

# **Mecanismos de resistência de *Aliarcobacter butzleri* a macrólidos**

**Ana Francisca Lopes do Couto**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2<sup>o</sup> ciclo de estudos)

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

**junho de 2022**



## **Declaração de Integridade**

Eu, Ana Francisca Lopes do Couto, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10239 do Mestrado em Bioquímica da Faculdade de Ciências, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridade da Universidade da Beira Interior.**

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 23/06/2022



# **Dedicatória**

*Aos meus avós, Lurdes e António.*



# Agradecimentos

Após muito trabalho chegou, por fim, a altura de agradecer a todos os que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a completar um dos maiores desafios que tive até hoje.

Primeiramente quero agradecer à minha orientada, Doutora Susana Ferreira, primeiro por me ter permitido integrar no seu grupo de investigação, mas também por toda a transmissão de conhecimento, preocupação, incentivo e pela imensa paciência que teve comigo ao longo deste trabalho. Nada disto teria sido possível se não fosse a sua dedicação constante e, por isso, só tenho a agradecer.

Quero agradecer também às minhas coorientadoras, Doutora Fernanda Domingues e Doutora Mónica Oleastro por todo o apoio e disponibilidade demonstrado ao longo deste tempo. À professora Filipa Vale, tenho de agradecer pela análise da sequenciação completa do genoma apresentada neste trabalho, pois sem ela não teria sido possível.

Às minhas colegas de laboratório, à Alexandra, à Filomena e à Cristiana, por toda a ajuda e conhecimento partilhado, mas principalmente pela amizade e por todos os momentos que eu não posso enumerar aqui, mas que tenho a certeza de que, tornaram toda esta jornada muito mais leve. Um agradecimento especial à minha borboleta favorita, Rodrigo, por me acompanhar “quase” desde o primeiro dia em que entrei na UBI e por ter feito parte de alguns dos meus melhores e dos piores momentos destes últimos sete anos.

Tenho que agradecer também a algumas pessoas muito especiais que sei que vou levar para a vida. Em primeiro ao meu Manelito pelo apoio incondicional e por ter aturado todas as minhas crises de ansiedade sem nunca me deixar ir abaixo, sem ele esta jornada teria sido muito mais difícil. Em segundo tenho de agradecer às minhas duas irmãs, Mariana e Salomé que, embora de maneiras diferentes, estiveram lá para mim sempre que eu precisei. E por último, tenho de agradecer à pessoa mais aleatória a vida me deu, Natacha, por ter partilhado comigo esta montanha-russa que foi a vida universitária.

Por fim, tenho de agradecer do fundo do coração, à minha família, por me apoiarem em todas as minhas decisões e por terem feito de mim a pessoa que sou hoje. Nunca vou conseguir agradecer o suficiente por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim!

OBRIGADO!



## Resumo

*Aliarcobacter butzleri* é um enteropatógeno emergente que tem sido considerado um grave perigo para a saúde humana. Nos últimos anos, vários isolados resistentes a antibióticos, comumente utilizados no tratamento de infecções por *Al. butzleri*, nomeadamente a macrólidos, têm sido identificados. Contudo, os mecanismos de resistência associados ainda não se encontram completamente elucidados. Para além disso, tem-se verificado que isolados com altos níveis de resistência aos macrólidos não são frequentemente encontrados no meio ambiente. Assim, os objetivos deste trabalho focaram-se na avaliação dos potenciais mecanismos que podem estar associados à resistência a macrólidos e os efeitos que esta aquisição de resistência pode ter na robustez da bactéria e na sua suscetibilidade a outros antibióticos. Para tal, procedeu-se a: i) avaliação da contribuição de mutações espontâneas na aquisição de resistência à eritromicina; ii) indução, *in vitro*, de elevados níveis de resistência ao referido antibiótico, a fim de identificar os mecanismos de resistência envolvidos; iii) avaliação do impacto da aquisição de resistência na suscetibilidade e robustez de *Al. butzleri*. Inicialmente, a fim de perceber de que forma a alteração da expressão das bombas de efluxo afetava o aparecimento de mutações espontâneas, foi determinada a frequência de mutação da estirpe nativa e duas estirpes mutantes para o gene *areB* da bomba de efluxo AreABC e respetivo repressor transcricional *areR*. Com base nos resultados é possível especular que o aumento da expressão da bomba de efluxo AreABC origina um aumento da frequência com que ocorrem mutações espontâneas nesta espécie. Seguidamente, foi determinada a taxa de mutação espontânea da estirpe de *Al. butzleri* DQ40A1, através do ensaio de flutuação, o que permitiu classificar a estirpe nativa como fracamente hipermutável. Nos ensaios de indução de resistência à eritromicina, *in vitro*, foi possível efetuar a indução de elevados níveis de resistência a este antibiótico, verificando-se aumentos de 512× na concentração mínima inibitória. Ao avaliar a suscetibilidade de estirpes provenientes dos ensaios de flutuação (cinco mutantes), e de evolução (evolução 8 e 9), na ausência de eritromicina, não se verificaram alterações significativas no perfil de crescimento das estirpes em estudo, à exceção da estirpe resistente da evolução 8 que apresentou uma diminuição da taxa de crescimento. Em relação ao perfil de crescimento na presença de eritromicina foi observado que as estirpes altamente resistentes da evolução 8 e 9 e a estirpe controlo do solvente da evolução 9 apresentavam crescimento na presença das concentrações mais elevadas de eritromicina. Além disso, as estirpes em estudo apresentaram uma diminuição da suscetibilidade à ciprofloxacina e à tetraciclina, contudo não foi verificada qualquer alteração em relação à resistência a compostos indutores de

stress oxidativo. Avaliando a expressão fenotípica das bombas de efluxo, observou-se que tanto as estirpes provenientes do ensaio de flutuação com as estirpes com elevados níveis de resistência induzida *in vitro* demonstraram uma diminuição da capacidade de acumulação de brometo de etídio. No caso da estirpe altamente resistente da evolução 8, este comportamento está correlacionado com o aumento da expressão relativa do gene *areB*, em cerca de 50 vezes quando comparado com a estirpe nativa, o que é explicado pela mutação observada no gene que codifica para o repressor transcricional do sistema de efluxo correspondente (AreABC). Em relação à avaliação da robustez, de forma geral, as estirpes em estudo demonstraram menor motilidade, menor capacidade de formação de biofilme e não apresentaram diferenças significativas na sobrevivência em modelos alimentares, quando comparados com a estirpe nativa. Assim, os resultados obtidos sugerem que os sistemas de efluxo podem ter um papel determinante na aquisição de resistência à eritromicina e que alterações na suscetibilidade das estirpes a este agente antimicrobiano podem ter um papel na virulência e na robustez da bactéria.

## **Palavras-chave**

*Aliarcobacter butzleri*; Bombas de Efluxo; Eritromicina; Resistência; Robustez; Suscetibilidade.



# Abstract

*Aliarcobacter butzleri* is an emerging enteropathogen that has been considered a serious hazard to human health. In the past few years, several isolates resistant to antibiotics, which are commonly used to treat infections by *Al. butzleri*, namely to macrolides, have been reported. However, the associated resistance mechanisms have not yet been fully elucidated. Furthermore, it has been noticed that isolates with high resistance levels to macrolides are not frequently found in the environment. Thus, the aims of this work were focused on evaluating the potential mechanisms that may be associated with macrolide resistance and the effects that this acquisition of resistance may have on the robustness of the bacterium and on its susceptibility to other antibiotics. For this purpose, we proceeded with the i) assessment of the contribution of spontaneous mutations in the acquisition of resistance to erythromycin; ii) *in vitro* induction, of high levels of resistance to this antibiotic, to identify the resistance mechanisms involved; iii) and the evaluation of the impact of the resistance acquisition on the susceptibility and robustness of *Al. butzleri*. Initially, to understand how the alteration in the expression of the efflux pumps affected the emergence of spontaneous mutations, the mutation frequency of the native strain and two mutant strains, for the *areB* gene of the AreABC efflux pump and its transcriptional repressor *areR*, has been determined. Based on the results, it can be speculated that an increased expression of the AreABC efflux pump leads to an increase in the frequency with which spontaneous mutations occur in this species. Next, the spontaneous mutation rate of *Al. butzleri* strain DQ40A1 was determined using the fluctuation assay, which allowed the native strain to be classified as weakly hypermutable. In the assays of *in vitro* induction of erythromycin resistance, it was possible to induce high levels of resistance to this antibiotic, with increases of 512× of the minimum inhibitory concentration. Evaluating the susceptibility of strains from the fluctuation (five mutants), and evolution (evolution 8 and 9) assays in the absence of erythromycin, there were no significant changes in the growth profile of the strains under study, except the resistant strain of evolution 8 that showed a decreased growth rate. Regarding the growth profile in the presence of erythromycin, it was observed that the highly resistant strains of evolution 8 and 9 and the solvent control strain of evolution 9 exhibited growth in the presence of the highest concentrations of erythromycin. In addition, the strains under study showed decreased susceptibility to ciprofloxacin and tetracycline; however, no changes were observed concerning the resistance to oxidative stress inducing compounds. By assessing the phenotypic expression of efflux pumps, it was observed that strains from the fluctuation assay and strains with high levels of *in vitro* induced resistance showed a decreased ability to accumulate ethidium bromide. In the case of the highly resistant

strain of evolution 8, this behavior correlates with an increase in the *areB* gene relative expression by around 50-fold when compared to the native strain, which is explained by the mutation observed in the gene encoding for the transcriptional repressor of the corresponding efflux system (AreABC). Regarding robustness evaluation, overall, the strains under study demonstrated lower motility, decreased biofilm-forming ability, and showed no significant differences in survival in food models when compared to the native strain. Thus, the results obtained suggest that efflux systems may play a determining role in the acquisition of resistance to erythromycin and that changes in the susceptibility of strains to this antimicrobial agent might play a pivotal role in bacterial virulence and robustness.

## **Keywords**

*Aliarcobacter Butzleri*; Efflux pumps; Erythromycin; Resistance; Robustness; Susceptibility.



# Índice

Capítulo 1: Introdução.....	1
1.1 Gênero <i>Aliarcobacter</i> .....	1
1.1.1 Taxonomia e desenvolvimento histórico do gênero <i>Aliarcobacter</i> .....	1
1.1.2 Características gerais do gênero <i>Aliarcobacter</i> .....	3
1.2 Fontes de <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	3
1.2.1 <i>Aliarcobacter butzleri</i> em águas.....	4
1.2.2 <i>Aliarcobacter butzleri</i> em alimentos.....	4
1.2.3 <i>Aliarcobacter butzleri</i> em animais domésticos e selvagens.....	6
1.2.4 <i>Aliarcobacter butzleri</i> em humanos.....	7
1.3 Vias de transmissão de <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	8
1.3.1 Consumo de águas contaminadas.....	9
1.3.2 Consumo de alimentos contaminados.....	9
1.3.3 Contato com animais domésticos.....	10
1.3.4 Contato pessoa-pessoa.....	11
1.4 Patogenicidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	11
1.5 Resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> a antibióticos.....	13
1.6 Mecanismos de resistência a antibióticos.....	16
1.7 Macrólidos.....	18
Capítulo 2: Objetivos.....	22
Capítulo 3: Materiais e Métodos.....	23
3.1 Estirpes bacterianas de <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	23
3.2. Armazenamento e preparação das estirpes.....	23
3.3. Determinação da concentração mínima inibitória para <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	23
3.4. Determinação da frequência de mutação espontânea em <i>Aliarcobacter butzleri</i> ...	25
3.5. Determinação da taxa de mutação espontânea em <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	25
3.6. Evolução de resistência <i>in vitro</i> .....	27
3.7 Avaliação da influência da resistência induzida <i>in vitro</i> à eritromicina na robustez de <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	28
3.7.1. Determinação das curvas de crescimento.....	28
3.7.3. Capacidade de formação de biofilme.....	29
3.7.5. Sobrevivência em modelos alimentares.....	30
3.8 Avaliação fenotípica da expressão de bombas de efluxo.....	31
3.9 Expressão do gene <i>areB</i> .....	32
3.9.1. Extração de RNA total.....	32
3.9.2. Tratamento do RNA total com DNase I.....	33
3.9.3. Síntese de DNA complementar (cDNA).....	33

3.9.4. Determinação da expressão do gene <i>areB</i> .....	34
Capítulo 4 – Resultados e Discussão .....	35
4.1. Avaliação da frequência de mutação espontânea em <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	35
4.2. Avaliação da taxa de mutação espontânea em <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	38
4.2.1. Avaliação da suscetibilidade à eritromicina de estirpes de <i>Aliarcobacter butzleri</i> após a aquisição espontânea de resistência à eritromicina .....	40
4.3. Indução de resistência <i>in vitro</i> à eritromicina em <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	42
4.4. Avaliação da influência da aquisição espontânea de resistência e da indução de resistência <i>in vitro</i> à eritromicina na suscetibilidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	45
4.4.1. Avaliação do crescimento das estirpes resistentes à eritromicina na ausência e na presença de antibiótico.....	45
4.4.2. Avaliação do efeito da indução de resistência à eritromicina <i>in vitro</i> na suscetibilidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i> a outros antibióticos .....	51
4.4.3. Avaliação fenotípica da expressão de bombas de efluxo de <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	53
4.4.3.1. Avaliação da expressão relativa do gene <i>areB</i> na evolução 8 .....	57
4.4.4. Avaliação da resistência ao stress oxidativo de <i>Aliarcobacter butzleri</i> .....	59
4.5. Avaliação da robustez de estirpes de <i>Aliarcobacter butzleri</i> após aquisição espontânea e indução de resistência <i>in vitro</i> à eritromicina .....	63
4.5.1. Avaliação da motilidade.....	63
4.5.2. Avaliação da formação de biofilme .....	66
4.5.3. Avaliação da sobrevivência em modelos alimentares .....	68
Capítulo 5: Conclusões .....	73
Capítulo 6: Perspetivas futuras .....	75
Capítulo 7: Bibliografia .....	76
Anexo I .....	91
Anexo II.....	93



## Lista de Figuras

Figura 1: Secção transversal da grande subunidade ribossomal ao longo do NPET, com o centro da peptidil-transferase (PTC) e a interface da subunidade à direita. A posição das proteínas ribossômicas L4 e L22 são mostradas em castanho e verde, respetivamente, e o sítio de ligação da eritromicina é indicado a azul. Imagem adaptada de: (Lovmar et al., 2009)..... 20

Figura 2: Representação do ensaio de evolução de resistência à eritromicina *in vitro*. Baseado Shuster, Steiner-Mordoch, Alon Cudkowicz e Schuldiner, 2016. ....27

Figura 3: Representação gráfica da evolução do IC<sub>50</sub> ao longo da indução de resistência *in vitro* à eritromicina. A: Evolução do IC<sub>50</sub> da estirpe DQ40P8 e dos controlos DQ40P8c e DQ40P8EtOH; B: Evolução do IC<sub>50</sub> da estirpe DQ40P9 e dos controlos DQ40P9c e DQ40P9EtOH; C: Evolução do IC<sub>50</sub> da estirpe DQ40P10 e dos controlos DQ40P10c e DQ40P10EtOH..... 43

Figura 4: Perfil de crescimento das estirpes de *Al. butzleri* DQ40A1, e respetivos mutantes resistentes à eritromicina. (A: DQ40A1 e TM1E; B: DQ40A e TM1F; C: DQ40A1 e TM1K; D: DQ40A1 e TM1L; E: DQ40A1 e TM1P). Resultados obtidos correspondem à média e desvio padrão resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA com comparação múltipla *Sidak's*. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a nativa; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ..... 45

Figura 5: Perfil de crescimento das estirpes de *Al. butzleri* DQ40A1, das estirpes resistentes à eritromicina e respetivos controlos provenientes dos ensaios de evolução na presença de eritromicina. A: DQ40A1 e Evolução 8; B: DQ40A e Evolução 9. Resultados obtidos correspondem à média e o desvio padrão resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação das estirpes resultantes dos ensaios de evolução com a nativa; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , obtidos através do teste de comparação múltipla *Sidak's*..... 46

Figura 6: Perfil de crescimento da estirpe de *Al. butzleri* DQ40A1, e respetivos mutantes resistentes à eritromicina na presença de concentrações de eritromicina entre 0– 8  $\mu\text{g/mL}$ . (Densidade ótica a 620 nm A: às 6 horas; B: às 12 horas; C: às 24 horas). Resultados obtidos correspondem à média e o desvio padrão resultante de pelo menos três

ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA com comparação múltipla *Dunnnett's*. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a nativa para concentrações de eritromicina  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ ; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .....48

Figura 7: Perfil de crescimento das estirpes de *Al. butzleri* DQ40A1, e das estirpes correspondentes às evoluções 8 na presença de concentrações de eritromicina de  $0 \mu\text{g/mL}$  –  $8 \mu\text{g/mL}$ . (A: Perfil de crescimento às 6 horas de ensaio; B: Perfil de crescimento às 12 horas de ensaio; C: Perfil de crescimento às 24 horas de ensaio). Resultados obtidos correspondem à média e ao erro padrão da média resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA com comparação múltipla *Dunnnett's*. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação das estirpes resultantes dos ensaios de evolução com a nativa; \*  $p < 0,05$ .....49

Figura 8: Perfil de crescimento das estirpes de *Al. butzleri* DQ40A1, e das estirpes da evolução 9 na presença de concentrações de eritromicina de  $0 \mu\text{g/mL}$  –  $8 \mu\text{g/mL}$ . A: Perfil de crescimento às 6 horas de ensaio; B: Perfil de crescimento às 12 horas de ensaio; C: Perfil de crescimento às 24 horas de ensaio. Resultados obtidos correspondem à média e ao erro padrão da média resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA com comparação múltipla *Dunnnett's*. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação das estirpes resultantes dos ensaios de evolução com a nativa; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . .....50

Figura 9: Representação gráfica da acumulação de brometo de etídio ( $2 \mu\text{g/mL}$ ) pelas estirpes mutantes, pelas evoluções 8 e 9 e pela estirpe nativa (DQ40A1). (A: DQ40A1 e mutantes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P; B: DQ40A1 e evolução 8; C: DQ40A1 e evolução 9). Os resultados apresentados representam a média e erro padrão da média de, pelo menos, três ensaios independentes. .... 54

Figura 10: Representação gráfica do efeito da adição de CCCP ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) aos 7 minutos na acumulação de brometo de etídio pelas estirpes mutantes, pelas evoluções 8 e 9 e pela estirpe nativa (DQ40A1). (A: DQ40A1 e mutantes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P; B: DQ40A1 e evolução 8; C: DQ40A1 e evolução 9). Os resultados apresentados representam a média e erro padrão da média de, pelo menos, três ensaios independentes. .... 56

Figura 11: Representação dos resultados obtidos pelo método Cartwheel em placas de meio TSA com 2 µg/mL BrEt após 24 horas de incubação. (A: DQ40A1; B: TM1E; C: TM1F; D: TM1K; E: TM1L; F: TM1P; G: DQ40P8; H: DQ40P8c; I: DQ40P8EtOH; J: DQ40P9; K: DQ40P9c; L: DQ40P9EtOH) Os resultados foram obtidos através da visualização das placas visualizadas num transiluminador (UVITEC, Reino Unido).....57

Figura 12: Representação gráfica da expressão relativa do gene *areB* para a estirpe nativa e para as estirpes da evolução 8, obtida através da aplicação do método  $\Delta\Delta Ct$ . Os resultados apresentados representam a média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ..... 58

Figura 13: Representação gráfica das zonas de inibição para as estirpes de *Al. butzleri* resistentes e nativa, na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio (A: 3% de peróxido de hidrogénio; B: 10% de peróxido de hidrogénio; C: 30% de peróxido de hidrogénio e de D: Metil de viologénio (a 125 mM)). Os dados representados são referentes à média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. A análise estatística realizada pelo teste *one-way* ANOVA..... 60

Figura 14: Representação gráfica das zonas de inibição para as evoluções 8 e 9 e da estirpe nativa DQ40A1, na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio (A: 3% de peróxido de hidrogénio; B: 10% de peróxido de hidrogénio; C: 30% de peróxido de hidrogénio; D: Metil viologênio a 125 mM). Os dados representados são referentes à média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. A análise estatística realizada pelo teste *one-way* ANOVA. ....61

Figura 15: Representação gráfica do halo de motilidade (em mm) da estirpe nativa DQ40A1 e das estirpes resistentes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P, às 48 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA. Colunas marcadas com letras diferentes eram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). .... 64

Figura 16: Representação gráfica do halo de motilidade (em mm) da estirpe nativa DQ40A1 e das três estirpes que integram as evoluções 8 e 9 após 48 horas de incubação. A: evolução 8 e estirpe nativa; b: evolução 9 e estirpe nativa. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA. Os asteriscos indicam

diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as estirpes; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . ..... 64

Figura 17: Representação gráfica da formação de biofilme, obtida pela leitura da absorvância a 570 nm da estirpe nativa DQ40A1 e das estirpes resistentes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P, às 48 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média e erro padrão da média de pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA. Colunas marcadas com letras diferentes apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ). ..... 66

Figura 18: Representação gráfica da formação de biofilme, obtida pela leitura da absorvância a 570 nm da estirpe nativa DQ40A1 e das três estirpes que integram as evoluções 8 e 9 após 48 horas de incubação. A: evolução 8 e estirpe nativa; B: evolução 9 e estirpe nativa. Os valores apresentados correspondem à média e erro padrão da média de, pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as estirpes; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ . ..... 67

Figura 19: Representação gráfica da sobrevivência das estirpes em quatro modelos alimentares conservados a 4 °C durante 14 dias A: Sobrevivência em leite magro; B: Sobrevivência em leite gordo; C: Sobrevivência em suco de frango; D: sobrevivência em suco de alface. A linha a tracejado representa o limite de detecção do ensaio. Os dados representados são referentes à média e erro padrão da média de, pelo menos, dois ensaios independentes. A análise dos gráficos foi efetuada pelo teste estatístico *two-way* ANOVA. .... 69

Figura 20: Representação gráfica da sobrevivência das estirpes da evolução 8, da evolução 9 e da estirpe nativa em quatro modelos alimentares, conservados a 4 °C durante 14 dias. Evolução 8: A: Sobrevivência em leite magro; B: Sobrevivência em leite gordo; C: Sobrevivência em suco de frango; D: sobrevivência em suco de alface. Evolução 9: E: Sobrevivência em leite gordo; F: Sobrevivência em leite magro; K: Sobrevivência em suco de frango; L: sobrevivência em suco de alface. A linha a tracejado representa o limite de detecção do ensaio. Os dados representados são referentes à média e erro padrão da média de, pelo menos, dois ensaios independentes. A análise dos gráficos foi efetuada pelo teste estatístico *two-way* ANOVA. .... 70



# Lista de Tabelas

Tabela 1: Espécies do gênero <i>Aliarcobacter</i> , por ano e fonte de primeiro isolamento.....	2
Tabela 2: Identificação dos agentes antimicrobianos utilizados na determinação das concentrações mínimas inibitórias. ....	24
Tabela 3: Concentrações de eritromicina usadas nas placas de meio TSA para cada estirpe em estudo. ....	25
Tabela 4: Lista de <i>primers</i> usados na reação de real-time PCR, sequência e tamanho.....	34
Tabela 5: Concentrações mínimas inibitórias dos macrólidos para a estirpe parental e para os dois mutantes.....	36
Tabela 6: Frequência de mutação espontânea obtidas para a estirpe de <i>Al. butzleri</i> nativa. ....	37
Tabela 7: Valores da taxa de mutação espontânea para a estirpe <i>Al. butzleri</i> DQ40A1, bem como os valores de UFC/mL ao tempo 0 (No) e no final (NT) e ainda o valor de <i>m</i> .....	39
Tabela 8: Concentração mínima inibitória de eritromicina para os mutantes selecionados dos ensaios de flutuação, após cinco passagens em meio TSA sem eritromicina. ....	41
Tabela 9: Características iniciais da estirpe nativa de <i>Al. butzleri</i> DQ40A1 para o ensaio de evolução, duração do ensaio e evoluções com fenótipo de resistência à eritromicina obtidas. ....	42
Tabela 10: Concentrações mínimas inibitórias de isolados das três evoluções originadas a partir da indução de <i>resistência in vitro</i> à eritromicina. ....	44
Tabela 11: Concentrações mínimas inibitórias para as estirpes mutantes (TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P), da evolução 8 (DQ40P8, DQ40P8c e DQ40P8EtOH) e 9 (DQ40P9, DQ40P9c e DQ40P9EtOH) e para a estirpe nativa (DQ40A1) de <i>Al. butzleri</i> . ....	52



## Lista de Acrónimos

ABC	Do inglês “ <i>Adenosine triphosphate (ATP)-Binding Cassette</i> ”
BA	Do inglês “ <i>Blood Agar</i> ”
BHI	Do inglês “ <i>Brain Heart Infusion</i> ”
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona, do inglês “ <i>Carbonyl Cyanide 3-Chlorophenylhydrazone</i> ”
cDNA	DNA complementar
CMI	Concentração mínima inibitória
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês “ <i>deoxyribonucleic acid</i> ”
DO	Densidade ótica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês “ <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ”
EUCAST	Do inglês “ <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> ”
BrEt	Brometo de etídio
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
MATE	Do inglês “ <i>Multidrug and toxin extrusion</i> ”
MFS	Do inglês “ <i>Major facilitator superfamily</i> ”
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NPET	Do inglês “ <i>Nascent peptide exit tunnel</i> ”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAβN	Fenil-arginina-β-naftilamida, do inglês “ <i>Phenylalanine-arginine β-naphthylamide</i> ”
PACE	Do inglês “ <i>Proteobacterial Antimicrobial Compound Efflux</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> ”
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês “ <i>Ribonucleic acid</i> ”
RND	Do inglês “ <i>Resistance-Nodulation-Division</i> ”
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês “ <i>Reactive oxygen species</i> ”
rpm	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossómico

SMR	Do inglês “ <i>Small Multidrug Resistance</i> ”
TSA	Do inglês “ <i>Tryptic Soy Agar</i> ”
TSB	Do inglês “ <i>Tryptic Soy Broth</i> ”
UFC	Unidades formadoras de colónias





# Capítulo 1: Introdução

## 1.1 Género *Aliarcobacter*

O género *Aliarcobacter* encontra-se atualmente inserido na família *Arcobacteraceae*, e na ordem *Campylobacterales* (Waite et al., 2019). Este género é composto por 9 espécies reconhecidas, isoladas a partir de diversas fontes, desde fezes de animais e humanos, a carcaças de animais e até mesmo de amostras de água (Alonso et al., 2020; Oren & Garrity, 2020b).

