de proteínas que compõem as bombas de efluxo, estes estão normalmente localizados no cromossoma ou em plasmídeos (Sun, Deng and Yan, 2014).

No reino procariota são cinco as famílias que congregam as diferentes bombas de efluxo (Figura 2): Superfamília “ATP (*adenosine triphosphate*)-Binding Cassete” (ABC), Superfamília “Major Facilitator” (MFS), Família “Small Multidrug Resistance” (SMR), Superfamília “Resistance-nodulation-cell-division” (RND) e Família “Multidrug and Toxic Compound Extrusion” (MATE) (Tseng et al., 1999; Lubelski, Konings and Driessen, 2007; Law, Maloney and Wang, 2008; Bay and Turner, 2009; Kuroda and Tsuchiya, 2009).

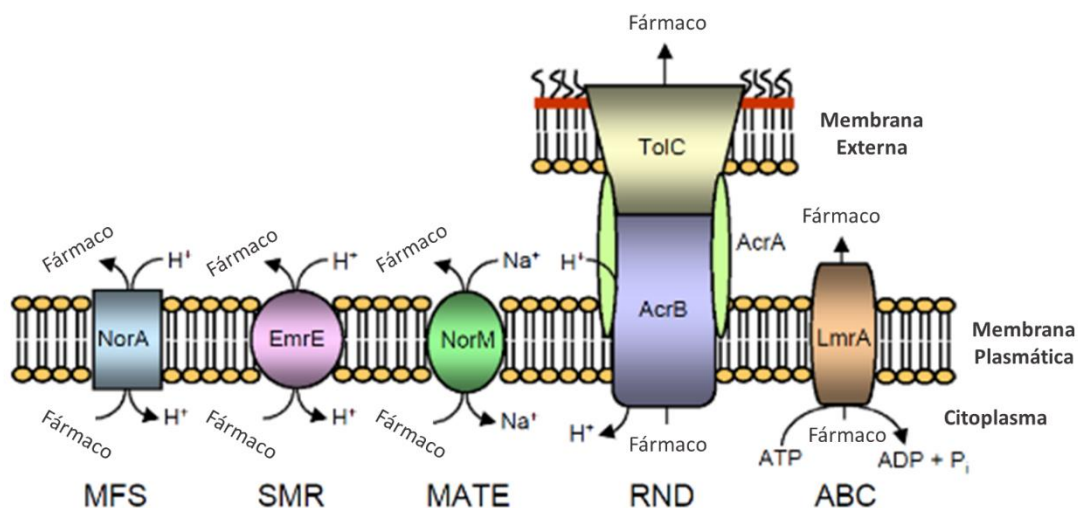


Figura 2 - Ilustração esquemática dos principais tipos de bombas de efluxo bacterianas. NorA de *Staphylococcus aureus*, um membro da superfamília MFS; EmrE de *Escherichia coli*, um membro da superfamília SMR; NorM de *Vibrio parahaemolyticus*, um membro da família MATE; AcrAB-TolC de *Escherichia coli*, um membro da superfamília RND; LmrA de *Lactococcus lactis*, um membro da superfamília ABC (Kumar and Schweizer, 2005).

Todas as famílias estão presentes em bactérias gram-negativas e gram-positivas à exceção da superfamília RND, que se encontra presente apenas nas bactérias gram-negativas. As bombas de efluxo na generalidade podem diferenciar-se com base na similaridade da sua sequência, substrato específico, número de componentes, número de regiões transmembranares e fonte de energia usada (Blanco et al., 2016). Algumas destas são transportadoras de múltiplos substratos, levando a múltiplas resistências, um caso identificado como uma das grandes ameaças à saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (Sun, Deng and Yan, 2014).

Contrariamente às restantes famílias de transportadores, os transportadores da família ABC utilizam energia derivada da hidrólise de ATP para conduzir à exportação de substâncias, tal como é possível verificar na figura 2 (Kumar and Schweizer, 2005; Blanco et al., 2016). O leque de substâncias possíveis de transportar é grande, incluindo açúcares, aminoácidos, iões, fármacos, polissacáridos e proteínas (Kumar and Schweizer, 2005). Uma das bombas de efluxo desta superfamília mais bem estudadas é a bomba LmrA de *Lactococcus lactis* (Kumar and Schweizer, 2005), que corresponde ao primeiro transportador de múltiplos fármacos ABC descoberto (Putman, van Veen and Konings, 2000).

Os transportadores MFS constituem uma família grande e bastante diversificada, presente ubiquitariamente em bactérias, estando envolvidos no transporte de açúcares, metabolitos, aniões e fármacos (Kumar and Schweizer, 2005). São capazes de promover o uniporte, o simporte de soluto/catião, o antiporte de soluto/H⁺ ou o antiporte soluto/soluto (Kumar and Schweizer, 2005). Esta é a família de bombas de efluxo de maior relevância em bactérias gram-

positivas e os seus transportadores mais bem estudados são o NorA de *Staphylococcus aureus* e o PmrA de *Streptococcus pneumoniae* (Kumar and Schweizer, 2005; Blanco et al., 2016).

Relativamente à superfamília SMR a sua energia para fazer a extrusão de compostos é proveniente da força proto-motriz (Figura 2) (Borges-Walmsley, McKeegan and Walmsley, 2003; Kumar and Schweizer, 2005). Das bombas de efluxo pertencentes a esta família, entre as melhor caracterizadas estão a bomba Smr de *S. aureus* e a bomba EmrE de *E. coli* (Kumar and Schweizer, 2005).

Os transportadores MATE são uma família recém-descoberta. Estes transportadores eram anteriormente classificados como pertencentes à superfamília MFS devido à semelhança na tipologia membranar. Atualmente são classificados de forma distinta visto não terem qualquer semelhança sequencial com as proteínas MFS (Borges-Walmsley, McKeegan and Walmsley, 2003; Kumar and Schweizer, 2005). Como é possível observar pela figura 2, estes sistemas utilizam um gradiente de Na⁺ como fonte de energia para realizar efluxo de corantes catiónicos e fluoroquinolonas, bem como a força proto-motriz (Kumar and Schweizer, 2005).

Os sistemas transportadores da superfamília RND consistem, de um modo geral, em grandes cadeias polipeptídicas de tamanho superior aos transportadores MFS (Borges-Walmsley, McKeegan and Walmsley, 2003). Estes sistemas são formados pela associação entre três proteínas (Figura 2), nomeadamente uma proteína transportadora de membrana interna, proteína membranar externa e proteína de fusão membranar periplasmática, formando assim um canal que atravessa o espaço periplasmático, permitindo o efluxo de compostos através das membranas das bactérias gram-negativas até ao exterior da célula (Blanco et al., 2016).

Todos os membros da família RND caracterizados até à data realizam o efluxo do substrato através de um mecanismo de antiporte substrato/H⁺. É através deste mecanismo que desempenham um papel importante na resistência a antibióticos, metais pesados, corantes, detergentes e solventes, sendo que todas as bombas RND estudadas são transportadoras de múltiplos componentes, conferindo multirresistência (Kumar and Schweizer, 2005). Os genes codificantes das bombas de efluxo da família RND, geralmente localizam-se no cromossoma, embora seja também identificada a sua presença em plasmídeos (Kumar and Schweizer, 2005). Esta família de bombas de efluxo é associada extensivamente a resistências a antibióticos em bactérias gram-negativas, tal como ocorre em *E. coli* e *Salmonella typhimurium* através da bomba de efluxo AcrAB-TolC e em *Pseudomonas aeruginosa* pela bomba MexAB-OprM (Sun, Deng and Yan, 2014).

Também em *Campylobacter* é conhecida a bomba de efluxo designada CmeABC, a qual contribui para a resistência de *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis* e *C. fetus* a múltiplos antibióticos (Guo et al., 2010). Esta partilha semelhanças sequenciais e estruturais com as bombas tripartidas de outras bactérias gram-negativas, sendo constituída por três componentes referidos: proteína de fusão periplasmática (CmeA), um transportador de membrana interna

(CmeB) e uma proteína membrana externa (CmeC). Estas três proteínas são codificadas por um operão de três genes (*cmeABC*) que atuam em conjunto para formar um canal de membrana que extruda os substratos tóxicos diretamente das células bacterianas, contribuindo significativamente para a sua resistência a agentes antimicrobianos (Lin, Michel and Zhang, 2002; Gibreel and Taylor, 2006). O gene *cmeR*, localizado a montante do gene *cmeA*, codifica uma proteína que funciona como um repressor da transcrição de *cmeABC*. A proteína codificada por *cmeR* assemelha-se aos membros da família de repressores transcricionais *tetR*, atuando em *Campylobacter* spp. como um modulador para manter um nível basal da bomba de efluxo CmeABC, de modo a satisfazer as necessidades fisiológicas e facilitar a adaptação de *Campylobacter* spp. a alterações ambientais, incluindo a exposição a antibióticos (Gibreel and Taylor, 2006). Esta é uma bomba de efluxo capaz de conferir resistência a diversas substâncias como fluoroquinolonas, sais biliares, brometo de etídio e metais pesados (Lin, Michel and Zhang, 2002). Através de um estudo sobre a inativação do gene codificador da proteína *cmeB* em *C. jejuni*, observou-se um aumento da suscetibilidade a um espectro alargado de antibióticos, brometo de etídio e detergentes, comprovando o papel das bombas de efluxo na resistência a estas substâncias (Pumbwe and Piddock, 2002).

Aquando da sequenciação do genoma completo de *A. butzleri* RM4018 verificou-se a resistência da estirpe a antibióticos hidrofóbicos (ácido nalidíxico e ácido oxolínico) e maior suscetibilidade a antibióticos hidrofílicos (ciprofloxacina e norfloxacina). Este facto sugeriu que a resistência a quinolonas estaria ao nível da absorção, associada ao aumento da impermeabilidade ou do aumento da atividade de bombas de efluxo, ou poderia mesmo estar associada à presença de uma bomba de efluxo específica para quinolonas hidrofóbicas. Este tipo de resistência é comum a outros microrganismos, com por exemplo em *S. aureus*, onde a proteína *NorA* demonstrou estar envolvida no efluxo específico de quinolonas hidrofílicas (Miller et al., 2007).

Dado que por análise das sequências disponíveis em bancos de dados públicos como o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) se pode observar que a espécie *A. butzleri* é portador de vários genes codificantes para bombas de efluxo do tipo RND, é importante perceber se este é um dos mecanismos de resistência que tem um papel preponderante na resistência de *A. butzleri* a vários antimicrobianos. Este estudo é da extrema importância para a saúde humana e veterinária uma vez que o número de relatórios que demonstraram elevadas taxas de resistência em *A. butzleri* tem vindo a aumentar, no entanto, os mecanismos por trás dessa resistência são ainda maioritariamente desconhecidos.

Capítulo 2 - Objetivos

Arcobacter butzleri está associado a enterite e bacteremia em seres humanos, pertencendo à lista de microrganismos considerados como um perigo grave para a saúde humana pela ICMSF. Com o uso indiscriminado de antibióticos na população humana, bem como na criação de animais, tem-se vindo a constatar um aumento da resistência antimicrobiana em vários agentes patogénicos. Também tem aumentado o número de relatórios que demonstraram elevadas taxas de resistência a diversas classes de antibióticos em *A. butzleri*, o que poderá contribuir para a falha de tratamentos de infeções graves ou até mesmo disseminação de resistências. A investigação em torno dos mecanismos de resistência desta bactéria é escassa e as bombas de efluxo têm demonstrado serem detentoras de um papel importante na resistência de diversos microrganismos, pelo que a investigação do seu papel em *A. butzleri* é relevante. Desta forma, o objetivo global deste trabalho consiste em avaliar o papel de bombas de efluxo na resistência a antimicrobianos de *A. butzleri*, com foco numa bomba de efluxo putativa da superfamília RND.

Os objetivos específicos definidos para este trabalho são:

- Avaliar a influência de inibidores de bombas de efluxo na alteração da resistência a antibióticos, sais biliares e desinfetante em *A. butzleri*;
- Construir estirpes mutantes de *A. butzleri* pela interrupção do gene codificante da proteína de membrana interna da bomba de efluxo putativa selecionada;
- Avaliar o efeito da inativação do gene na resistência de *A. butzleri* a antibióticos, sais biliares e desinfetante.

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1. Estirpes bacterianas de *A. butzleri*

No decorrer deste trabalho de investigação, foram usadas cinco estirpes de *A. butzleri* para avaliação do papel das bombas de efluxo na resistência antimicrobiana desta bactéria. As estirpes foram previamente sujeitas a sequenciação do genoma total, sendo assim selecionadas usando como critério a presença de um operão de três genes do tipo *cmeABC*. A origem das estirpes usadas encontra-se apresentada na tabela 1. Uma estirpe de *E. coli* portadora do vetor plasmídeo pUC18-K2, foi usada para produção do mesmo.

Tabela 1 - Identificação e origem das cinco estirpes de *Arcobacter butzleri* utilizadas.

Estirpe	Origem
AB28/11	Pele de pescoço de carcaça de frango (matadouro)
CR64-1	Carne de aves de capoeira (comércio a retalho)
CR113-2	Vegetais embalados prontos para consumo (comércio a retalho)
CR114-3	Carne de aves de capoeira (comércio a retalho)
DQ40A1	Superfície de equipamento de queijaria

3.2. Armazenamento e preparação das estirpes

As estirpes utilizadas foram conservadas a longo prazo à temperatura de -80 °C em tubos criogénicos contendo meio Brain Heart Infusion (Liofilchem) com 20% (V/V) glicerol. Aquando da sua utilização as estirpes de *A. butzleri* foram inoculadas em placas com Blood Agar Base (Oxoid) suplementado com 5% (V/V) de sangue de cavalo desfibrinado (BA - Blood Agar) ou *Tryptic Soy Agar* (TSA, Merck Millipore) dependendo da metodologia a usar. Quanto à estirpe de *E. coli* utilizada para a produção do plasmídeo pUC18-K2, esta foi inoculada em meio Luria-Bertani (LB, Liofilchem) com 30 µg/mL de canamicina.

3.3. Agentes antimicrobianos

No decorrer deste trabalho utilizaram-se vários agentes antimicrobianos, nomeadamente antibióticos, sais biliares e um desinfetante. Também foram utilizados Inibidores de bombas de efluxo de forma a entender o papel das bombas de efluxo na resistência de *A. butzleri*. Estes compostos encontram-se descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Compostos usados na avaliação da resistência de *Arcobacter butzleri*.

	Agente antimicrobiano	Fabricante	Grau de Pureza	Solventes
Antibióticos	Ampicilina - sal de sódio (AMP)	NZyTech	100%	Água
	Cefotaxima - sal de sódio (CTX)	Sigma-Aldrich	95%	Água
	Ciprofloxacina (CIP)	Sigma-Aldrich	98%	Água basificada com NaOH (1 M)
	Cloranfenicol (CHL)	Fluka BioChemika	98%	Etanol 95%
	Eritromicina (ERY)	Sigma-Aldrich	100%	Etanol 95%
	Sulfato de gentamicina (GEN)	Sigma-Aldrich	100%	Água
	Tetraciclina (TET)	Sigma-Aldrich	95%	Etanol 95%
	Sulfato de canamicina (KAN)	Fisher	100%	Água
Sais biliares	Sais Biliares (SB)	Sigma-Aldrich	100%	Meio <i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)
	Colato de Sódio (CS)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	100%	Meio TSB
	Desoxicolato de Sódio (DS)	Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.	100%	Meio TSB
Desinfetante	Irgasan (IRG)	Sigma-Aldrich	100%	DMSO
Inibidores de bombas de efluxo	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP)	ACROS	100%	DMSO
	1-(1-naftilmetil)-piperazina (NMP)	Sigma-Aldrich	100%	20% DMSO, 20% HCl 1M e 60% água
	Fenil-arginina- β -naftilamida (PA β N)	Sigma-Aldrich	100%	Água
Fluorocromo	Brometo de Etídio (EtBr)	Fisher	Solução 1%	Água

3.4. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de antimicrobianos em *A. butzleri*

Para avaliar a suscetibilidade de uma determinada bactéria a um agente antimicrobiano podem ser utilizados métodos de diluição em meio sólido ou líquido. O método de microdiluição em meio líquido é um método amplamente utilizado para a avaliação da suscetibilidade

antimicrobiana. Permite determinar a concentração mínima de um agente antimicrobiano capaz de inibir visivelmente o crescimento bacteriano (Andrews, 2001).

Assim, foi determinada a CMI de vários antibióticos, sais biliares, desinfetante, inibidores de bombas de efluxo e brometo de etídio de forma a avaliar a suscetibilidade das estirpes a estes antimicrobianos, e para estabelecer as condições experimentais a utilizar nos ensaios seguintes, que estavam dependentes das concentrações destes compostos, mas também para estudar o comportamento dos mutantes face à suscetibilidade aos antibióticos.

A determinação da CMI dos antibióticos, sais biliares, desinfetante, inibidores de bombas de efluxo e brometo de etídio para as estirpes de *A. butzleri* em estudo, foi realizada pelo método de microdiluições sucessivas em placas de 96 poços. Assim, numa microplaca de 96 poços, para um volume de 50 µL, realizaram-se diluições sucessivas de 1:2 dos compostos que se pretendiam testar com meio TSB (Merck Millipore), sendo posteriormente adicionado 50 µL de inóculo ou meio de acordo com o objetivo, para um volume final de 100 µL. O intervalo de concentração dos compostos em estudo foi ajustado de acordo com a suscetibilidade das estirpes.

Previamente, as diferentes estirpes em estudo foram inoculadas em meio TSA e incubadas a 30 °C durante 24 h. A partir desta cultura, procedeu-se à suspensão das bactérias numa solução salina de cloreto de sódio a 0,85% (p/V) ajustando a turbidez das suspensões celulares a aproximadamente 0,5 unidades McFarland. Posteriormente, o inóculo foi diluído em meio TSB de modo a obter-se uma suspensão celular com aproximadamente 10⁶ unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. Distribuiu-se depois 50 µL de inóculo diluído obtendo-se uma concentração celular final de 5x10⁵ UFC/mL em cada poço. Como controlo de crescimento foram usados poços com 50 µL de meio TSB e 50 µL de inóculo e como controlo de esterilidade utilizou-se 100 µL de meio de cultura. Os resultados foram observados após incubação das placas durante 48 h a 30 °C. Os ensaios foram realizados em duplicado, sendo executados três ensaios independentes. Definiu-se como CMI a concentração mais baixa de cada composto testado que inibiu o crescimento bacteriano a olho nu, sendo que a turbidez dos poços foi sempre confirmada a uma absorvância 620 nm através de um leitor de microplacas.