### 1.1.1 Taxonomia e desenvolvimento histórico do género *Aliarcobacter*

No ano de 1977, Ellis e colaboradores descreveram, pela primeira vez, um organismo espiralado proveniente de fetos de bovinos e suínos que foi inicialmente classificado como *Campylobacter* aerotolerante com capacidade de crescer a baixas temperaturas, sendo incluído no género *Campylobacter* (Ferreira et al., 2016). Em 1991, Vandamme e colaboradores (Vandamme & De Ley, 1991), levaram a cabo um estudo filogenético que analisou sequências parciais do gene *16S rRNA*. Esta análise levou a que fosse proposta a criação do género *Arcobacter* que inicialmente, seria composto por duas espécies, previamente designadas de *Campylobacter nitrofigilis* e *Campylobacter cryaerophila*, que passariam a ser conhecidas como *Arcobacter nitrofigilis* e *Arcobacter cryaerophilus*. Posteriormente, foi adicionada a este novo género a espécie *Campylobacter butzleri* (*Arcobacter butzleri*) e a nova espécie *Arcobacter skirrowii* (Perez-Cataluña et al., 2018; Vandamme et al., 1992a). Até este ponto, o então denominado género *Arcobacter* integrava a família *Campylobacteraceae*, no entanto, em 2017, Waite e colaboradores, após uma análise genómica comparativa entre três géneros da família *Campylobacteraceae*: *Arcobacter*, *Campylobacter* e *Sulfurospirillum*, propuseram a criação de uma nova família para acolher o género *Arcobacter* que se denominaria *Arcobacteraceae*, alteração taxonómica que foi validada em 2020 (Oren & Garrity, 2020a; Waite et al., 2017).

Em 2018, devido à variabilidade genómica e à determinação de novas combinações de características fenotípicas, Pérez-Cataluña e seus colaboradores propuseram uma revisão taxonómica para a divisão do género *Arcobacter* em pelo menos seis diferentes géneros: *Arcobacter*, *Aliarcobacter*, *Halarcobacter*, *Malaciobacter*, *Poseidonibacter*, *Pseudarcobacter* e um género candidato denominado *Arcomarinus* (Perez-Cataluña et al., 2018). Os géneros *Pseudarcobacter*, *Halarcobacter*, *Malaciobacter* e *Poseidonibacter* foram validados em 2019 (Oren & Garrity, 2019), e por sua vez o género *Aliarcobacter* foi validado em 2020 (Oren & Garrity, 2020b).

Recentemente, On e colaboradores procederam à reavaliação da divisão do género *Arcobacter*, proposta por Pérez-Cataluña, através de uma análise comparativa ao nível genético, filogenético e fenótipo (On et al., 2020). Esta análise considerou que, embora a proposta feita por Waite e colaboradores em 2017 fosse aceitável, uma vez que foram encontradas diferenças filogenéticas que justificavam a criação da família *Arcobacteraceae*, a divisão do género *Arcobacter* em seis diferentes géneros, proposta por Pérez-Cataluña, deveria ser refutada, uma vez que todas as espécies eram capazes de crescer em condições aeróbicas e a reclassificação não era cientificamente justificada, considerando assim que a família *Arcobacteraceae* deveria ser apenas constituída pelo género *Arcobacter*, similarmente ao que acontece com outras famílias de bactérias (On et al., 2020). Uma vez que não existe um consenso em relação à nomenclatura, neste trabalho vamos utilizar a classificação validada até ao momento, proposta por Pérez-Cataluña e assim considerar o género *Aliarcobacter* como válido, bem como todas as espécies que nele se inserem (Perez-Cataluña et al., 2018).

Dentro da família *Arcobacteraceae*, o género *Aliarcobacter* tem vindo a receber mais atenção, contando, até ao momento, com nove espécies validadas (Alonso et al., 2020; Chieffi et al., 2020) (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies do género *Aliarcobacter*, por ano e fonte de primeiro isolamento.

<b>Espécie</b>	<b>Ano</b>	<b>Origem</b>	<b>Referência</b>
<i>Aliarcobacter cryaerophilus</i>	1985	Fetos bovinos abortados	(Neill et al., 1985)
<i>Aliarcobacter butzleri</i>	1991	Humanos e animais com doenças diarreicas	(Kiehlbauch et al., 1991)
<i>Aliarcobacter skirrowii</i>	1992	Fluido prepucial de touros	(Vandamme et al., 1992a)
<i>Aliarcobacter cibarius</i>	2005	Carcaças de frango	(Houf et al., 2005)
<i>Aliarcobacter thereius</i>	2009	Fígado e rins de abortos de suínos e de cloaca de patos	(Houf et al., 2009)
<i>Aliarcobacter trophiarum</i>	2011	Feces de suínos	(De Smet et al., 2011)
<i>Aliarcobacter lanthieri</i>	2015	Suínos e estrume de gado leiteiro	(Whiteduck-Leveillee et al., 2015)
<i>Aliarcobacter faecis</i>	2016	Poço séptico de resíduos humanos	(Whiteduck-Leveillee et al., 2016)
<i>Aliarcobacter vitoriensis</i>	2020	Cenoura e esgotos urbano	(Alonso et al., 2020)

### 1.1.2 Características gerais do género *Aliarcobacter*

As bactérias do género *Aliarcobacter* são descritas como bacilos de Gram-negativo curvados em forma de “S” (Perez-Cataluña et al., 2018). Por ser um microrganismo de Gram-negativo possui uma membrana interna, constituída por fosfolípidos, proteínas integrais, uma membrana externa, composta por lipopolissacarídeos e proteínas como as porinas, separadas pelo espaço periplasmático que contém peptidoglicanos, características que diminuem a permeabilidade da bactéria (Willey et al., 2007). Estas três camadas, podem ainda ser atravessadas por bombas de efluxo responsáveis pelo transporte ativo de toxinas e antibióticos para fora da bactéria (Blair et al., 2015). A presença de bombas de efluxo associadas à baixa permeabilidade conferida pela estrutura das bactérias de Gram-negativo facilitam a aquisição de resistência a antibióticos (Blair et al., 2015).

O género *Aliarcobacter* possui, aproximadamente, 1 a 3 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de largura, não formam esporos e possuem um único flagelo polar que lhes confere mobilidade (Perez-Cataluña et al., 2018). As espécies deste género multiplicam-se a temperaturas entre 15 e 42 °C, sendo o seu crescimento inibido na presença de 4 % de NaCl, de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (0,04%, m/V) ou glicina (1% m/V). No entanto, algumas espécies conseguem crescer na presença de safranina (0,05% m/V) ou ox-gall (1% m/V) (Perez-Cataluña et al., 2018).

As espécies do género *Aliarcobacter* são quimioorganotróficas, oxidase e catalase positivas, contudo a atividade da urease é variável. Têm a capacidade de hidrolisar o acetato de indoxil e conseguem reduzir nitrato a nitrito. No entanto, não possuem capacidade de fermentação de hidratos de carbono e não produzem pigmentos fluorescentes (Chieffi et al., 2020). Em relação à composição de bases do DNA, *Aliarcobacter* é constituída por uma percentagem que varia entre 26,4 % e 29,4 % mol de G+C (Perez-Cataluña et al., 2018).

## 1.2 Fontes de *Aliarcobacter butzleri*

Ao longo dos anos, diversas espécies do género *Aliarcobacter* têm sido isoladas a partir de variados locais, desde alimentos de origem vegetal ou animal, como legumes, marisco ou carne de aves, até amostras de água, indústrias de processamento alimentar como queijarias ou mesmo isolados de animais e humanos (Ferreira et al., 2016; Hsu & Lee, 2015). *Al. butzleri* é considerado um patógeno emergente de origem alimentar e é encontrado ao longo da cadeia alimentar, sendo apontado como um potencial problema para a saúde pública devido ao consumo de alimentos e águas contaminadas (Chieffi et al., 2020; Ferreira et al., 2019a).

### 1.2.1 *Aliarcobacter butzleri* em águas

A presença do género *Aliarcobacter* em diferentes fontes aquáticas, desde rios, lagos, lençóis freáticos, esgotos e até em água para consumo humano tem vindo a ser reportada em diversos estudos (Collado et al., 2008; Merga et al., 2014; Van Driessche & Houf, 2008). Tendo em conta os dados existentes, as águas residuais são as que apresentam maior prevalência de *Aliarcobacter*, incluindo *Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus* e *Al. skirrowii*, seguidas da água de mar, águas superficiais, águas subterrâneas e por fim, este género é menos encontrado em água considerada potável (Venâncio et al., 2022).

Merga e colaboradores isolaram pela primeira vez *Al. butzleri* em Inglaterra, a partir de água de esgotos não tratada, tendo esta sido isolada a partir de todas as nove localizações analisadas neste estudo, o que aponta para a presença de *Al. butzleri* em esgotos de áreas urbanas (Merga et al., 2014). Um outro estudo realizado em Espanha, detetou *Al. butzleri* em todas as amostras provenientes de lagos, estando ainda presente em 94,1% das amostras de rios, em 83,7% das amostras de água do mar, 46,2% em amostras de lamas ativadas de estações de tratamento de águas residuais e em 26,3% das amostras de água de esgotos, concluindo que *Al. butzleri* foi a espécie mais prevalente (94,0%).

Em 2008, um estudo realizado na Bélgica colocou a hipótese de que a presença de *Al. butzleri* em amostras de fezes de animais saudáveis poderia levar à contaminação de reservatórios de água potável e lençóis freáticos através das fezes dos animais, o que seria um sério risco para outros animais e humanos (Van Driessche & Houf, 2008).

Pensa-se que a prevalência de espécies do género *Aliarcobacter* em ambiente aquático se encontre diretamente associada aos níveis de contaminação fecal, uma vez que amostras provenientes de locais afetados por esgotos urbanos apresentam um maior número de diferentes genótipos (Ferreira et al., 2016; Lee et al., 2012). Para além deste ponto, a capacidade demonstrada por *Al. butzleri* para sobreviver a baixas temperaturas e com escassas reservas de nutrientes reforça o seu potencial como patógeno de origem aquática (Ferreira et al., 2016). Conclui-se assim que a presença de espécies deste género em meio aquático é considerado um risco para a saúde humana uma vez que muitos destes ambientes aquáticos são utilizados para atividades balneares e recreativas e que a sua presença na água do mar pode levar à contaminação de moluscos (Collado et al., 2008; Venâncio et al., 2022).

### 1.2.2 *Aliarcobacter butzleri* em alimentos

Grande parte dos estudos, sobre a prevalência de espécies do género *Aliarcobacter*, elaborados até ao momento, têm como principal foco os produtos alimentares, uma vez

que o consumo de alimentos contaminados é visto como a mais provável fonte de transmissão de *Aliarcobacter* a humanos (Hsu & Lee, 2015). A presença de espécies do gênero *Aliarcobacter* em produtos para consumo humano pode dever-se a contaminações durante a produção primária dos mesmos ou devido a contaminações cruzadas, durante o processamento industrial ou doméstico levando a que haja uma transferência do agente patogénico entre alimentos (Ferreira et al., 2019a).

Em relação a *Al. butzleri* são vários os estudos que têm demonstrado a sua ampla distribuição ao longo da cadeia alimentar, desde a fase de processamento dos alimentos, passando pelos alimentos para venda ao consumidor final e mesmo em produtos prontos para consumo humano (Ferreira et al., 2019a; Mateus et al., 2021a).

Diversos estudos têm vindo a demonstrar uma elevada prevalência de *Al. butzleri* em amostras de carne de aves. Um estudo realizado em Espanha detetou a presença de *Al. butzleri* em 100% das amostras de carne de frango, em 80% nas amostras de carne de peru e em 50% das amostras de carne de pato (Collado et al., 2009), enquanto um outro realizado em Portugal demonstrou uma prevalência de *Al. butzleri* em amostras de carne de aves de 88,2% (Vicente-Martins et al., 2018). Embora com valores de prevalência mais baixos, *Al. butzleri* também foi isolada a partir amostras de carne suína, bovina e ovina, apresentando valores estimados de prevalência de 12,3%, 9,6% e 5,2%, respetivamente (Mateus et al., 2021a). Resultados idênticos foram conseguidos por Golla e colaboradores que concluíram que *Al. butzleri* estava presente em amostras de carne bovina e gado leiteiro (9% - 18%), embora com níveis de prevalência inferiores aos encontrados em carne suína e de aves (Golla et al., 2002). A contaminação dos vários tipos de carne também pode ocorrer devido ao contato das carcaças dos animais com fezes de animais contaminados durante o processo de abate (Collado & Figueras, 2011).

Uma outro setor onde a prevalência do gênero *Aliarcobacter* é bastante significativa é o setor dos lacticínios, no qual é reportada uma prevalência entre 5,8% e 56% (Hsu & Lee, 2015). Em relação a *Al. butzleri*, um estudo realizado em Itália, com a finalidade de investigar a presença, distribuição e persistência do gênero *Aliarcobacter* numa fábrica de lacticínios artesanais, detetou a presença de *Al. butzleri* em 46,6% das amostras recolhidas de leite e queijo (Giacometti et al., 2013). Valores idênticos foram obtidos num estudo que avaliou amostras de leite de vaca, leite de búfala e de queijo fresco e no qual foi reportado o isolamento de *Al. butzleri* em 38,9% das amostras de leite de vaca, em 12,5% de leite de búfala e em 21,4% das amostras de queijo fresco (Yesilmen et al., 2014). Contudo, foram reportados valores de prevalência mais baixos, como por exemplo, numa meta análise levada a cabo por Mateus e colaboradores, no qual a prevalência estimada de *Al. butzleri* em lacticínios foi de 9,5 % num intervalo de confiança de 6% a 17% (Mateus et al., 2021a).

Para além destes alimentos, a espécie *Al. butzleri* foi também isolada a partir de amostras de peixe e marisco, sendo que um estudo levado a cabo em Portugal registou uma prevalência de *Al. butzleri* em 28,6% das amostras de peixe analisadas. Estes valores estão em linha com os valores obtidos na meta análise levada a cabo por Mateus e colaboradores, que reportou valores de prevalência estimada de *Al. butzleri* de 24%, num intervalo de confiança de 15,9 % a 34,5 %, em amostras de frutos do mar (Mateus et al., 2021a; Vicente-Martins et al., 2018).

Foi também possível o isolamento do género *Aliarcobacter* em 27,5% das amostras de vegetais prontos a consumir, provenientes de supermercados da zona de Apúlia, na Itália, como por exemplo, espinafres, alface, rúcula e valeriana, sendo que 90,9% dos isolados detetados correspondiam à espécie *Al. butzleri*, o que representa uma prevalência de *Al. butzleri* de aproximadamente 25% (Mottola et al., 2016). Um estudo, realizado em Portugal, descreveu uma prevalência bastante superior à anterior em vegetais embalados e prontos para consumo, sendo a prevalência reportada de 66,7% (Vicente-Martins et al., 2018). De facto, a presença de contaminações em vegetais pode ser um perigo para a saúde humana uma vez que, na grande maioria das vezes, estes alimentos são consumidos crus, o que torna os vegetais contaminados uma possível fonte de infeção para os humanos (González et al., 2011).

### 1.2.3 *Aliarcobacter butzleri* em animais domésticos e selvagens

Estudos realizados na Dinamarca, Turquia, Países Baixos e na Nova Zelândia, indicam que as espécies mais comumente isoladas em répteis, aves como gansos, patos e perus e também em animais domésticos como cães e gatos, são *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* (Atabay et al., 2008; Atabay et al., 2006; Gilbert et al., 2014; Petersen et al., 2007).

Em relação à prevalência de *Al. butzleri*, esta espécie é frequentemente isolada a partir de amostras de fezes, tratos gastrointestinais e até mesmo carcaças de diversos animais que se destinam ao consumo humano como é o caso de frango, peru, gado bovino e ovino (Collado & Figueras, 2011; Hsu & Lee, 2015).

Para além dos animais de quinta, *Al. butzleri* é também frequentemente isolado a partir de animais domésticos como é reportado num estudo realizado no sul de Itália que analisou diferentes amostras provenientes de gatos domésticos e que reportou a presença de *Al. butzleri* em 77,6% das amostras testadas (Fera et al., 2009). Contudo, resultados diferentes foram observados num estudo realizado na Bélgica, com amostras de fezes e esfregaços bocais de cães e gatos no qual não foi isolado *Al. butzleri* a partir de nenhuma

das amostras provenientes de gatos e apenas foi isolada a partir de uma amostra fecal de cão (Fera et al., 2009; Houf et al., 2008).

*Al. butzleri* foi também isolado a partir de amostras provenientes de diversos animais selvagens e de jardins zoológicos como por exemplo, amostras recolhidas a partir do estômago de um feto de equino, amostras de fezes de pelicanos, amostras de urina de rinocerontes e ainda em esfregaços cloacais e amostras fecais de lagartos, tartarugas, cobras e macacos (Anderson et al., 1993; Fernández et al., 2007; Gilbert et al., 2014; Higgins et al., 1999; Wesley & Schroeder-Tucker, 2011).

Alguns estudos referem que a presença de *Al. butzleri* nem sempre se correlaciona com a presença de sintomatologia associada a uma infeção, sendo que a explicação proposta para este facto é que, algumas estirpes desta espécie colonizam de forma generalizada o trato gastrointestinal destes animais, tendo um papel na microflora intestinal (Collado & Figueras, 2011; Houf et al., 2008).

#### 1.2.4 *Aliarcobacter butzleri* em humanos

Como visto anteriormente, espécies do género *Aliarcobacter* são frequentemente isoladas a partir de diversas fontes, como alimentos, água, animais domésticos e selvagens, equipamentos da indústria alimentar e também a partir de humanos (Silha et al., 2019). A primeira espécie *Aliarcobacter* isolada a partir de humanos foi *Al. cryaerophilus*, em 1988, na Austrália (Tee et al., 1988). Contudo, vários estudos apontam *Al. butzleri* como a quarta espécie de organismos *Campylobacter-like* mais prevalente em amostras de fezes diarreicas em humanos (Collado et al., 2013; Prouzet-Mauleon et al., 2006; Vandenberg et al., 2004). Em 2002, tanto *Al. cryaerophilus* como *Al. butzleri* foram considerados um perigo grave para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas para Alimentos (ICMSF, 2002).

Vários são os estudos que reportam o isolamento de *Al. butzleri* a partir de amostras de fezes humanas como é o caso de um estudo levado a cabo na Bélgica, no qual foram analisadas todas as amostras de fezes recolhidas em dois laboratórios hospitalares entre janeiro de 1995 e dezembro de 2002. Este estudo concluiu que, das 67599 amostras de fezes diarreicas e não diarreicas recolhidas, foram detetados 77 isolados (0,14%) de *Al. butzleri* provenientes de amostras diarreicas e sete isolados (0,06%) provenientes de amostras não diarreicas, resultado que demonstra uma prevalência de *Al. butzleri* mais elevada em amostras de fezes diarreicas (Vandenberg et al., 2004). Um outro estudo realizado em França, onde foram analisadas 2855 isolados de organismos *Campylobacter-like*, provenientes de amostras clínicas humanas recolhidas entre julho de 2002 e

dezembro de 2003 no qual, através do método molecular, foi possível detetar que cerca de 1% (29/2855) dos isolados analisados correspondiam à espécie *Al. butzleri*, sendo que 27 dos isolados eram provenientes de fezes humanas (Prouzet-Mauleon et al., 2006). Resultados semelhantes foram reportados por dois outros estudos, o primeiro realizado no Chile por Collado e colaboradores que, após analisarem 140 amostras de fezes diarreicas humana usando uma combinação entre métodos tradicionais e métodos moleculares, observaram uma prevalência de *Al. butzleri* de 1,4% e o segundo, realizado em Portugal, no qual foram recolhidas amostras de fezes provenientes de pacientes com sintomas gastrointestinais agudos, e que reportou que foram detetados isolados de *Al. butzleri* em 1,3% das amostras analisadas (Collado et al., 2013; Ferreira et al., 2014).

Valores de prevalência ligeiramente inferiores foram observados noutros estudos como por exemplo um realizado na Nova Zelândia, no qual foram recolhidas 1380 amostras de fezes diarreicas entre outubro de 2007 e dezembro de 2008, sendo que 0,5% (7/1380) dos isolados foram classificados como *Al. butzleri* (Mandisodza et al., 2012). Resultados idênticos foram verificados num estudo levado a cabo na Bélgica, onde foram analisadas 6774 amostras de fezes provenientes de humanos com sintomas de enterite, recolhidas entre 2008 e 2013, no qual se observou uma prevalência de *Al. butzleri* de 0,7%, resultados que são semelhantes aos obtidos por um outro estudo realizado na Alemanha, em 2020, no qual foram analisadas amostras de fezes humanas provenientes de pacientes hospitalizados e de pacientes com alta hospitalar e foi obtida uma prevalência de 0,77% de *Aliarcobacter*, sendo que destas 66,6% foram identificadas como sendo *Al. butzleri* (Bruckner et al., 2020; Van den Abeele et al., 2014). Contudo, valores de prevalência mais elevadas foram reportadas no Chile, por um estudo no qual foi detetada a presença de *Al. butzleri* em 3,6% dos isolados provenientes de crianças com diarreia, e na África do Sul, através de um estudo que analisou 322 amostras de fezes provenientes de pacientes de um hospital (255 amostras) e de crianças de uma escola primária (67 amostras) no qual 6,2% dos isolados foram identificados, através de métodos moleculares, como *Al. butzleri* (Fernandez et al., 2015; Samie et al., 2007). Apesar de, no geral, a prevalência de *Al. butzleri* em amostras humanas ser reduzida, este valor pode estar a ser subestimado, devido ao facto de os métodos de isolamento e deteção utilizados não serem os ideais para esta espécie bacteriana (Miller et al., 2007).

### **1.3 Vias de transmissão de *Aliarcobacter butzleri***

Como descrito anteriormente, *Al. butzleri* é considerado um patógeno emergente, globalmente distribuído pela cadeia alimentar, facto que torna esta espécie num potencial causador de problemas de saúde pública devido à sua potencial transmissão a humanos e

animais (Collado & Figueras, 2011; Ferreira et al., 2019a). As vias de transmissão associadas a *Al. butzleri* ainda não são totalmente conhecidas, contudo pensa-se que o consumo de água e alimentos contaminados sejam as principais vias de transmissão (Ferreira et al., 2016).

### 1.3.1 Consumo de águas contaminadas

Como referido anteriormente, o consumo de água contaminada é uma das possíveis vias de transmissão de *Al. butzleri* para animais e humanos, dado que esta bactéria foi já isolada a partir de vários ambientes aquáticos, mas também devido ao relato de surtos que tiveram como provável origem o consumo de água contaminada por esta bactéria (Collado & Figueras, 2011; Fong et al., 2007; Moreno et al., 2003; Rice et al., 1999).

Um surto de gastroenterite ocorrido em julho de 1996 num parque de campismo no Idaho, Estados Unidos da América, foi o primeiro a ser associado à contaminação de águas subterrâneas por *Al. butzleri*, uma vez que foi possível isolar esta bactéria a partir do poço do acampamento (Rice et al., 1999). Rice e colaboradores chegaram à conclusão de que o surto teria ocorrido devido a uma falha no sistema de cloração da água utilizada para consumo dos campistas (Rice et al., 1999). Mais recentemente, em julho de 2004, um novo surto, desta vez no Ohio, que afetou aproximadamente 1450 pessoas, sendo também associado a águas subterrâneas que teriam sido contaminadas por águas sépticas provenientes de uma estação de tratamento de águas após um episódio de precipitação intensa (Fong et al., 2007).

Os surtos anteriormente apresentados comprovam a hipótese de que a transmissão de *Al. butzleri* a humanos possa ocorrer devido ao consumo de água contaminada (Ferreira et al., 2016).

### 1.3.2 Consumo de alimentos contaminados

O consumo de alimentos contaminados tem sido apontado como uma das possíveis vias de transmissão de *Al. butzleri* a humanos, uma vez que este microrganismo é encontrado em diversos alimentos (Collado & Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016).

*Al. butzleri* tem sido detetado ao longo de toda a cadeia alimentar e pensa-se que esta contaminação possa ser introduzida na cadeia alimentar através do setor primário, a partir da contaminação dos solos pela utilização de água de estações de tratamento de águas residuais ou por fezes de animais quando estas são usadas como fertilizante, ou também através da contaminação fecal de carcaças de animais durante o processamento

da carne nos matadouros. (Mateus et al., 2021a) Para além destes pontos, o facto de *Al. butzleri* ter vindo a ser isolado a partir de superfícies de processamento de alimentos, em fábricas de lacticínios ou matadouros, aponta para a possibilidade de ocorrer uma contaminação cruzada durante o fabrico e processamento dos alimentos destinados ao consumo humano (Ferreira et al., 2019a).

Como referido anteriormente, vários estudos detetaram a presença de *Al. butzleri* em diversos vegetais frescos e em embalagens de vegetais prontos a consumir, facto que sugere que o consumo de vegetais crus pode representar uma importante via de transmissão de infeções por *Al. butzleri* a humanos, uma vez que estes alimentos não sofrem qualquer processo de preparação antes de serem consumidos (Gonzalez & Ferrus, 2011; Mottola et al., 2016; Vicente-Martins et al., 2018).

Contudo, não só em alimentos crus foi detetada a presença de *Al. butzleri*, como foi demonstrado por um estudo que recolheu amostras de alimentos, crus e cozinhados, provenientes de refeições servidas em 35 restaurantes de Bangkok, recomendados por dois guias de viagens, que concluiu que a probabilidade de uma pessoa contrair uma infeção provocada por *Al. butzleri* seria de 13% por refeição, ou 75% caso fossem consumidas 10 ou mais refeições nesses estabelecimentos, não sendo contudo possível concluir quais os alimentos que estariam mais contaminados (Teague et al., 2010). Um outro estudo, que analisou um surto de origem alimentar que ocorreu entre os participantes de um casamento nos Estados Unidos da América, associado a *Al. butzleri*, concluiu que a origem das infeções seria o consumo de frango assado contaminado (Lappi et al., 2013). Estes resultados reforçam a hipótese de que o consumo de alimentos contaminados possa ser uma potencial via de transmissão de *Al. butzleri* (Collado & Figueras, 2011).

### 1.3.3 Contato com animais domésticos

A transmissão de *Al. butzleri* a humanos poderá também ocorrer a partir do contato com fezes ou com saliva de animais domésticos (Collado & Figueras, 2011).

Alguns estudos têm demonstrado a presença de *Al. butzleri* em amostras provenientes de esfregaços orais, fezes e sangue de animais domésticos (cães e gatos). Entre eles está um estudo efetuado em Itália onde foram analisadas diversas amostras provenientes de gatos e no qual foi detetada uma elevada prevalência de *Al. butzleri* (77,6%) (Fera et al., 2009). Um outro estudo realizado na República Checa, no qual foram analisadas amostras provenientes de cães e gatos, detetou a presença de *Al. butzleri* em 3,7% das amostras de cães e em 1,4% das amostras de gatos (Pejchalová et al., 2016). No Chile foi reportada a presença de *Al. butzleri* em 3,3% das amostras de fezes de cães (Fera et al., 2009;

Fernández et al., 2007; Pejchalová et al., 2016). A presença de *Al. butzleri* em amostras de fezes e esfregaços orais de animais domésticos levam a que seja colocada a hipótese de o contato direto dos humanos com animais domésticos poder ser uma fonte de transmissão de infecções provocadas por *Al. butzleri* (Fera et al., 2009; Fernández et al., 2007; Pejchalová et al., 2016).

#### 1.3.4 Contato pessoa-pessoa

Vandamme e colaboradores sugeriram pela primeira vez, em 1992, que o contato pessoa-pessoa poderia ser considerada uma via de transmissão de *Al. butzleri* (Vandamme et al., 1992b). O estudo levado a cabo por Vandamme *et al.* (1992), descreveu um surto de cólicas abdominais em crianças de uma escola na Itália ocorrido em 1983, no qual concluiu que todos os isolados de *Al. butzleri* tinham as mesmas características fenotípicas e o mesmo perfil proteico, indicando a existência de uma relação epidemiológica entre elas, e uma vez que os casos ocorreram num curto espaço de tempo e em crianças que frequentavam os mesmos locais pode ter ocorrido uma transmissão pessoa-a-pessoa (Vandamme et al., 1992b).

Anos mais tarde, em 1995, um outro estudo propôs um novo caso de transmissão pessoa-pessoas no qual uma mulher de 34 anos, que não apresentava qualquer sinal de infecção, deu à luz uma criança com sintomas de bacteremia provocada por *Al. butzleri* (On et al., 1995). Apesar de, a principal fonte de infecção ser desconhecida, este estudo sugere que a infecção bacteriana tenha começado dentro do útero materno, possivelmente resultado de várias hemorragias pré-natais experienciadas pela mãe, provocadas por placenta prévia, demonstrando que o contato pessoa-a-pessoa, incluindo a transmissão vertical, pode ser uma via de transmissão de *Al. butzleri* (On et al., 1995).

### 1.4 Patogenicidade de *Aliarcobacter butzleri*

Várias espécies do género *Aliarcobacter* são consideradas patógenos humanos, nomeadamente *Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus* e *Al. skirrowii*, sendo que *Al. butzleri* é a espécie mais frequentemente associada a infecções em humanos (Ferreira et al., 2014). No caso de infecções provocadas por *Al. butzleri*, os humanos infetados podem apresentar gastroenterites, bacteremias e septicemias, sendo que os sintomas mais frequentemente reportados são episódios diarreicos persistentes associados a dor abdominal, náuseas, vômitos e em casos mais raros, febre (Chieffi et al., 2020; Karadas et al., 2016).

Apesar de existir uma relação estabelecida entre a doença em humanos e *Al. butzleri*, o seu potencial patogénico é ainda pouco explorado, uma vez que não existem muitos estudos focados em esclarecer os mecanismos de patogénese e genes associados em *Al. butzleri* (Fallahchay et al., 2021).

Estudos desenvolvidos *in vitro* têm demonstrado a capacidade de *Al. butzleri* para aderir e invadir células eucarióticas e também têm demonstrado a capacidade deste microrganismo para produzir toxinas que afetam as células hospedeiras (Ferreira et al., 2016). Exemplo disso é o estudo levado a cabo por Bucker e colaboradores, no qual foram avaliados os efeitos provocados pela infeção de *Al. butzleri* em células epiteliais do intestino humano HT-29/B6, a partir do qual foi possível verificar que a infeção por *Al. butzleri* provocava uma diminuição da resistência epitelial, associada à redução da expressão de proteínas de junção apertada, um aumento da permeabilidade a macromoléculas pela via paracelular e numa fase mais tardia, verificou-se que a infeção por *Al. butzleri* conduzia ao aparecimento de efeitos citotóxicos por necrose e indução de apoptose sendo que ambos os mecanismos apresentados podem levar ao surgimento de diarreia, que é um dos principais sintomas de infeção por *Al. butzleri* (Bucker et al., 2009). Em 2013, foram efetuados novos estudos com linhas celulares do intestino humano, nomeadamente o estudo levado a cabo por Karadas e colaboradores, que utilizou células Caco-2 e HT-29 e que concluiu que todos os isolados de *Al. butzleri* eram capazes de aderir e invadir as células Caco-2 no entanto, em relação às células HT-29, apenas quatro dos seis isolados de *Al. butzleri* testados eram capazes de aderir a esta linha celular e apenas três desses isolados mostraram ter capacidade de invadir as células HT-29 (Karadas et al., 2013). Um outro estudo realizado em 2016, no qual foi estudado o efeito de *Al. butzleri* em células HT29-B6, concluiu que cinco dos seis isolados testados possuíam capacidade de adesão e invasão nesta linha celular (Karadas et al., 2016). Além disso, foi também verificado que dois dos isolados, apesar de apresentarem reduzida capacidade de invasão eram altamente citotóxicos para essa linha celular (Karadas et al., 2016). Estes estudos reforçaram o potencial patogénico de *Al. butzleri* (Karadas et al., 2016; Karadas et al., 2013; Levican et al., 2013).

No que diz respeito a estudos *in vivo*, foram feitas pesquisas com foco no intestino delgado e grosso de roedores que concluíram que a infeção por *Al. butzleri* provocava alterações na expressão de genes reguladores e da resposta pró-inflamatória que regulam a resposta regulatória e pró-inflamatórias, tal como degradação de tecidos (Heimesaat et al., 2016; Heimesaat et al., 2015)

Em 2007, Miller e colaboradores, sequenciaram pela primeira vez o genoma completo de um isolado clínico de *Al. butzleri* RM4018, que permitiu verificar a presença de nove

genes de virulência putativos (*cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *hecA*, *hecB*, *irgA*) que têm recebido uma atenção especial (Ferreira et al., 2016; Miller et al., 2007). Estes genes são homólogos a genes identificados noutras bactérias e estão associados à virulência desses microrganismos, uma vez que estão envolvidos em diversas funções como por exemplo, a capacidade de adesão e invasão das células hospedeiras, a formação do flagelo, a hidrólise de fosfolípidos presentes na membrana externa das bactérias e a lise de eritrócitos (Doudah et al., 2012).

Ao longo dos anos têm vindo a ser efetuados diversos estudos com a finalidade de investigar a presença e a distribuição dos genes de virulência putativos descritos por Miller e colaboradores. Um destes estudos, realizado em 2013, verificou que os genes *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *cj1349* e *cadF* se encontravam presentes em todos os isolados de *Al. butzleri* testados e que os genes *irgA*, *hecA* e *hecB* estavam presentes em apenas 15%, 44% e 13% dos isolados, respetivamente (Karadas et al., 2013). Do mesmo modo, um outro estudo foi capaz de detetar a presença de quatro genes de virulência putativos (*cadF*, *cj1349*, *irgA* e *hecA*) em todos os isolados de *Al. butzleri* e o gene *ciaB* em todas as estirpes de demonstraram capacidade de invasão (Levican et al., 2013). Embora em ambos os estudos tenha sido possível detetar a presença de genes de virulência putativos, o que destaca o seu potencial papel na epidemiologia de infeções provocadas por *Al. butzleri*, apenas Levican e colaboradores conseguiram estabelecer uma correlação entre a presença do gene *ciaB* e a capacidade de invasão deste microrganismo o que indica que são necessários mais estudos de forma a caracterizar os traços de virulência e o seu papel na infeção (Levican et al., 2013).

## **1.5 Resistência de *Aliarcobacter butzleri* a antibióticos**

Com a descoberta da penicilina, feita por Sir Alexander Fleming em 1929, tinha início uma nova era para o tratamento de infeções. Com o aparecimento crescente de substâncias similares à penicilina, surgiu a necessidade de encontrar um termo que abrangesse todos estes compostos. Esse termo foi introduzido em 1941, por Selman Waksman, que atribuiu o termo “antibiótico” a qualquer substância, produzida por um microrganismo, que fosse antagonista do crescimento de outros microrganismos (Kumar & Schweizer, 2005; Neu, 1992; Ventola, 2015).

A utilização de antibióticos veio facilitar o tratamento de infeções o que, consequentemente, conduziu à diminuição da mortalidade e aumento da esperança média de vida da população (Blair et al., 2015). No entanto, o uso destes compostos tornou-se cada vez mais comum, não só para uso clínico em humanos, mas também na agricultura e

na criação de animais, para efeitos terapêuticos e para promover o crescimento dos mesmos (Andersson & Hughes, 2014). A utilização inadequada destes compostos conduziu ao aparecimento de bactérias resistentes ou multirresistentes a antibióticos que estão a causar uma crise de saúde global (Andersson & Hughes, 2014; Blair et al., 2015).

Até ao momento, os estudos referentes à suscetibilidade de *Aliarcobacter* a antibióticos, limitam-se a três espécies deste género nomeadamente, *Al. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, e ao contrário do que se verifica para *Campylobacter*, os testes de suscetibilidade para o género *Aliarcobacter* ainda não se encontram padronizados, o que pode conduzir a diversidade de resultados e dificultar a comparação dos mesmos

(Collado & Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016).

À semelhança do que se verifica em infeções provocadas por *Campylobacter*, também as infeções provocadas pelo género *Aliarcobacter* são na sua grande maioria autolimitadas e não necessitam da utilização de antibióticos contudo, o uso destes é justificado quando os sintomas são prolongados ou quando se tornam mais severos (Collado & Figueras, 2011). Os antibióticos considerados para o tratamento de bacteremia provocada por *Aliarcobacter* são as cefalosporinas ou combinações de outras classes de antibióticos com estas. Já no caso de infeções intestinais e extraintestinais foi sugerido o uso de quinolonas, tetraciclina, macrólidos e também antibióticos  $\beta$ -lactâmicos combinados com um inibidor de  $\beta$ -lactamases para o tratamento destas infeções (Ferreira et al., 2016; Isidro et al., 2020).

Apesar destes antibióticos serem usados para o tratamento de infeções provocadas por *Aliarcobacter*, alguns estudos têm demonstrado que espécies como *Al. butzleri* apresentam resistência a alguns destes antibióticos, provavelmente devido à utilização indevida destes agentes antimicrobianos no tratamento de animais e na agricultura e à vasta distribuição desta bactéria, facto que pode afetar a sua eficácia (Ferreira et al., 2017). Um desses estudos, no qual foi analisada a suscetibilidade de 50 isolados de *Al. butzleri* provenientes de fezes de pato, pelicanos, mexilhões, gado bovino, fígado de frango e água de rio concluiu que a maioria dos isolados eram resistentes à ampicilina (90%) e ao cloranfenicol (98%), mas apenas 2% eram resistentes à eritromicina e à ciprofloxacina e nenhuma das amostras testadas apresentou resistência para a gentamicina e tetraciclina (Oth et al., 2004). Um outro estudo, realizado em 2004, onde foi avaliada a suscetibilidade de 98 isolados de *Al. butzleri* provenientes de aves de capoeira e de fezes de humanos, verificou a presença de isolados resistentes à eritromicina e uma diminuição da suscetibilidade à ciprofloxacina em isolados provenientes de aves de capoeira, facto que pode ser preocupante uma vez que estes antibióticos são usados como primeira linha de tratamento de infeções provocadas por este microrganismo (Houf et al., 2004). Resultados

diferentes foram reportados por um estudo levado a cabo nos Estados Unidos da América, onde foram analisados isolados provenientes de carcaças de frango de uma fábrica de processamento, no qual foram encontrados isolados de *Al. butzleri* resistentes à clindamicina (90%), azitromicina (81,4%) e também ao ácido nalidíxico (23,6%) (Son et al., 2007). Para além destes resultados, foi também reportado que 82,9% dos isolados de *Al. butzleri* apresentavam resistência a dois ou mais antibióticos, sendo que as combinações mais frequentes eram azitromicina/clindamicina (96,6%) e azitromicina/clindamicina/ácido nalidíxico (93,3%) (Son et al., 2007).

Já na Bélgica, onde foram analisados isolados de *Campylobacter* e *Aliarcobacter* provenientes de fezes humanas, submetidas a um laboratório entre 1995 e 2005, concluiu que 78,7% dos isolados de *Al. butzleri* eram suscetíveis à ampicilina, 82% ao ácido nalidíxico, 96,7% à ciprofloxacina e 100% eram suscetíveis à gentamicina e à tetraciclina (Vandenberg et al., 2006).

Em Portugal, dois estudos realizados com isolados de *Al. butzleri* provenientes de uma fábrica de laticínios e de alimentos prontos para consumo, verificaram que a grande maioria dos isolados eram resistentes ao ácido nalidíxico, à cefotaxima e à tetraciclina, com 100%, 97,9-98,5% e 95,4% de isolados resistentes, respetivamente. Por outro lado, também foi possível observar que a percentagem de isolados resistentes à eritromicina e à gentamicina era bastante mais baixa, uma vez que a percentagem de isolados resistentes a estes antibióticos variava entre 0% e 10,8%. Os resultados obtidos por estes estudos indicam que tanto a eritromicina como a gentamicina poderiam ser uma boa opção para tratamento de infeções provocadas por *Al. butzleri* (Ferreira et al., 2017; Vicente-Martins et al., 2018). Mais recentemente, uma meta-análise realizada com o objetivo de avaliar a resistência a antibióticos do género *Aliarcobacter* concluiu que a espécie *Al. butzleri* apresentava frequências de resistência mais elevadas à ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalotina, azitromicina e levofloxacina. A mesma análise concluiu que *Al. butzleri* era a espécie que apresentava maior suscetibilidade à eritromicina, gentamicina, tetraciclina, estreptomina e doxiciclina (Ferreira et al., 2019b).

Os diferentes resultados obtidos na avaliação da suscetibilidade de *Al. butzleri* a antibióticos podem ser suportados pelo facto de não existirem protocolos de referência para determinar a suscetibilidade dos isolados e a falta de pontos de corte específicos contribuem para a subestimação dos valores, no entanto, a origem dos isolados e o tipo de amostra utilizado também podem ter influência nos resultados obtidos (Chieffi et al., 2020; Ferreira et al., 2019b; Ferreira et al., 2016).

## 1.6 Mecanismos de resistência a antibióticos

Tendo em conta a número crescente de bactérias resistentes e multirresistentes a antibióticos, surgiu a necessidade de estudar os mecanismos que tornam estes microrganismos resistentes, com a finalidade de arranjar novas formas de combater as infeções provocadas por estes (Petchiappan & Chatterji, 2017).

As bactérias podem ter mecanismos de resistência intrínsecos como a inativação do antibiótico por ação de enzimas, alterações na permeabilidade da parede celular e o efluxo do fármaco. Já os mecanismos de resistência adquiridos estão ligados a mutações genéticas ou à transferência horizontal de genes, e dividem-se em três grupos principais: a inativação do fármaco, a modificação do alvo terapêutico e a diminuição da concentração intracelular do antibiótico (Blair et al., 2015; Peterson & Kaur, 2018).

No que diz respeito à inativação de antibióticos, esta pode ocorrer devido a enzimas que hidrolisam o antibiótico, sendo que estas enzimas são capazes de modificar ou até mesmo degradar o agente antimicrobiano. As classes de antibióticos mais afetadas por estas enzimas, são os  $\beta$ -lactâmicos, por ação de  $\beta$ -lactamases, e os macrólidos por ação de esterases. Uma outra forma de inativar o fármaco é através da adição de um grupo funcional ao antibiótico, pela ação de enzimas produzidas pelas bactérias, levando a que o composto antimicrobiano deixe de ter capacidade para se ligar à proteína alvo. Exemplo dessas enzimas são as aciltransferases, o aminoglicosídeo cinases, tioltransferases, nucleotidiltransferases, ADP-ribosiltransferases, ou glicotransferases. Os aminoglicosídeos como é o caso da gentamicina, e os macrólidos como a eritromicina são particularmente suscetíveis a ação destas enzimas (Blair et al., 2015; Wright, 2005).

Em relação à modificação do alvo terapêutico, este é um mecanismo de autodefesa que afeta antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, glicopéptidos, macrólidos, lincosaminas, estreptograminas ou aminoglicosídeos (Peterson & Kaur, 2018). As alterações provocadas na estrutura do alvo terapêutico impedem que haja uma ligação eficiente do antibiótico. Estas alterações podem ocorrer devido a mutações pontuais nos genes que codificam o alvo, modificação enzimática no local de ligação e substituição ou desvio do alvo, para além destes, a proteção da molécula alvo também é um mecanismo de defesa (Blair et al., 2015; Munita & Arias, 2016).

A diminuição da concentração intracelular de antibióticos pode ser causada pela diminuição da permeabilidade da membrana através da diminuição da expressão de porinas ou através da sobreexpressão de sistemas de efluxo, sendo este mecanismo muito importante para a resistência de bactérias de Gram-negativo, nomeadamente para perfis de multirresistência (Blair et al., 2015).

As bombas de efluxo são formadas por conjuntos de proteínas que estão presentes na membrana celular de quase todas as bactérias e têm um papel fundamental na remoção de substâncias nocivas do interior da célula para o exterior. Estas dividem-se em seis superfamílias: a *ATP-binding cassette* (ABC), a *small multidrug resistance* (SMR), a *multidrug and toxin extrusion* (MATE), a *major facilitator superfamily* (MFS), a *proteobacterial antimicrobial compound efflux* (PACE) e a *resistance-nodulation division* (RND) (AlMatar et al., 2021; Mateus et al., 2021b).

Entre estas famílias de bombas de efluxo, no que diz respeito a bactérias de Gram-negativo, a superfamília RND é a mais relevante, uma vez que quando sobreexpressa pode levar as bactérias a exibir níveis significativos de resistência (Mateus et al., 2021b).

No que diz respeito a mecanismos de resistência a antibióticos de *Al. butzleri*, ainda pouco se sabe. Em 2007, Miller e colaboradores, ao sequenciarem o genoma completo de *Al. butzleri* colocaram a hipótese de a resistência apresentada por esta espécie a quinolonas hidrofóbicas, como o ácido nalidíxico, ser devida à presença de uma bomba de efluxo específica para estas moléculas (Miller et al., 2007).