3.5. Avaliação do efeito de inibidores de bombas de efluxo na ação de antimicrobianos em *A. butzleri*

De forma a determinar o papel das bombas de efluxo na resistência a antimicrobianos, foram realizados ensaios de determinação da CMI dos diferentes antibióticos, sais biliares e desinfetante na presença de inibidores de bombas de efluxo. Para tal, numa microplaca de 96 poços, para um volume final de 100 µL, foram executadas diluições seriadas de 1:2 dos compostos em estudo em meio TSB num volume de 25 µL, sendo posteriormente adicionado 25

μL dos potenciais inibidores de bombas de efluxo em concentrações subinibitórias (1/4x da CMI) e 50 μL de inóculo. O inóculo adicionado foi preparado de acordo com o descrito no ponto 3.4.. Os resultados foram observados após incubação das placas de 96 poços durante 48 h a 30 °C. Foram realizados pelo menos três ensaios independentes, cada um em duplicado. Avaliou-se a CMI como a concentração mais baixa de cada composto testado que inibiu o crescimento bacteriano na presença dos inibidores em estudo. Como controlo negativo utilizaram-se poços com meio TSB e como controlo positivo, poços contendo meio e inóculo. Foram ainda feitos controlos para a atividade antibacteriana dos inibidores de bombas de efluxo de forma a garantir que a gama de concentração testada não inibia o crescimento da bactéria.

3.6. Construção de mutantes de efluxo de *A. butzleri*

Para estudar a função biológica de um gene, pode proceder-se à construção de uma estirpe mutante, à qual se elimina o gene que se pretende estudar, o gene a eliminar deve ser substituído por DNA exógeno como uma cassette de resistência a antibiótico (Ge et al., 2005). Neste caso, o mutante foi construído por mutagénesis insercional no gene tipo *cmeB* da bomba de efluxo do tipo CmeABC através da inserção da cassette de resistência à canamicina *aphA-3*, presente no plasmídeo pUC18-K2. O gene *cmeB* foi selecionado por codificar uma proteína transmembranar responsável pela extrusão dos antimicrobianos.

3.6.1. Extração de DNA genómico

Para a extração de DNA genómico (gDNA) utilizou-se o kit GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit (Vivantis). Para tal, as diversas estirpes de *A. butzleri* foram inicialmente inoculadas em placas de TSA e incubadas a 30 °C durante 24 h. Posteriormente, fez-se uma suspensão de inóculo em NaCl (0,85%) e procedeu-se de acordo com o protocolo do manual de utilização do kit acima referido.

3.6.2. Obtenção do fragmento de DNA transformante

3.6.2.1. Extração do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli*

Para proceder à extração do plasmídeo, primeiramente procedeu-se à inoculação da estirpe de *E. coli* portadora do plasmídeo pUC18-K2 (Anexo I) numa placa de LB com 30 μg/mL de canamicina, a qual foi incubada durante 24 h a 37 °C. De seguida, fez-se uma pré-cultura com o inóculo em 62,5 mL de meio TB (Terrific Broth) composto por 12 g/L de triptona, 24 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de glicerol, 0,17 M de KH₂PO₄, 0,72 M de K₂HPO₄ e ainda suplementado com 30 μg/mL de canamicina. A cultura foi incubada num agitador orbital (Agitorb200ICP, Aralab) 37 °C a 250 rpm até se obter uma DO_{620nm} de 2,6. Posteriormente realizou-se uma cultura a partir da pré-cultura anterior durante 16 h em 62,5 mL de meio TB,

iniciando-se a uma DO_{620nm} de 0,2. As células foram recuperadas através de centrifugação a 5500 xg durante 20 min a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o depósito celular foi armazenado a -20 °C até utilização. A extração do plasmídeo foi feita com o kit NZYMaxiprep (NZYtech) e determinação da concentração e pureza do DNA plasmídico extraído foi avaliada através de um nanoespectrofotômetro (NanoPhotometer, IMPLEN).

3.6.2.2. Digestão do plasmídeo pUC18-K2

O plasmídeo pUC18-K2 deriva do plasmídeo pUC18, contendo uma cassette de resistência à canamicina (*aphA-3*) entre os locais de restrição de BamH I e Kpn I (Figura 3). Assim, a digestão do plasmídeo para extração da cassette de resistência a canamicina foi feita usando as enzimas de restrição que reconhecem os locais de restrição pretendidos. Utilizou-se, para tal, para um volume total de 50 μ L, 10 U de enzima BamHI (NZYtech), 10 U de enzima KpnI (Takara), 5 μ L de buffer U (10x) (NZYtech) e 2,52 μ g de plasmídeo (168 $\text{ng}/\mu\text{L}$), perfazendo o volume com água ultrapura. A reação de restrição enzimática foi posteriormente incubada durante 18 h a 37 °C.

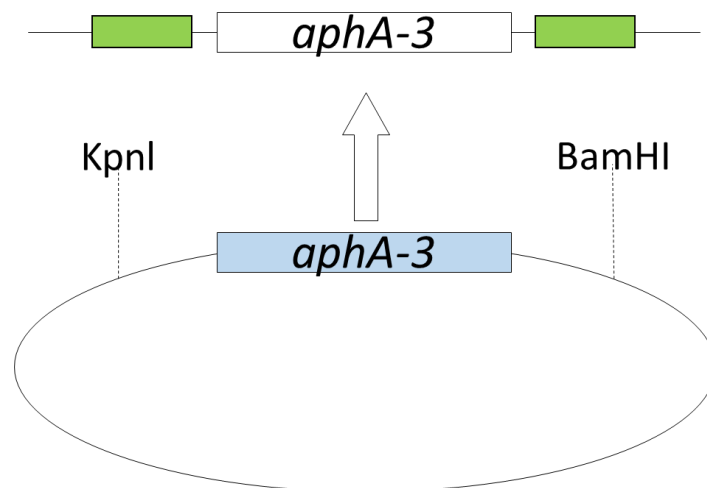


Figura 3 - Representação da digestão da cassette *aphA-3* com os locais de corte pelas enzimas KpnI e BamHI.

3.6.2.3. Purificação da cassette *aphA-3*

Para realizar a purificação da cassette *aphA-3* a partir do produto da digestão procedeu-se primeiramente a uma eletroforese em gel de agarose de 1,5 % (p/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x e corado com Midori Green (Nippon Genetics Europe), sendo sempre aplicado um marcador de peso molecular (GRS Universal Ladder - GRiSP). A corrida decorreu durante 30 minutos a 130 V de forma a separar os produtos da reação de digestão de acordo com o seu tamanho e por fim os géis foram visualizados sob luz ultravioleta (UV) num transiluminador.

Assim sendo, prosseguiu-se com a excisão do gel contendo o fragmento com tamanho correspondente à *aphA-3* e posterior purificação utilizando o kit NZYGelPure (NZYtech). A quantificação da cassette foi avaliada pela utilização de um nanoespectrofotômetro.

3.6.2.4. Construção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*

Para levar a cabo o processo de recombinação homóloga de forma eficiente, a cassette *aphA-3* tem que ser flanqueada por regiões de DNA homólogas à vizinhança do gene que se pretende eliminar. Desta forma começou por se amplificar por PCR uma região do gene tipo *cmeB* de *A. butzleri* de aproximadamente 400 pares de bases (pb) a jusante do codão de iniciação usando os oligonucleótidos iniciadores *cmeB_A1* e *cmeB_A2*. De seguida usou-se um segundo par de oligonucleótidos iniciadores, *cmeB_B1* e *cmeB_B2* para a amplificação de uma região imediatamente a montante do codão stop (tabela 3). Os fragmentos obtidos correspondem às regiões A e B representadas na figura 4. Aos oligonucleótidos iniciadores *cmeB_A2* e *cmeB_B1* adicionou-se na extremidade 3' um adaptador de aproximadamente 20 pares de bases que hibridiza nas regiões que flanqueiam a cassette de resistência à canamicina no plasmídeo pUC18-K2.

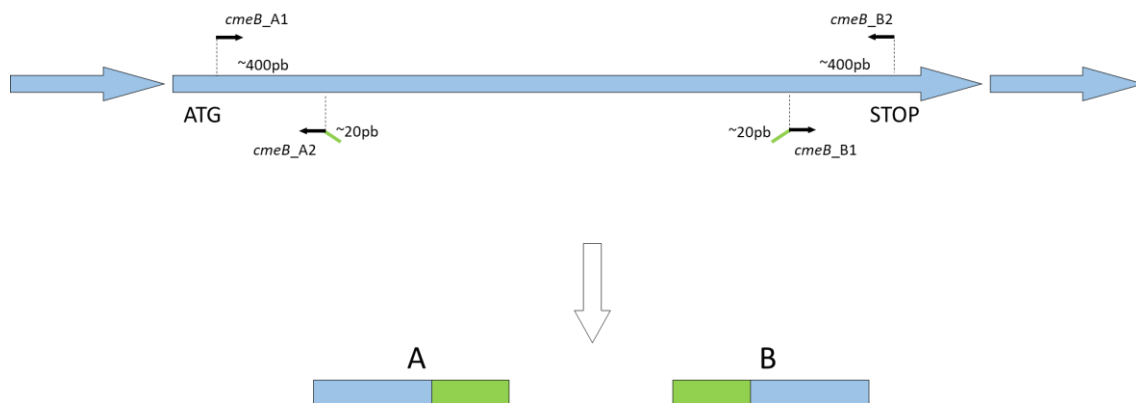


Figura 4 - Representação da amplificação das extremidades de DNA homólogo de aproximadamente 400 pb a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop com um adaptador de aproximadamente 20 pb na extremidade 3' (verde), resultando nos fragmentos A e B respetivamente.

Para a amplificação do fragmento A, efetuou-se uma mistura reacional utilizando 1 μ L do buffer Dream Taq Green Buffer (10x) (Thermo Fisher Scientific), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 0,5 μ M do oligonucleótido iniciador *cmeB_A1* e *cmeB_A2*, 1 μ L de amostra de gDNA da estirpe AB28/11, 0,5 U da enzima Dream Taq DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific) e perfazendo o volume até 10 μ L com água ultrapura (PCR A). Para a amplificação do fragmento B, utilizou-se uma mistura reacional de constituição semelhante, mas usando o par de oligonucleótidos iniciadores *cmeB_B1* e *cmeB_B2* (PCR B).

Tabela 3 - Sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados para as reações de PCR descritas no ponto 3.6.2.4..

Designação do oligonucleótido iniciador	Sequência do oligonucleótido iniciador	Tamanho do oligonucleótido iniciador (pb)
<i>cmeB_A1</i>	ttgaataagggtactactcagg	25
<i>cmeB_A2</i>	<i>Ttattcctcctagttagtcactccaacaccatctactcttgc</i> ¹	22
<i>cmeB_B1</i>	<i>Tacctggaggggaataatgatccattaggaattattggtgcag</i> ¹	23
<i>cmeB_B2</i>	gttcgctctggcttgcaaat	20

¹ A itálico encontra-se representado o adaptador adicionado ao oligonucleótido iniciador de forma a permitir hibridizar nas regiões que flanqueiam a cassette no plasmídeo pUC18-K2.

Depois de efetuadas as misturas reacionais, os tubos de PCR foram incubados num termociclador (T100 Thermal Cycler, BIO-RAD) e desenhou-se o programa de forma a obter a amplificação de cada um dos fragmentos. Iniciou-se o processo com um passo de desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos constituídos por um primeiro passo de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguido de hibridização a 56°C durante 30 segundos e por fim a uma extensão a 72°C durante 1 minuto. Foi realizada uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. De seguida, os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose de 1 % (p/v) em tampão TAE 1x e corado com Midori Green, sendo sempre aplicado um marcador de pesos moleculares GRS Universal Ladder. A corrida decorreu durante 30 minutos a 130 V de forma a separar os produtos da reação de digestão de acordo com o seu tamanho seguido de visualização do gel sob luz UV num transiluminador.

3.6.2.5. Ligação dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*

De forma a construir o fragmento de DNA transformante a introduzir em *A. butzleri*, procedeu-se à junção da cassette com os dois produtos de PCR correspondentes aos flanqueantes (A e B) que lhe conferem homologia com o gene tipo *cmeB* de *A. butzleri* (Figura 5).

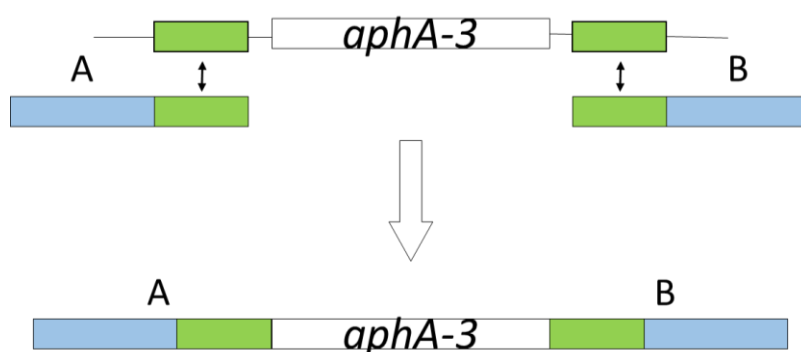


Figura 5 - Representação da união da cassette de canamicina com regiões a jusante do codão de iniciação (A) e a montante do codão stop (B) do gene tipo *cmeB*.

Para isso, efetuou-se uma mistura reacional utilizando 4 µL de Phusion HF Buffer (5x), 0,2 mM de dNTP's, 0,5 µM de oligonucleótido iniciador *cmeB_A1* e *cmeB_B2*, 0,5 µL de cada um dos produtos de PCR A e B efetuados anteriormente, 0,5 µL da cassete purificada anteriormente, 0,4 U de Phusion DNA Polymerase (2 U/µL) (Thermo Fisher Scientific) e perpez-se o volume até 20 µL com água ultra-pura.

À semelhança do procedimento anterior, depois de efetuadas as misturas reacionais, os tubos foram incubados no termociclador e procedeu-se a uma desnaturação inicial a 98°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos compostos por uma desnaturação a 98°C durante 10 segundos, hibridização a 52°C durante 20 segundos e extensão a 72°C durante 1 minuto. Por último, a extensão final durante 10 minutos a 72°C. Seguidamente os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose de 1 % (p/v) em tampão TAE 1x e corado com Midori Green, sendo sempre aplicado um marcador de pesos moleculares GRS Universal Ladder. Neste caso, como a reação de PCR não contém tampão de deposição, este teve de ser adicionado a cada reação de forma a poder-se visualizar a corrida e a aumentar a densidade final da amostra para auxiliar a sua deposição. A corrida decorreu durante 30 minutos a 130 V de forma a separar os produtos da reação de digestão de acordo com o seu tamanho e por fim os géis foram visualizados sob luz UV num transiluminador. O produto de PCR obtido foi purificado através de um kit de purificação de produtos de PCR (NZYGelPure, NZYtech). Por fim, a quantificação do fragmento foi avaliada pela utilização de um nanoespectrofotómetro.

3.7. Transformação natural de *A. butzleri*

De forma a avaliar a função da bomba de efluxo do tipo CmeABC previamente identificada em várias estirpes de *A. butzleri*, construíram-se mutantes onde se inativou o gene tipo *cmeB* utilizando a técnica de mutagénesis insercional. A inativação foi feita por transformação natural através da inserção de um fragmento de PCR contendo uma cassete de canamicina flanqueada por regiões a montante e a jusante internas do gene tipo *cmeB*, obtido de acordo com o ponto 3.6.2.5 (Figura 6).

Assim sendo, de forma a proceder à transformação natural de *A. butzleri* em meio sólido, foram utilizadas as cinco estirpes descritas na tabela 1. As estirpes foram repicadas em placas de BA e incubadas 24 h a 37 °C numa jarra de microaerofilia, numa atmosfera alterada para 6% O₂, ±7,1% CO₂ e 3,6% H₂ através de um modificador de atmosfera (Anoxomat AN2CTS, Mart Microbiology B.V.). Após incubação, as células foram suspensas em 200 µL de meio TSB e espalhadas em novas placas de BA, incubando 4 h a 37 °C em condições de microaerofilia. Colocou-se na mesma placa em duas áreas distintas 40 µL do fragmento obtido no ponto 3.6.2.5. testando-se as concentrações de 1 e 2 µg e 40 µL de produto de PCR do controlo negativo. Procedeu-se a nova incubação por 8 h nas mesmas condições. Posteriormente, a cultura foi

novamente passada para uma nova placa de BA e incubada mais 18 h. Por fim, de forma a selecionar os clones resistentes à canamicina por transformação, transferiu-se a biomassa para uma placa de BA com 20 µg/mL de canamicina e incubou-se por mais 2 a 7 dias até se obterem colónias típicas de *Arcobacter* spp..

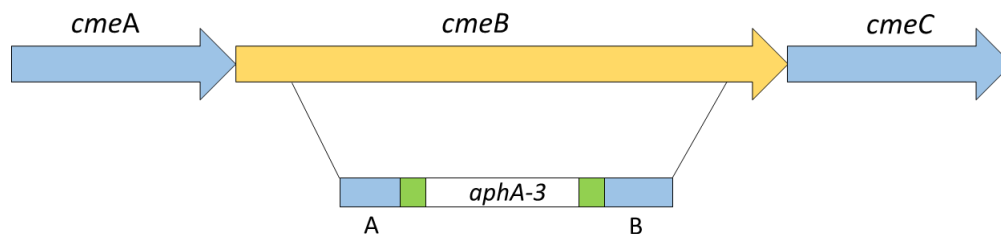


Figura 6 - Representação da inserção do fragmento de PCR contendo uma cassete de canamicina flanqueada por regiões a jusante do codão de iniciação (A) e a montante do codão stop (B) do gene tipo *cmeB* de *Arcobacter butzleri*.

3.8. Verificação da mutagénese

3.8.1. Confirmação da inserção do fragmento

Para confirmar a ocorrência da mutação, começou por se repicar colónias isoladas para novas placas de BA com canamicina para aumento da biomassa. Seguidamente extraiu-se o gDNA de cada um dos clones positivos de acordo com o ponto 3.6.1.. Para uma verificação da inserção do DNA transformante no genoma de *A. butzleri* das estirpes mutantes, utilizou-se a técnica de PCR de forma a amplificar a região específica, utilizando-se o par de oligonucleótidos iniciadores *cmeB_A1* e *cmeB_B2*, de acordo com o descrito no ponto 3.6.2.5.. No entanto, usando o gDNA das estirpes parentais e transformadas como DNA *template*, ajustando a temperatura de hibridização para 52°C de forma a que fosse mais adequada aos oligonucleótidos iniciadores que se utilizaram e aumentando-se o tempo de extensão para dois minutos, dado que este é um fragmento maior. O tamanho dos fragmentos amplificados foi analisado por eletroforese de forma a verificar o tamanho das sequências amplificadas para cada uma das estirpes analisadas. A eletroforese foi feita em gel de agarose de 1 % (p/v) em tampão TAE 1x e corado com Midori Green, sendo sempre aplicado um marcador de pesos moleculares GRS Universal Ladder. A corrida decorreu durante 30 minutos a 130 V de forma a separar os produtos da reação de digestão de acordo com o seu tamanho e por fim os géis foram visualizados sob luz UV num transiluminador. Analisou-se assim o gDNA das estirpes parentais e as respetivas mutantes e verificou-se o tamanho do fragmento amplificado.

3.8.2. Confirmação da expressão do gene

Para confirmar que através da interrupção do gene *cmeB* deixa de haver expressão do mesmo, efetuou-se uma *Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction* (RT-PCR). Esta técnica consiste numa reação com a transcriptase reversa de forma a obter DNA complementar (cDNA) a partir de ácido ribonucleico (RNA), seguida de um PCR.