Em 2020, num estudo levado a cabo por Isidro e colaboradores, com o objetivo de analisar o conjunto de genes que poderiam estar ligados à adaptação e à patogenicidade de *Al. butzleri*, construindo uma base de dados de genes associados à virulência e resistência a antibióticos, foram identificados 8 sistemas de efluxo da família RND em *Al. butzleri* (Isidro et al., 2020). Relativamente à resistência a antibióticos, este estudo analisou a suscetibilidade de 22 estirpes de *Al. butzleri* a seis antibióticos, a partir da qual foi possível verificar que nove das estirpes de *Al. butzleri* analisadas apresentavam um fenótipo a resistência a fluoroquinolonas (levofloxacina e ciprofloxacina) e que todas as estirpes resistentes tinham em comum uma mutação do Thr-85-Ile no gene *gyrA*, mutação associada anteriormente à resistência a estes antibióticos (Abdelbaqi et al., 2007). Em relação à resistência à ampicilina, 10 estirpes apresentavam o fenótipo de resistência e foi encontrada uma forte correlação entre a presença de uma  $\beta$ -lactamase OXA-15-like e a resistência à ampicilina, no entanto, em relação ao ácido nalidíxico e à cefotaxima não foi possível retirar conclusões. No que diz respeito à eritromicina, Isidro e colaboradores encontraram uma correlação entre um codão *stop* prematuro no regulador transcricional da família de repressores da transcrição TetR, que provavelmente regula a bomba de efluxo 16, e o fenótipo de resistência à eritromicina. Neste estudo, foi, assim, observado pela primeira vez um mecanismo de resistência a antibióticos mediado por sistemas de efluxo em *Al. butzleri*, colocando a hipótese de esta mutação no gene repressor da transcrição TetR levar a uma sobreexpressão da bomba de efluxo que, conseqüentemente

levaria ao aumento da extrusão deste antibiótico e em última instância, levaria ao aumento da resistência ou tolerância à eritromicina (Isidro et al., 2020).

Nos últimos anos, alguns estudos foram realizados com a finalidade de avaliar a influência da expressão de bombas de efluxo na resistência a diversas classes de antibióticos em *Al. butzleri*, tendo como objetivo entender o papel de três sistemas de efluxo da família RND, os AreABC, AreDEF e AreGHI, na resistência a antibióticos de *Al. butzleri* (Ferreira et al., 2021; Mateus et al., 2021b). A partir destes estudos foi possível obter resultados que suportam a hipótese de a expressão destes sistemas de efluxo contribuírem para a resistência de *Al. butzleri* a diversos antibióticos (Ferreira et al., 2021; Mateus et al., 2021b). Para além disso, foi também possível verificar que a bomba de efluxo AreABC (identificada como bomba de efluxo 16 no estudo por Isidro et al. (2020)) é regulada por um repressor da transcrição AreR e que a resistência de *Al. butzleri* a macrólidos estava associada à presença de formas truncadas deste repressor (Ferreira et al., 2021). No que diz respeito aos restantes sistemas de efluxo da família RND, o sistema de efluxo AreGHI demonstrou ter influência na extrusão de diversos agentes antimicrobianos, já o sistema de efluxo AreDEF, apesar de mostrar seletividade para alguns substratos, não parece ter um papel significativo na resistência em *Al. butzleri* (Mateus et al., 2021b).

Apesar de os macrólidos serem uma das classes de antibióticos utilizadas para o tratamento de infeções provocadas por *Aliarcobacter* em animais e humanos, tem vindo a ser descrita a existência de uma baixa a moderada frequência de resistência associada a esta classe de antibióticos, sendo que essa aquisição de resistência pode comprometer o tratamento de infeções provocadas por *Aliarcobacter* (Ferreira et al., 2019b). Contudo, os mecanismos associados à resistência a esta classe de antibióticos ainda não se encontram totalmente descritos, sendo necessários mais estudos.

## 1.7 Macrólidos

Em 1952 foi descoberto o primeiro macrólido, a eritromicina, produzida por *Streptomyces erythreus*, um microrganismo isolado pela primeira vez a partir de uma amostra de solo das Filipinas (Kirst, 2002). Assim como a eritromicina, a grande maioria dos macrólidos são metabolitos do género *Streptomyces*, à exceção da mirosamicina e da rosaramicina que foram isoladas a partir de *Micromonospora* (Kanfer et al., 1998).

Os macrólidos são tradicionalmente usados para tratar infeções provocadas por bactérias de Gram-positivo, como *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila* ou *Staphylococcus aureus*. No entanto, também são considerados para o tratamento de algumas bactérias de Gram-negativo como *Bordetella*

*pertussis*, *Bartonella spp.*, *Chlamydia spp.*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema spp.* ou mesmo *Campylobacter spp.*, e também mostraram eficácia contra protozoários como *Plasmodium spp.* e *Toxoplasma gondii* (Gomes et al., 2017; Zhanel et al., 2001).

Os macrólidos podem ser divididos em três grupos, baseados no número de átomos que constituem a lactona circular característica da estrutura química destes compostos. No grupo com 14 átomos estão incluídos a eritromicina (A-F), oleandomicina, roxitromicina, diritromicina, claritromicina e fluritromicina, com 15 átomos na lactona circular existe a azitromicina e no grupo que tem 16 átomos estão incluídos a josamicina, rosaramicina, roquitamicina, kitasamicina, espiramicina e a tilocina (Kanfer et al., 1998).

Embora esta classe de antibióticos tivesse propriedades antimicrobianas excelentes, a sua reduzida biodisponibilidade e instabilidade no pH ácido do estômago humano levou a que uma nova geração de macrólidos fosse criada. Com base na eritromicina foram criados macrólidos de segunda geração, semissintéticos, no qual estão incluídas a claritromicina, roxitromicina, azitromicina, entre outros (Dinos, 2017).

Inicialmente, pensava-se que os macrólidos simplesmente bloqueavam por completo a tradução de novos péptidos através do bloqueio do NPET (Tenson et al., 2003). No entanto, novos estudos indicam que a estrutura do NPET define se a síntese das novas proteínas é bloqueada, interrompida ou continuada. O processo de tradução é interrompido quando há a presença de péptidos específicos, como é o caso dos péptidos codificados por genes reguladores da resistência a macrólidos. Caso o N-terminal sofra um desvio, alguns péptidos conseguem passar pelo NPET e completar o processo, levando à existência de polipéptidos longos (Gomes et al., 2013; Kannan et al., 2012). Já em 2013 foi proposto um novo mecanismo de ação no qual o macrólido se liga ao NPET, provocando um bloqueio parcial do lúmen gerado pelas proteínas L4 e L22 (Figura 1), no entanto esse semibloqueio não era suficiente para bloquear a síntese de péptidos (Gomes et al., 2013). Em suma, os estudos mais recentes apresentam os macrólidos como modeladores da tradução em vez de inibidores globais da síntese proteica (Vazquez-Laslop & Mankin, 2018).

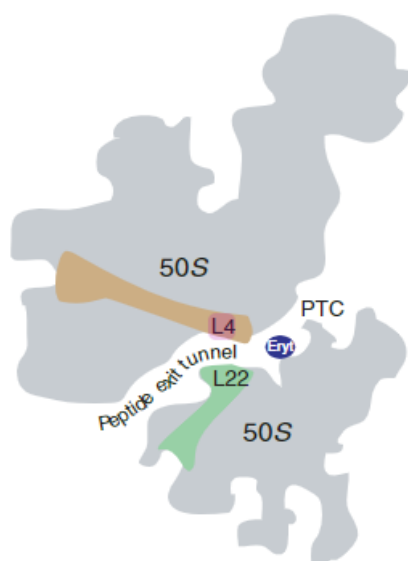


Figura 1: Secção transversal da grande subunidade ribossomal ao longo do NPET, com o centro da peptidil-transferase (PTC) e a interface da subunidade à direita. A posição das proteínas ribossômicas L4 e L22 são mostradas em castanho e verde, respetivamente, e o sítio de ligação da eritromicina é indicado a azul. Imagem adaptada de: (Lovmar et al., 2009).

Como referido anteriormente, nos últimos anos, têm vindo a surgir estirpes de *Al. butzleri* resistentes a macrólidos, mas os mecanismos que tornam estes microrganismos resistentes ainda não são compreendidos. Em *Campylobacter*, os mecanismos mais comumente associados a este aumento de resistência são mutações do domínio V do rRNA 23S, mutações nas proteínas ribossomais L4 e L22 que causam uma diminuição da afinidade da eritromicina para alvo, o efluxo do fármaco pela bomba de efluxo CmeABC ou outras, e ainda a diminuição da permeabilidade da membrana celular (Iovine, 2013; Lovmar et al., 2009). Um outro mecanismo de resistência aos macrólidos descrito é mediado pelo gene *erm* que codifica para uma metiltransferase que metila o nucleótido A2058 do rRNA 23S impedindo a ligação do antibiótico ao alvo (Fyfe et al., 2016).

Os estudos realizados para tentar entender quais os mecanismos de resistência de *Al. butzleri* aos macrólidos já evidenciaram o papel das bombas de efluxo na aquisição de resistência, como é comprovado num estudo realizado em Portugal onde foram comparados 49 genomas de *Al. Butzleri*. Nessa análise foi apresentada a primeira descrição de fatores genéticos que determinavam a resistência à eritromicina em *Al. Butzleri* (Isidro et al., 2020), e que foram posteriormente validados, em 2021, num estudo levado a cabo por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 2021). Em ambos os estudos mencionados anteriormente, foram associadas formas truncadas da proteína AreR a baixos níveis de resistência a macrólidos (Ferreira et al., 2021; Isidro et al., 2020). Em

relação aos restantes mecanismos de resistência associados aos macrólidos, como mutações nas proteínas ribossomais L4 e L22 ou mutações associadas ao domínio V do rRNA 23S, até ao momento ainda nenhum destes foi descrito em *Al. butzleri* (Ferreira et al., 2021; Isidro et al., 2020).

Uma vez que a resistência a antibióticos de bactérias com potencial patogénico é um problema cada vez maior de saúde pública, conhecer os seus mecanismos de resistência é um passo importante para tentar combater as linhagens resistentes.

## Capítulo 2: Objetivos

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o aumento da resistência a antibióticos, por parte de bactérias patogênicas, como uma das principais ameaças à saúde pública, sendo por isso importante estudar os mecanismos de resistência a antibióticos a fim de facilitar a identificação de linhagens resistentes e também de encontrar outras formas de tratamento. A espécie *Al. butzleri* é um enteropatógeno emergente, cujas infecções são associadas a doenças autolimitadas. No entanto, em casos de doenças com sintomatologia persistente é recomendado o uso de antibióticos, sendo que para adultos a eritromicina é um dos antibióticos recomendados. Nos últimos anos, têm vindo a ser reportados cada vez mais estirpes de *Al. butzleri* com perfis de resistência a antibióticos, tendo-se verificado uma baixa a moderada frequência de resistência à eritromicina. Porém, existe um défice de informação relativa aos mecanismos associados à resistência em *Al. butzleri*. Até ao momento pensa-se que possa existir correlação entre o fenótipo de resistência à eritromicina e a regulação da expressão de uma bomba de efluxo AreABC, no entanto, este não é o mecanismo mais comumente associado à resistência a este tipo de antibióticos em bactérias de Gram-negativo, e não parece explicar todos os casos de resistência.

Assim este trabalho teve como objetivo geral investigar os potenciais mecanismos, que podem estar associados à resistência a macrólidos de *Al. butzleri*, e os efeitos que a aquisição de resistência a esta classe de antibióticos provocam na robustez desta bactéria e na sua suscetibilidade a outros antibióticos.

Para tal, os objetivos específicos definidos para este trabalho foram:

- Avaliar a taxa de mutação espontânea da espécie *Al. butzleri*;
- Avaliar de que forma as mutações espontâneas interferem na suscetibilidade a antibióticos e na robustez de *Al. butzleri*;
- Desenvolver estirpes com elevado nível de resistência à eritromicina a fim de determinar os possíveis mecanismos associados à resistência de *Al. butzleri* a macrólidos;
- Avaliar os efeitos da elevada resistência à eritromicina na suscetibilidade a antibióticos e na robustez de *Al. butzleri*.

## Capítulo 3: Materiais e Métodos

### 3.1 Estirpes bacterianas de *Aliarcobacter butzleri*

Para a realização deste trabalho foi usada uma estirpe de *Al. butzleri*, denominada DQ40A1, naturalmente transformável, proveniente da superfície do equipamento de uma queijaria (Ferreira et al., 2017). Para além disso, foram ainda usadas duas estirpes mutantes derivadas de DQ40A1, uma cujo sistema de efluxo AreABC foi inativado por mutação insercional no gene *areB* que codifica para uma proteína de membrana interna do transportador AreABC (*DQ40A1 $\Delta$ areB*), e outro no qual o gene *areR* foi substituído passando a codificar uma proteína truncada (*DQ40A1\_trunc\_areR*), ambos criados a partir de um processo de transformação natural (Ferreira et al., 2021).

### 3.2. Armazenamento e preparação das estirpes

Para armazenamento das estirpes a longo prazo, estas foram mantidas em tubos criogénicos com meio Brain Heart Infusion (Liofilchem, Itália) com 20% (v/v) glicerol e armazenadas a -80°C. Para armazenamento a curto prazo, as estirpes foram inoculadas em meio Blood Agar Base (VWR Bélgica), suplementado com 5% (v/v) de sangue de cavalo desfibrinado e incubadas durante 48 horas a 30 °C. Após incubação, as placas foram armazenadas a 4 °C num período máximo de duas semanas.

### 3.3. Determinação da concentração mínima inibitória para *Aliarcobacter butzleri*

Com a finalidade de avaliar a suscetibilidade de um microrganismo a um determinado agente antimicrobiano é necessário determinar a concentração mínima inibitória (CMI) deste. A determinação da CMI é normalmente usada para avaliar a atividade de novos agentes antimicrobianos *in vitro* e também é usada como diagnóstico laboratorial para confirmar níveis de resistência (Andrews, 2001).

Assim, ao longo deste trabalho, foram determinadas as CMI de vários antibióticos (Tabela 2) pelo método de microdiluição em placas de 96 poços.

Tabela 2: Identificação dos agentes antimicrobianos utilizados na determinação das concentrações mínimas inibitórias.

<b>Agente antimicrobiano</b>	<b>Marca do composto</b>	<b>Grau de pureza (%)</b>	<b>Solvente</b>
<b>Eritromicina</b>	Sigma-Aldrich	100	Etanol 95%
<b>Claritromicina</b>	Sigma-Aldrich	95	Etanol 95%
<b>Gentamicina</b>	Sigma-Aldrich	100	Água
<b>Tetraciclina</b>	Sigma-Aldrich	98	Etanol 95%
<b>Ampicilina</b>	NzyTech	100	Tampão fosfato, pH=8
<b>Ciprofloxacina</b>	Sigma-Aldrich	98	NaOH e água
<b>Cefotaxima</b>	Acros Organics	95	Água

Para tal, as estirpes de *Al. butzleri* foram previamente inoculadas em meio Tryptic Soy Agar (TSA) (VWR, Bélgica) e incubadas a 30 °C durante 24 horas. A partir desta cultura preparou-se uma suspensão bacteriana em solução de NaCl a 0,85% (p/v), ajustando a turbidez da suspensão celular a ~0,5 unidades de McFarland, correspondendo a cerca de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colónias (UFC)/mL. De seguida, o inóculo foi diluído numa razão de 1:100 antes de ser adicionado a cada poço da microplaca. O antibiótico em estudo foi diluído sucessivamente de 1:2 em meio TSB, num volume de 50 µL, num intervalo de concentração ajustado de acordo com a suscetibilidade da cada estirpe em estudo. Por fim, foram adicionados 50 µL de inóculo diluído, para um volume final de 100 µL em cada poço, ficando com uma concentração final de cerca de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. A microplaca foi incubada a 30 °C durante 48 horas. A determinação da CMI foi feita por observação a olho nu da turbidez dos poços, considerando a CMI a concentração mais baixa a inibir o crescimento bacteriano. Os resultados foram confirmados através da avaliação da densidade ótica (DO) a um comprimento de onda de 620nm (DO<sub>620nm</sub>) usando um leitor de microplacas (Biorad, xMark).

Neste ensaio foram ainda incluídos controlos negativos e de crescimento, sendo que o controlo negativo foi constituído por 100 µL de meio TSB e o controlo de crescimento foi constituído por 50 µL de meio TSB e 50 µL de inóculo. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente.

### 3.4. Determinação da frequência de mutação espontânea em *Aliarcobacter butzleri*

A frequência de mutação espontânea define-se como a proporção de mutantes presentes numa cultura (Zheng, 2018) e corresponde à razão entre as UFC/mL obtidas em placas com meio seletivo e as UFC/mL totais contadas a partir das placas sem antibiótico.

Por forma a proceder a esta avaliação foi utilizado o protocolo descrito por Hass e colaboradores (Haas et al., 1990), com algumas modificações. Inicialmente, as estirpes DQ40A1, DQ40A1 $\Delta$ areB e DQ40A1\_trunc\_areR foram inoculadas em placas de TSA e incubadas durante 24 horas a 30 °C. Posteriormente a biomassa foi recolhida e as células foram lavadas e ressuspendidas em NaCl 0,85%. Seguidamente procedeu-se à leitura da DO<sub>620nm</sub> e às diluições necessárias para acertar a concentração de células a 10<sup>9</sup> UFC/mL. Por fim, foram inoculados 100 µL da suspensão celular em placas de meio TSA com antibiótico nas concentrações descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Concentrações de eritromicina usadas nas placas de meio TSA para cada estirpe em estudo.

Estirpes de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	Concentração de eritromicina (µg/mL)
DQ40A1	2, 4, 8, 16, 32 e 64
DQ40A1 $\Delta$ areB	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64
DQ40A1_trunc_areR	16, 32 e 64

Foi ainda determinado o número de células cultiváveis através do método *drop plate* no qual foram inoculados 10 µL de diluições decimais realizadas em NaCl 0,85%, correspondentes a 10<sup>-5</sup> e 10<sup>-11</sup>, em placas de TSA sem antibiótico. Todas as placas foram incubadas a 30 °C e foram efetuadas contagens após 48 horas de incubação e nos cinco dias que se seguiram. Para esta determinação foram efetuados, pelo menos, três ensaios independentes.

### 3.5. Determinação da taxa de mutação espontânea em *Aliarcobacter butzleri*

A taxa de mutação ( $\mu$ ) é uma estimativa da probabilidade de ocorrer uma mutação por divisão celular, sem a intervenção de agentes exógenos ao longo da vida da bactéria (Pope et al., 2008). A avaliação da taxa de mutação foi descrita pela primeira vez por Luria e Delbrück (Luria & Delbruck, 1943) e permite o cálculo da taxa de mutação espontânea através da análise da distribuição de mutantes em diversas culturas paralelas (Rosche & Foster, 2000).

Antes de iniciar o ensaio foi necessário garantir alguns parâmetros iniciais como: (i) o inóculo inicial ( $N_0$ ) não possuir mutações pré-existentes, (ii) ter um baixo número de células ( $\leq 10^4$  UFC/mL) e (iii) ocorrer um aumento de 1000 vezes no inóculo final ( $N_t$ ) ( $N_t > 1000N_0$ ) (Foster, 2006; Pope et al., 2008; Rosche & Foster, 2000).

De modo a validar estes parâmetros a estirpe *Al. butzleri* DQ40A1 foi inicialmente inoculada em meio TSA durante 24 horas a 30 °C. Após o que foi preparada uma cultura em meio TSB com uma  $DO_{620nm}$  de 0,005, e incubada num orbital a 30°C e 100 rpm durante 18 horas. Para verificar a inexistência de mutações pré-existentes foram transferidos 30  $\mu$ L da cultura anterior para uma placa de TSA suplementada com eritromicina numa concentração quatro vezes superior à CMI. Para validar os dois últimos parâmetros foi efetuada uma diluição da cultura de 1:200000 para um volume final de 5 mL. A partir desta diluição foram efetuadas contagens no dia zero, para garantir que o ensaio tinha início com aproximadamente  $10^4$  UFC/mL e após um período de 24 e 48 horas para garantir que ocorria um aumento de pelo menos 1000 vezes em relação ao número de células inicial.

Após estarem garantidos todos os parâmetros iniciais procedeu-se à realização do ensaio começando por preparar uma cultura nas mesmas condições aplicadas na validação dos parâmetros. Assim, após a cultura *overnight*, foi efetuada uma diluição de 1:200000 para, pelo menos, 20 tubos com um volume final de 5 mL. Para determinar o  $N_0$  foram selecionados três tubos aleatoriamente, e procedeu-se às contagens das UFC/mL totais, em placas sem antibiótico. Todos os tubos foram depois incubados a 30°C durante 48 horas e após este período foram recolhidos 500  $\mu$ L de cada tubo que foram inoculados, com o auxílio de um espalhador de vidro, em placas de TSA suplementadas com eritromicina com uma concentração quatro vezes superior à CMI. De três tubos selecionados aleatoriamente foram determinadas UFC/mL totais, usando meio não seletivo (TSA). As placas foram incubadas a 30 °C durante 72 horas e depois foi efetuada a contagens das colónias resistentes e totais.

A distribuição das colónias nas placas com e sem antibiótico foi utilizada para calcular a taxa de mutação espontânea. Este parâmetro foi determinado de acordo com o método da mediana, descrito por Lea e Coulson em 1949 (Lea & Coulson, 1949), no qual a distribuição dos mutantes nas placas com meio seletivo é utilizada para determinar o número de mutações por cultura,  $m$ . De acordo com o modelo usado, o valor de  $m$  deve variar entre 1,5 e 15 e é calculado de acordo com a Equação 1 (Pope et al., 2008).

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

O número de culturas paralelas necessárias para representar uma população bacteriana foi estabelecido com base na sua dependência do valor de  $m$ , de acordo com Rosche e Foster (Rosche & Foster, 2000). A taxa de mutação espontânea foi determinada pela razão entre esse parâmetro  $m$  e o número de UFC/mL totais do ensaio (Lea & Coulson, 1949; Pope et al., 2008).

Por fim, foram selecionadas 17 colónias aleatoriamente (TM1A-TM1Q) que foram sujeitas a ampliação de biomassa por passagens sucessivas em placas de TSA sem antibiótico, incubadas a 30 °C durante 24 horas. Cada mutante foi de seguida congelado em meio BHI suplementado com 20% de glicerol para uso posterior. Foi ainda efetuada a determinação da CMI da eritromicina para cada isolado segundo a metodologia apresentada no ponto 3.3.

### 3.6. Evolução de resistência *in vitro*

Devido ao facto de, até ao momento não ter sido possível isolar estirpes com elevados níveis de resistência à eritromicina e de, por isso, não serem conhecidos os mecanismos de resistência associados a estes níveis de resistência, surgiu a necessidade de criar estirpes com este fenótipo. Para isso o aumento de resistência à eritromicina foi induzido *in vitro* como descrito por Shuster e colaboradores (Shuster et al., 2016), com algumas alterações, como ilustrado na Figura 2.

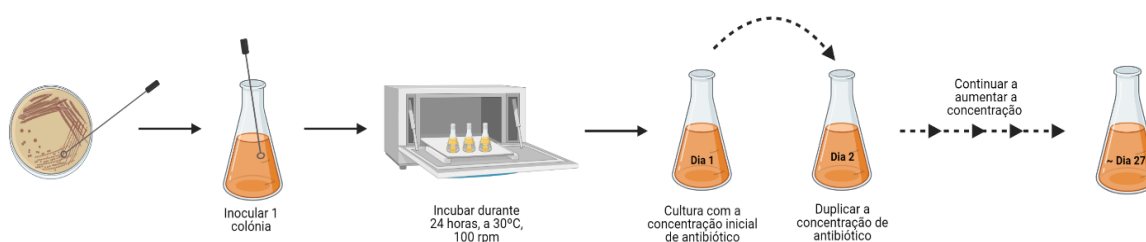


Figura 2: Representação do ensaio de evolução de resistência à eritromicina *in vitro*. Baseado Shuster, Steiner-Mordoch, Alon Cudkowicz e Schuldiner, 2016.

Inicialmente, procedeu-se à inoculação da estirpe de *Al. butzleri* DQ40A1 numa placa de TSA durante 48 horas, após este tempo foi retirada da placa uma colónia isolada que foi colocada a crescer num erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de TSB, incubado a 30 °C e 100 rpm durante 24 horas.