3.8.2.1. Isolamento de RNA total

Para o isolamento do RNA total a partir das estirpes nativas e mutantes, estas foram inicialmente inoculadas em placas de TSA e incubadas a 30 °C durante 24 h. Posteriormente, fez-se uma suspensão de inóculo em NaCl (0,85%) de forma a obter numa concentração celular bacteriana de 10⁹ células. Esta suspensão foi depois usada para o isolamento do RNA com o kit NZY Total RNA Isolation (NZYTech). Por fim, verificou-se a concentração e pureza de RNA obtida através da utilização de um nanoespectrofotómetro e armazenou-se a -20°C.

3.8.2.2. Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA a partir de RNA, foi utilizada a GRS cDNA Synthesis Mastermix (GRiSP). Começou por se efetuar a mistura reacional adicionando num tubo isento de RNase, 10 µL de GRS RT Mastermix, RNA total, 2 µL de Random Hexaprimer (N6) e água livre de RNA até perfazer 20 µL. De seguida, a mistura foi incubada num termociclador e aquecido pela seguinte ordem: 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C e posteriormente a 4 °C. Seguidamente procedeu-se à quantificação do cDNA através da utilização de um nanoespectrofotómetro e armazenou-se a -20°C.

3.8.2.3. Determinação da expressão genética de *cmeABC*

Ao cDNA obtido anteriormente, aplicou-se a técnica de PCR. Efetuou-se uma mistura reacional utilizando 2,5 µL do buffer Dream Taq Green Buffer (10x), 0,2 mM dNTP's, 0,5 µM do oligonucleótido iniciador *cmeB RTPCR_F1* e *cmeB RTPCR_R1* (Tabela 4), 2,5 µL de cDNA, 1,25 U da enzima Dream Taq DNA Polimerase (5 U/µL) e perfazendo o volume até 25 µL com água ultrapura.

Depois de efetuadas as misturas reacionais, os tubos foram incubados num termociclador e desenhou-se o programa de PCR de forma a obter-se amplificação do gene de interesse. Iniciou-se o processo com uma desnaturação inicial a 95°C durante 3 minutos, desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguido de hibridização a 60°C durante 30 segundos e por fim a uma extensão a 72°C durante 30 segundos. Este processo foi repetido 30 vezes. Por último, a enzima Dream Taq DNA polimerase proporciona a extensão final através da adição das bases complementares, formando uma cadeia complementar. Esse processo acontece a uma temperatura de 72 °C durante 10 minutos. De seguida, verificou-se quais eram as estirpes em

que ocorria expressão do gene por eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) a 130 V durante 30 minutos.

Tabela 4 - Sequências dos oligonucleótidos iniciadores usados para as reações de RT-PCR descritos no ponto 3.8.2.3..

Designação do oligonucleótido iniciador	Sequência do oligonucleótido iniciador	Tamanho do oligonucleótido iniciador (pb)
<i>cmeB</i> _RTPCR_F1	tggaaatggacaaaatggtg	20
<i>cmeB</i> _RTPCR_R1	tccaagccctggaatagaag	20

3.9. Determinação das curvas de crescimento das estirpes naturalmente mutáveis e respetivos mutantes

Para observar se a mutação induzida provoca alterações no crescimento bacteriano, realizou-se a determinação das curvas de crescimento das estirpes mutantes e respetivas estirpes nativas. As estirpes cresceram 24 h em placas de TSA a 30 °C e foram posteriormente usadas para iniciar uma cultura em TSB com uma DO_{620nm} inicial de 0,05, a qual foi incubada a 30 °C com agitação (100 rpm). Foram recolhidas amostras de 2 em 2 horas para leitura da DO_{620nm} até ser atingida a fase estacionária, recolhendo-se uma última amostra às 24 h. Por fim, analisou-se os resultados através da construção das curvas de crescimento da DO_{620nm} em função do tempo.

3.10. Ensaios de acumulação de Brometo de Etídio

De forma a observar se a mutação por interrupção do gene *cmeB* altera a acumulação intracelular de compostos, foi analisada a acumulação do fluorocromo EtBr. Para isso, as estirpes nativas e respetivas mutantes cresceram 24 h em placas de TSA e o inóculo foi posteriormente usado para iniciar uma cultura em TSB com uma DO_{620nm} inicial de 0,05, a qual foi incubada a 30 °C com agitação (100 rpm) e prolongada até que o crescimento exponencial previamente determinado através das curvas de crescimento fosse atingido. De seguida, as células foram recolhidas por centrifugação a 13500 xg durante 6 minutos e foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e novamente centrifugadas a 13500 xg durante 6 minutos. Por fim, as células foram ressuspensas em PBS a uma DO_{620nm} de aproximadamente 0,2.

Após uma determinação prévia da CMI do EtBr de cada uma das estirpes estudadas de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.4., testou-se duas concentrações subinibitórias de EtBr, de 1 e 2 µg/mL. Para isso, numa microplaca de 96 poços preta de fundo claro para

fluorescência (Greiner Bio-one), foi adicionada a suspensão celular para um volume final de 100 µL, a qual se incubou 30 °C durante 10 minutos. O EtBr foi adicionado imediatamente antes do início da medição da fluorescência, a qual foi lida durante 37 min em intervalos de 1 minuto, usando um fluorímetro leitor de microplacas (excitação 530 nm e emissão 600 nm). Estes ensaios foram realizados em duplicado; três vezes independentes. Como controle de autofluorescência celular, foram utilizados poços com 100 µL de suspensão celular.

Por fim, de modo a determinar o efeito do inibidor de bomba de efluxo CCCP, realizou-se um ensaio semelhante ao anterior, ao qual foi adicionado o inibidor de bombas de efluxo CCCP numa concentração de 20 µg/mL aos 7 minutos de leitura, ajustando-se previamente os volumes a adicionar em cada poço.

3.11. Análise bioinformática do gene tipo *cmeB* e previsão da estrutura da proteína tipo CmeABC de *A. butzleri*

Foram realizadas pesquisas na base de dados BLASTP (NCBI) para determinar homólogos de proteína codificada pelo gene *cmeB* presente no genoma de *A. butzleri*. Para isso, realizaram-se alinhamentos com géneros pertencentes à família *Campylobacteraceae* e organismos modelo, de forma a determinar quais os microrganismos que apresentavam uma maior identidade para esta proteína. Seguidamente, utilizou-se um software de previsão do tipo de proteína, Batch Web CD-Search tool (NCBI). Determinou-se a provável estrutura secundária da proteína, usando um software de previsão de estruturas de proteínas, Protean (Plasterer, 2000). A realização do alinhamento das sequências das estirpes de *A. butzleri* utilizadas no decorrer deste estudo, para determinar as diferenças entre elas, foi efetuada utilizando o software MEGA7.

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1. Suscetibilidade de *A. butzleri* aos antimicrobianos

O aumento da resistência de *A. butzleri* a vários grupos de antimicrobianos, juntamente com a falta de conhecimento acerca dos seus mecanismos de resistência, dá relevância ao estudo destes mecanismos. Assim com o intuito de perceber o papel das bombas de efluxo na resistência antimicrobiana em *A. butzleri*, neste trabalho, começámos por analisar a CMI de cinco estirpes de *A. butzleri* obtidas de origens distintas (Tabela 5) para os antibióticos tetraciclina, ciprofloxacina, ampicilina, cefotaxima, eritromicina, gentamicina, cloranfenicol e canamicina. Definimos os pontos de corte para *A. butzleri* de forma a caracterizar cada uma das estirpes como suscetível ou resistente a cada um dos antibióticos. Uma vez que para *A. butzleri* não se encontram definidos pontos de corte de suscetibilidade ou resistência, os valores utilizados para definir resistência a um antibiótico foram os estabelecidos para as espécies *C. jejuni* e *C. coli* seguindo os critérios do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2017); na ausência desses, seguindo os critérios do *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CASFM 2016) ou *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS, 2011). Na ausência de valores referenciados para *Campylobacter* spp. foram utilizados os determinados para *Enterobacteriaceae* (EUCAST 2017).

Pela análise da tabela 5, verifica-se que de entre as estirpes de *A. butzleri* estudadas, nenhuma apresenta resistência à gentamicina demonstrando um maior potencial antimicrobiano deste antibiótico, tal como verificado em estudos anteriores. As estirpes CR113-2 e DQ40A1 apresentaram-se como suscetíveis a todos os antibióticos estudados, à exceção da cefotaxima. Este foi o antibiótico que demonstrou ter menor efeito na inibição do crescimento de *A. butzleri*, sendo que todas as estirpes estudadas lhe são resistentes. Foi para a estirpe AB28/11, recolhida a partir da pele de pescoço de carcaça de frango num matadouro, que se verificou resistência a um maior número de antibióticos, tendo sido o seu crescimento inibido apenas pela gentamicina. São as estirpes AB28/11 e CR114-3 que exibem um maior perfil individual de resistência, apresentando-se como multirresistentes, sendo que a estirpe AB28/11 apresenta uma CMI para a ciprofloxacina 32 vezes superior ao ponto de corte definido para este antibiótico. Também a estirpe CR64-1 demonstrou um perfil de multirresistência, sendo de salientar que todas as estirpes que demonstraram um perfil de multirresistência foram obtidas a partir de aves de capoeira.

Tabela 5 - Concentração mínima inibitória dos antibióticos testados contra as estirpes de *Arcobacter butzleri* em estudo.

Estirpes	CMI (µg/mL)						
	TET	CIP	AMP	CTX	ERY	GEN	CHL
AB28/11	8	32	128	64	16	2	64
CR64-1	4	0,5	32	32	32	2	16
CR113-2	2	0,06	16	16	2	1	8
CR114-3	4	8	256	64	4	2	8
DQ40A1	1	0,06	8	16	2	1	8
Ponto de corte de Resistência ¹ (µg/mL)	>2 ^{a)}	>0,5 ^{a)}	>16 ^{c)}	>2 ^{b)}	>8 ^{a)}	>2 ^{c)}	>32 ^{d)}

¹ Uma vez que para *A. butzleri* não se encontram definidos pontos de corte de suscetibilidade ou resistência, os valores utilizados para definir resistência a um antibiótico foram os estabelecidos para a) *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* ou b) *Enterobacteriaceae* segundo os critérios do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 2017); ou na ausência desse os relativos a c) *Campylobacter jejuni* seguindo os critérios do *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CASFM 2016); ou os determinados para d) género *Campylobacter* segundo o *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS, 2011).

As bombas de efluxo são um sistema de resistência a antimicrobianos descrito em diversos microrganismos, que atuam por extrusão destes compostos para o espaço extracelular. A existência de bombas de efluxo do tipo RND está descrita para diversos microrganismos, como é o caso da bomba de efluxo CmeABC em *Campylobacter* spp., responsável pela extrusão de diferentes compostos, incluindo antibióticos e desinfetantes. É sabido que os inibidores de bombas de efluxo apresentam um papel na inibição da bomba CmeABC (Martinez and Lin, 2006). Com base na análise do genoma completo de várias estirpes de *A. butzleri* (n=20), foi prevista a existência de pelo menos uma possível bomba de efluxo tipo CmeABC no genoma desta bactéria. Assim o estudo dos inibidores de bombas de efluxo é relevante para que se consiga compreender como ocorre a resistência aos antimicrobianos e identificar e caracterizar os sistemas de efluxo que conferem resistência aos mesmos. Os EPIs caracterizam-se por aumentarem a acumulação de fármacos dentro da célula bacteriana através do bloqueio das bombas de efluxo, aumentando a suscetibilidade bacteriana aos antimicrobianos (Hannula and Hänninen, 2008; Mavri and Možina, 2013). Desta forma prevê-se que com a utilização de EPIs leve a uma diminuição da CMI dos antimicrobianos.

O CCCP é um inibidor desacoplador de protões, que interfere com a força motriz de protões funcionando como bloqueador de energia, reduzindo o gradiente eletroquímico transmembranar e inibindo as bombas de efluxo movidas por gradientes de iões de hidrogénio (Pumbwe and Piddock, 2002; Zhang et al., 2010). Trabalhos de investigação realizados anteriormente demonstraram que o CCCP pode então inibir uma vasta gama de bombas de efluxo de diversas famílias que sejam dependentes de um gradientes de iões de hidrogénio, restabelecendo a sensibilidade das bactérias aos antibióticos (Zhang et al., 2010).

O inibidor NMP foi descrito pela primeira vez por Bohnert and Kern (2005) num estudo realizado em *E. coli* em que foram identificadas várias arilpiperazinas - derivados da maior classe de ligandos dos recetores de serotonina - capazes de reverter a resistência a múltiplos fármacos por subexpressão de bombas de efluxo nesta bactéria (Bohnert and Kern, 2005). São vários os estudos realizados tendo como base a concentração intracelular de antimicrobianos, em que o NMP demonstra aumentar a acumulação intracelular. Entre estes encontram-se as fluoroquinolonas, cloranfenicol e linezolidina (Sun, Deng and Yan, 2014). O NMP foi já testado em várias espécies bacterianas incluindo isolados clínicos, verificando-se que o composto foi eficaz em *Acinetobacter baumannii* e em diferentes bactérias da família *Enterobacteriaceae* (Kourtesi et al., 2013). Apesar de uma possível aplicabilidade na formulação de antibióticos, estes compostos são provavelmente demasiado tóxicos para uso em humanos e animais devido às propriedades antagonistas da serotonina de arilpiperazinas (Mahamoud et al., 2007).

O PAβN é um EPI primeiramente identificado como tendo ação em *P. aeruginosa*, sendo capaz de inibir todos os seus sistemas de efluxo clinicamente relevantes: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM. O seu mecanismo de inibição deve-se a uma competição com o substrato nas bombas RND, podendo reconhecer e ligar-se ao local específico de ligação dos antibióticos. Alternativamente pode também gerar impedimento estérico, reduzindo a possibilidade de ligação do antibiótico (Kourtesi et al., 2013); e provocar alterações na permeabilidade da membrana das bactérias, levando a que seja necessário especial cuidado com a concentração de inibidor que se usa nos ensaios (Lamers, Cavallari and Burrows, 2013). Este tem ainda atividade sobre a bomba de efluxo AcrAB-TolC em vários patogénicos gram-negativos, tais como *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Sun, Deng and Yan, 2014), *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter aerogenes* (Kourtesi et al., 2013) e na bomba de efluxo CmeABC de *Campylobacter* spp. (Quinn et al., 2007).

Com o objetivo de estudar os mecanismos de efluxo de agentes antimicrobianos destes isolados de *A. butzleri*, pudemos então avaliar a influência de bombas de efluxo na resistência aos antimicrobianos pela determinação da CMI na presença de EPIs. Para isso, começámos por determinar a CMI de cada uma das estirpes para os EPIs de forma a utilizarmos concentrações subinibitórias nos ensaios seguintes, para que estes não interfiram com a suscetibilidade celular. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 - Concentração mínima inibitória dos inibidores de bombas de efluxo testados contra as estirpes de *Arcobacter butzleri* em estudo.

Estirpes	CMI ($\mu\text{g/mL}$)		
	CCCP	NMP	PA β N
AB28/11	64	200	80
CR64-1	64	200	80
CR113-2	64	100	20
CR114-3	32	200	80
DQ40A1	32	100	10

Analisando a CMI dos EPIs para cada estirpe apresentada na tabela 6, verificamos que há diferenças na suscetibilidade aos compostos entre estirpes. Utilizaram-se assim concentrações subinibitórias de 1/4x da CMI nos ensaios de determinação do efeito dos EPIs na CMI dos antimicrobianos. Na generalidade, observando os resultados obtidos podemos verificar que há uma diminuição notória da CMI em alguns antibióticos na presença de EPIs (Tabela 7).

Há estudos anteriores que referem as bombas de efluxo como mecanismo principal de resistência às tetraciclinas em bactérias gram-negativas (Poole, 2005). A resistência à tetraciclina em *Helicobacter pylori*, um membro da ordem *Epsilonproteobacteria*, é multifatorial, envolvendo alterações no gene *rRNA 16S* e na permeabilidade da membrana (Jeng et al., 2005). Contudo, este mecanismo não se encontra descrito em *Campylobacter spp.* (Gibreel et al., 2004). Em *A. butzleri* foi possível observar o efeito de dois dos EPIs com diminuições de duas a quatro vezes a CMI, não se observando, no entanto, qualquer papel por parte do PA β N (Tabela 7). Estes resultados sugerem que as bombas de efluxo têm algum papel na resistência de *A. butzleri* à tetraciclina, mas provavelmente as bombas do tipo RND não estarão envolvidas, contudo, este não será o único mecanismo. Um outro mecanismo de resistência à tetraciclina conhecido, é a modificação do alvo da tetraciclina por ligação de tet(O). Este é considerado o maior mecanismo de resistência em *C. jejuni* e *C. coli*, contudo, é sugerido que quando CmeABC e tet(O) são funcionais, o impacto na resistência à tetraciclina é sinérgico (Gibreel, Wetsch and Taylor, 2007; Iovine, 2013). No entanto a presença do gene *tet(O)* não está descrita em *A. butzleri*.

Tabela 7 - Concentração mínima inibitória dos antibióticos testados na presença de inibidores de bombas de efluxo contra as estirpes de *Arcobacter butzleri* estudadas.

Estirpe	Antibiótico	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
		Sem EPI	CCCP	NMP	PA β N
AB28/11	TET	8	8	2	8
	CIP	32	16	16	32
	AMP	128	128	64	32
	CTX	64	32	32	32
	ERY	16	8	8	0,06
	GEN	2	1	2	2
	CHL	64	64	16	8
CR64-1	TET	4	2	2	4
	CIP	0,5	0,25	0,06	0,25
	AMP	32	16	8	16
	CTX	32	32	16	8
	ERY	32	32	8	0,06
	GEN	2	2	2	2
	CHL	16	16	4	4
CR113-2	TET	2	1	1	2
	CIP	0,06	0,015	0,03	0,03
	AMP	16	16	16	16
	CTX	16	8	8	1
	ERY	2	0,125	1	0,125
	GEN	1	1	1	1
	CHL	8	4	4	4
CR114-3	TET	4	4	2	4
	CIP	8	8	8	8
	AMP	256	128	128	128
	CTX	64	32	16	32
	ERY	4	4	1	0,015
	GEN	2	2	2	2
	CHL	8	8	4	2
DQ40A1	TET	1	1	1	1
	CIP	0,06	0,03	0,06	0,03
	AMP	8	2	2	4
	CTX	16	4	4	2
	ERY	2	1	2	<0,03
	GEN	1	1	1	0,5
	CHL	8	4	4	2

Observando os resultados obtidos para o antibiótico ciprofloxacina verificou-se uma diminuição da CMI na presença de pelo menos um dos três EPIs, com exceção da estirpe CR114-3. O efeito do CCCP foi notório na maioria das estirpes, diminuindo duas a quatro vezes a CMI. O efeito do NMP foi semelhante, inibindo duas a oito vezes a CMI para a ciprofloxacina. Já o PAβN reduziu a CMI para metade em três estirpes. O mecanismo de extrusão através de bombas de efluxo está descrito como importante na resistência de bactérias gram-negativas a fluoroquinolonas, contudo, neste caso não se verifica uma redução muito evidente da CMI na presença dos EPIs. Um caso semelhante foi anteriormente relatado em *C. jejuni* onde o EPI PAβN demonstrou um efeito pouco notório na diminuição da CMI das fluoroquinolonas (Martinez and Lin, 2006). É de notar que as duas estirpes resistentes à ciprofloxacina, na presença de EPIs continuam a ser resistentes. Podendo as bombas de efluxo ter algum papel na resistência a esta classe de antibióticos, como indicam os resultados apresentados, a resistência a fluoroquinolonas por *A. butzleri*, nomeadamente ciprofloxacina, pode estar associada a outros mecanismos de resistência. Entre estes mecanismos pode encontrar-se a mutação do gene da *gyrA*, anteriormente descritos para esta espécie, o qual é apontado como o principal mecanismo de resistência às fluoroquinolonas em diversos microrganismos (Abdelbaqi et al., 2007). No caso de *Campylobacter* spp., há dois mecanismos descritos para a resistência às fluoroquinolonas: inativação do alvo e efluxo do antibiótico, havendo evidências de que estes mecanismos poderão funcionar de forma sinérgica (Iovine, 2013). Em *C. jejuni*, foi demonstrado que a bomba de efluxo CmeABC conferia resistência às fluoroquinolonas (Pumbwe and Piddock, 2002) e que este mecanismo em sinergia com mutações ao nível de *gyrA* confere altas taxas de resistência às fluoroquinolonas (Luo et al., 2003). O mesmo poderá acontecer em *A. butzleri*, pelo que o estudo do sinergismo destes dois mecanismos será de importante interesse.