De seguida, as células foram recolhidas e a  $DO_{620nm}$  ajustada a aproximadamente 0,2, e 100  $\mu$ L desta suspensão celular foram transferidos para um erlenmeyer de 50 mL com 10 mL de meio TSB e eritromicina numa concentração subinibitória de 0,25  $\mu$ g/mL. O erlenmeyer foi incubado a 30 °C durante 24 horas. Este processo foi repetido diariamente,

iniciando o ensaio a uma concentração de eritromicina igual a  $0,25 \times \text{CMI}$  e aumentando gradualmente a concentração até se atingir a concentração igual a  $128 \times \text{CMI}$ . No caso de, após 24 horas, a cultura não apresentar uma  $\text{DO}_{620\text{nm}} \geq 0,1$ , o tempo de incubação era estendido para 48 horas. Se após as 48 horas de incubação a  $\text{DO}_{620\text{nm}}$  não atingisse o valor pretendido, a concentração de eritromicina retornava ao valor anterior. O incremento da concentração de eritromicina prosseguiu até se atingir uma concentração de antibiótico igual a  $128 \mu\text{g/mL}$ . Após crescimento da estirpe nesta concentração, esta foi de seguida inoculada numa placa de TSA sem antibiótico pelo método de esgotamento por estrias e a partir desta inoculação foi selecionada uma colónia de cada estirpe. As colónias selecionadas foram sujeitas a cinco passagens em meio sólido sem antibiótico e após este processo foi determinada a CMI de eritromicina para cada uma das estirpes e a biomassa obtida foi congelada a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  em BHI com 20% de glicerol para ensaios posteriores. Acompanhando a estirpe em evolução foram mantidos dois controlos, um controlo do crescimento da estirpe, que sofreu as mesmas passagens que a estirpe em evolução, mas sem a presença de antibiótico, e um controlo de solvente usando sempre a mesma concentração de etanol encontrada no ensaio com o antibiótico. Ao longo de todo o ensaio, foram retiradas alíquotas de cada um dos erlenmeyer que eram congeladas a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  em BHI com 20% de glicerol. Este processo foi efetuado até se obterem três evoluções independentes.

Ao longo deste processo foi determinada a concentração inibitória média ( $\text{IC}_{50}$ ) para cada evolução quando a concentração de eritromicina era 0, 4, 12, 32, 96 e  $128 \mu\text{g/mL}$ . Para tal, foram recolhidas e centrifugadas células que foram depois ressuspensas em meio TSB e a  $\text{DO}_{620\text{nm}}$  ajustada a 0,1. Numa microplaca de 96 poços foram feitas diluições sucessivas de eritromicina, e foram depois adicionados  $50 \mu\text{L}$  da suspensão celular preparada anteriormente. A microplaca foi incubada a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 48 horas e a leitura da mesma foi efetuada no leitor de microplacas (Biorad, xMark) a uma  $\text{DO}_{620\text{nm}}$ . Com os resultados obtidos na leitura das microplacas foram elaboradas curvas de dose/resposta e a partir delas foi determinado o  $\text{IC}_{50}$  ao longo dos vários dias de ensaio.

### **3.7 Avaliação da influência da resistência induzida *in vitro* à eritromicina na robustez de *Aliarcobacter butzleri***

#### **3.7.1. Determinação das curvas de crescimento**

Para a determinação das curvas de crescimento sem antibiótico, todas as estirpes, provenientes do ensaio de avaliação da taxa de mutação espontânea e do ensaio de evolução de resistência *in vitro*, foram inicialmente inoculadas em placas de TSA durante

24 horas a 30 °C. Posteriormente foram utilizadas para iniciar as pré-culturas em TSB com uma DO<sub>620nm</sub> de 0,02 que foram incubadas a 30 °C com agitação (100 rpm) durante 16 horas. As pré-culturas foram usadas para iniciar as culturas nas mesmas condições, sendo recolhidas amostras às 0, 2, 4, 6, 12 e 24 horas para leitura da DO<sub>620nm</sub>. Os resultados foram analisados por construção de curvas de crescimento, considerando a DO<sub>620nm</sub> em função do tempo.

No caso da realização de curvas de crescimento na presença de antibiótico, estas foram efetuadas na presença de concentrações de eritromicina entre 0 e 8 µg/mL. Para tal foram usadas placas de 96 poços onde foram feitas diluições sucessivas de eritromicina. A cultura *overnight* foi diluída de 1:25 e foram colocados 100µL em cada poço, perfazendo um volume final de 200 µL por poço. As placas foram incubadas nas mesmas condições de crescimento e foram efetuadas leituras da DO<sub>620nm</sub> no leitor de microplacas de hora a hora e construídas curvas de crescimento para cada estirpe em função da concentração de antibiótico presente em cada poço.

### 3.7.2. Avaliação da motilidade

De modo a verificar se a motilidade das estirpes era influenciada pelo aumento da resistência à eritromicina, foi levado a cabo um ensaio descrito por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 2018), com algumas alterações. Para tal, as estirpes foram inoculadas em placas de TSA durante 24 horas a 30 °C, seguindo-se incubação em meio TSB durante 16 horas, como descrito no ponto 3.7.1. As células foram recolhidas e ressuspensas em meio TSB ajustando a uma DO<sub>620nm</sub> de 0,2. Por fim, 5 µL desta suspensão aplicados em placa com perfuração do agar de TSA semissólido (0,4 % de agar) e as placas foram incubadas a 30 °C, sendo que o diâmetro do crescimento bacteriano foi medido às 24, 48 e 72 horas. Este ensaio foi realizado três vezes de forma independente.

### 3.7.3. Capacidade de formação de biofilme

Dado que *Al. butzleri* tem a capacidade de formar biofilmes, procedeu-se à avaliação da capacidade de formação de biofilme para a estirpe nativa DQ40A1 e para as estirpes provenientes do ensaio de taxa de mutação espontânea e do de evolução de resistência *in vitro* à eritromicina. Para tal, foi seguido o protocolo descrito por Reeser e colaboradores, com algumas modificações (Reeser et al., 2007). Após uma cultura de 24 horas em placas de TSA a 30 °C, todas as estirpes foram colocadas a crescer em meio TSB a 30 °C, e 100 rpm até atingirem a fase estacionária (aproximadamente 16 horas). De seguida cada cultura foi recolhida, centrifugada durante 4 minutos a 11,000×g e ressuspensa em meio

TSB com uma  $DO_{620nm}$  de 0,2. Seguidamente, foi colocado 1 mL de suspensão cada estirpe em placas de 24 poços (VWR, Bélgica) e a placa foi incubada a 30 °C durante 48 horas. Após a incubação, o meio TSB foi removido e a placa secou a 55 °C durante uma hora, e foi adicionado 1 mL de solução de violeta de cristal a 0,1% (p/v) seguido de incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente. Passado o período de incubação, o violeta de cristal foi retirado e foram efetuadas três lavagens com água destilada, de seguida a placa secou a 55 °C durante 10 minutos e após este tempo o violeta de cristal foi solubilizado com a adição de 1 mL de uma solução de 30% de metanol e 10% de ácido acético. Por fim, foi feita a leitura das placas a uma absorvância de 570 nm no leitor de microplacas (Biorad, xMark). Para este ensaio foram feitos quatro replicados em pelo menos três ensaios independentes.

#### 3.7.4. Tolerância ao stress oxidativo

A fim de avaliar se o aumento de resistência a macrólidos tinha influência na sobrevivência das estirpes quando estas eram expostas ao stress oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogénio a 3, 10 e 30% (v/v) e pelo metil de viologénio a 125mM, foi efetuado o ensaio descrito por Kern e colaboradores (Kern et al., 2011) com algumas alterações. Para tal, foi feita uma pré-cultura de todas as estirpes nas condições referidas anteriormente, seguindo-se a recolha de células por centrifugação durante 4 minutos a 11,000× g. O depósito celular foi ressuspensão em meio TSB ajustando o número de células a aproximadamente  $10^8$  UFC/mL. Seguidamente, cada estirpe foi inoculada em placas de TSA usando uma zaragatoa, e discos de celulose estéreis de 6 mm de diâmetro carregados com 5 µL dos compostos em análise foram posicionados no centro da placa de TSA. Após este processo, as placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas e o halo de inibição de crescimento formado foi medido. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes para cada estirpe de forma independente.

#### 3.7.5. Sobrevivência em modelos alimentares

Leite ultrapasteurizado gordo e magro, suco de alface e suco de frango foram usados como modelos alimentares para verificar se o aumento de resistência à eritromicina afetava a sobrevivência da bactéria em estudo em alimentos. Para tal, foi usado o protocolo descrito por Ferreira e colaboradores (Ferreira & Domingues, 2016), com modificações. O suco de alface foi preparado usando 50 g de alface *iceberg* homogeneizada com 100 mL de água destilada usando um *stomacher* (Biomaster-Lab system) durante dois minutos. A solução obtida foi filtrada através de filtros de celulose e por fim foi misturada, numa proporção de

2:1 com tampão fosfato de potássio (0,3 mol/L) e o pH acertado a 7,2. A solução foi autoclavada e armazenada a 4 °C até à realização do ensaio.

O suco de frango foi obtido a partir de frango congelado sem vísceras. Assim, este frango foi colocado sobre uma grelha e descongelado no frigorífico com um recipiente para colheita dos sucos provenientes da descongelação. O suco obtido foi recolhido e armazenado a -80 °C até se obter a quantidade necessária para todos os ensaios. O suco foi depois descongelado a 4 °C e centrifugado a 3900×g durante 20 minutos, o sobrenadante foi então recolhido e filtrado com filtros de poro 0,45 µm e congelado a -20 °C até se realizar o ensaio.

Os dois modelos alimentares de leite gordo e magro corresponderam à utilização direta destes dois tipos de leite ultrapasteurizado.

Para iniciar o ensaio, as estirpes foram inoculadas em meio TSA durante 24 horas e após este tempo foram preparadas culturas em meio TSB com  $DO_{620nm}$  de 0,02 que foram incubadas a 30°C, 100 rpm durante 16 horas. A cultura foi recolhida e foram efetuadas as diluições necessárias nos diversos modelos alimentares, para que todas as culturas tivessem um número de células inicial de cerca de  $10^6$  UFC/mL num volume final de 1 mL. Neste ensaio, foram efetuados duplicados para cada estirpe nos quatro modelos alimentares, e foram incluídos controlos de esterilidade de cada modelo. Todos os tubos foram armazenados a 4 °C durante 14 dias e foram efetuadas contagens, em placas de TSA, nos dias 0, 2, 4, 7, 10 e 14 utilizando o método de *drop plate*, seguindo-se incubação a 30 °C, durante 48 horas. Este ensaio foi realizado duas vezes de forma independente.

### **3.8 Avaliação fenotípica da expressão de bombas de efluxo**

As bombas de efluxo podem ter um papel importante na resistência a antibióticos, por isso, a fim de avaliar a funcionalidade das bombas de efluxo, procedeu-se à avaliação da acumulação de brometo de etídio (BrEt), um composto intercalante que emite fluorescência quando ligado ao DNA da bactéria. Em simultâneo, foi também avaliado o efeito do Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), um inibidor de bombas de efluxo, na acumulação de BrEt. O ensaio teve como base o protocolo descrito por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 2014) com modificações.

Inicialmente, a estirpe de *Al. butzleri* DQ40A1 e todas as estirpes obtidas nos pontos 3.5. e 3.6. foram colocadas em cultura em meio TSA durante 24 horas a 30 °C. De seguida foram feitas pré-culturas de todas as estirpes em meio TSB durante 16 horas a 30 °C e 100 rpm, como descrito anteriormente. Estas foram depois usadas para iniciar culturas em meio TSB com uma  $DO_{620nm}$  inicial de 0,02, as quais foram incubadas a 30 °C e 100 rpm até

atingirem o meio da fase exponencial (6h-7h). Posteriormente, as células foram recolhidas por centrifugação a 11,000× g durante 4 minutos e ressuspensas em PBS (pH 7,2) a uma  $DO_{620nm}$  aproximadamente de 0,4. Por fim, 50  $\mu$ L das suspensões celulares foram aplicados, em triplicado, numa placa de 96 poços preta com fundo claro (Greiner Bio-one, Alemanha), apropriada para a leitura de fluorescência, juntamente com 48  $\mu$ L de PBS e a placa foi incubada a 30°C, durante 10 minutos.

A adição de 2  $\mu$ L de BrEt (100  $\mu$ g/mL) foi feita imediatamente antes do início da leitura numa concentração final de 2  $\mu$ g/mL. A leitura da fluorescência foi efetuada usando um leitor de microplacas SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, Estados Unidos da América) a uma temperatura constante de 30 °C durante 60 minutos, com leituras em intervalos de 1 em 1 minuto, com excitação a 530 nm e emissão a 600 nm.

Para a avaliação do efeito do CCCP, a quantidade de PBS foi ajustada para um volume final de 100  $\mu$ L após adição de CCCP. Após 7 minutos de leitura com BrEt, foram adicionados 2  $\mu$ L de CCCP (5 mg/mL) nos poços respetivos e retomada a leitura. Neste ensaio foram também realizados um controlo negativo, contendo apenas PBS, um controlo de autofluorescência, que continha 50  $\mu$ L de PBS e 50  $\mu$ L de suspensão celular, e ainda um controlo do fluorocromo contendo 98  $\mu$ L de PBS e 2  $\mu$ g/mL de BrEt. Ambos os ensaios foram realizados três vezes para cada estirpe, de forma independente.

Para além deste ensaio, de modo a confirmar os resultados obtidos, foi aplicado o método Cartwheel descrito por Komora e colaboradores (Komora et al., 2017), com algumas modificações. Para tal, as estirpes foram colocadas a crescer em meio líquido até meio da fase exponencial, nas mesmas condições descritas anteriormente e foram recolhidas e ressuspensas em meio TSB com uma  $DO_{620nm}$  de 0,6. De seguida as suspensões celulares foram inoculadas do centro para a periferia da placa, com o auxílio de uma zaragatoa, em placas de meio TSA suplementado com BrEt (2  $\mu$ g/mL). Após este processo as placas foram incubadas a 30 °C, durante 24 horas, protegidas da luz. Depois do período de incubação, as placas foram visualizadas num transiluminador (UVITEC, Reino Unido) e foram registadas imagens das mesmas.

### **3.9 Expressão do gene *areB***

A expressão do gene *areB* foi avaliada para a estirpe nativa *Al. butzleri*, DQ40A1 e para as DQ40P8, DQ40P8c e DQ40P8EtOH.

#### **3.9.1. Extração de RNA total**

As quatro estirpes foram inoculadas em placas de meio TSA e incubadas a 30 °C durante 24 horas. Após a incubação, foram feitas pré-culturas e culturas das estirpes em estudo

nas condições referidas anteriormente no ponto 3.8. Destas culturas, após o período de incubação foi recolhido 1 mL de suspensão de cada cultura que foi centrifugado a  $8.000 \times g$  durante 3 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Seguidamente, foi efetuada uma lavagem com NaCl a 0,85 (p/v) e procedeu-se a uma nova centrifugação nas mesmas condições. No final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500  $\mu\text{L}$  de TripleXtractor (GRiSP, Portugal) e armazenadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

A extração de RNA foi executada segundo as recomendações do fabricante, sendo a sua quantidade e pureza determinadas utilizando um nanoespectrofotómetro e a sua integridade foi avaliada por uma eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão Tris Acetato-EDTA  $\times 1$  e corado com Midori Green (NIPPON Genética, Alemanha). A corrida de eletroforese decorreu durante 30 minutos a 100 V e foi acompanhada pelo marcador de peso molecular GRS universal Ladder (GRiSP, Portugal). A análise do gel obtido foi feita no transiluminador (UVITEC, Reino Unido).

### 3.9.2. Tratamento do RNA total com DNase I

A fim de remover, das amostras obtidas anteriormente, possíveis contaminações de DNA foi utilizado o kit comercial DNase I, RNases-free (Thermo Scientific, Estados Unidos da América). Seguindo as recomendações do fornecedor, foi preparada uma mistura reacional com 1  $\mu\text{L}$  de tampão da reação ( $\times 10$ ), 1  $\mu\text{L}$  de DNase I e 1  $\mu\text{g}$  de RNA e água ultrapura até perfazer 10  $\mu\text{L}$ . A mistura foi depois incubada a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos e de seguida foi adicionado 1  $\mu\text{L}$  de EDTA a 50 mM e procedeu-se a uma incubação de 10 minutos a  $65\text{ }^\circ\text{C}$ . No final da incubação as alíquotas foram armazenadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  até serem usadas.

### 3.9.3. Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para sintetizar o cDNA foi utilizado um kit comercial Xpert cDNA Synthesis Mastermix (GRiSP, Portugal). Foi preparada a mistura reacional com 9  $\mu\text{L}$  de RNA tratado e 10  $\mu\text{L}$  de *Master Mix* que foi de seguida incubada durante 5 minutos a  $65\text{ }^\circ\text{C}$ . Após este tempo foi adicionado a cada reação 1  $\mu\text{L}$  de RTase em gelo e foi realizada nova incubação com os seguintes passos: 10 minutos a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ , 15 minutos a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  e 5 minutos a  $85\text{ }^\circ\text{C}$ . Após a síntese o cDNA foi armazenado a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até ser usado.

### 3.9.4. Determinação da expressão do gene *areB*

Para determinar a expressão do gene *areB* foi usada a técnica de Real-Time PCR (qPCR) usando o kit comercial NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2×) (NZY Tech). Para a reação de amplificação foi efetuada uma mistura reacional para cada gene contendo 5 µL de *Master Mix* (2×), 0,4 µM de cada conjunto de *primers* correspondentes ao gene *areB* ou ao *16S rRNA* (Tabela 4) e ainda 1 µL de cDNA e água ultrapura até perfazer 10 µL. As misturas feitas anteriormente foram incubadas no CFX Real-Time PCR System (Biorad, Estados Unidos da América) usando o seguinte programa: 2 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 5 segundos a 95 °C, 30 segundos a 60 °C e por fim um gradiente crescente de 5 segundos a 95 °C. Os níveis de pureza e de formação de dímeros foram avaliados pelas curvas de *melting* obtidas.

Tabela 4: Lista de *primers* usados na reação de real-time PCR, sequência e tamanho.

<b>Gene alvo</b>	<b>Designação dos primers</b>	<b>Sequência dos primers</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Referência</b>
<i>areB</i>	areB_RTPCR_F	5` - TGG AAA TGG ACA AAA TGG TG - 3`	20	(Mateus et al., 2021b)
<i>areB</i>	areB_RTPCR_R	5` - TCC AAG CCC TGG AAT AGA AG - 3	20	(Mateus et al., 2021b)
16S rRNA	P338_F	5- ACT CCT ACG GGA GGC AGC AG - 3	20	(Reis et al., 2014)
16 rRNA	P518_R	5- ATT ACC GCG GCT GCT GG - 3	17	(Reis et al., 2014)

Por fim, foi feita uma avaliação comparativa da expressão relativa do gene *areB* entre as estirpes resistentes e a estirpe controlo através do método  $\Delta\Delta C_t$  usando o gene *16S rRNA*.

## Capítulo 4 – Resultados e Discussão

Uma vez que o tratamento usado em casos de enterites com sintomatologia persistente provocadas por *Al. butzleri* é, normalmente idêntico ao usado para *Campylobacter jejuni*, a eritromicina surge como um dos antibióticos recomendados (Ferreira et al., 2016). Nos últimos anos têm vindo a ser publicados estudos sobre a resistência de *Al. butzleri* a antibióticos nos quais se verifica uma frequência baixa a moderada de resistência à eritromicina, no entanto existe um grande défice de informação relativa aos mecanismos de resistência envolvidos, sendo por isso importante avaliar estes possíveis mecanismos e também avaliar quais os efeitos que a aquisição de resistência à eritromicina provoca na robustez de *Al. butzleri* (Ferreira et al., 2019b; Isidro et al., 2020).

### 4.1. Avaliação da frequência de mutação espontânea em *Aliarcobacter butzleri*

A resistência a antibióticos pode ser adquirida através da transferência horizontal de genes, mas também devido ao surgimento de mutações espontâneas (Luangtongkum et al., 2009). As mutações espontâneas estão geralmente ligadas à replicação do DNA durante o crescimento do microrganismo, seja devido a erros da DNA polimerase, ou podem ainda ocorrer mutações provocadas por agentes endógenos ou por deleção, duplicação ou inserção de genes. Estas mutações cromossómicas em bactérias estão, muitas vezes, associadas à aquisição de resistência a várias classes de antibióticos (Blair et al., 2015; Rosche & Foster, 2000).

Mutações pontuais estão associadas à resistência a diversas classes de antibióticos, como é o caso da resistência às fluoroquinolonas em *Al. butzleri* que está relacionada com uma mutação pontual nos genes da DNA girase, na região determinante de resistência às quinolonas (Abdelbaqi et al., 2007; Ferreira et al., 2018). Em relação aos mecanismos de resistência a macrólidos em *Al. butzleri*, estes ainda não são bem conhecidos no entanto, um estudo levado a cabo por Ferreira e colaboradores coloca a hipótese de a resistência de *Al. butzleri* a macrólidos poder estar associada a mutações no gene repressor da transcrição *areR*, que afeta a expressão da bomba de efluxo AreABC (Ferreira et al., 2021). Em *Campylobacter* spp. existem vários mecanismos associados à resistência a macrólidos como a eritromicina, entre eles estão: (i) mutações pontuais no domínio V do gene *23S rRNA*, as quais são associadas a níveis elevados de resistência, (ii) mutações nas proteínas ribossomais L4 e L22 associadas a níveis mais baixos de resistência, (iii) a presença de metilases ribossómicas, codificadas pelo gene *ermB*, que diminui a ligação dos macrólidos ao alvo e (iv) a sobreexpressão de bombas de efluxo como a CmeABC (Bolinger &

Kathariou, 2017; Hao et al., 2013). No entanto, em *Al. butzleri* só o último dos mecanismos descritos anteriormente foi identificado até ao momento.

Neste trabalho, a fim de avaliar como é que o sistema de efluxo associado a resistência a eritromicina, AreABC, pode influenciar a frequência com que ocorriam mutações espontâneas, foi determinada a frequência de mutação espontânea de três estirpes de *Al. butzleri*, sendo uma delas a estirpe nativa (DQ40A1) e as restantes dois mutantes (DQ40A1 $\Delta$ areB e DQ40A1\_trunc\_areR). Sendo que *Al. butzleri* DQ40A1 $\Delta$ areB possui uma mutação no gene que codifica a proteína de membrana interna que a torna mais suscetível a macrólidos, enquanto *Al. butzleri* DQ40A1\_trunc\_areR, apresenta uma mutação na qual o gene *areR* foi substituído e passou a codificar uma proteína truncada que leva à sobreexpressão da bomba de efluxo AreABC, o que torna esta estirpe mais resistente à classe de antibióticos em estudo (Ferreira et al., 2021).

Para tal, primeiramente foi determinada a CMI de dois macrólidos, a eritromicina e a claritromicina, para cada uma das estirpes em estudo pelo método de microdiluição (Tabela 5).

Tabela 5: Concentrações mínimas inibitórias dos macrólidos para a estirpe parental e para os dois mutantes.

Estirpes de <i>Al. butzleri</i>	CMI ( $\mu$ g/mL)	
	Eritromicina	Claritromicina
<b>DQ40A1</b>	1	1
<b>DQ40A1<math>\Delta</math>areB</b>	0,5	0,5
<b>DQ40A1_trunc_areR</b>	16	16

Para analisar os resultados obtidos foram tidos em consideração os pontos de corte apresentados pela *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) para *C. jejuni*, uma vez que não existem pontos de cortes especificados para *Al. butzleri* (EUCAST, 2022). Considerando que ponto de corte para resistência à eritromicina é  $>4$   $\mu$ g/mL, verifica-se que a estirpe *Al. butzleri* DQ40A1 e o mutante DQ40A1 $\Delta$ areB são suscetíveis a ambos os antibióticos, por sua vez a DQ40A1\_trunc\_areR é resistente tanto à eritromicina como à claritromicina. Os resultados estão de acordo com os obtidos por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 2021), no qual a estirpe DQ40A1 $\Delta$ areB apresentou uma diminuição de duas vezes na CMI para a eritromicina em relação à estirpe nativa, DQ40A1, enquanto a estirpe DQ40A1\_trunc\_areR apresentou uma CMI para a eritromicina de cerca de 16 vezes superior à da estirpe nativa.

Com o intuito de tentar perceber de que forma a alteração da expressão das bombas de efluxo afetava o surgimento de mutações espontâneas numa cultura bacteriana, foi feita a

determinação da frequência de mutação espontânea. Esta determinação foi realizada para as três estirpes mencionadas na presença de concentrações de eritromicina que variaram entre  $2 \times$  CMI da estirpe DQ40A1 $\Delta$ areB e  $4 \times$  CMI da estirpe DQ40A1\_trunc\_areR. (Tabela 6).

Tabela 6: Frequência de mutação espontânea obtidas para a estirpe de *Al. butzleri* nativa.

Concentração de Eritromicina	Frequência de Mutação Espontânea		
	DQ40A1	DQ40A1 $\Delta$ areB	DQ40A1_trunc_areR
1 $\mu$ g/mL	-	$6,60 \times 10^{-7} \pm 9,01 \times 10^{-7}$	-
2 $\mu$ g/mL	$1,99 \times 10^{-6} \pm 1,53 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6} \pm 1,22 \times 10^{-6}$	-
4 $\mu$ g/mL	$1,97 \times 10^{-6} \pm 2,16 \times 10^{-6}$	$\leq 1,0 \times 10^{-10}$	-
8 $\mu$ g/mL	$9,33 \times 10^{-7} \pm 8,56 \times 10^{-7}$	$\leq 1,0 \times 10^{-10}$	-
16 $\mu$ g/mL	$4,94 \times 10^{-9} \pm 8,56 \times 10^{-9}$	$\leq 1,0 \times 10^{-10}$	$2,05 \times 10^{-7} \pm 1,78 \times 10^{-8}$
32 $\mu$ g/mL	$\leq 1,0 \times 10^{-10}$	$\leq 1,0 \times 10^{-10}$	$2,05 \times 10^{-7} \pm 1,62 \times 10^{-7}$
64 $\mu$ g/mL	$\leq 1,0 \times 10^{-10}$	$\leq 1,0 \times 10^{-10}$	$8,65 \times 10^{-9} \pm 5,10 \times 10^{-9}$

Após sete dias de incubação é possível observar que a frequência de mutação espontânea para *Al. butzleri* DQ40A1 é de aproximadamente  $10^{-6}$ , para concentrações de antibiótico de  $2 \times$  CMI, e  $10^{-9}$  para concentrações correspondentes a  $16 \times$  CMI. No que diz respeito ao mutante *Al. butzleri* DQ40A1 $\Delta$ areB o valor da frequência de mutação varia entre  $10^{-6}$  e  $<10^{-10}$  e esta estirpe, ao contrário do que se observou na estirpe nativa, apenas apresentou mutantes em placas de TSA com  $2 \times$  e  $4 \times$  CMI de eritromicina, ao passo que a estirpe nativa apresenta o aparecimento de mutantes em placas com até  $16 \times$  CMI do antibiótico em estudo. Em relação ao mutante que possui uma sobreexpressão do sistema de efluxo AreABC, a frequência de mutação espontânea em placas com 16  $\mu$ g/mL de eritromicina é mais elevada ( $\sim 10^{-7}$ ) do que a apresentada pela estirpe nativa ( $\sim 10^{-9}$ ) e, ao contrário do que acontece para as estirpes DQ40A1 e DQ40A1 $\Delta$ areB, a estirpe DQ40A1\_trunc\_areR é a única que demonstrou a presença de mutantes em placas com 64  $\mu$ g/mL ( $>10^{-10}$ ).

Resultados semelhantes foram obtidos por Yan e colaboradores quando avaliaram a frequência de mutação espontânea a fluoroquinolonas em *Campylobacter* (Yan et al., 2006). Neste estudo, a estirpe mutante de *C. jejuni*, com o gene *cmeB* inativo, apresentou frequências de mutação mais baixas do que as verificadas para a estirpe nativa na presença de 10 e  $32 \times$  CMI para a ciprofloxacina da estirpe nativa, já no caso da estirpe que apresentava uma sobreexpressão da bomba de efluxo *cmeABC*, esta demonstrou uma maior frequência de mutação do que a estirpe nativa apenas na presença de concentrações de ciprofloxacina  $32 \times$  CMI (Yan et al., 2006). Os autores associaram o surgimento de um

maior número de mutantes para a estirpe que sobreexpressava a bomba CmeABC ao facto de estes sistemas reduzirem a acumulação do antibiótico dentro do microrganismo, facilitando assim o aparecimento e a sobrevivência de mutantes resistentes às fluoroquinolonas (Yan et al., 2006). Resultados idênticos foram obtidos num estudo realizado com estirpes de *E. coli* no qual foi avaliada a influência da sobreexpressão das bombas de efluxo no aparecimento de mutações espontânea e no qual foi possível observar que a estirpe nativa apresentava uma frequência de mutação significativamente mais baixa do que a estirpe que sobreexpressava a bomba de efluxo AcrAB (El Meouche & Dunlop, 2018).

Os resultados obtidos neste ensaio e os resultados anteriormente descritos sugerem assim que o aumento da expressão da bomba de efluxo AreABC presente em estirpes de *Al. butzleri* possa aumentar a frequência com que ocorrem mutações espontâneas nesta espécie.

#### **4.2. Avaliação da taxa de mutação espontânea em *Aliarcobacter butzleri***

Como referido anteriormente, as mutações espontâneas ocorrem geralmente durante a replicação do DNA. Embora determinar a frequência de mutação seja mais simples, a determinação da taxa de mutação ( $\mu$ ) é mais precisa, reprodutível e oferece mais informações sobre os processos biológicos do que a frequência de mutação (Rosche & Foster, 2000).

Por definição, a taxa de mutação é uma estimativa da probabilidade de uma mutação por nucleótido, por locus ou para todo o genoma ocorrer por geração, ou seja, no tempo de vida da bactéria (Martinez & Baquero, 2000; Pope et al., 2008). A determinação da taxa de mutação pode ser feita através de dois métodos diferentes, sendo eles a avaliação da acumulação de mutantes e a análise da flutuação (Foster, 2006).

Neste estudo foi aplicado o ensaio de flutuação a fim de avaliar a probabilidade de ocorrer uma mutação espontânea no genoma de *Al. butzleri* durante o seu tempo de vida, utilizando a estirpe nativa DQ40A1. Um outro objetivo para a realização deste ensaio foi a obtenção de colónias derivadas da estirpe nativa que apresentassem um fenótipo de resistência à eritromicina.

Antes de realizar o ensaio foi necessário assegurar alguns parâmetros preliminares, que foram verificados e ajustados recorrendo a três culturas paralelas, nomeadamente garantir que não existiam mutações pré-existentes no inóculo inicial ( $N_0$ ), assegurar que o ensaio se inicia com um valor menor ou igual a  $10^4$  UFC/mL e que no final do ensaio ocorra um aumento do número de células, no mínimo, de 1000 vezes.

Após validação destes parâmetros, procedeu-se à realização do ensaio para determinar a taxa de mutação espontânea, cujos resultados estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores da taxa de mutação espontânea para a estirpe *Al. butzleri* DQ40A1, bem como os valores de UFC/mL no tempo o (N<sub>o</sub>) e no final (N<sub>T</sub>) e ainda o valor de *m*

Número de culturas	Contagens	Jackpots	Média	Mediana	N <sub>o</sub> (×10 <sup>3</sup> )	N <sub>T</sub> (×10 <sup>7</sup> )	<i>m</i>	Taxa de mutação espontânea (μ) (×10 <sup>-8</sup> )
1	25	1	79,21	23,0	4,05	7,74	7,17	9,26
2	10							
3	113							
4	11							
5	10							
6	7							
7	29							
8	8							
9	6							
10	39							
11	186							
12	10							
13	853							
14	23							
15	40							
16	32							
17	4							
18	9							
19	1121*							
20	90							

\* o valore assinalado corresponde ao Jackpot (número superior a 1000) e foi retirado dos cálculos por ultrapassarem o limite de deteção do método.

Antes de proceder à determinação da taxa de mutação espontânea é necessário determinar o número de mutações que aconteceram por cultura, *m*. Para o cálculo deste parâmetro podem ser aplicados vários modelos matemáticos, neste caso foi usado o método de Lea and Coulson dado que *m* se encontra no intervalo de 1,5 a 15 (Pope et al., 2008; Rosche &

Foster, 2000). Aplicando a Equação (1) representada na secção 3.5., o  $m$  tem um valor de 7,17, e assim encontra-se dentro do intervalo de valores válidos para este método.

O cálculo da taxa de mutação espontânea foi feito através da divisão do valor de  $m$  pelo valor do  $N_T$ , que representa o valor total de células cultiváveis no ensaio e como está representado na Tabela 7, o valor da taxa de mutação para a estirpe DQ40A1 é de  $9,26 \times 10^{-8}$ .

Um estudo realizado com a finalidade de avaliar a taxa de mutação de quatro estirpes de *Al. butzleri* na presença de fluoroquinolonas obteve valores de taxa de mutação espontânea na ordem de  $10^{-9}$  (Alves, 2018), abaixo dos verificados neste estudo com eritromicina, o que significa que existe mais probabilidade de ocorrerem mutações espontâneas em *Al. butzleri* na presença de eritromicina. No entanto, estudos realizados em estirpes de *C. jejuni* e *C. coli* concluíram que a taxa de mutação espontânea na presença de eritromicina nestas duas espécies tem valores na ordem de  $10^{-9}$  e  $10^{-10}$ , enquanto que na presença de fluoroquinolonas os valores obtidos para a taxa de mutação foram mais elevados, situando-se entre  $10^{-6}$  e  $10^{-8}$ , dependendo da concentração de antibiótico aplicada, demonstrando que a taxa de mutação de *Campylobacter* para os macrólidos é mais baixa do que para fluoroquinolonas (Lin et al., 2007; Luangtongkum et al., 2009; Yan et al., 2006).

A análise da taxa de mutação fornece ainda informações sobre a mutabilidade da bactéria e no que diz respeito a esta classificação um estudo, que avaliou a taxa de mutação de 696 em estirpes de *E. coli* resistentes à rifampicina, dividiu os seus resultados em hipomutáveis ( $<10^{-9}$ ), normomutáveis ( $8 \times 10^{-9}$  a  $4 \times 10^{-8}$ ), fracamente hipermutáveis ( $4 \times 10^{-8}$  a  $4 \times 10^{-7}$ ) e fortemente hipermutáveis ( $> 4 \times 10^{-7}$ ), sendo que, quanto maior for o valor da taxa de mutação, maior é a hipermutabilidade da estirpe (Baquero et al., 2004). Assim, considerando este sistema de classificação, a estirpe de *Al. butzleri* DQ40A1 pode classificar-se como um microrganismo fracamente hipermutável na presença de eritromicina.

Através deste ensaio foram selecionadas 17 colónias (TM1A – TM1Q) de mutantes que foram passadas cinco vezes em placas de meio TSA sem antibiótico antes da sua biomassa ser recolhida e armazenada a  $-80$  °C para ensaios posteriores.

#### 4.2.1. Avaliação da suscetibilidade à eritromicina de estirpes de *Aliarcobacter butzleri* após a aquisição espontânea de resistência à eritromicina

Após a aquisição espontânea de resistência à eritromicina, as 17 colónias mutantes isoladas sofreram cinco passagens em meio TSA sem antibiótico, com o objetivo de

perceber se o fenótipo de resistência se mantinha após as passagens ou se este se devia apenas à pressão provocada pela presença de antibiótico. Para tal, foi determinada a CMI para cada um dos mutantes para a eritromicina.

Em todos os mutantes verificou-se um aumento de pelo menos duas vezes do valor da CMI, uma vez que seis dos mutantes testados apresentaram CMI igual a 2 µg/mL, cinco mutantes demonstraram um aumento da CMI para 4 µg/mL, quatro apresentaram uma CMI de 8 µg/mL enquanto apenas um dos mutantes apresentou uma CMI de 16 µg/mL (Tabela 8).

Tabela 8: Concentração mínima inibitória de eritromicina para os mutantes selecionados dos ensaios de flutuação, após cinco passagens em meio TSA sem eritromicina.

Estirpes de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	CMI (µg/mL)
	Eritromicina
TM1A	4
TM1B	2
TM1C	4
TM1E*	8
TM1F*	8
TM1G	4
TM1H	4
TM1I	2
TM1J	2
TM1K*	16
TM1L*	8
TM1M	2
TM1N	4
TM1O	2
TM1P*	8
TM1Q	2

\* estirpes resistentes selecionadas para ensaios subsequentes.

De seguida foram selecionados os cinco isolados que apresentavam a CMI acima do ponto de corte usado para estabelecer resistência, nomeadamente as estirpes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P, para ensaios subsequentes a fim de avaliar quais os efeitos da aquisição de resistência à eritromicina na robustez das estirpes.

### 4.3. Indução de resistência *in vitro* à eritromicina em *Aliarcobacter butzleri*

A exposição continuada de estirpes suscetíveis a um dado agente antimicrobiano pode levar a uma aquisição de resistência a esse composto (Ferreira et al., 2018). Assim, a fim de induzir elevados níveis de resistência à eritromicina, neste estudo, a estirpe de *Al butzleri* DQ40A1, que possui uma CMI para a eritromicina de 1 µg/mL, sofreu passagens sucessivas em meio TSB com concentrações crescentes de eritromicina, começando com 0,25 × CMI da estirpe DQ40A1 até se atingir a concentração de 128 × CMI.

Tabela 9: Características iniciais da estirpe nativa de *Al. butzleri* DQ40A1 para o ensaio de evolução, duração do ensaio e evoluções com fenótipo de resistência à eritromicina obtidas.

<b>Estirpe Nativa</b>	<b>CMI Inicial</b>	<b>IC<sub>50</sub> Inicial</b>	<b>Duração do ensaio (Dias/ N° de passagens com antibiótico)</b>	<b>Evoluções</b>
	1	0,31	25/20	DQ40P8
DQ40A1	1	0,32	25/17	DQ40P9
	1	0,16	26/19	DQ40P10

Na Tabela 9 estão representadas as características dos três ensaios de evolução realizados, a duração e o número de passagens com antibiótico que foram efetuadas em cada ensaio. Em simultâneo, acompanhou-se com duas evoluções que sofreram as mesmas passagens em meio TSB, o controlo de crescimento sem eritromicina (DQ40P8c, DQ40P9c e DQ40P10c) e o controlo do solvente (DQ40P8EtOH, DQ40P9EtOH e DQ40P10EtOH) (na presença da mesma concentração de etanol usada no ensaio com o antibiótico).

Ao longo da indução de resistência foi calculado o IC<sub>50</sub> quando se atingiram concentrações de eritromicina de 0 µg/mL, 4 µg/mL, 12 µg/mL, 32 µg/mL, 96 µg/mL e 128 µg/mL.

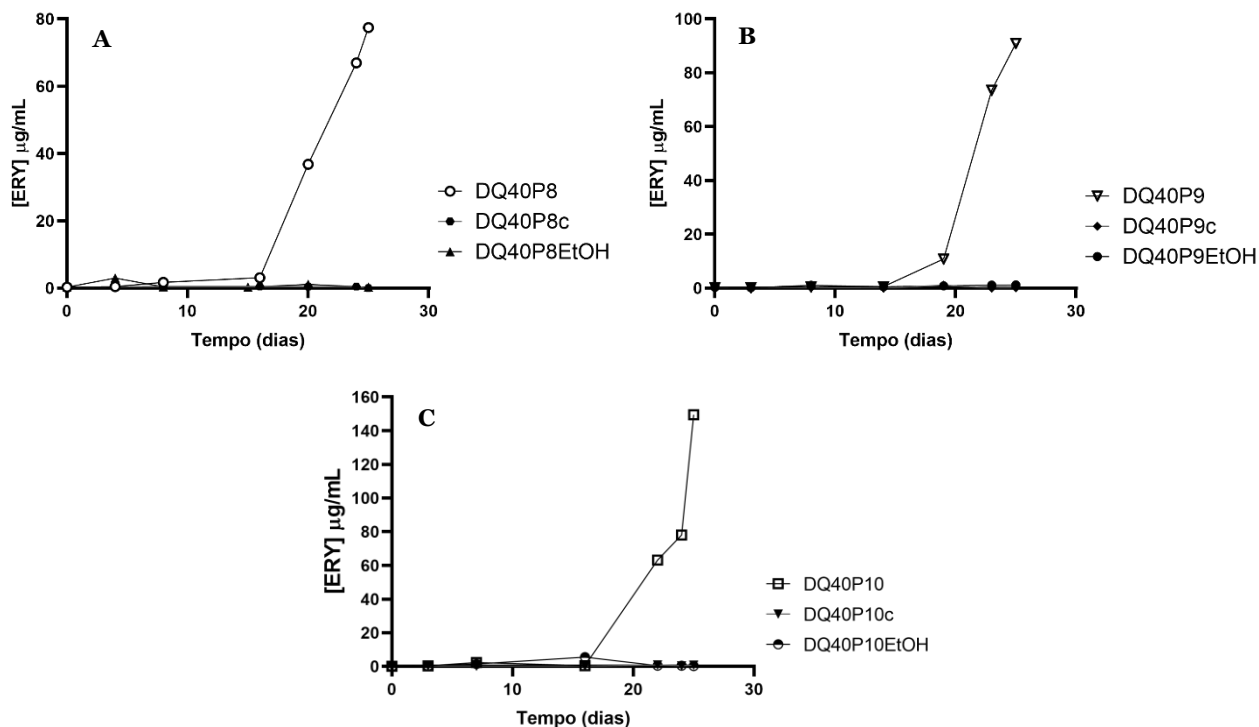


Figura 3: Representação gráfica da evolução do IC<sub>50</sub> ao longo da indução de resistência *in vitro* à eritromicina. A: Evolução do IC<sub>50</sub> da estirpe DQ40P8 e dos controlos DQ40P8c e DQ40P8EtOH; B: Evolução do IC<sub>50</sub> da estirpe DQ40P9 e dos controlos DQ40P9c e DQ40P9EtOH; C: Evolução do IC<sub>50</sub> da estirpe DQ40P10 e dos controlos DQ40P10c e DQ40P10EtOH

Através da observação da Figura 3 pode-se verificar que as evoluções correspondentes às DQ40P8, DQ40P9 e DQ40P10, apresentaram um aumento significativo no IC<sub>50</sub> com um aumento de 249 vezes para a evolução DQ40P8 (aumento de 0,32 µg/mL para 77,42 µg/mL). No que diz respeito à evolução DQ40P9 houve um aumento do IC<sub>50</sub> de 0,31 µg/mL para 90,96 µg/mL, e para a evolução DQ40P10 de 0,16 µg/mL para 149,50 µg/mL, o que corresponde a um aumento no IC<sub>50</sub> de aproximadamente 284 e de 934 vezes, respetivamente.

Para além da avaliação do IC<sub>50</sub> de cada estirpe, também foi determinada a CMI. Para tal, após a finalização do ensaio de evolução de resistência, procedeu-se à inoculação das estirpes em placas de meio TSA sem antibiótico e a partir dessas placas foi selecionada uma colónia isolada de cada evolução que de seguida sofreu cinco passagens em placas de meio TSA sem antibiótico (Tabela 10).

Tabela 10: Concentração mínimas inibitórias de isolados das três evoluções originadas a partir da indução de *resistência in vitro* à eritromicina.

<i>Aliarcobacter butzleri</i>		CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
		Eritromicina
<b>Evolução 8</b>	DQ40P8	256
	DQ40P8c	2
	DQ40P8EtOH	2
<b>Evolução 9</b>	DQ40P9	512
	DQ40P9c	4
	DQ40P9EtOH	8
<b>Evolução 10</b>	DQ40P10	Instável*
	DQ40P10c	2
	DQ40P10EtOH	2

\*Após descongelar, a estirpe demonstrou diminuições sucessivas da CMI.

A partir da análise da tabela 10 é possível verificar que duas das estirpes resistentes à eritromicina apresentam um aumento considerável na CMI que passou de 1  $\mu\text{g/mL}$  para 256  $\mu\text{g/mL}$  e 512  $\mu\text{g/mL}$  nas estirpes DQ40P8 e DQ40P9, respetivamente. Em relação à estirpe DQ40P10, numa fase inicial apresentou um aumento da CMI, contudo este valor era instável e diminuía com as passagens em meio TSA sem antibiótico. Por este motivo, nos ensaios seguintes a evolução 10 não foi utilizada.

Em relação às estirpes controlo da evolução 8, ambos apresentaram um ligeiro aumento da CMI que passou de 1  $\mu\text{g/mL}$  para 2  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto os controlos da evolução 9 apresentaram um aumento maior, sendo que a estirpe de controlo de crescimento apresentou uma CMI de 4  $\mu\text{g/mL}$  e o controlo do solvente uma CMI de 8  $\mu\text{g/mL}$ . O aumento da CMI registado nas estirpes controlo pode ter sido provocado por mutações que decorreram pela replicação contínua das estirpes ou pela presença de concentrações subinibitória de etanol (Woo et al., 2018).

Em suma, a partir deste ensaio conseguimos produzir evoluções de *Al. butzleri* com elevado nível de resistência à eritromicina que, foram posteriormente utilizadas para avaliar os efeitos fenotípicos e genómicos provocados pela indução de altos níveis de resistência em estirpes de *Al. butzleri*.

## 4.4. Avaliação da influência da aquisição espontânea de resistência e da indução de resistência *in vitro* à eritromicina na suscetibilidade de *Aliarcobacter butzleri*

### 4.4.1. Avaliação do crescimento das estirpes resistentes à eritromicina na ausência e na presença de antibiótico

A fim de avaliar se o crescimento dos mutantes, isolados a partir do ensaio de flutuação, e das populações, provenientes da indução de resistência *in vitro*, seria afetado pela aquisição de resistência à eritromicina procedeu-se à construção das curvas de crescimento das estirpes resistentes e da estirpe nativa (DQ40A1) na ausência de eritromicina, registrando o crescimento de todas as estirpes ao longo de 24 horas.