O principal mecanismo de resistência aos antibióticos β-lactâmicos dá-se através das β-lactamases, contudo, as bombas de efluxo também têm sido implicadas nesta resistência. Várias são as bombas de efluxo do tipo RND que têm demonstrado a sua ação na resistência aos β-lactâmicos, como é o caso da bomba de efluxo MexAB-OprM em *P. aeruginosa* (Poole, 2007). Em *C. jejuni*, as bombas de efluxo também apresentam um papel na resistência, sendo a bomba de efluxo CmeABC da família RND que tem um maior papel (Iovine, 2013). No presente estudo em *A. butzleri*, é possível constatar um papel por parte das bombas de efluxo (Tabela 7). Os três EPIs diminuíram entre duas a quatro vezes a CMI da ampicilina, exceto para a estirpe CR113-2 onde não se observou qualquer diminuição e para a AB28/11 onde o CCCP não demonstrou qualquer efeito. Os compostos NMP e PAβN reduziram a CMI de todas as outras quatro estirpes, destacando-se a estirpe CR64-1 que passou de resistente a suscetível à ampicilina através do efeito do NMP. Quanto à cefotaxima, antibiótico ao qual todas as estirpes *A. butzleri* em estudo são resistentes, os três EPIs exerceram efeito em todas as estirpes. Foi para o PAβN que na generalidade se observou uma maior redução da CMI, reduzindo-a até 16 vezes. Contudo, à semelhança do que aconteceu para a ampicilina, neste caso também duas das estirpes passaram de resistente a suscetível pela ação do PAβN.

O papel das bombas de efluxo do tipo RND na resistência aos macrólidos foi anteriormente descrito em diversas bactérias como *P. aeruginosa* (MexAB-OprM, MexCD- OprJ, MexXY/OprM), *Neisseria gonorrhoeae* (MtrCDE), *Campylobacter* spp. (CmeABC), *Burkholderia pseudomallei* (AmrAB-OprA, BpeAB-OprB) e *Acinetobacter* spp. (AdeDE) (Poole, 2007). Em *C. jejuni* e *C. coli*, o mecanismo de resistência mais comum para macrólidos é a mutação no gene alvo rRNA 23S. No entanto, sinergismos entre o efluxo dos fármacos e as mutações, podem conferir um alto nível de resistência destes microrganismos a esta classe de antibióticos (Payot et al., 2006). Do mesmo modo, as bombas de efluxo parecem ter também um papel importante na resistência de *A. butzleri* à eritromicina, uma vez que foi onde se registou a maior diminuição da CMI na presença de EPIs. Foi o PAβN que demonstrou uma maior inibição, atuando em todas as estirpes e provocando uma diminuição da CMI de 256 e 512 vezes para as duas estirpes resistentes (AB28/11 e CR64-1), que passaram a sensíveis. O CCCP diminuiu a CMI à eritromicina de duas a 16 vezes. Já para o NMP houve uma diminuição da CMI da eritromicina entre duas a oito vezes para a maioria das estirpes. Assim sendo, os resultados sugerem um papel relevante das bombas de efluxo do tipo RND na resistência à eritromicina por *A. butzleri*. Estes resultados são corroborados por dados obtidos em *C. jejuni* num estudo levado a cabo por Martinez e Lin (2006) onde analisaram o efeito do inibidor PAβN na CMI de antimicrobianos conhecidos como substratos da bomba de efluxo CmeABC. Através da análise de estirpes de várias origens verificou-se que a inibição do sistema de efluxo de CmeABC pelo PAβN aumentou significativamente a suscetibilidade de *C. jejuni* a diferentes antibióticos, incluindo a eritromicina, um dos fármacos de escolha para o tratamento da campilobacteriose humana. No caso específico da eritromicina, o PAβN diminuía a CMI de eritromicina entre duas a 512 vezes em todos os isolados. Com a construção de um mutante isogénico para *cmeB*, foi possível verificar que os níveis de inibição por PAβN foram menos notórios, indicando assim que o efeito do EPI é principalmente dependente do sistema CmeABC (Martinez and Lin, 2006).

A resistência a aminoglicosídeos por influência de bombas de efluxo do tipo RND foi já descrita para algumas bactérias, como *P. aeruginosa* (MexXY-OprM), *B. pseudomallei* (AmrAB-OprA, BpeAB-OprB), *A. baumannii* (AdeABC), *E. coli* (AcrAD-TolC), *Acinetobacter* spp. (AdeDE) e *Francisella tularensis* (Poole, 2007). Em *Campylobacter* spp., a resistência mediada por bombas de efluxo não é completamente clara e não aparenta ser significativa quando comparado com o efeito provocado pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (Iovine, 2013). O mesmo acontece em *A. butzleri* neste estudo. O efeito dos inibidores das bombas de efluxo relativamente à gentamicina não têm efeito notório, havendo uma diminuição máxima da CMI deste antibiótico para metade em apenas duas estirpes, e apenas com um dos EPIs.

Para o cloranfenicol observa-se na generalidade um efeito na redução da CMI de duas a quatro vezes na presença de inibidores, sendo que foi o PAβN que provocou maiores níveis de inibição. Também se observou que a única estirpe resistente (AB28/11) se tornou suscetível na presença quer de NMP quer de PAβN. Miller *et al.* (2007) sugeriu que a resistência de *A. butzleri* ao cloranfenicol estaria associada à presença do gene *cat*, que codifica uma cloranfenicol O-

acetiltransferase, contudo, através dos resultados obtidos podemos verificar que as bombas de efluxo terão também um papel na resistência deste antibiótico. Semelhantemente ao que é possível observar neste estudo em *A. butzleri*, o sistema de efluxo CmeABC de *C. jejuni*, tem também um papel na resistência ao cloranfenicol (Pumbwe and Piddock, 2002).

Relativamente aos sais biliares, estes são antimicrobianos naturais, produzidos no fígado dos hospedeiros de forma a criarem uma barreira contra as bactérias invasoras do trato intestinal. Dado isto, as bactérias entéricas ao longo da sua evolução desenvolveram múltiplos mecanismos de adaptação ao habitat contendo biliar de forma a conseguirem sobreviver no hospedeiro. O principal mecanismo envolvido na resistência biliar é a extrusão destes através das bombas de efluxo (Lin et al., 2005).

Quando avaliámos a suscetibilidade das estirpes estudadas aos sais biliares (Tabela 8), todas as estirpes apresentaram CMI variáveis, dependendo do sal biliar, sendo a estirpe CR113-2 que apresenta menores valores de CMI. Por sua vez, são as estirpes CR64-1 e CR114-3 que apresentam menor suscetibilidade, sendo ambas originárias de carne de aves de capoeira. Na generalidade, é para o colato de sódio que se observam valores da CMI mais baixos.

Ao estudar o efeito dos EPIs na CMI do colato de sódio e do desoxicolato de sódio, observou-se, de forma global, uma diminuição da CMI pelos três inibidores de bombas de efluxo. O CCCP e o NMP provocaram reduções da CMI entre duas a oito vezes, já o PAβN diminuiu entre duas a 512 vezes a CMI de quase todas as estirpes. Observando em particular o comportamento da estirpe DQ40A1 verifica-se que não houve alteração da CMI do desoxicolato de sódio na presença de nenhum dos EPIs. Estes resultados demonstram que as bombas de efluxo desempenham um papel na resistência de *A. butzleri* aos sais biliares, corroborando estudos noutros patogénicos entéricos, como por exemplo, em *C. jejuni* (Lin et al., 2003). Também em *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Vibrio cholerae*, a bomba de efluxo AcrAB-TolC (um homólogo da bomba CmeABC) contribui para a resistência biliar (Lin et al., 2005). Contudo, em *A. butzleri* este não será o único mecanismo de resistência associado a estes compostos, mas apresenta um papel relevante.

Tabela 8 - Concentração mínima inibitória dos sais biliares na ausência e presença de inibidores de bombas de efluxo para as diversas estirpes de *Arcobacter butzleri* estudadas.

Estirpe	Sais Biliares	CMI ($\mu\text{g/mL}$)			
		Sem EPI	CCCP	NMP	PA β N
AB28/11	SB	32	ND	ND	ND
	SC	8	4	8	1
	SD	16	8	16	8
CR64-1	SB	16	ND	ND	ND
	SC	4	4	2	1
	SD	32	16	4	0,06
CR113-2	SB	4	ND	ND	ND
	SC	4	1	1	1
	SD	8	1	2	0,5
CR114-3	SB	4	ND	ND	ND
	SC	2	1	2	1
	SD	32	4	4	0,06
DQ40A1	SB	16	ND	ND	ND
	SC	4	2	1	2
	SD	16	16	16	16

ND - não determinado.

Os biocidas têm uma atividade fulcral no controlo da disseminação de microrganismos, sendo estes usados na desinfecção e limpeza diária de matadouros, locais de processamento alimentar, bem como de ambientes hospitalares (Schweizer, 2001). Os bisfenóis são uma classe de compostos que exibem um amplo espectro de atividade antimicrobiana. Triclosan (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol) ou Irgasan como é conhecido comercialmente, é um antibacteriano pertencente a esta classe de amplo espectro usado na composição de diversos artigos tais como cosméticos, sabões, pastas dentífricas (Schweizer, 2001; Dinwiddie, Terry and Chen, 2014) e biocidas (Webber and Piddock, 2003). Irgasan, em conjunto com os antibióticos, partilham os mesmos mecanismos de resistência e considera-se ainda que, em certos casos, os biocidas possam compartilhar os seus alvos com os antibióticos (Schweizer, 2001). Também a sua ampla utilização poderá levar a uma pressão seletiva nas bactérias, levando a crer que o uso generalizado de Irgasan pode conferir resistência cruzada aos antibióticos e diminuir a ação dos mesmos (Schweizer, 2001). Estes podem, portanto, estar relacionados com o número crescente de resistências de algumas bactérias aos antibióticos e biocidas. No entanto, apesar de haver evidências científicas de que o uso generalizado de biocidas induz resistência aos mesmos, não há provas conclusivas de que isso também determinará um aumento da resistência aos antibióticos (Oggioni et al., 2013). Desta forma, determinou-se a CMI do Irgasan para as estirpes

de *A. butzleri* em estudo e o papel dos EPIs na CMI de forma a perceber se as bombas de efluxo têm um papel na resistência de *A. butzleri*.

Analisando a tabela 9 podemos verificar que são necessárias quantidades elevadas deste antimicrobiano para que se verifique um efeito sobre as estirpes, quando comparamos aos antibióticos. Neste trabalho é de notar que as estirpes provenientes de animais e da superfície de um equipamento de uma queijaria são as que demonstram maior resistência ao desinfetante em estudo. Sendo este um produto utilizado na desinfecção de estabelecimentos de processamento e manipulação alimentar, os resultados obtidos tornam-se preocupantes, pois as concentrações utilizadas nos produtos de limpeza podem não ser totalmente eficazes.

À semelhança dos resultados anteriores, também para o Irgasan foi o PAβN que provocou uma maior diminuição da CMI, tendo reduzido a CMI de todas as estirpes, até menos 128 vezes da CMI. A importância do efluxo na resistência ao Irgasan foi anteriormente descrita em *Campylobacter spp.*, bem como em *P. aeruginosa* e *Salmonella spp.*, onde mutações de inibição da expressão dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e AcrB-TolC, respetivamente, diminuíram significativamente a resistência a este composto (Mavri and Možina, 2012).

Tabela 9 - Concentração mínima inibitória do Irgasan na ausência e presença de inibidores de bombas de efluxo para as diversas estirpes de *Arcobacter butzleri* estudadas

Estirpe	Desinfetante	CMI (µg/mL)			
		Sem EPI	CCCP	NMP	PAβN
AB28/11	IRG	>128	>128	>128	16
CR64-1	IRG	>128	64	32	8
CR113-2	IRG	32	2	16	1
CR114-3	IRG	128	32	16	1
DQ40A1	IRG	64	64	32	4

De forma geral, a utilização de EPIs em *A. butzleri* demonstra ter efeito, sendo o PAβN, um inibidor de sistemas de efluxo do tipo RND, o inibidor globalmente mais eficaz. Desta forma, esta poderá vir a ser uma nova abordagem para combater a resistência a antibióticos, prevenir e controlar a infeção por *A. butzleri* em humanos e reservatórios de animais, à semelhança do que tinha sido anteriormente descrito para *Campylobacter spp.* (Martinez and Lin, 2006). Sendo o PAβN um inibidor de bombas RND, os resultados sugerem que as bombas de efluxo RND terão um papel relevante na resistência de *A. butzleri*, levando a concluir que globalmente os compostos para os quais esta bomba de efluxo terá um maior efeito em *A. butzleri* serão a eritromicina e o Irgasan, e em alguns casos os sais biliares.

4.2. Análise *in silico* do transportador de membrana RND tipo CmeABC

A família de bombas de efluxo RND inclui vários membros que são relevantes para a resistência a antibióticos em bactérias gram-negativas (Alvarez-Ortega, Olivares and Martínez, 2013) sendo que, tal como foi referido anteriormente, em *Campylobacter* spp. a bomba de efluxo CmeABC está descrita como implicada na resistência aos antibióticos (macrólidos e fluoroquinolonas) (Poole, 2007), sais biliares (Lin et al., 2003) e biocidas (Mavri and Možina, 2012). De acordo com os resultados apresentados na secção 4.1., no caso de *A. butzleri* esta família de bombas de efluxo parece também ter um papel relevante.

Pela análise do genoma de várias estirpes de *A. butzleri*, foi detetada a presença de um operão semelhante ao apresentado para o sistema CmeABC em *Campylobacter* spp.. Através da análise da sequência do gene do transportador tipo *cmeB* presente nas estirpes estudadas, verifica-se que este codifica para uma proteína longa de 1056 aminoácidos, prevendo-se que seja uma proteína exportadora pertencente à superfamília RND (Batch Web CD-Search tool, National Center for Biotechnology Information (NCBI)) (Anexo II).

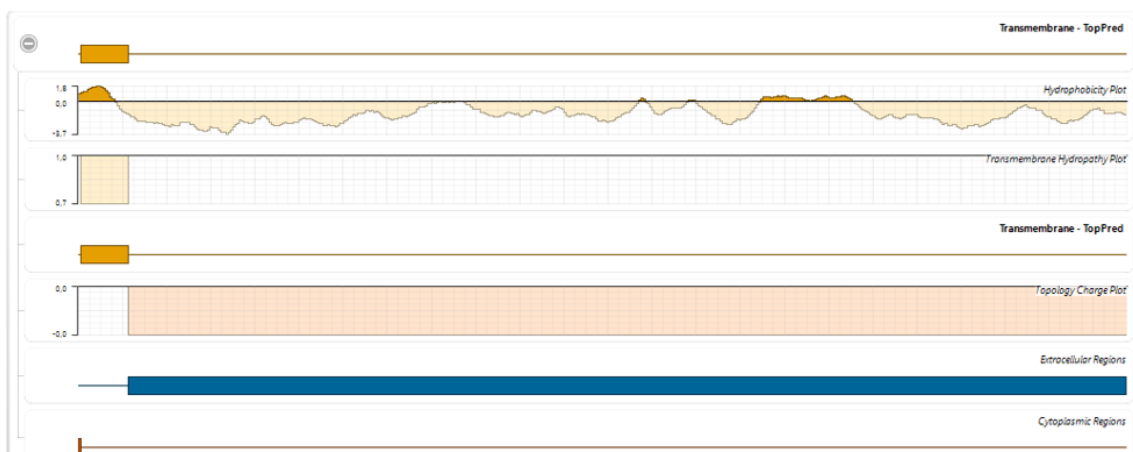
Com a realização de uma pesquisa em BLASTP (NCBI), verificou-se que a proteína tipo CmeB é semelhante a um componente de bombas de efluxo AcrB, exibindo 99% de identidade com outras sequências de transportadores RND em *Arcobacter butzleri* (E-value=0), indicando que este é um domínio conservado e presente em várias espécies e estirpes de *Arcobacter* (Anexo II). Dada a sua vasta distribuição em *Arcobacter* spp., esta torna-se uma proteína de interesse para estudo. Quando comparamos a proteína tipo CmeB presente em *A. butzleri* com os transportadores do tipo RND de outras espécies da família *Campylobacteriaceae* é observável uma identidade de aminoácidos elevada. É de destacar a elevada identidade com algumas bactérias, entre elas, 59% de identidade para *Sulfurospirillum halorespirans* (E-value=0), 40% de identidade para *Helicobacter* sp. (E-value=0) e 39% para *Campylobacter* sp. (E-value=0). É observável ainda uma identidade de 51% com a bomba de efluxo MexB de *P. aeruginosa* (E-value=0) e uma bomba de efluxo de múltiplos componentes de *E. coli* (E-value=0). O tamanho destes transportadores também se assemelha, variando entre 1041 a 1049 aminoácidos (BLAST, NCBI).