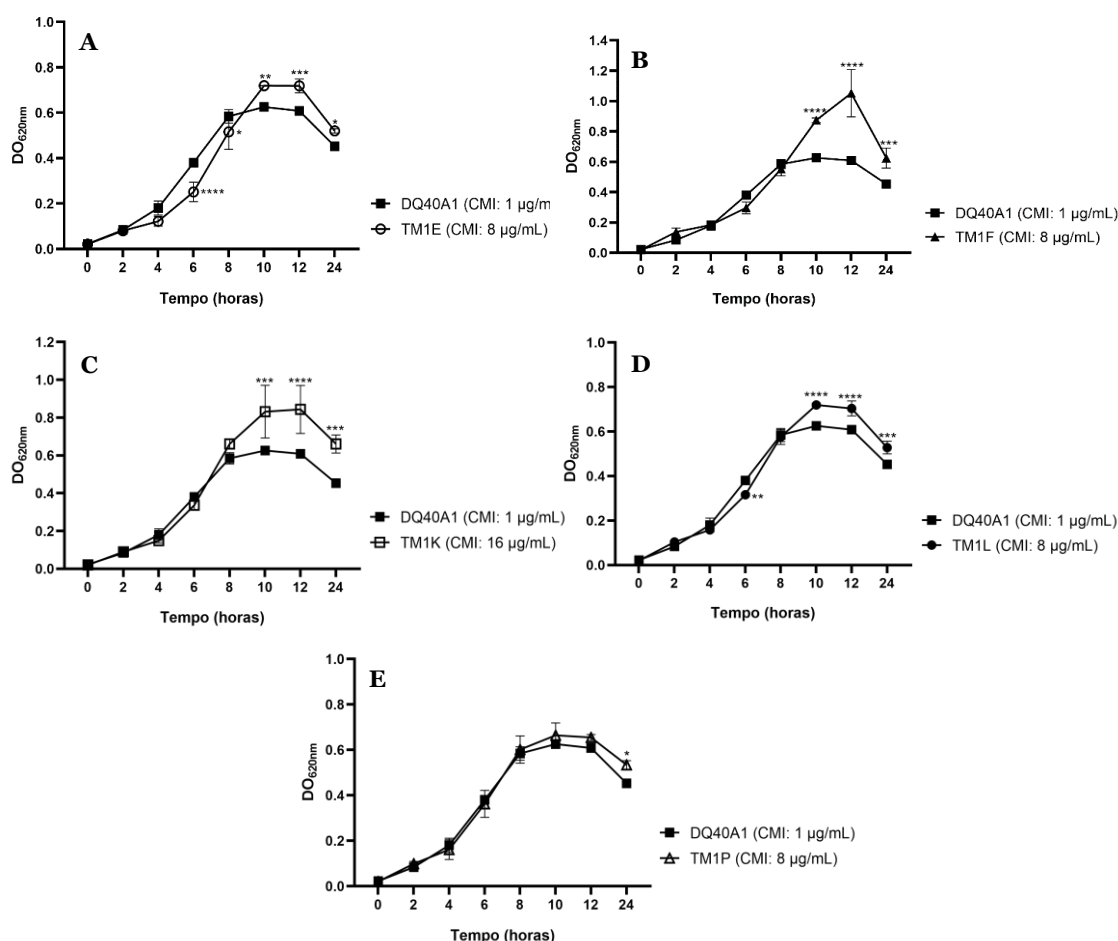


Figura 4: Perfil de crescimento das estirpes de *Al. butzleri* DQ40A1, e respectivos mutantes resistentes à eritromicina. (A: DQ40A1 e TM1E; B: DQ40A1 e TM1F; C: DQ40A1 e TM1K; D: DQ40A1 e TM1L; E: DQ40A1 e TM1P). Resultados obtidos correspondem à média e desvio padrão resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA com comparação múltipla *Sidak's*. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a nativa; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Observando os gráficos representados da Figura 4 é possível verificar que os mutantes TM1E, TM1L, cuja CMI é de 8 µg/mL, possuem uma fase exponencial ligeiramente mais longa e a densidade ótica ( $DO_{620nm}$ ) final mais elevada quando comparada com a estirpe nativa. Em relação aos mutantes TM1F (8 µg/mL) e TM1K (16 µg/mL), os perfis de crescimento começam por ser praticamente sobreponíveis com a estirpe nativa, no entanto, a partir das 8 horas de crescimento a  $DO_{620nm}$  de ambos os mutantes continua a aumentar até às 12 horas, enquanto a estirpe DQ40A1 entra em fase estacionária. No que diz respeito à curva de crescimento da estirpe TM1P, esta é praticamente sobreponível com a da estirpe nativa, apresentando diferença estatística ( $p < 0,05$ ) após 24 horas de ensaio.

Analisando os resultados obtidos é possível observar que a maioria dos mutantes em estudo apresentou diferenças significativas no crescimento, no entanto, a CMI de cada estirpe não parece estar associada às alterações observadas uma vez que estirpes com CMI iguais apresentaram perfis de crescimento diferentes.

O mesmo ensaio foi efetuado para obter o perfil de crescimento das estirpes provenientes da indução de elevados níveis de resistência à eritromicina *in vitro* e os resultados obtidos estão representados na Figura 5.

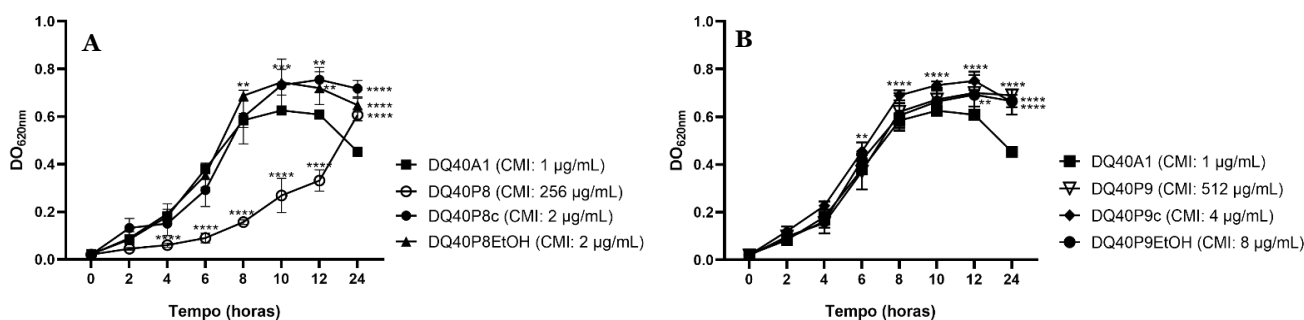


Figura 5: Perfil de crescimento das estirpes de *Al. butzleri* DQ40A1, das estirpes resistentes à eritromicina e respetivos controlos provenientes dos ensaios de evolução na presença de eritromicina. A: DQ40A1 e Evolução 8; B: DQ40A e Evolução 9. Resultados obtidos correspondem à média e o desvio padrão resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação das estirpes resultantes dos ensaios de evolução com a nativa; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , obtidos através do teste de comparação múltipla *Sidak's*.

Avaliando a Figura 5A, referente às evoluções 8 podemos observar que a estirpe resistente DQ40P8, apresenta um aumento da fase lag de crescimento que se reflete numa diminuição da taxa de crescimento desta estirpe quando comparada com a estirpe nativa e com os controlos, DQ40P8c e DQ40P8EtOH. Em relação à evolução 9 (Figura 5B) os perfis de crescimento são todos idênticos ao perfil apresentado pela estirpe nativa, DQ40A1, até às 8 horas de ensaio. A partir deste ponto as estirpes das evoluções 9

apresentam densidade óticas superiores à DQ40A1, sendo que, para a estirpe resistente a diferença de crescimento só é significativa após 12 horas de ensaio.

Observando os resultados obtidos pelas evoluções é possível verificar que a estirpe resistente da evolução 8 apresenta uma alteração drástica no perfil de crescimento, resultado que está de acordo com vários estudos que referem que a aquisição de resistência a antibióticos pode provocar uma diminuição na taxa de crescimento das bactérias (Andersson et al., 2007; Bjorkholm et al., 2001). Contudo, para a evolução 9, ao contrário do que seria esperado, não se verificaram alterações drásticas no crescimento, apesar da estirpe resistente desta evolução apresentar uma CMI superior à da evolução 8.

Assim, é possível considerar que as alterações apresentadas pela estirpe resistente, DQ40P8, podem dever-se ao facto de a indução de resistência ter provocado mutações que levaram a alterações do perfil metabólico da bactéria, alterando assim o seu perfil de crescimento, ou seja, a indução de resistência pode ter tido custos de adaptação para a bactéria, como foi sugerido por Andersson e colaboradores (Andersson & Levin, 1999). Contudo, os resultados obtidos para as estirpes mutantes, provenientes do ensaio de flutuação, e para as estirpes da evolução 9 sugerem que estas estirpes podem ter sofrido mutações adaptativas que compensaram as alterações metabólicas provocadas pela aquisição de resistência. Resultados idênticos foram obtidos por Ferreira e colaboradores num estudo que, comparou a cinética de crescimento de estirpes de *Al. butzleri* resistentes à ciprofloxacina com as respetivas estirpes nativas e no qual se verificou que, nas primeiras 4-6 horas de ensaio, as curvas de crescimento das estirpes mutantes se sobrepujam às curvas de crescimento das estirpes parentais, mostrando uma cinética de crescimento semelhante, apresentado ligeiras alterações nas restantes horas de ensaio (Ferreira et al., 2018). O aumento da  $DO_{620nm}$  apresentados pela maioria das estirpes em estudo, a partir das 10 horas de ensaio, pode dever-se ao possível aparecimento de mutações compensatórias que, têm como função reduzir os custos de adaptação causados pelo aumento da resistência a antibióticos, levando assim ao melhoramento da capacidade de crescimento das estirpes resistentes (Bjorkman et al., 2000; Laurent et al., 2001).

Após a análise dos perfis de crescimento na ausência de eritromicina, procedeu-se à avaliação do perfil de crescimento das estirpes em estudo na presença eritromicina num intervalo de concentrações entre 0  $\mu\text{g/mL}$  a 8  $\mu\text{g/mL}$ . As leituras da densidade ótica a 620 nm de cada estirpe foram feitas de hora a hora e de seguida foi analisado o perfil de crescimento em função da concentração de eritromicina em três pontos de crescimento.

Os perfis de crescimento na presença de eritromicina referentes às estirpes provenientes do ensaio de flutuação estão demonstrados nos gráficos representados na Figura 6.

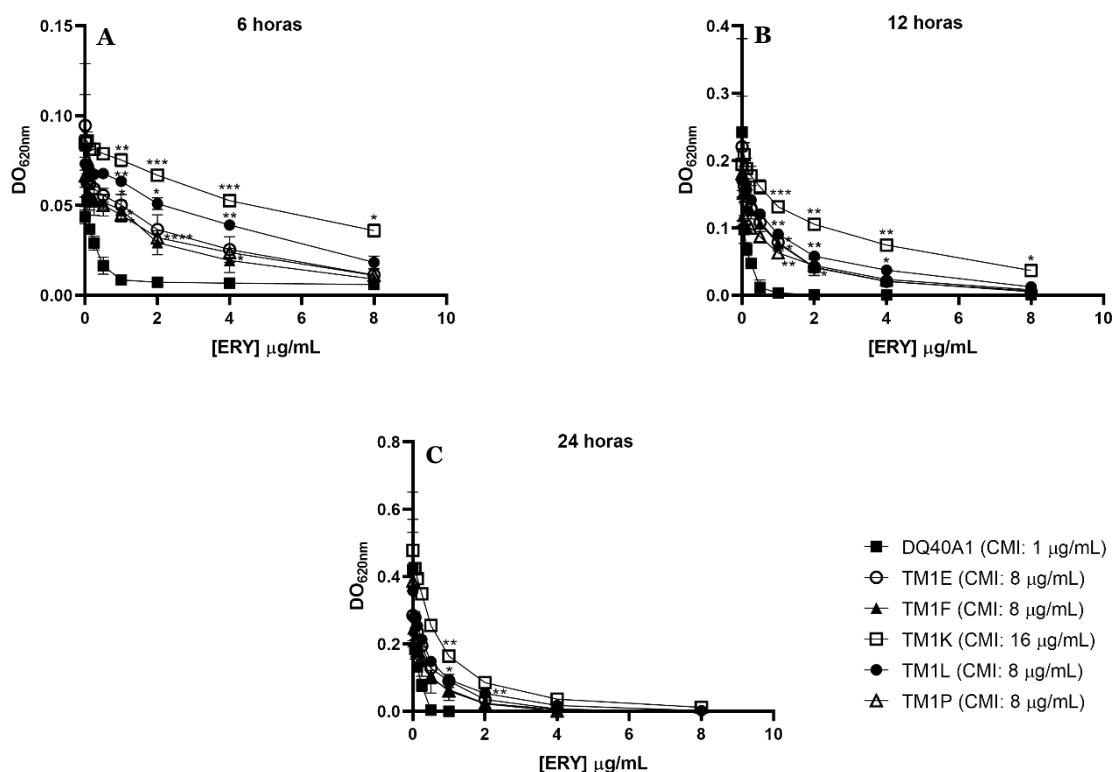


Figura 6: Perfil de crescimento da estirpe de *Al. butzleri* DQ40A1, e respetivos mutantes resistentes à eritromicina na presença de concentrações de eritromicina entre 0– 8 µg/mL. (Densidade ótica a 620 nm A: às 6 horas; B: às 12 horas; C: às 24 horas). Resultados obtidos correspondem à média e o desvio padrão resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA com comparação múltipla *Dunnett's*. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a nativa para concentrações de eritromicina  $\geq 1$  µg/mL; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Ao observar o gráfico representado na Figura 6 é possível verificar que, após as primeiras 6 horas de ensaio, todas as estirpes resistentes testadas apresentaram crescimento mais acentuado relativamente à estirpe nativa para todas as concentrações de eritromicina testadas, sendo que as estirpes TM1K e TM1L são as que apresentam maiores diferenças, quando comparadas com a estirpe DQ40A1, facto que se mantém após 12 horas de ensaio. Contudo, após 24 horas de incubação com concentrações mais elevadas de eritromicina, nenhum dos mutantes apresenta crescimento.

Relativamente às estirpes que integram a evolução 8, os perfis de crescimento na presença de eritromicina às 6, 12 e 24 horas de ensaio estão representados na Figura 7.

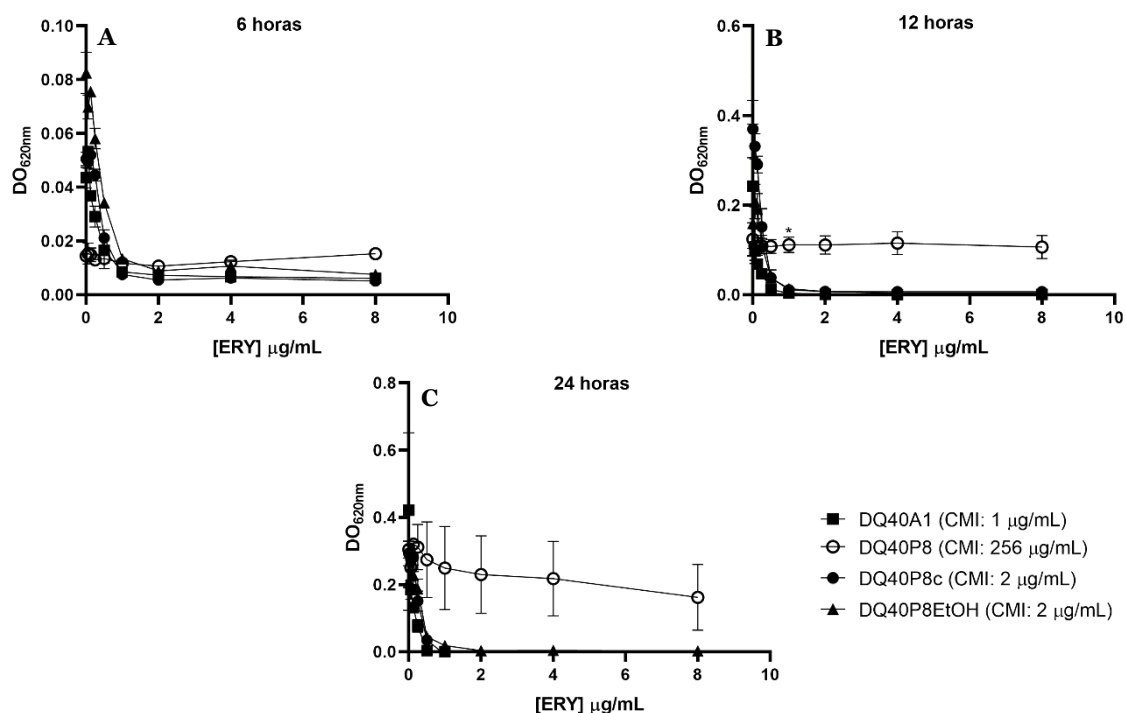


Figura 7: Perfil de crescimento das estirpes de *Al. butzleri* DQ40A1, e das estirpes correspondentes às evoluções 8 na presença de concentrações de eritromicina de 0 µg/mL – 8 µg/mL. (A: Perfil de crescimento às 6 horas de ensaio; B: Perfil de crescimento às 12 horas de ensaio; C: Perfil de crescimento às 24 horas de ensaio). Resultados obtidos correspondem à média e ao erro padrão da média resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA com comparação múltipla *Dunnett's*. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação das estirpes resultantes dos ensaios de evolução com a nativa; \*  $p < 0,05$ .

Em relação à evolução 8 (Figura 7), pode-se observar que a estirpe resistente à eritromicina, DQ40P8, apresenta diferenças claras na capacidade de crescimento na presença de eritromicina. Às 6 horas de ensaio (Figura 7A), o crescimento da estirpe DQ40P8, para concentrações de antibiótico superiores a 1 µg/mL, não apresenta diferenças significativas de crescimento, no entanto é possível verificar um ligeiro aumento da  $DO_{620nm}$  na presença de 8 µg/mL de eritromicina, quando comparada com os controlos, podendo esta observação estar associada ao aumento da fase lag verificado nas curvas de crescimento. Para as 12 e 24 horas de ensaio (Figura 7B e 7C), o crescimento da estirpe da DQ40P8 é evidentemente superior para as concentrações mais altas de eritromicina, no entanto, só se verificaram diferenças estatísticas significativas após 12 horas de incubação com 1 µg/mL de eritromicina.

O mesmo ensaio foi efetuado para as estirpes da evolução 9 e os resultados obtidos encontram-se representados na Figura 8.

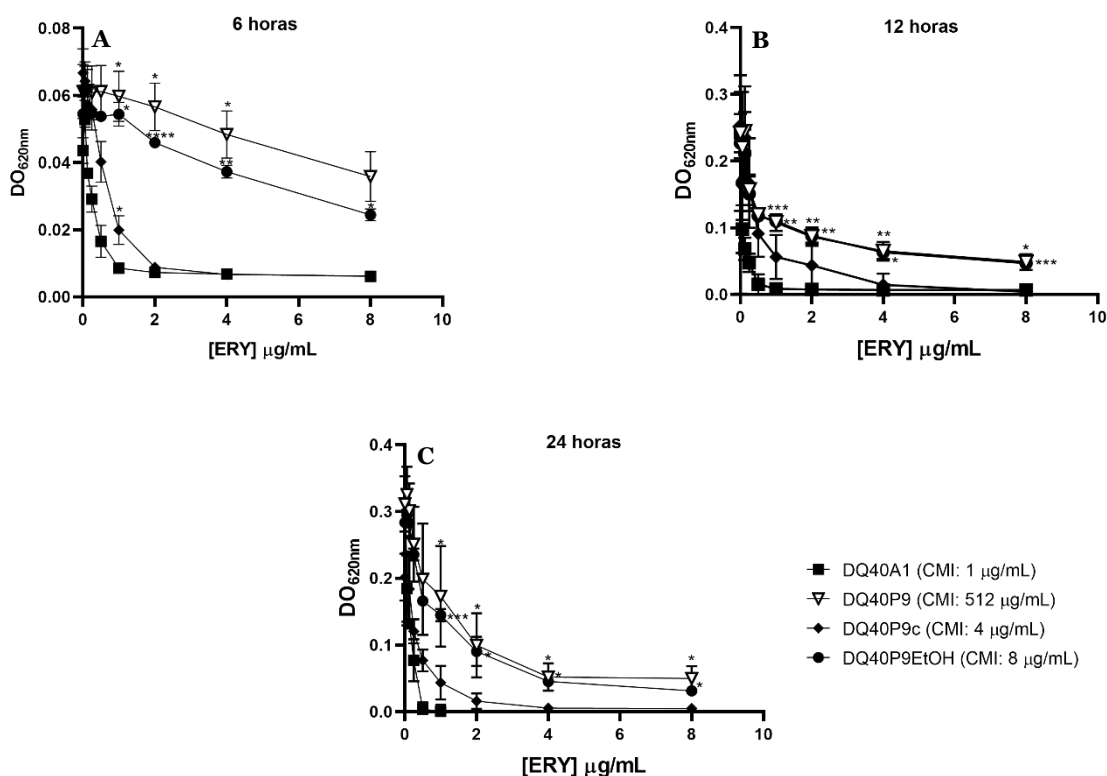


Figura 8: Perfil de crescimento das estirpes de *Al. butzleri* DQ40A1, e das estirpes da evolução 9 na presença de concentrações de eritromicina de 0 µg/mL – 8 µg/mL. A: Perfil de crescimento às 6 horas de ensaio; B: Perfil de crescimento às 12 horas de ensaio; C: Perfil de crescimento às 24 horas de ensaio. Resultados obtidos correspondem à média e ao erro padrão da média resultante de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística foi realizada com o teste *two-way* ANOVA com comparação múltipla *Dunnnett's*. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação das estirpes resultantes dos ensaios de evolução com a nativa; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

No que diz respeito à evolução 9 (Figura 8), ao contrário do observado na evolução 8, na qual apenas a estirpe resistente DQ40P8 foi capaz de crescer na presença de concentrações mais elevadas de eritromicina, nesta também o controlo do solvente, DQ40P9EtOH, apresentou esta capacidade.

Às 6 horas de ensaio (Figura 8<sup>a</sup>) a estirpe que apresenta uma  $DO_{620nm}$  mais elevada em todas as concentrações de eritromicina é a DQ40P9 seguida pela DQ40P9EtOH, apresentando diferenças significativas na presença de concentrações de eritromicina superiores a 0,25 µg/mL. Na Figura 8B pode-se observar que às 12 horas de ensaio a estirpe resistente e o controlo do solvente apresentam densidades óticas idênticas em todas as concentrações de eritromicina, sendo que apresentam diferenças estatísticas em todas as concentrações superiores a 1 µg/mL. No final do ensaio (Figura 8C), é possível verificar que apenas estas duas estirpes têm a capacidade de crescer na presença de 8 µg/mL de eritromicina, enquanto a estirpe controlo, DQ40P9c, apenas apresenta crescimento em concentrações inferiores a 2 µg/mL.

Em suma, analisando os resultados obtidos foi possível verificar que, tanto os mutantes selecionados do ensaio de flutuação como as estirpes resistentes das evoluções, têm maior capacidade de crescimento na presença de eritromicina do que a estirpe nativa, com ênfase para as estirpes com valor de CMI mais elevado, indicando que, como seria expectável, o aumento da CMI para a eritromicina tornou as estirpes mais aptas a crescer na presença deste agente antimicrobiano. Além disso, o facto da estirpe controlo do solvente (DQ40P9EtOH) da evolução 9, também apresentar a capacidade de crescer nas mesmas concentrações que a estirpe resistente pode dever-se à existência de mutações provocadas pela exposição a concentrações crescentes de etanol ao longo do processo de indução de resistência. De facto, num estudo realizado em *A. baumannii* a exposição das bactérias a etanol foi capaz de induzir mutações em genes que codificam para bombas de efluxo do tipo RND que conferem resistência a várias classes de antibióticos (Camarena et al., 2010).

#### 4.4.2. Avaliação do efeito da indução de resistência à eritromicina *in vitro* na suscetibilidade de *Aliarcobacter butzleri* a outros antibióticos

A fim de avaliar se a aquisição espontânea de resistência e a indução de resistência a elevadas concentrações de eritromicina provocou alterações na suscetibilidade a outros agentes antimicrobianos, foram selecionados cinco antibióticos de diferentes classes. A gentamicina que pertence à classe dos aminoglicosídeos, a tetraciclina, dois antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, sendo eles a ampicilina (penicilina) e a cefotaxima (cefalosporina) e ainda a ciprofloxacina que pertence à classe das fluoroquinolonas, e procedeu-se a determinação da CMI de cada antibiótico para cada estirpe. Para tal, foi aplicado o método de microdiluição em placa e os resultados estão representados na Tabela 11.

Tabela 11: Concentração mínimas inibitórias para as estirpes mutantes (TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P), da evolução 8 (DQ4oP8, DQ4oP8c e DQ4oP8EtOH) e 9 (DQ4oP9, DQ4oP9c e DQ4oP9EtOH) e para a estirpe nativa (DQ4oA1) de *Al. butzleri*.