Ao alinhar as três proteínas constituintes da bomba de efluxo tipo CmeABC de *A. butzleri* de cada uma das estirpes estudadas (software MEGA7), podemos verificar que existem algumas diferenças nos aminoácidos presentes em cada estirpe (Anexo II). Na proteína CmeA verifica-se uma diferença de 18 em 384 aminoácidos, correspondendo a aproximadamente 5% de disparidade entre sequências (Anexo II). Esta proteína nas estirpes AB28/11 e CR64-1 tem 100% de homologia, já a estirpe DQ40A1 é a que apresenta uma maior diferença. Também a proteína codificada pelo gene *cmeC* apresenta uma baixa variação na sequência de aminoácidos,

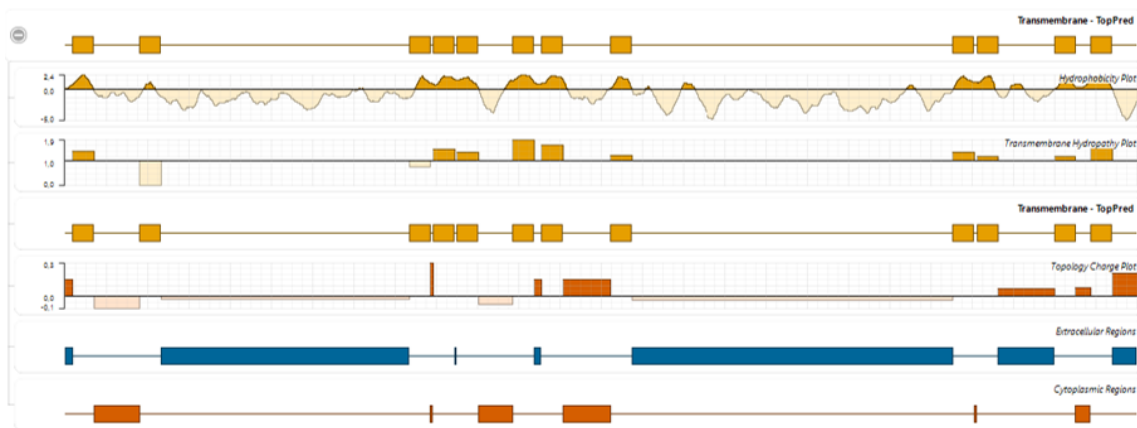
variando 15 em 462 aminoácidos, quando comparando as cinco estirpes em estudo (Anexo II). Quanto à proteína codificada pelo gene *cmeB*, verifica-se uma diferença em 11 dos 1056 aminoácidos que constituem a proteína identificada nas estirpes em estudo (Anexo II). Nenhuma das estirpes apresenta uma completa homologia, sendo a estirpe DQ40A1 que apresenta maior divergência de aminoácidos.

Através da análise pelo software Protean (DNASTAR, Inc), usando como base a sequência consenso de cada proteína considerando as cinco estirpes de *A. butzleri* em estudo, conseguimos ter uma previsão da estrutura das proteínas constituintes do complexo tipo CmeABC identificado nesta bactéria (Figura 7). Por análise dos dados, prevê-se que as proteínas CmeA e CmeC (Figura 7 (A e C)) sejam proteínas extracelulares com um domínio transmembranar. Quanto à proteína CmeB (Figura 7 (B)), verifica-se que esta possui uma estrutura prevista com 12 domínios transmembranares, como é tipicamente encontrado em transportadores das famílias MFS ou RND. Esta proteína possui também dois grandes *loops* extracelulares entre os domínios 2-3 e 8-9, sendo que uma característica típica das bombas de efluxo do tipo RND são os *loops* entre os domínios 1-2 e 7-8 (Kumar and Schweizer, 2005).

A



B



C

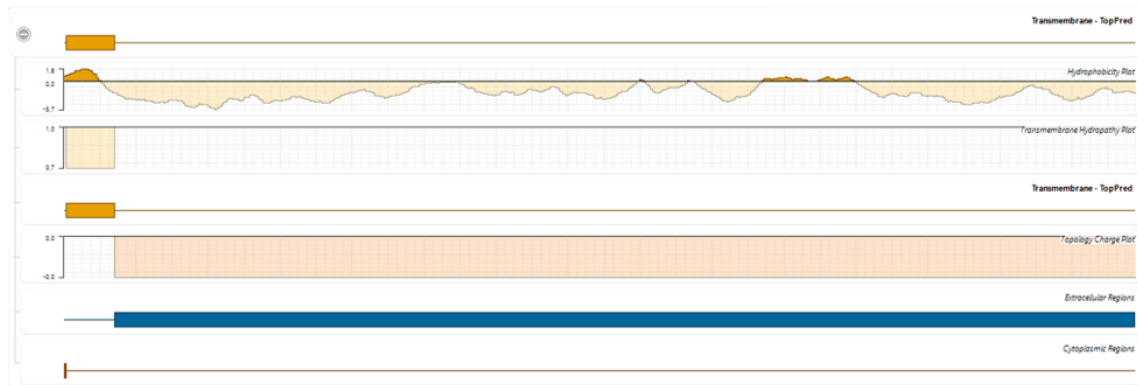


Figura 7 - Previsão da estrutura das proteínas codificadas pelo operão tipo *cmeABC* de *Arcobacter butzleri*. A: proteína CmeA; B: proteína CmeB; C: proteína CmeC. A previsão foi obtida através da análise pelo software Protean (DNASTAR, Inc) usando sequências consenso.

Em geral, a análise *in silico* sugere que o sistema de efluxo tipo CmeABC de *A. butzleri* é, de facto, um sistema de transporte do tipo RND bastante semelhante a outras bombas de efluxo de espécies pertencentes à família *Campylobacteraceae*, bem como a outras espécies portadoras de bombas de efluxo do tipo RND.

4.3. O papel da bomba de efluxo tipo CmeABC

4.3.1. Construção de mutantes

De forma a avaliar a função da bomba de efluxo do tipo CmeABC previamente identificada em várias estirpes de *A. butzleri* na resistência antimicrobiana, o gene tipo *cmeB* foi interrompido por transformação através de mutagénesis insercional. Este gene codifica para uma putativa proteína transmembranar de efluxo do tipo RND, normalmente associada à responsabilidade pela especificidade do substrato, tal como previsto anteriormente através da análise *in silico*.

A transformação é um processo de aquisição de DNA exógeno por bactérias que se pode dar de forma natural, caso estejamos perante bactérias naturalmente competentes, ou por processos químicos de transformação. Bactérias naturalmente competentes têm a capacidade de adquirir espontaneamente fragmentos de DNA presentes no meio em que se encontram. A sua competência é normalmente expressa quando estas se encontram num ambiente de stress, como acontece quando as bactérias são expostas a antibióticos (Wang and Taylor, 1990; Wilson et al., 2003). No decorrer deste trabalho foi utilizada a transformação natural para fazer a inativação do gene de interesse, metodologia esta que ainda não tinha sido apresentada para estudos em *A. butzleri*. Esta foi feita através da utilização de DNA transformante constituído

por uma cassette de resistência à canamicina digerida do plasmídeo pUC18-K2 flanqueada por regiões pertencentes ao início e fim do gene tipo *cmeB*.

Para obter o DNA transformante começou por se proceder à produção e isolamento do plasmídeo pUC18-K2, seguida de digestão do plasmídeo através das enzimas BamHI e KpnI. O produto da digestão foi corrido num gel de eletroforese (Figura 8), do qual se purificou as bandas do gel correspondentes à cassette através de um kit de purificação de gel de eletroforese. Na figura 8 pode observar-se uma primeira banda que representa o plasmídeo não digerido, seguidamente o fragmento maior do plasmídeo digerido e por último o produto de interesse da digestão, a cassette *aphA-3*.

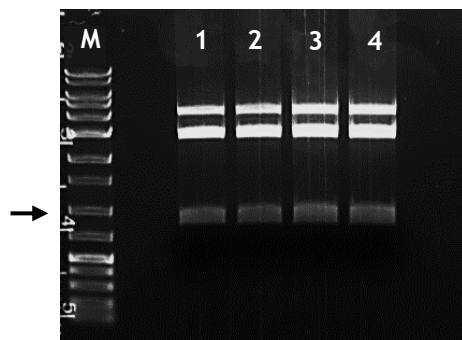


Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos da digestão do plasmídeo pUC18K2 com as enzimas de restrição BamHI e KpnI. M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1-4: produto da digestão do plasmídeo pUC18-K2. A seta representa a localização da cassette de resistência à canamicina, *aphA-3*.

De seguida, amplificaram-se dois fragmentos com regiões a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *cmeB* para hibridização com a cassette *aphA-3* através de PCR (Figura 9). Na figura 9, apresenta-se um gel de eletroforese onde no poço 1 pode observar-se o fragmento obtido por amplificação do gene tipo *cmeB* a jusante do codão de iniciação e no poço 2 o fragmento amplificado da região a montante do codão STOP. No poço 3 pode observar-se a banda correspondente à cassette *aphA-3*.

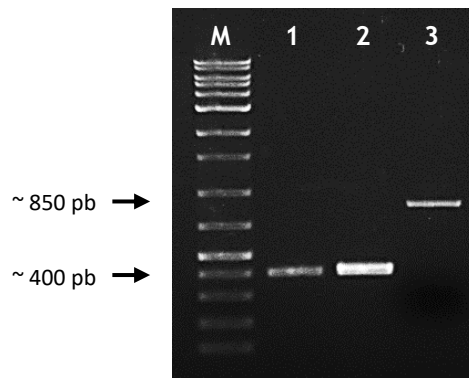


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR correspondentes aos fragmentos de hibridização com a cassette e respetiva cassette. M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1 e 2: produtos de PCR correspondentes aos fragmentos hibridizantes com a cassette relativos ao PCR A e B, respetivamente; 3: cassette *aphA-3*.

Novamente através de PCR, procedeu-se a uma junção dos fragmentos de hibridização com a cassette, originando o fragmento de DNA transformante constituído por uma cassette de resistência à canamicina flanqueada por regiões a montante e a jusante no interior do gene *cmeB*, obtendo-se assim o fragmento de DNA transformante (Figura 10) com aproximadamente 1638 pb.

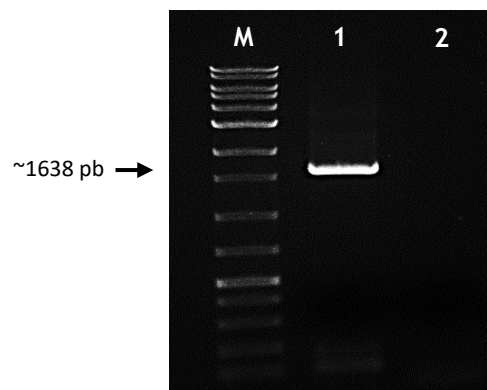


Figura 10 - Eletroforese em gel de agarose representativa do fragmento obtido por junção dos fragmentos de hibridização e a cassette *aphA-3*. M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 1: fragmento obtido por junção dos fragmentos de hibridização dos PCR A e B e a cassette *aphA-3*; Poço 2: controlo negativo do PCR.

O fragmento construído foi então utilizado para testar a transformação natural em *A. butzleri*. Considerando que a utilização de transformação natural não foi previamente descrita para *A. butzleri*, este processo foi testado em todas as estirpes em estudo, considerando a utilização do método descrito na secção dos materiais e métodos (ponto 3.7.), inicialmente sem haver um controlo da concentração de DNA transformante usada. Através destes ensaios nenhuma

estirpe foi transformada. Posteriormente foram testadas concentrações de DNA transformante de 1 e 2 µg, tendo sido transformadas naturalmente as estirpes CR113-2 e DQ40A1. Foi posteriormente confirmada a transformação através da amplificação por PCR a partir do gDNA das estirpes nativas e respectivas mutantes do fragmento de DNA transformante, usando o par de oligonucleótidos iniciadores *cmeB_A1* e *cmeB_B2*. Por eletroforese em gel de agarose, verificou-se que na estirpe mutante o gene *cmeB* está inativado pela cassete, dando origem à amplificação de um fragmento de ~1638 pb (tamanho do DNA transformante inserido), em oposição ao gene intacto que tem um tamanho de ~2988 pb, presente na estirpe não mutada.

Desta forma, verificou-se que *A. butzleri* é uma espécie naturalmente transformável, podendo esta técnica ser utilizada para criar mutantes.

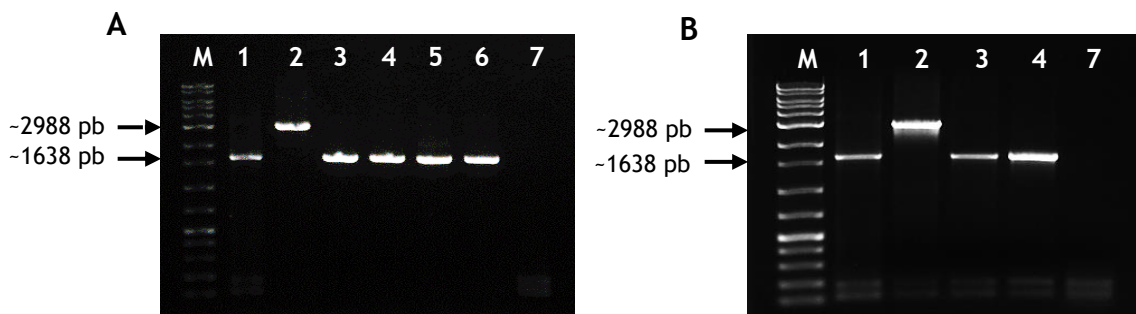


Figura 11 - Representação da eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR obtidos a partir da amplificação do fragmento de DNA transformante, do gDNA das estirpes naturalmente mutáveis e respectivas mutantes (A - DQ40A1, B - CR113-2), usando o par de oligonucleótidos iniciadores *cmeB_A1* e *cmeB_B2*. M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 2: fragmento de DNA transformante usado; 3: fragmento amplificado a partir do gDNA da estirpe parental; 3-6: fragmento amplificado a partir do gDNA da estirpe mutante; 7: controlo negativo).

4.3.2. Confirmação da expressão do gene

A expressão do gene *cmeB* nas estirpes parentais e respetivos mutantes foi avaliada utilizando uma reação de RT-PCR. Através da aplicação da reação de transcriptase reversa no RNA mensageiro bacteriano, obteve-se cDNA, permitindo seguidamente verificar a expressão genética por PCR (Madigan et al., 2014). Através de eletroforese das amostras obtidas por RT-PCR foi possível verificar que as estirpes mutantes não expressam o gene tipo *cmeB*. (Figura 12), confirmando a sua inativação pela cassete.

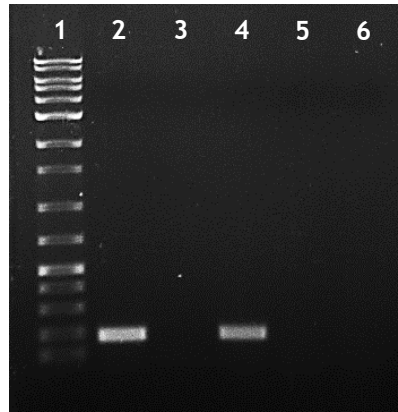


Figura 12 - Eletroforese dos produtos de RT-PCR para verificação da expressão do gene tipo *cmeB*. M: marcador de peso molecular GRS Universal Ladder; 2: amplificação do cDNA da estirpe CR113-2; 3: amplificação do cDNA da estirpe CR113-2Δ*cmeB*; 4: amplificação do cDNA da estirpe DQ40A1; 5: amplificação do cDNA da estirpe DQ40A1Δ*cmeB*; 6: controlo negativo).

4.3.3. Efeito da inativação do gene *cmeB* no crescimento de *A. butzleri*

O efeito da inativação do gene *cmeB* no crescimento bacteriano foi avaliado por realização de curvas de crescimento para as estirpes parentais e respetivos mutantes, verificando-se uma diminuição do crescimento das estirpes mutantes relativamente às nativas (Figura 13). Este facto foi anteriormente constatado em *A. baumannii* aquando de mutações no seu transportador de membrana AbeD que tal como o transportador tipo CmeABC de *A. butzleri* pertence à superfamília RND (Srinivasan et al., 2015). Não há evidências de qual será o motivo pelo qual este decréscimo ocorre, mas poderá dever-se ao facto de esta bomba não ser específica para um determinado substrato, permitindo uma possível extrusão de compostos tóxicos celulares. Ao inibir a sua função de exportação, há uma possível acumulação intracelular de tóxicos, culminando num crescimento mais lento e entrada na fase de morte mais rápida.

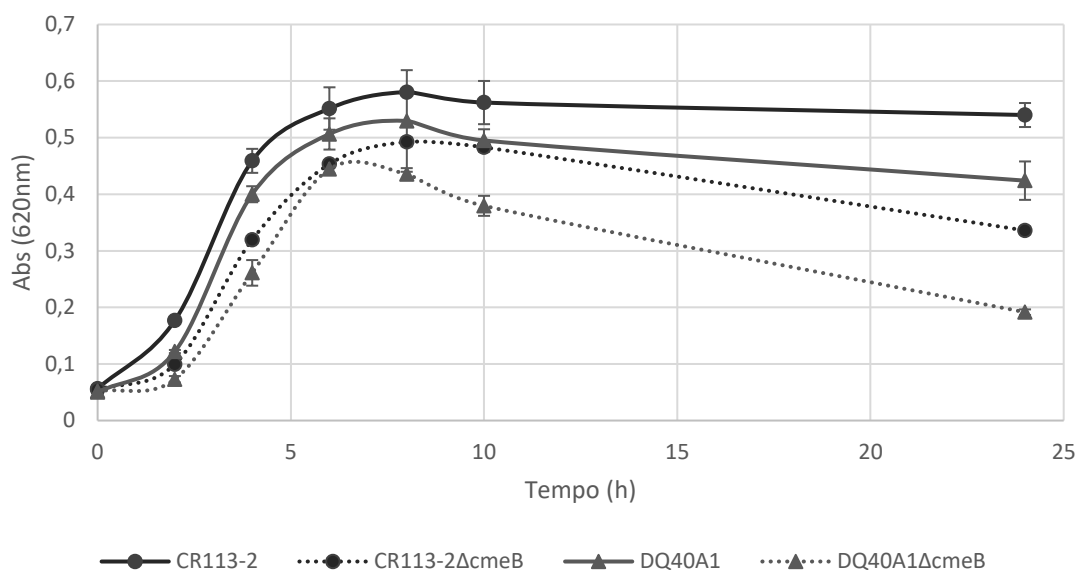


Figura 13 - Perfil de crescimento das estirpes de *Arcobacter butzleri* CR113-2, CR113-2ΔcmeB, DQ40A1 e DQ40A1ΔcmeB

4.3.4. Comparação da concentração mínima inibitória entre as estirpes parentais e mutantes

O efluxo ativo de agentes antimicrobianos é um mecanismo primário através do qual as bactérias podem tornar-se resistentes a diversos fármacos. De forma a determinar o contributo do sistema tipo CmeABC para a multirresistência de *A. butzleri*, testou-se a suscetibilidade das estirpes nativas e mutantes a antibióticos e outros compostos antimicrobianos. Através desta comparação pode avaliar-se o efeito da mutação na resistência de *A. butzleri*, verificando mais especificamente se esta bomba de efluxo desempenha ou não um papel na resistência desta bactéria.

Através da análise da CMI aos diferentes antibióticos em estudo (Tabela 10), pôde observar-se primeiramente um aumento acentuado para a canamicina, compatível com a introdução da cassette de resistência.

Quanto aos restantes antibióticos, pode observar-se uma diminuição na resistência à ciprofloxacina, cefotaxima e eritromicina para ambas as estirpes mutantes quando comparadas às estirpes parentais correspondentes. Tomando em conta os resultados apresentados na tabela 7 com os obtidos nesta secção, verifica-se por análise dos valores de CMI na presença de PAβN para as estirpes parentais e o valor de CMI obtido para as estirpes mutantes que no caso da ciprofloxacina o sistema de efluxo em estudo parece ser o principal responsável, de entre os sistemas RND, pela diminuição de suscetibilidade a este antibiótico. Por outro lado, no caso da

cefotaxima, da eritromicina e do cloranfenicol os resultados indicam que outras bombas de efluxo do tipo RND poderão estar envolvidas na extrusão destes compostos.

A diminuição da CMI da ciprofloxacina foi fracamente afetada pela inativação do gene *cmeB*, o que vai de encontro aos resultados previamente obtidos e ao observado em *C. jejuni* e *C. coli*, onde diversos estudos demonstram uma diminuição pouco notória da CMI com a inativação do gene *cmeB* para este antibiótico (Lin, Michel and Zhang, 2002; Cagliero et al., 2005), mas mais evidenciada para a eritromicina (Iovine, 2013).

Assim, esta bomba em específico pode ter um papel na extrusão dos antibióticos ciprofloxacina, cefotaxima e eritromicina, tendo estes resultados que ser confirmados com o estudo de maior número de estirpes. A discrepância apresentada de resultados entre estirpes (Tabela 10) pode dever-se à existência de outras bombas de efluxo na membrana de *A. butzleri* responsáveis pelo efluxo dos antibióticos estudados.

Tabela 10 - Concentração mínima inibitória dos antibióticos para as estirpes parentais e respectivas mutantes de *Arcobacter butzleri*.

Estirpe	CMI (µg/mL)							
	TET	CIP	AMP	CTX	ERY	GEN	CHL	KAN
CR113-2	2	0,06	16	16	2	1	8	2
CR113-2Δ <i>cmeB</i>	2	0,03	16	8	1	1	8	≥128
DQ40A1	1	0,06	8	16	2	1	8	2
DQ40A1Δ <i>cmeB</i>	1	0,03	4	8	0,5	1	8	≥256

Quando realizado o mesmo tipo de estudo, desta vez para os sais biliares, verificamos que o papel desta bomba de efluxo não é muito evidente (Tabela 11). No caso do desoxicolato de sódio observou-se um aumento da suscetibilidade ao composto apenas para a estirpe mutante DQ40A1Δ*cmeB* a qual sofreu uma diminuição de duas vezes da CMI.

Relacionando estes resultados com os dados obtidos para as CMI na presença de EPIs, verifica-se que provavelmente haverá uma bomba de efluxo do tipo RND envolvida na resistência de *A. butzleri*, contudo, não será a bomba de efluxo em estudo uma vez que a sua inativação não provoca grande alteração na CMI. Portanto, esta discrepância poderá ser devida à existência de outras bombas de efluxo responsáveis pelo transporte dos sais biliares, à semelhança do que foi observado anteriormente para alguns antibióticos. No entanto, estes resultados foram obtidos com apenas duas estirpes, e requerem validação com maior número de estirpes.

Tabela 11 - Concentração mínima inibitória dos sais biliares para as estirpes naturalmente transformáveis e respectivas mutantes de *Arcobacter butzleri*.

Estirpes	CMI ($\mu\text{g/mL}$)	
	CS	DS
CR113-2	4	8
CR113-2 $\Delta cmeB$	4	8
DQ40A1	4	16
DQ40A1 $\Delta cmeB$	4	8

Também para o Irgasan não foi notória qualquer alteração da CMI para as estirpes com o gene do tipo *cmeB* inativado (Tabela 12). Este resultado pode indicar que a bomba de efluxo tipo CmeABC presente em *A. butzleri* não é responsável pela resistência a este composto, contudo, tendo o PA β N um papel marcado na CMI do Irgasan, poderá haver outras bombas de efluxo do tipo RND responsáveis pelo efluxo. Este resultado corrobora o que foi demonstrado para *C. jejuni* e *C. coli*, onde foi a bomba de efluxo CmeDEF que revelou ser responsável pelo efluxo de biocidas (Mavri and Možina, 2012).

Tabela 12 - Concentração mínima inibitória do Irgasan para as estirpes naturalmente transformáveis e respectivas mutantes de *Arcobacter butzleri*.

Estirpes	CMI ($\mu\text{g/mL}$)
	IRG
CR113-2	32
CR113-2 $\Delta cmeB$	32
DQ40A1	64
DQ40A1 $\Delta cmeB$	64

De uma forma geral, quando observamos o comportamento das estirpes de *A. butzleri* aquando da disrupção do gene *cmeB* da bomba de efluxo tipo CmeABC, podemos concluir que este sistema desempenha um papel na resistência a alguns antibióticos, mas existirão outras bombas de efluxo com o mesmo papel.

4.3.5. Ensaios de acumulação de brometo de etídio

O brometo de etídio é um fluorocromo e substrato comum de bombas de efluxo, frequentemente usado para detetar o influxo/acumulação por difusão passiva (Joux and Lebaron, 2000; Martins et al., 2010). A acumulação de EtBr no interior da célula e o consequente aumento de fluorescência detetada é o resultado do equilíbrio dinâmico entre a

difusão passiva para o meio intracelular e o transporte ativo mediado pelas bombas de efluxo no sentido inverso, e a conseqüente ligação do EtBr a componentes presentes no interior das células, tais como DNA e RNA (Jernaes and Steen, 1994). Quando o composto entra na célula liga-se a componentes celulares, e a sua fluorescência aumenta significativamente. Este composto é assim usado como indicador do efluxo devido às suas características de aumento da fluorescência com a entrada na célula e intercalação com os ácidos nucleicos. Usando um detector de fluorescência, é possível identificar as estirpes bacterianas que expressam mais ou menos as suas bombas de efluxo de acordo com a intensidade de fluorescência detetada (Viveiros, Martins et al., 2008; Paixão et al., 2009; Viveiros, Rodrigues et al., 2010).

Em *C. jejuni*, num estudo em que se utilizou esta técnica para analisar a acumulação de EtBr no interior das células, pôde verificar-se que na presença do inibidor de bombas de efluxo CCCP a acumulação do composto no meio intracelular aumentava. Verificou-se assim que a bomba de efluxo multicomponente CmeABC contribui significativamente para o efluxo do brometo de etídio e comprovou-se o papel inibitório do CCCP (Lin, Michel and Zhang, 2002). Sendo que *A. butzleri* apresenta uma bomba de efluxo semelhante à CmeABC de *Campylobacter* spp. é expectável que esta espécie tenha um comportamento semelhante.

Assim sendo, a acumulação do fluorocromo EtBr nas estirpes parentais e respetivas mutantes foi estudada, de forma a observar se a mutação por interrupção do gene tipo *cmeB* altera a sua acumulação intracelular de *A. butzleri* e analisou-se também qual o efeito da adição de CCCP nesse ensaio. Para tal, determinou-se previamente a CMI do brometo de etídio para as estirpes em estudo para que a concentração do composto não interferisse com a viabilidade celular. Pela análise da tabela 13 constatou-se que as estirpes mutantes se podem tornar mais suscetíveis ao EtBr, como ocorre para um dos casos.

Tabela 13 - Concentração mínima inibitória do brometo de etídio para as estirpes de *Arcobacter butzleri* em estudo.

Estirpe	CMI (µg/mL)
	EtBr
CR113-2	16
CR113-2Δ <i>cmeB</i>	16
DQ40A1	8
DQ40A1Δ <i>cmeB</i>	4

Foram testadas duas concentrações subinibitórias diferentes de EtBr (1 e 2 µg/mL) para a estirpe mais suscetível ao EtBr, de forma a ajustar a concentração a usar de acordo com possíveis alterações de integridade celular e com o sinal obtido. Os resultados obtidos

encontram-se na figura 14. Quando comparamos os ensaios onde se usou 1 e 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de EtBr, verifica-se que utilizando a concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ torna-se mais visível a diferença de acumulação entre a estirpe nativa e mutante. Uma vez que o EtBr pode afetar a integridade da membrana, os ensaios que se seguiram foram realizados apenas com a concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de forma a diminuir os riscos de suscetibilidade.

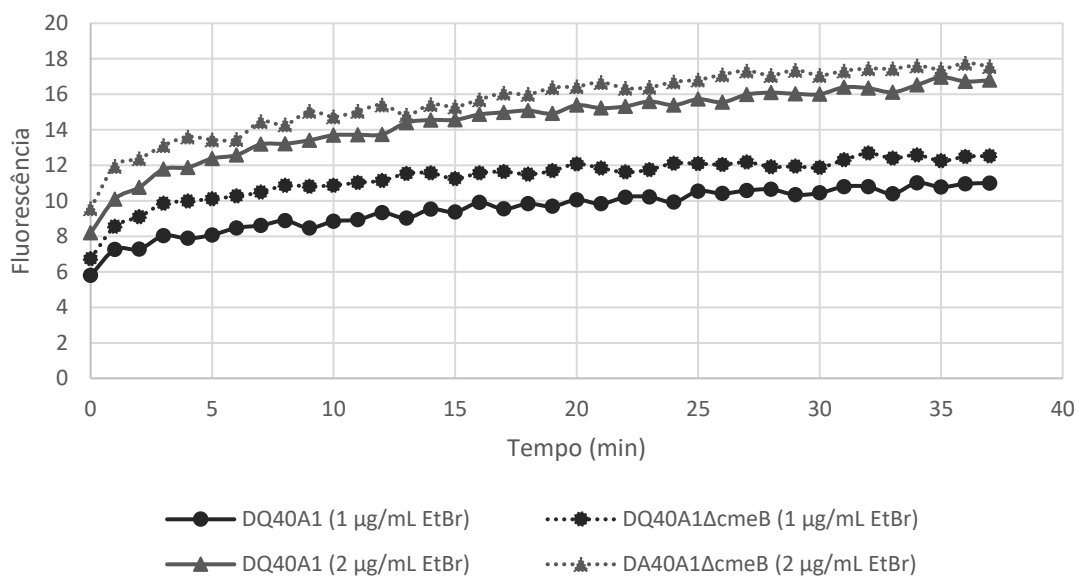


Figura 14 - Otimização da concentração de brometo de etídio a utilizar nos ensaios de acumulação de EtBr

Os resultados mostram uma maior acumulação de EtBr por parte das estirpes mutantes relativamente às nativas (Figura 15 A e B). Isto indica uma correlação entre a interrupção do gene tipo *cmeB* e a acumulação de EtBr, indicando que a bomba de efluxo tipo CmeABC é funcional tendo um papel na extrusão do EtBr. Os resultados obtidos são concordantes com o anteriormente determinado para *C. jejuni*. De facto, em diversos estudos nos quais se estudou a acumulação de EtBr no meio intracelular, pôde verificar-se que mutantes com deleção do gene *cmeB* acumulavam mais EtBr que a estirpe nativa, revelando o papel da proteína CmeB na extrusão do EtBr para o espaço extracelular (Lin, Michel and Zhang, 2002; Pumbwe and Piddock, 2002).

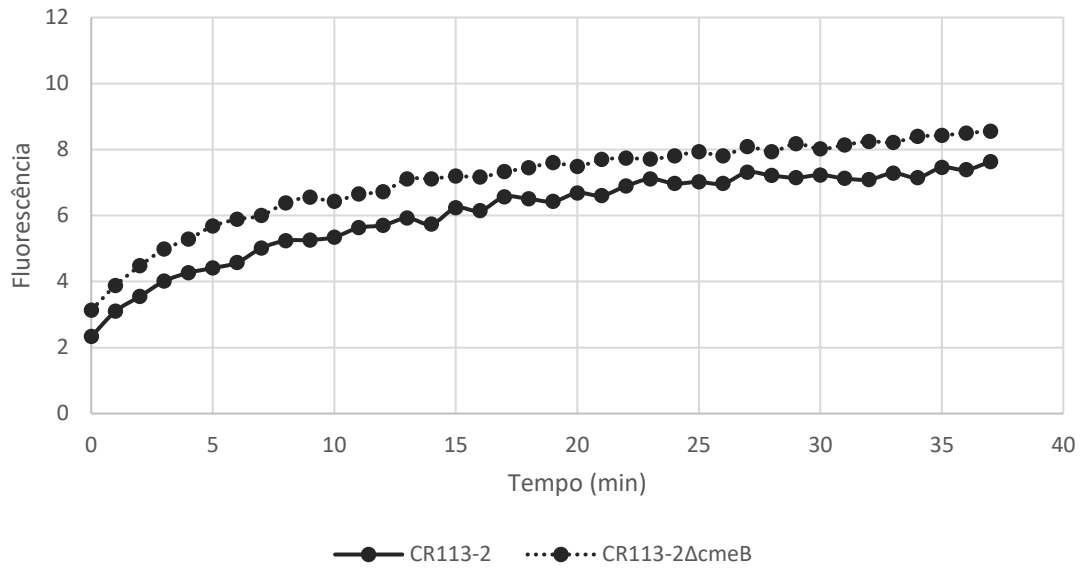
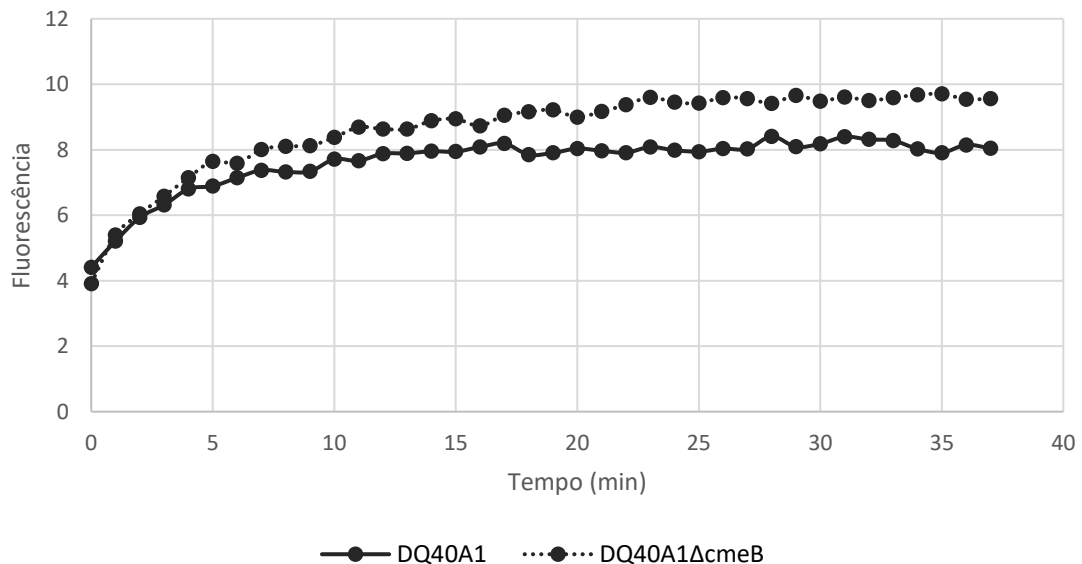
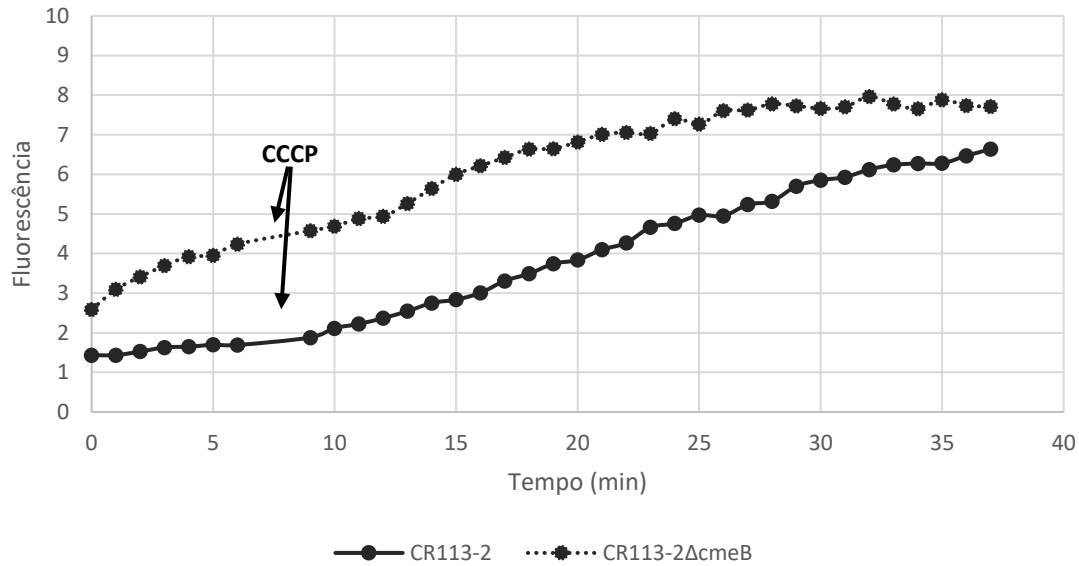
A**B**

Figura 15 - Acumulação de brometo de etídio pelas estirpes parentais e respectivas mutantes (A - estirpe CR113-2 e respetiva mutante; B - estirpe DQ40A1 e respetiva mutante). Os dados apresentados representam a média de três ensaios com uma concentração de brometo de etídio de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Através dos ensaios de adição do inibidor de bombas de efluxo - CCCP pôde observar-se que quando aos 7 minutos se adiciona uma concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CCCP, ocorre um aumento na acumulação para as estirpes nativas e mutantes. Verifica-se que a presença do EPI diminui a diferença na acumulação de EtBr no meio intracelular entre a estirpe nativa e a estirpe mutante. Isto pode ser explicado pelo facto de nas estirpes mutantes ter sido inativada uma das bombas de efluxo, levando a que o CCCP revele um maior efeito na estirpe nativa que contém a bomba de efluxo do tipo RND (Figura 16A e B). Este facto vem uma vez mais realçar

o papel dos EPIs na diminuição da resistência aos antimicrobianos por aumento da acumulação intracelular de antimicrobianos.

A



B

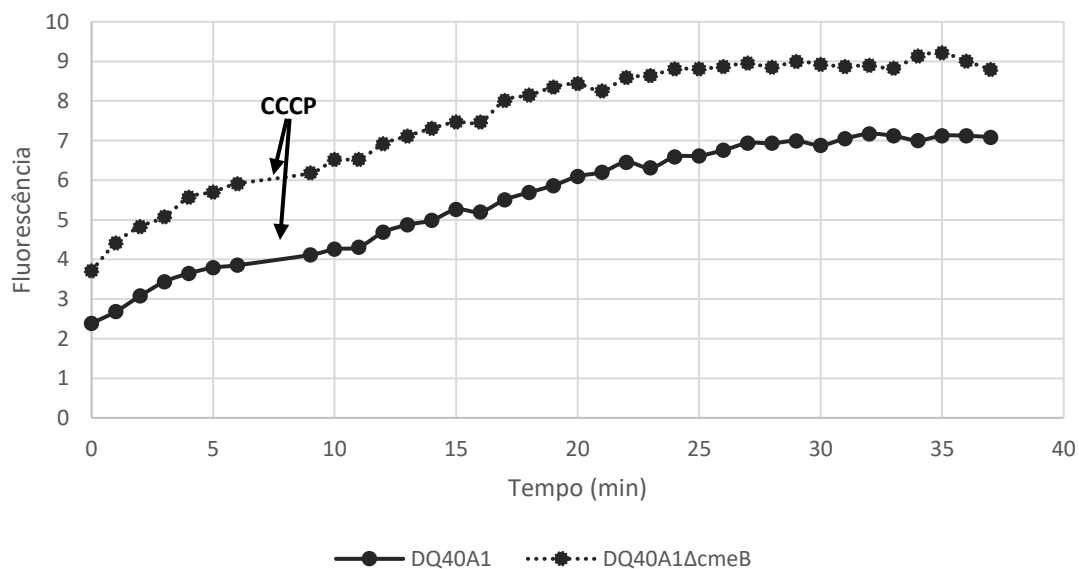


Figura 16 - Efeito do CCCP na acumulação de brometo de etídio pelas estirpes naturalmente transformáveis e respectivas mutantes. Os dados apresentados representam a média de três ensaios com uma concentração de EtBr de 1 µg/mL e 20 µg/mL de CCCP (A - estirpe CR113-2 e respectiva mutante; B - estirpe DQ40A1 e respectiva mutante).

Conclui-se assim que a bomba de efluxo multicomponente tipo CmeABC contribuiu para o efluxo e comprova-se o papel inibitório do CCCP nesta bomba de efluxo de *A. butzleri*.

Capítulo 5 - Conclusões

As taxas de resistência a antimicrobianos em *A. butzleri* têm vindo a aumentar, o que pode contribuir para tratamentos inadequados de infeções graves ou mesmo disseminação de resistência. No entanto, pouco se sabe acerca dos mecanismos envolvidos na resistência deste microrganismo, que é considerado como perigoso para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel de bombas de efluxo na resistência a antimicrobianos de *A. butzleri*, com foco numa bomba de efluxo putativa pertencente à superfamília RND.

Para tal, foi avaliada a influência global dos sistemas de efluxo desta bactéria por utilização de inibidores de bombas de efluxo na alteração da resistência a antibióticos, sais biliares e desinfetante em *A. butzleri*. Verificou-se que nenhuma das cinco estirpes estudadas apresentou resistência à gentamicina, por outro lado todas demonstraram resistência ao antibiótico cefotaxima. Foi ainda notória a capacidade de multirresistência de algumas estirpes, nomeadamente nas originárias de aves de capoeira. Relativamente ao papel das bombas de efluxo na resistência a antimicrobianos por estudos na presença de inibidores destes sistemas, foi observada uma relevância global das bombas de efluxo na resistência a eritromicina, cloranfenicol, β -lactâmicos, sais biliares e Irgasan. O inibidor de bombas de efluxo do tipo RND (PA β N) demonstrou ter um papel mais evidente no aumento de suscetibilidade à eritromicina e Irgasan e em alguns casos a sais biliares, indicando que os sistemas de efluxo tipo RND podem assim ser de relevância na resistência de *A. butzleri* a diversos antimicrobianos.

A análise *in silico* das proteínas codificadas pelo operão tipo *cmeABC* previamente detetado no genoma de *A. butzleri*, confirmou que este codifica para um transportador de múltiplos componentes característicos dos sistemas do tipo RND. Os três genes que constituem o operão tipo *cmeABC* codificam para proteínas altamente conservadas no género *Arcobacter*, que apresentam elevada identidade com outras bombas de efluxo deste tipo presentes em microrganismos como *S. halorespirans* e *P. aeruginosa*, apresentando níveis de identidade acima dos 50%.

Considerando esta informação, de modo a verificar se o sistema de efluxo tipo CmeABC teria ou não influência na resistência de *A. butzleri* construíram-se por transformação natural estirpes mutantes pela inativação do gene codificante da proteína de membrana interna da bomba de efluxo putativa selecionada, *cmeB*. Inicialmente foi possível constatar que algumas estirpes de *A. butzleri* são naturalmente transformáveis, facto este que ainda não tinha sido reportado. Através da análise das alterações na CMI das estirpes mutantes relativamente às nativas foi possível verificar que esta bomba de efluxo tem efetivamente um papel na resistência de *A. butzleri* a alguns antibióticos, nomeadamente ciprofloxacina, β -lactâmicos e

eritromicina. Contudo, este não será o único sistema de efluxo com papel na resistência a antimicrobianos nesta bactéria, podendo o sinergismo com outros mecanismos de resistência ser o responsável pelas elevadas taxas de resistência verificadas para alguns antibióticos.

Em suma, neste trabalho foi demonstrada a influência global dos sistemas de efluxo na resistência de *A. butzleri*, evidenciando a existência de uma bomba de efluxo tipo CmeABC funcional com papel na resistência desta bactéria patogénica a alguns antimicrobianos. No entanto, mais estudos são necessários de forma a obter um melhor entendimento dos mecanismos de resistência deste microrganismo emergente.

Capítulo 6 - Perspetivas futuras

Considerando a importância do estudo dos mecanismos de resistência a antimicrobianos por *A. butzleri* e o papel da utilização de mutantes nestes trabalhos, será relevante compreender e estudar melhor os mecanismos responsáveis pela competência de *A. butzleri* e estabelecer um protocolo de transformação natural.

Quanto aos mecanismos de resistência presentes em *A. butzleri*, que lhes permite resistir a diversos antimicrobianos, é de elevada importância a realização de outros estudos, nomeadamente:

- Alargar o número de estirpes usadas para validação do papel da bomba de efluxo do tipo CmeABC na resistência antimicrobiana.
- Determinar se existem outros sistemas de efluxo presentes em *A. butzleri* associados à sua resistência a antimicrobianos;
- Perceber se existe efetivamente um sinergismo entre diversos mecanismos de resistência, capazes de aumentar a resistência aos antimicrobianos, tais como modificação do alvo e bombas de efluxo do tipo RND.

Bibliografia

Aarestrup, F. M. and Engberg, J. (2001) 'Antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter*', *Veterinary Research*, 32(3-4), pp. 311-321.

Abay, S., Kayman, T., Hizlisoy, H. and Aydin, F. (2012) 'In vitro Antibacterial Susceptibility of *Arcobacter butzleri* Isolated from Different Sources', *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(5), pp. 613-616.

Abdelbaqi, K., Ménard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P. and 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.

Van den Abeele, A.-M., Vogelaers, D., Van Hende, J. and Houf, K. (2014) 'Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008-2013', *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), pp. 1731-1734.

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

Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J. and Handelsman, J. (2010) 'Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments', *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group, 8(4), pp. 251-259.

Alvarez-Ortega, C., Olivares, J. and Martínez, J. L. (2013) 'RND multidrug efflux pumps: What are they good for?', *Frontiers in Microbiology*, 4, pp. 1-11.

Ambler, R. P. (1980) 'The structure of β -lactamases', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 289, pp. 321-331.

Assanta, M. A., Roy, D., Lemay, M.-J. and Montpetit, D. (2002) 'Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces', *Journal of Food Protection*, 65(8), pp. 1240-1247.

Atabay, H. I. and Aydin, F. (2001) 'Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agents', *Letters in Applied Microbiology*, 33, pp. 430-433.

Van Bambeke, F., Glupczynski, Y., Plésiat, P., Pechère, J. C. and Tulkens, P. M. (2003) 'Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy.', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, pp. 1055-1065.

Bay, D. C. and Turner, R. J. (2009) 'Diversity and evolution of the small multidrug resistance protein family', *BMC Evolutionary Biology*, 9(140), pp. 1-27.

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B. and Martinez, J. L. (2016) 'Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants', *Microorganisms*, 4(14), pp. 1-19.

Bohnert, J. A. . and Kern, W. V. (2005) 'Selected Arylpiperazines Are Capable of Reversing Multidrug Resistance in *Escherichia coli* Overexpressing RND Efflux Pumps', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), pp. 849-852.

Borges-Walmsley, M. I., McKeegan, K. S. and Walmsley, A. R. (2003) 'Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs', *The Biochemical Journal*, 376, pp. 313-338.

Brunton, L. L., Chabner, B. A. and Knollmann, B. C. (2007) *Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 12th ed. New York: The McGraw-Hill Companies.

Cagliero, C., Mouline, C., Payot, S. and Cloeckaert, A. (2005) 'Involvement of the CmeABC efflux pump in the macrolide resistance of *Campylobacter coli*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, pp. 948-950.

Cervenka, L. (2007) 'Survival and Inactivation of *Arcobacter* spp ., a Current Status and Future Prospect', *Critical Reviews in Microbiology*, 33, pp. 101-108.

Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trappen, S., De Vos, P. and Figueras, M. J. (2009) '*Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, pp. 1391-1396.

Collado, L. and Figueras, M. J. (2011) 'Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*', *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), pp. 174-192.

Collado, L., Gutiérrez, M., González, M. and Fernández, H. (2013) 'Assessment of the prevalence and diversity of emergent campylobacteria in human stool samples using a combination of traditional and molecular methods', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75, pp. 434-436.

Collado, L., Inza, I., Guarro, J. and Figueras, M. J. (2008) 'Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution', *Environmental Microbiology*, 10, pp. 1635-1640.

Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, J. M. and Jose, M. (2010) 'Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment , at sewage effluents and in a drinking water treatment plant', *Water Research*,. 44, pp. 3696-

3702.

Collado, L., Levican, A., Perez, J. and Figueras, M. J. (2011) 'Arcobacter defluvii sp. nov., isolated from sewage samples', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, pp. 2155-2161.

Diéguez, A. L., Balboa, S., Magnesen, T. and Romalde, J. L. (2017) 'Arcobacter lekithochrous sp. nov., a new species isolated from a molluscan hatchery in Norway', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), pp.1327-1332.

Dinwiddie, M. T., Terry, P. D. and Chen, J. (2014) 'Recent evidence regarding triclosan and cancer risk', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, pp. 2209-2217.

Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L. W. and Alam, M. (2005) 'Arcobacter halophilus sp. nov., the first obligate halophile in the genus Arcobacter', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, pp. 1271-1277.

Doudidah, L., De Zutter, L., Baré, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., Van Den Abeele, A. M., Houf, K. and Houf, K. (2012) 'Occurrence of putative virulence genes in Arcobacter species isolated from humans and animals', *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3) pp. 735-741.

Van Driessche, E. and Houf, K. (2007) 'Discrepancy between the occurrence of Arcobacter in chickens and broiler carcass contamination.', *Poultry science*, 86, pp. 744-751.

Fera, M., Camera, E. La, Carbone, M., Malara, D. and 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., Giannone, M., Gugliandolo, C., La Camera, E., Blandino, G. and Carbone, M. (2003) 'In vitro susceptibility of Arcobacter butzleri and Arcobacter cryaerophilus to different antimicrobial agents', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(5), pp. 488-491.

Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Giannone, M., Camera, E. La and Carbone, M. (2004) 'Detection of Arcobacter spp. in the Coastal Environment of the Mediterranean Sea', *Applied and Environmental Microbiology*, 70(3), pp. 1271-1276.

Fernández, H., Krause, S. and Villanueva, M. P. (2004) 'Arcobacter butzleri an emerging enteropathogen: Communication of two cases with chronic diarrhea', *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, pp. 216-218.

Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. and 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(1), pp. 82-88.

Ferreira, S., Júlio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C. and Oleastro, M. (2014) 'Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients', *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78, pp. 220-225.

Ferreira, S., Oleastro, M. and Domingues, F. (2017) '*Arcobacter* spp. in Food Chain - From Culture to Omics', in *Food borne Pathogens and Antibiotic Resistance*. Ed. Singh, O. V. pp. 73-118. Wiley-Blackwell.

Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M. and 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. and Domingues, F. C. (2016) 'Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review', *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), pp. 364-383.

Figueras, M. J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J. and Yustes, C. (2011) '*Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish', *Systematic and Applied Microbiology*, 34, pp. 105-109.

Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L., Inza, M. I. and Yustes, C. (2011) '*Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels', *Systematic and Applied Microbiology*, 34, pp. 414-418.

Figueras, M. J., Levican, A., Pujol, I., Ballester, F., Quilez, M. J. R. and Gomez-Bertomeu, F. (2014) 'A severe case of persistent diarrhoea associated with *Arcobacter cryaerophilus* but attributed to *Campylobacter* sp. and a review of the clinical incidence of *Arcobacter* spp.', *New Microbes and New Infections*, 2(2), pp. 31-37.

Figueras, M. J., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Levican, A. and Collado, L. (2017) '"*Arcobacter porcinus*" sp. nov., a novel *Arcobacter* species uncovered by *Arcobacter thereius*', *New Microbes and New Infections*, 15, pp. 104-106.

Ge, B., McDermott, P. F., White, D. G. and Meng, J. (2005) 'Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), pp. 3347-3354.

Giacometti, F., Lucchi, A., Manfreda, G., Florio, D., Zanoni, R. G. and Serraino, A. (2013) 'Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* in an artisanal dairy plant in Italy', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), pp. 6665-6669.

- Giacometti, F., Serraino, A., Pasquali, F., De Cesare, A., Bonerba, E. and Rosmini, R. (2014) 'Behavior of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in ultrahigh-temperature, pasteurized, and raw cow's milk under different temperature conditions', *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(1), pp. 15-20.
- Gibreel, A. and Taylor, D. E. (2006) 'Macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), pp. 243-255.
- Gibreel, A., Tracz, D. M., Nonaka, L., Ngo, T. M., Connel, S. R. and Taylor, D. E. (2004) 'Incidence of Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Isolated in Alberta, Canada, from 1999 to 2002, with Special Reference to tet (O)-Mediated Tetracycline Resistance', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(9), pp. 3442-3450.
- Gibreel, A., Wetsch, N. M. and Taylor, D. E. (2007) 'Contribution of the CmeABC Efflux Pump to Macrolide and Tetracycline Resistance in *Campylobacter jejuni* ', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(9), pp. 3212-3216.
- González, A. and 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.
- González, A., Morejón, I. F. B. and Ferrús, M. A. (2017) 'Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain', *Food Microbiology*, 65, pp. 279-283.
- González, I., García, T., Fernández, S. and Martín, R. (2012) 'Current Status on *Arcobacter* Research: An Update on DNA-Based Identification and Typing Methodologies', *Food Analytical Methods*, 5, pp. 956-968.
- Guo, B., Lin, J., Reynolds, D. L. and Zhang, Q. (2010) 'Contribution of the multidrug efflux transporter CmeABC to antibiotic resistance in different *Campylobacter* species.', *Foodborne Pathogens and Disease*, 7, pp. 77-83.
- Hannula, M. and Hänninen, M.-L. (2008) 'Effect of putative efflux pump inhibitors and inducers on the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *Journal of Medical Microbiology*, 57, pp. 851-855.
- Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., Schlüter, O. and 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.
- Houf, K., Devriese, L. A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J.-P., Van Hoof, J. and

Vandamme, P. (2004) 'Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers', *Microbial Drug Resistance*, 10(3), pp. 243-247.

Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S. and Vandamme, P. (2009) '*Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, pp. 2599-2604.

Houf, K., De Smet, S., Baré, J. and Daminet, S. (2008) 'Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*', *Veterinary Microbiology*, 130(1-2), pp. 208-213.

Houf, K. and Stephan, R. (2007) 'Isolation and characterization of the emerging foodborn pathogen *Arcobacter* from human stool', *Journal of Microbiological Methods*, 68(2), pp. 408-413.

Hsu, T.-T. D. and Lee, J. (2015) 'Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water', *Zoonoses and Public Health*, 62, pp. 579-589.

Hsueh, P.-R., Teng, L.-J., Yang, P.-C., Wang, S.-K., Chang, S.-C., Ho, S.-W., Hsieh, W.-C. and Luh, K.-T. (1997) 'Bacteremia caused by *Arcobacter cryaerophilus* 1B', *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2), pp. 489-491.

International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (2002) *Microorganisms in Foods 7 - Microbiological Testing in Food Safety Management*, Springer Science and Business Media.

Iovine, N. M. (2013) 'Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*', *Virulence*, 4(3), pp. 230-240.

Jacob, J., Lior, H. and Feuerpfeil, I. (1993) 'Isolation of *Arcobacter butzleri* from a drinking water reservoir in eastern Germany.', *International Journal of Hygiene and Environmental Medicine*, 193, pp. 557-562.

Jeng, Y. W., Kim, J. J., Reddy, R., Wang, W. M., Graham, D. Y. and Kwon, D. H. (2005) 'Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2), pp. 578-583.

Jernaes, M. W. and Steen, H. B. (1994) 'Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: Influx and efflux of ethidium bromide', *Cytometry*, 17, pp. 302-309.

Joux, F. and Lebaron, P. (2000) 'Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level', *Microbes and Infection*, 2, pp. 1523-1535.

Kabaya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., Abe, M., Katsube,

- Y. and Mikami, T. (2004) 'Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan', *International Journal of Food Microbiology*, 90(3), pp. 303-308.
- Kayman, T., Abay, S., Hizlisoy, H., Atabay, H. I., Diker, K. S. and Aydin, F. (2012) 'Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: Molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated arcobacters', *Journal of Medical Microbiology*, 61, pp. 1439-1444.
- Kiehlbauch, J. A., Baker, C. N. and Wachsmuth, I. K. (1992) 'In vitro susceptibilities of aerotolerant *Campylobacter* isolates to 22 antimicrobial agents', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(4), pp. 717-722.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G. and Wachsmuth, I. K. (1991) '*Campylobacter butzleri* sp. nov. Isolated from Humans and Animals with Diarrheal Illness', *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), pp. 376-385.
- Kim, H. M., Hwang, C. Y. and Cho, B. C. (2010) '*Arcobacter marinus* sp. nov.', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, pp. 531-536.
- Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M. and Kraigher, A. (2008) 'Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a coastal area in Slovenia in June and July 2008', *Eurosurveillance*, 13(7-9), pp. 1-3.
- Kourtesi, C., Ball, A. R., Huang, Y.-Y., Jachak, S. M., Vera, D. M. A., Khondkar, P., Gibbons, S., Hamblin, M. R. and Tegos, G. P. (2013) 'Microbial efflux systems and inhibitors: approaches to drug discovery and the challenge of clinical implementation', *The Open Microbiology Journal*, 7, pp. 34-52.
- Kumar, A. and Schweizer, H. P. (2005) 'Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, pp. 1486-1513.
- Kuroda, T. and Tsuchiya, T. (2009) 'Multidrug efflux transporters in the MATE family', *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1794, pp. 763-768.
- Lamers, R. P., Cavallari, J. F. and Burrows, L. L. (2013) 'The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PA β N) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria', *PLoS ONE*, 8(3), pp. 1-7.
- Lappi, Victoria, Archer, John R., Cebelinski, Elizabeth, Leano, Fe and Besser, John M. (2013) 'An Outbreak of Foodborne Illness Among Attendees of a Wedding Reception in Wisconsin Likely Caused by *Arcobacter butzleri*', *Foodborn Pathogens and Disease*, 10(3), pp. 250-255.

Law, C. J., Maloney, P. C. and Wang, D. (2008) 'Ins and Outs of Major Facilitator Superfamily Antiporters', *Annual Review of Microbiology*, 62, pp. 289-305.

Levican, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, S. J. and Figueras, M. J. (2013) 'Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes', *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), pp. 4951-4957.

Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L. and Figueras, M. J. (2012) '*Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish', *Systematic and Applied Microbiology*, 35(3), pp. 133-138.

Levican, A., Collado, L. and Figueras, M. J. (2013) '*Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage', *Systematic and Applied Microbiology*, 36, pp. 22-27.

Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martínez-Murcia, A., Collado, L. and Figueras, M. J. (2015) '*Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment', *Systematic and Applied Microbiology*, 38, pp. 30-35.

Lin, J., Guo, B., Barton, Y., Maurel, M., Payot, S., Zhang, Q., Al, L. I. N. E. T. and Acteriol, J. B. (2005) 'Bile Salts Modulate Expression of the CmeABC Multidrug Efflux Pump in *Campylobacter jejuni*', *Journal of Bacteriology*, 187(21), pp. 7417-7424.

Lin, J., Michel, L. O. and Zhang, Q. (2002) 'CmeABC Functions as a Multidrug Efflux System in *Campylobacter jejuni*', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), pp. 2124-2131.

Lin, J., Sahin, O., Michel, L. O. and Zhang, Q. (2003) 'Critical Role of Multidrug Efflux Pump CmeABC in Bile Resistance and *In Vivo* Colonization of *Campylobacter jejuni*', *Infection and Immunity*, 71(8), pp. 4250-4259.

Lubelski, J., Konings, W. N. and Driessen, A. J. M. (2007) 'Distribution and physiology of ABC-type transporters contributing to multidrug resistance in bacteria.', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), pp. 463-476.

Luo, N., Sahin, O., Lin, J., Michel, L. O. and 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(1), pp. 390-394.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Bender, K. S., Buckley, D. H. and Stahl, D. A. (2014) *Brock Biology of Microorganisms*. 14th ed. Pearson.

Mahamoud, A., Chevalier, J., Alibert-Franco, S., Kern, W. V. and Pagès, J. M. (2007) 'Antibiotic

efflux pumps in Gram-negative bacteria: The inhibitor response strategy', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, pp. 1223-1229.

Martinez, A. and Lin, J. (2006) 'Effect of an Efflux Pump Inhibitor on the Function of the Multidrug Efflux Pump CmeABC and Antimicrobial Resistance in *Campylobacter*', *Foodborne Pathogens and Disease*, 3(4), pp. 393-402.

Martins, M., Couto, I., Viveiros, M. and Amaral, L. (2010) 'Identification of Efflux-Mediated Multi-drug Resistance in Bacterial Clinical Isolates by Two Simple Methods', *Methods in Molecular Biology*, 642, pp. 143-157.

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

Mavri, A. and Možina, S. S. (2012) 'Involvement of efflux mechanisms in biocide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *Journal of Medical Microbiology*, 61, pp. 800-808.

Mavri, A. and Možina, S. S. (2013) 'Effects of efflux-pump inducers and genetic variation of the multidrug transporter CmeB in biocide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*', *Journal of Medical Microbiology*, 62, pp. 400-411.

McClung, C. R., Patriquin, D. G. and David, R. E. (1983) '*Campylobacter nitrofigilis* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Roots of *Spavtina alternijlora* Loisel', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(3), pp. 605-612.

Merga, J. Y., Royden, A., Pandey, A. K. and Williams, N. J. (2014) '*Arcobacter* spp. isolated from untreated domestic effluent', *Letters in Applied Microbiology*, 59, pp. 122-126.

Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wosten, 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. and Mandrell, R. E. (2007) 'The Complete Genome Sequence and Analysis of the *Epsilonproteobacterium* *Arcobacter butzleri*', *PLoS ONE*, (12), pp. 1-21.

Mottola, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Marchetti, P., Celano, G. V., Colao, V., Terio, V., Tantillo, G., Figueras, M. J. and Di Pinto, A. (2016) 'Occurrence of emerging food-borne pathogenic *Arcobacter* spp. isolated from pre-cut (ready-to-eat) vegetables', *International Journal of Food Microbiology*, 236, pp. 33-37.

Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C. and Ellis, W. A. (1985) 'Taxonomic Position of *Campylobacter cryaeophila* sp. nov.', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(3), pp. 342-356.

Nieva-Echevarria, B., Martinez-Malaxetxebarria, I., Girbau, C., Alonso, R. and Fernandez-Astorga, A. (2013) 'Prevalence and Genetic Diversity of *Arcobacter* in Food Products in the North of Spain', *Journal of Food Protection*, 76(8), pp. 1447-1450.

Nikaido, H. (2001) 'Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria', *Seminars In Cell & Developmental Biology*, 12, pp. 215-223.

Oggioni, M. R., Furi, L., Coelho, J. R., Maillard, J.-Y. and Martínez, J. L. (2013) 'Recent advances in the potential interconnection between antimicrobial resistance to biocides and antibiotics', *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(4), pp. 363-366.

On, S. L. W., Stacey, A. and Smyth, J. (1995) 'Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia', *Journal of Infection*, 31, pp. 225-227.

Otth, L., Wilson, M., Cancino, R., Fernandez, H. and Sc, D. (2004) 'In vitro susceptibility of *Arcobacter butzleri* to six antimicrobial drugs', *Archivos de Medicina Veterinaria*, 36(2), pp. 207-210.

Padungton, P. and Kaneene, J. B. (2003) '*Campylobacter* spp in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance', *The Journal of Veterinary Medical Science*, 65(2), pp. 161-170.

Paixão, L., Rodrigues, L., Couto, I., Martins, M., Fernandes, P., de Carvalho, C. C. C. R., Monteiro, G. A., Sansonetty, F., Amaral, L. and Viveiros, M. (2009) 'Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*', *Journal of Biological Engineering*, 3(18), pp. 1-13.

Park, S., Jung, Y.-T., Kim, S. and Yoon, J.-H. (2016) '*Arcobacter acticola* sp. nov., isolated from seawater on the East Sea in South Korea', *Journal of Microbiology*, 54(10), pp. 655-659.

Payot, S., Bolla, J. M., Corcoran, D., Fanning, S., Mégraud, F. and Zhang, Q. (2006) 'Mechanisms of fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter* spp.', *Microbes and Infection*, 8, pp. 1967-1971.

Pianta, C., Passos, D. T., Hepp, D. and de Oliveira, S. J. (2007) 'Isolation of *Arcobacter* spp from the milk of dairy cows in Brazil', *Ciência Rural, Santa Maria*, 37(1), pp. 171-174.

Plasterer, T. N. (2000) 'PROTEAN - Protein sequence analysis and prediction', *Molecular Biotechnology*, 16, pp. 117-125.

Poole, K. (2005) 'Efflux-mediated antimicrobial resistance', *Antibiotic Discovery and Development*, 56, pp. 20-51.

Poole, K. (2007) 'Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanism', *Annals of Medicine*, 39, pp. 162-176.

- Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A. and Mégraud, F. (2006) 'Arcobacter butzleri: Underestimated Enteropathogen', *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), pp. 307-309.
- Pumbwe, L. and Piddock, L. J. (2002) 'Identification and molecular characterisation of CmeB, a *Campylobacter jejuni* multidrug efflux pump', *FEMS Microbiology Letters*, 206, pp. 185-189.
- Putman, M., van Veen, H. W. and Konings, W. N. (2000) 'Molecular properties of bacterial multidrug transporters', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), pp. 672-693.
- Quinn, T., Bolla, J.-M., Pagès, J.-M. and Fanning, S. (2007) 'Antibiotic-resistant *Campylobacter*: could efflux pump inhibitors control infection?', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, pp. 1230-1236.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H. and Tanner, S. A. (1999) 'Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water', *Letters in Applied Microbiology*, 28, pp. 31-35.
- Samie, A., Obi, C. L., Barrett, L. J., Powell, S. M. and Guerrant, R. L. (2007) 'Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: Studies using molecular diagnostic methods', *Journal of Infection*, 54, pp. 558-566.
- Sasi Jyothsna, T. S., Rahul, K., Ramaprasad, E. V. V, Sasikala, C. and 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.
- Scanlon, K. A., Cagney, C., Walsh, D., McNulty, D., Carroll, A., McNamara, E. B., McDowell, D. A. and Duffy, G. (2013) 'Occurrence and characteristics of fastidious *Campylobacteraceae* species in porcine samples', *International Journal of Food Microbiology*, 163, pp. 6-13.
- Schweizer, H. P. (2001) 'Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics', *FEMS Microbiology Letters*, 202, pp. 1-7.
- Scullion, R., Harrington, C. S. and Madden, R. H. (2006) 'Prevalence of *Arcobacter* spp. in raw milk and retail raw meats in Northern Ireland.', *Journal of Food protection*, 69(8), pp. 1986-1990.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Murugaiyah, M., Zunita, Z. and Memon, A. A. (2012) 'Prevalence and Distribution of *Arcobacter* spp. in Raw Milk and Retail Raw Beef', *Journal of Food Protection*, 75(8), pp. 1474-1478.
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A. B. and 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.

Silhavy, T. J., Kahne, D. and Walker, S. (2010) 'The bacterial cell envelope', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, pp. 1-16.

De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L. and Houf, K. (2011) 'Arcobacter trophiarum sp. nov., isolated from fattening pigs', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, pp. 356-361.

Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J. and Harrison, M. A. (2007) 'Antimicrobial resistance of Arcobacter and Campylobacter from broiler carcasses', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29, pp. 451-455.

Srinivasan, V. B., Venkataramaiah, M., Mondal, A. and Rajamohan, G. (2015) 'Functional characterization of AbeD, an RND-type membrane transporter in antimicrobial resistance in Acinetobacter baumannii', *PLoS ONE*, 10(10), pp. 1-17.

Sun, J., Deng, Z. and Yan, A. (2014) 'Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453, pp. 254-267.

Taylor, D. E. and Chau, A. (1996) 'Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(1), pp. 1-5.

Taylor, D. E. and Courvalin, P. (1988) 'Mechanisms of antibiotic resistance in Campylobacter species', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(8), pp. 1107-1112.

Teague, N. S., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Poramathikul, K., Champathai, T., Ruksasiri, S., Pavlin, J. and Mason, C. J. (2010) 'Enteric pathogen sampling of tourist restaurants in Bangkok, Thailand', *Journal of Travel Medicine*, 17(2), pp. 118-123.

Tseng, T.-T. T., Gratwick, K. S., Kollman, J., Park, D., Nies, D. H., Goffeau, A. and Saier, M. H. (1999) 'The RND permease superfamily: an ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins', *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 1(1), pp. 107-125.

Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. and 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(1), pp. 88-103.

Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H. and Lauwers, S. (1992) 'Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with

- Arcobacter butzleri* in an Italian school', *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 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., Kersters, K., Butzler, J.-P. and Goossens, H. (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(3), pp. 344-356.
- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J. and Vandamme, P. (2004) '*Arcobacter* Species in Humans', *Emerging Infectious Diseases*, 10(10), pp. 1863-1867.
- Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J. P. and 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(4), pp. 277-83.
- Villalobos, E. G., Jaramillo, H. F., Ulate, C. C. and 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(5), pp. 879-882.
- Viveiros, M., Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Fahrnich, E., Kern, W. V. and Amaral, L. (2008) 'Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, pp. 458-462.
- Viveiros, M., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Spengler, G., Martins, A. and Amaral, L. (2010) 'Evaluation of Efflux Activity of Bacteria by a Semi-automated Fluorometric System', *Methods in Molecular Biology*, 642, pp. 159-172.
- Wang, Y. and Taylor, D. E. (1990) 'Natural transformation in *Campylobacter* species', *Journal of Bacteriology*, 172(2), pp. 949-955.
- Webber, M. A. and Piddock, L. J. V (2003) 'The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, pp. 9-11.
- Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. A., Lapen, D. R., Villemur, R. and Khan, I. U. H. (2016) 'Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank', *Systematic and Applied Microbiology*, 39(2), pp. 93-

Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. A., Lapen, D. R., Villemur, R., Talbot, G. and Khan, I. U. H. (2015) '*Arcobacter lanthieri* sp. Nov., isolated from pig and dairy cattle manure', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, pp. 2709-2716.

Willey, J. M., Sherwood, L. M. and Woolverton, C. J. (2008) *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. 7th ed. New York: The McGraw-Hill Companies.

Wilson, D. L., Bell, J. A., Young, V. B., Wilder, S. R., Mansfield, L. S. and Linz, J. E. (2003) 'Variation of the natural transformation frequency of *Campylobacter jejuni* in liquid shake culture', *Microbiology*, 149, pp. 3603-3615.

Wright, G. D. (2005) 'Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, pp. 1451-1470.

Zhang, Z., Liu, Z.-Q., Zheng, P.-Y., Tang, F.-A. and Yang, P.-C. (2010) 'Influence of efflux pump inhibitors on the multidrug resistance of *Helicobacter pylori*', *World Journal of Gastroenterology*, 16(10), pp. 1279-1284.

Zhang, Z., Yu, C., Wang, X., Yu, S. and Zhang, X.-H. (2016) '*Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the south pacific Gyre', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, pp. 542-547.

Anexo II

Previsão da superfamília através do Batch Web CD-Search tool, National Center for Biotechnology Information (NCBI). Comparação feita com base nos aminoácidos codificadas pelo gene *cmeB* da estirpe AB28/11 de *Arcobacter butzleri*.

Aminoácidos		E-Value	Bitscore	Denominação
De	A			
2	1047	0	1301.24	ACR_tran superfamily
297	492	6.84489e ⁻¹³	72.7215	COG1033 superfamily
334	556	3.66067e ⁻⁰⁸	57.549	SecD superfamily
347	496	4.10078e ⁻⁰⁶	49.9827	MMPL superfamily
338	491	3.42503e ⁻⁰⁵	47.5609	COG4258 superfamily
335	498	0.00207889	42.0145	Sec_GG superfamily

Alinhamento dos aminoácidos codificadas pelo gene *cmeB* de *A. butzleri* com outros microrganismos de identidade relevante

Microrganismo	Descrição	E-value	Identidade
<i>Arcobacter butzleri</i>	Multidrug efflux RND transporter permease subunit	0	99%
<i>Arcobacter nitrofigilis</i>	Multidrug efflux RND transporter permease subunit	0	81%
<i>Sulfurospirillum halorespirans</i>	Hydrophobe/amphiphile efflux-1 family RND transporter	0	59%
<i>Escherichia coli</i>	Multidrug efflux system protein	0	51%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Multidrug resistance protein MexB	0	51%
<i>Helicobacter sp.</i>	Multidrug efflux RND transporter permease subunit	0	40%
<i>Campylobacter sp.</i>	Multidrug efflux RND transporter permease subunit	0	39%

Anexo III

Apresentação de parte do presente trabalho no *II International Congress in Health Sciences Research* realizado na Covilhã, sob a forma de apresentação em painel.



P8. EFFECTS OF THE SILYMARIN, A P-GLYCOPROTEIN INHIBITOR, ON THE PHARMACOKINETICS OF OXCARBAZEPINE AND ITS ACTIVE METABOLITE LICARBAZEPINE

Ferreira, A. Rodrigues, M. Fortuna, A. Falcão, A. Alves, G.

P9. ISOBOLOGRAPHIC ANALYSIS OF THE NEURO AND HEPATOTOXICOLOGICAL PROFILE RESULTING FROM THE COMBINATION OF THE ANTIEPILEPTIC DRUGS CARBAMAZEPINE, OXCARBAZEPINE OR PHENYTOIN WITH SILYMARIN, A FLAVONOID-TYP

Ferreira, A. Luszczki, J. Czuczwar, S. Falcão, A. Alves, G.

P10. PHYTOCHEMICALS AS POTENTIAL EFFLUX PUMP INHIBITORS IN *ARCOBACTER BUTZLERI*

Sousa, VC. Luis, Â. Domingues, F. Ferreira, S.

P11. CONTRIBUTION OF TARGET GENE MUTATION AND EFFLUX TO CIPROFLOXACIN RESISTANCE IN *ARCOBACTER BUTZLERI*

Correia, DR. Domingues, F. Oleastro, M. Ferreira, S.

P12. SYNERGISTIC POTENTIAL OF LINALOOL AND DISINFECTANTS AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Oliveira, AR. Domingues, FC. Ferreira, S.

P13. ROLE OF EFFLUX PUMPS IN THE RESISTANCE OF *ARCOBACTER BUTZLERI*

Silva, AL. Domingues, F. Oleastro, M. Ferreira, S.

P14. NOVEL LAB PROTOCOL FROM BIOSYNTHESIS TO PURIFICATION OF STEAP1 PROTEIN FRAGMENT: A THERAPEUTIC TARGET FOR PROSTATE CANCER

Barroca-Ferreira, J. Pais, JP. Santos, MM. Passarinha, LA. Maia, CJ.

P15. DEVELOPMENT OF THERAPEUTIC IGY ANTIBODIES AGAINST *VIBRIO ANGUILLARUM*

Rosa, M. Francisco, R. Laranjeira, J. Rodrigues, L. Costas, B. Freire, MG. Mano, M. Vieira-Pires, RS.

P13. ROLE OF EFFLUX PUMPS IN THE RESISTANCE OF *ARCOBACTER BUTZLERI*

Silva, AL.¹ Domingues, F.¹ Oleastro, M.² Ferreira, S.¹

¹ CICS-UBI- Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal;

² National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge, Department of Infectious Diseases, National Reference Laboratory for Gastrointestinal Infections, Lisbon, Portugal

Arcobacter is one of the three genera of the family *Campylobacteraceae*, comprising, at the moment, 27 recognized species, among which *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* and *A. skirrowii* have been associated with animal and human disease. *A. butzleri* is one of the most commonly found species in samples from a variety of sources, such as water, food, environment and humans. Being associated with enteritis and bacteraemia in humans, it belongs to the list of microorganisms considered to be a serious hazard to human health by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods. The indiscriminate use of antibiotics in the human population as well as in animal rearing has led to an increase of antimicrobial resistance of pathogenic agents. In line with this, the number of reports showing high resistance rates in *A. butzleri* is rising, and thus may contribute to unsuccessful treatments of severe infections or even dissemination of resistance. The investigation around the resistance mechanisms of this bacterium is scarce but relevant. Efflux of the antibiotic is one important resistance mechanism in bacteria. So, to address its role in *A. butzleri* resistance, in this study we aimed to evaluate the function of a *cmeABC* type efflux pump previously identified in several *A. butzleri* strains by our group, through whole genome sequencing.

Insertional mutagenesis to construct a mutant *A. butzleri* strain with inactivated *cmeB* gene from the efflux pump *cmeABC* was used. In order to disrupt the gene, a PCR fragment containing a kanamycin cassette flanked by upstream and downstream regions of *cmeB* gene, was used in the natural transformation of *A. butzleri* strain and favoring the replacement of the gene on the chromosome by homologous recombination. After confirmation of the successful mutation, several essays were made to test the role of this efflux pump. Through an ethidium bromide (EtBr) accumulation test, with and without the addition of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, a proton motive force inhibitor, a correlation between the *cmeB* gene disruption and accumulation of EtBr was confirmed, indicating that the *cmeABC* has a role on the resistance mechanisms of *A. butzleri*. However, results also indicate that this efflux pump is not the only resistance mechanism.