Estirpes de <i>Aliarcobacter butzleri</i>	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	Eritromicina	Gentamicina	Tetraciclina	Ampicilina	Ciprofloxacina	Cefotaxima
<b>DQ4oA1</b>	1	0,5	1	4	$\leq 0,03$	8
<b>TM1E</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	1	4	<b>0,06</b>	8
<b>TM1F</b>	<b>8</b>	0,5	1	4	<b>0,06</b>	8
<b>TM1K</b>	<b>16</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	4	<b>0,06</b>	8
<b>TM1L</b>	<b>8</b>	0,5	1	4	<b>0,06</b>	8
<b>TM1P</b>	<b>8</b>	<b>1</b>	1	4	<b>0,06</b>	8
<b>DQ4oP8</b>	<b>256</b>	0,5	<b>2</b>	4	<b>0,25</b>	<b>2</b>
<b>DQ4oP8c</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	4	<b>0,06</b>	8
<b>DQ4oP8EtOH</b>	<b>2</b>	0,5	<b>2</b>	4	$\leq 0,03$	8
<b>DQ4oP9</b>	<b>512</b>	0,5	<b>4</b>	4	<b>0,25</b>	8
<b>DQ4oP9c</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	4	<b>0,06</b>	8
<b>DQ4oP9EtOH</b>	<b>8</b>	0,5	<b>2</b>	4	<b>0,125</b>	8

A negrito encontram-se evidenciadas as alterações na CMI relativamente à estirpe nativa.

Observando os resultados obtidos, podemos verificar que, no geral os resultados obtidos pelos mutantes selecionados e pelas evoluções são semelhantes.

No que diz respeito à gentamicina, foi possível observar que, as estirpes mutantes TM1E, TM1K e TM1P, bem como as estirpes controlo das evoluções, DQ4oP8c e DQ4oP9c, demonstravam um ligeiro aumento na CMI para este antibiótico, quando comparadas com a estirpe nativa.

Em relação aos resultados obtidos para a tetraciclina, a estirpe mutante TM1K e todas as estirpes das evoluções sofreram um aumento de duas vezes na CMI, que passou de 1  $\mu\text{g/mL}$  para 2  $\mu\text{g/mL}$ , à exceção da estirpe resistente à eritromicina da evolução 9 que apresentou um aumento de quatro vezes CMI quando comparada com a estirpe DQ4oA1.

Em relação aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, ampicilina e cefotaxima não se verificaram alterações na CMI de nenhuma das estirpes em estudo, à exceção da estirpe DQ4oP8 que apresentou um aumento de suscetibilidade à cefotaxima.

No caso da ciprofloxacina foi possível verificar que os cinco mutantes selecionados a partir do ensaio de flutuação apresentaram um aumento de pelo menos duas vezes na CMI. Em relação às evoluções, o aumento da CMI para a ciprofloxacina foi bastante superior ao observado para as estirpes mutantes sendo que, as duas estirpes resistentes (DQ4oP8 e a DQ4oP9) apresentaram um aumento na CMI que passou de  $\leq 0,03 \mu\text{g/mL}$  para 0,25

µg/mL, o que representa um aumento superior a oito vezes na CMI. Em relação às estirpes controlo (DQ40P8c e DQ40P9c), ambas apresentaram um aumento de pelo menos 2x CMI. No entanto, no que toca aos controlos do solvente, apenas a estirpe DQ40P9EtOH sofreu um aumento da CMI de pelo menos quatro vezes, passando de  $\leq 0,03$  µg/mL para 0,125 µg/mL.

Em suma, é possível observar que o aumento da CMI para a eritromicina levou a alterações na suscetibilidade das estirpes à tetraciclina e à ciprofloxacina sendo essas alterações mais visíveis nas estirpes das evoluções que passaram por um processo de aquisição de resistência mais prolongado que as restantes. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos num estudo realizado por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 2021), no qual a estirpe DQ40A1\_trunc\_areR que possui uma expressão aumentada da bomba de efluxo AreABC, para além de apresentar um aumento na CMI para a eritromicina também apresentou uma diminuição da suscetibilidade à ciprofloxacina e à tetraciclina, o que pode indicar um papel das bombas de efluxo da família RND na aquisição de resistência. Contudo, a sobreexpressão de bombas de efluxo não explica o aumento de suscetibilidade que a estirpe DQ40P8 apresentou para a cefotaxima, o que indica que a indução de resistência à eritromicina pode ter provocado mutações que alteraram a produção de  $\beta$ -lactamases ou que modificaram a expressão de porinas, aumentando a permeabilidade da membrana celular (LeFrock et al., 1982).

#### 4.4.3. Avaliação fenotípica da expressão de bombas de efluxo de *Aliarcobacter butzleri*

As bombas de efluxo presentes na membrana celular das bactérias são responsáveis pela extrusão de forma ativa de moléculas antimicrobianas, diminuindo a concentração destas dentro das células, sendo por isso, considerado o mecanismo que mais contribui para a resistência intrínseca a antibióticos em bactérias de Gram-negativo (Blair et al., 2015). Uma vez que existem estudos que correlacionam a existência de um fenótipo de resistência a macrólidos com mutações nos genes associados à regulação destas bombas de efluxo e tendo em consideração os resultados obtidos na sequenciação completa do genoma, feita para a DQ40P8 (Anexo 1) na qual, por comparação com a estirpe nativa, DQ40A1, foi detetada uma mutação nas proteínas ribossomais L4 e L22 e uma deleção no gene repressor da transcrição *areR*, que está associado à regulação da expressão da bomba de efluxo AreABC, procedeu-se à avaliação do papel das bombas de efluxo na aquisição de resistência à eritromicina através do ensaio de acumulação de brometo de etídio (Du et al., 2018; Isidro et al., 2020).

O brometo de etídio é um composto intercalante que emite fluorescência quando ligado ao DNA da bactéria, sendo considerado um substrato das bombas de efluxo. Assim, este ensaio baseia-se na avaliação da emissão de fluorescência, parâmetro que está associado com uma maior ou menor acumulação de BrEt pelas células e conseqüentemente, correlacionado com diferentes graus de expressão das bombas de efluxo (Martins et al., 2010). Deste modo, foi avaliada a acumulação de brometo de etídio por cada estirpe ao longo de 60 minutos e os resultados estão esquematizados nos gráficos da Figura 9.

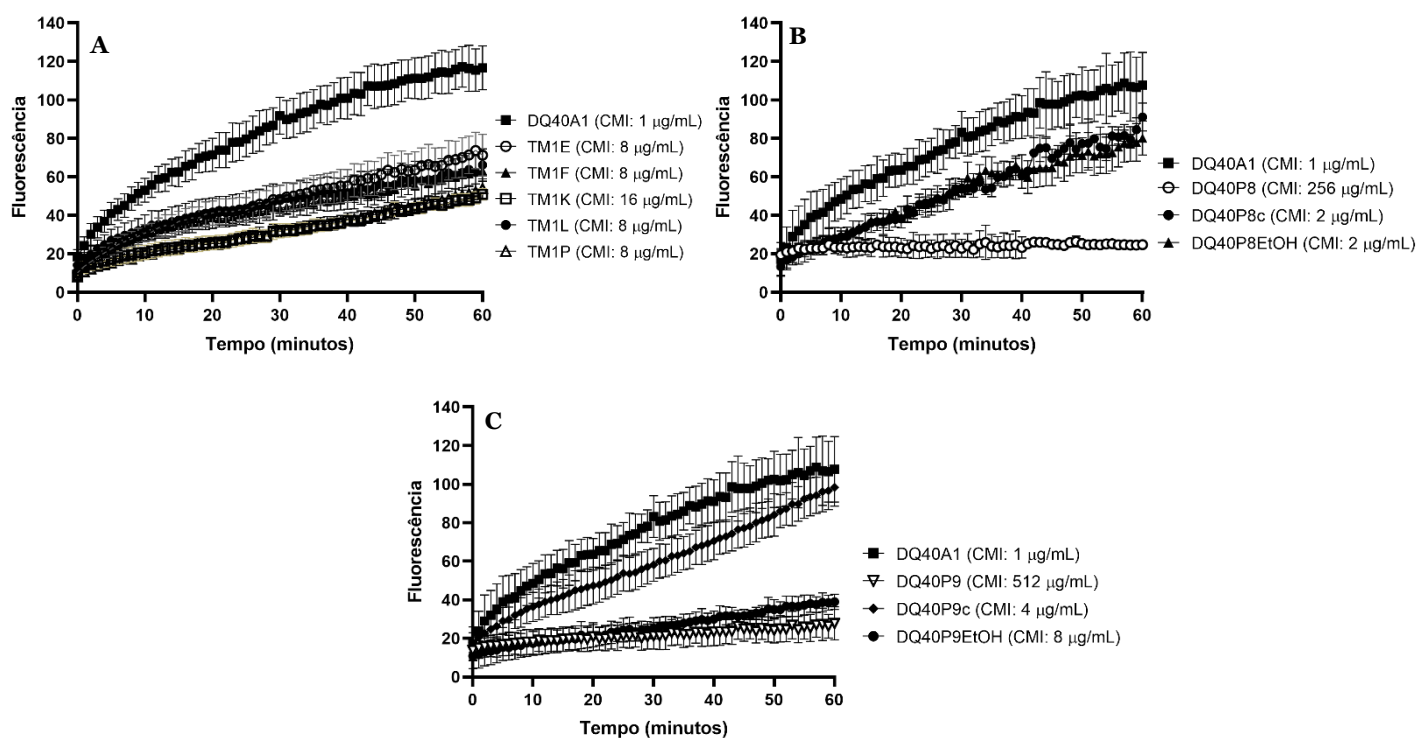


Figura 9: Representação gráfica da acumulação de brometo de etídio (2 µg/mL) pelas estirpes mutantes, pelas evoluções 8 e 9 e pela estirpe nativa (DQ40A1). (A: DQ40A1 e mutantes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P; B: DQ40A1 e evolução 8; C: DQ40A1 e evolução 9). Os resultados apresentados representam a média e erro padrão da média de, pelo menos, três ensaios independentes.

Através da análise do gráfico, podemos concluir que a estirpe DQ40A1 é a que apresenta maior emissão de fluorescência, o que significa que foi a estirpe que acumulou mais brometo de etídio. Em relação às estirpes mutantes, todas apresentaram uma clara diminuição da fluorescência sendo que, as estirpes TM1K e TM1P foram as que demonstraram uma maior redução da acumulação de brometo de etídio (Figura 9A). O mesmo é verificado nas evoluções 8 (Figura 9B) e 9 (Figura 9C), nas quais é possível observar que as estirpes altamente resistentes à eritromicina demonstraram uma emissão de fluorescência praticamente constante ao longo dos 60 minutos de ensaio, o que significa que estas estirpes têm uma maior capacidade para expulsar o brometo de etídio das células. No que diz respeito às estirpes controlo de ambas as evoluções, todas

apresentam uma emissão de fluorescência crescente ao longo do ensaio, mas sempre com valores inferiores aos apresentados pela DQ40A1, à exceção da estirpe controlo DQ40P9EtOH que demonstrou uma acumulação de brometo de etídio idêntica à apresentada pela estirpe resistente, DQ40P9. O aumento da extrusão de brometo de etídio por parte da estirpe DQ40P9EtOH pode significar que o aumento da resistência ao etanol pode levar a mutações que alteram a expressão das bombas de efluxo.

Em suma, esta alteração na acumulação de BrEt sugere que os sistemas de efluxo podem estar envolvidos no processo de aquisição de resistência a antibióticos (Cagliero et al., 2007). Assim, uma diminuição de acumulação de BrEt, que pode estar correlacionada com um aumento de expressão dos sistemas de efluxo, poderá explicar a diminuição de suscetibilidade à eritromicina e ciprofloxacina. Resultados idênticos foram obtidos num estudo realizado em 2021, por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 2021), no qual ficou provada a relação entre o aumento da expressão das bombas de efluxo da família AreABC e a diminuição da acumulação de BrEt em *Al. butzleri* e no qual também foi possível associar o aumento da expressão da bomba de efluxo AreABC com o aumento da resistência a diversos antibióticos, entre eles a ciprofloxacina e a eritromicina.

A fim de confirmar que o aumento da expressão das bombas de efluxo era responsável pelo aumento da extrusão de brometo de etídio por parte das células, foi avaliada a acumulação deste composto na presença de CCCP (Figura 10).

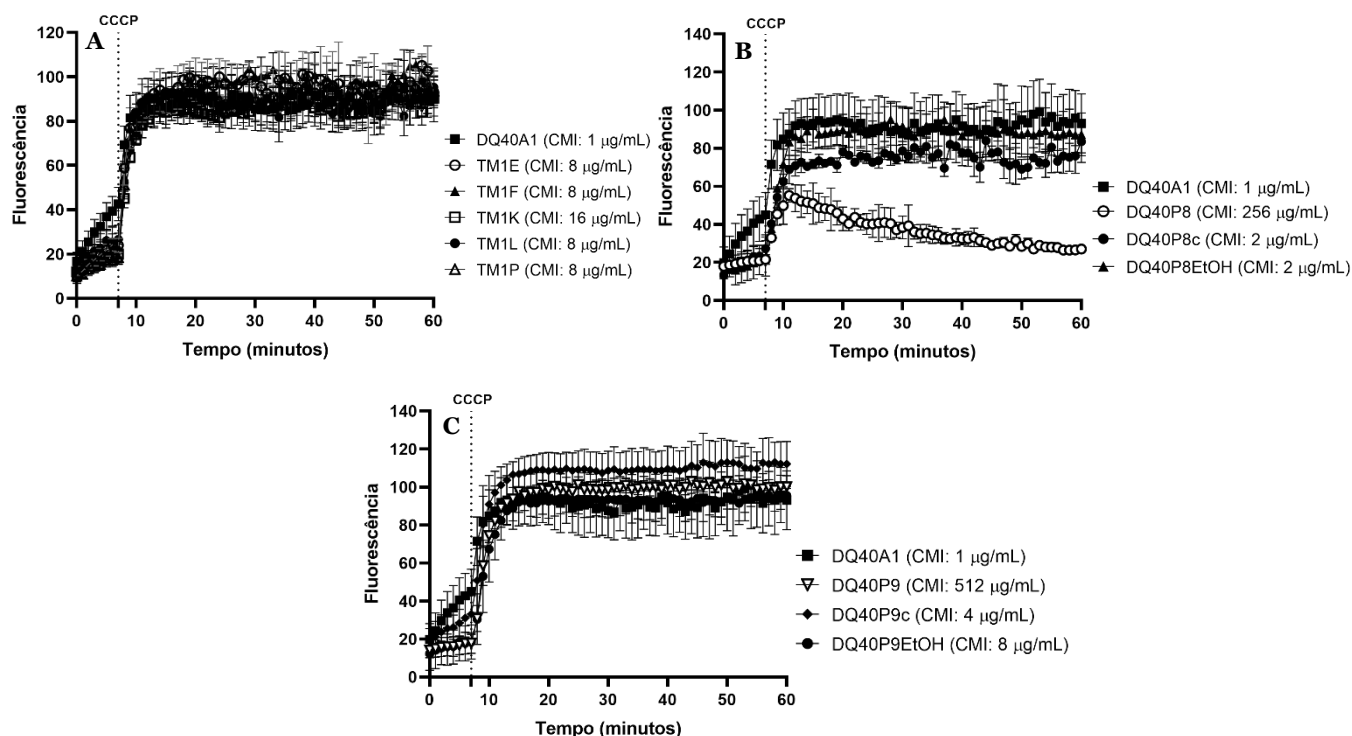


Figura 10: Representação gráfica do efeito da adição de CCCP (10 µg/mL) aos sete minutos na acumulação de brometo de etídio pelas estirpes mutantes, pelas evoluções 8 e 9 e pela estirpe nativa (DQ40A1). (A: DQ40A1 e mutantes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P; B: DQ40A1 e evolução 8; C: DQ40A1 e evolução 9). Os resultados apresentados representam a média e erro padrão da média de, pelo menos, três ensaios independentes.

Pela análise do gráfico da Figura 10 pode-se observar que, após a adição do inibidor de bombas de efluxo, há um aumento brusco da acumulação de brometo de etídio por parte de todas as estirpes em estudo, causado pelo bloqueio das bombas de efluxo. Este aumento confirma que as bombas de efluxo têm um papel importante na acumulação de brometo de etídio, facto já anteriormente reportado em *Al. butzleri* e *C. jejuni* (Lin et al., 2002; Mateus et al., 2021b).

No entanto, ao contrário das restantes estirpes resistentes, na estirpe DQ40P8, o aumento de fluorescência não é tão elevado como nas restantes estirpes em estudo e, ao invés das restantes, a emissão de fluorescência diminui ao longo do restante tempo de ensaio. Este resultado sugere que a estirpe DQ40P8 pode apresentar uma elevada expressão de sistemas de efluxo e que a concentração de CCCP utilizada pode não ter sido suficiente para inibir o funcionamento de todas as bombas de efluxo presentes nesta estirpe. Contudo, não foi testada uma concentração de CCCP mais elevada uma vez que a presença deste composto em concentrações mais altas poderia levar à morte da bactéria.

Os resultados obtidos foram ainda confirmados através do método *Cartwheel* (Figura 11).

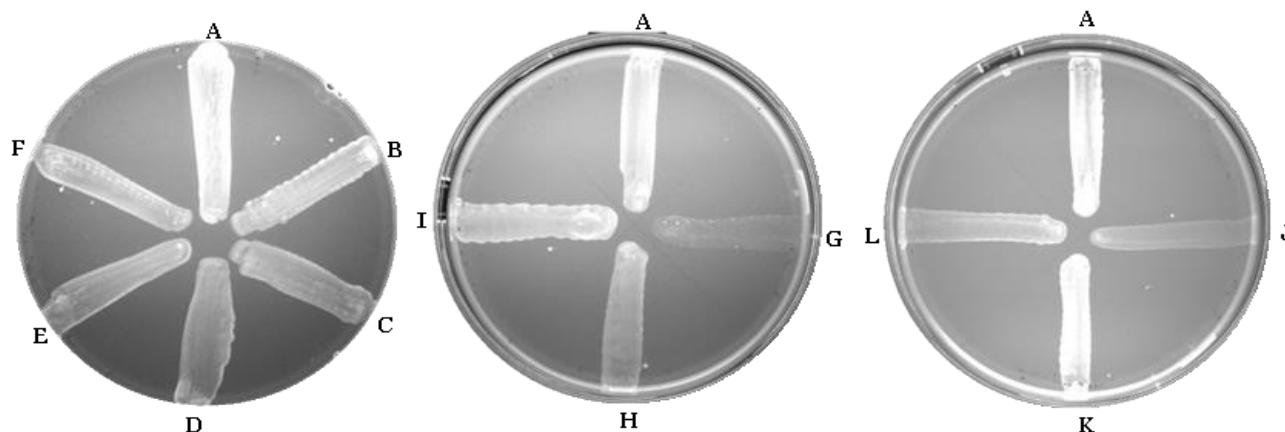


Figura 11: Representação dos resultados obtidos pelo método Cartwheel em placas de meio TSA com 2 µg/mL BrEt após 24 horas de incubação. (A: DQ40A1; B: TM1E; C: TM1F; D: TM1K; E: TM1L; F: TM1P; G: DQ40P8; H: DQ40P8c; I: DQ40P8EtOH; J: DQ40P9; K: DQ40P9c; L: DQ40P9EtOH) Os resultados foram obtidos através da visualização das placas visualizadas num transiluminador (UVITEC, Reino Unido).

Observando a Figura 11, podemos verificar que há uma correlação direta com o observado nos ensaios de acumulação de BrEt, onde as estirpes que apresentaram maior acumulação de BrEt são as que apresentam maior fluorescência.

#### 4.4.3.1. Avaliação da expressão relativa do gene *areB* na evolução 8

Uma vez que a bomba de efluxo AreABC tem demonstrado desempenhar um papel importante na resistência a antibióticos, nomeadamente à eritromicina, fomos avaliar se o aumento de resistência da evolução 8 estaria associada ao aumento da expressão desta bomba de efluxo. Para tal, foi determinada a expressão relativa do gene *areB*, que codifica para uma proteína da membrana interna deste sistema de efluxo, através da técnica de PCR em tempo real (qPCR). Os resultados obtidos através da aplicação do método  $\Delta\Delta C_t$  encontram-se representados no gráfico da Figura 12.

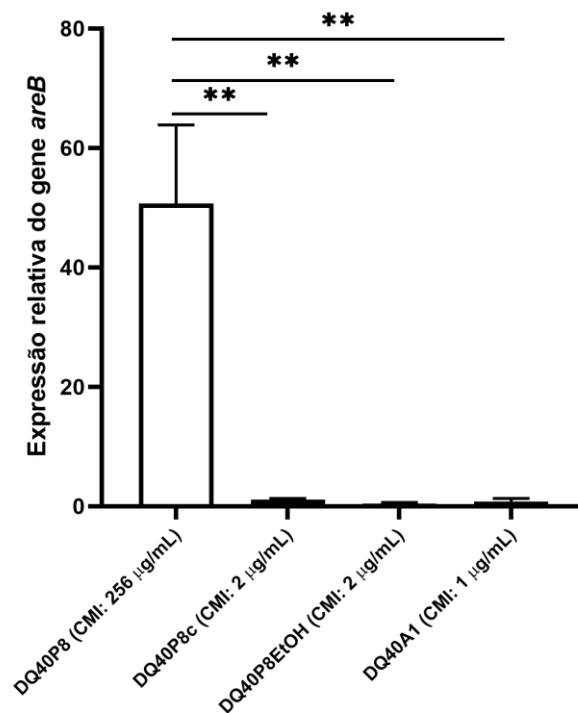


Figura 12: Representação gráfica da expressão relativa do gene *areB* para a estirpe nativa e para as estirpes da evolução 8, obtida através da aplicação do método  $\Delta\Delta Ct$ . Os resultados apresentados representam a média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação da estirpe mutada com a parental; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Através destes resultados pode-se verificar que a estirpe DQ40P8 apresentou um aumento de cerca de 50 vezes na expressão do gene *areB*, quando comparada com os controlos e estirpe nativa, podendo este aumento da expressão ser responsável pela aquisição de resistência a elevadas concentrações de eritromicina. O aumento na expressão das bombas de efluxo da família AreABC pode ter ocorrido devido à mutação no gene repressor da transcrição, *areR*, detetada na análise da sequenciação completa do genoma (Anexo 1).

Em 2020, Isidro e colaboradores (Isidro et al., 2020) verificaram que diversos isolados de *Al. butzleri* resistentes à eritromicina possuíam a proteína reguladora da família TetR truncada devido a mutações e propuseram que essas mutações poderiam levar à sobreexpressão das bombas de efluxo responsáveis pela extrusão da eritromicina. Esta proposta foi validada por Ferreira e colaboradores (Ferreira et al., 2021), que propuseram que a resistência aos macrólidos em *Al. butzleri* estaria associada a mutações no gene *areR* que conduziriam, por sua vez, ao aparecimento de formas truncadas deste repressor da transcrição. Mutações nos reguladores da transcrição foram anteriormente associadas ao aumento da expressão de bombas de efluxo em *Al. butzleri* e *C. jejuni*, podendo assim apoiar os resultados obtidos (Ferreira et al., 2021; Li et al., 2015).

Através da sequenciação do genoma da estirpe DQ40P8, para além da alteração no gene *areR*, também foram observadas mutações pontuais nos genes que codificam para as proteínas ribossomais L4 e L22, o que pode estar associado ao elevado nível de resistência à eritromicina verificado para esta estirpe. Esta observação está em linha com o descrito para *C. jejuni* e *C. coli*, onde, para além do aumento da expressão das bombas de efluxo, a resistência a macrólidos está também associada a mutações nas proteínas ribossomais L4 e L22, que são responsáveis pela diminuição da afinidade dos macrólidos ao local de ligação. Existe um estudo que descreve que mutações nestas proteínas ribossomais podem atuar em sinergia com as bombas de efluxo para conferir resistência a esta classe de antibióticos (Cagliero et al., 2006).

#### 4.4.4. Avaliação da resistência ao stress oxidativo de *Aliarcobacter butzleri*

O oxigénio é uma espécie química reativa que quando não é reduzido na totalidade durante a respiração produz espécies reativas de oxigénio (ROS do inglês *reactive oxygen species*) como por exemplo o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o radical hidróxil ( $\bullet OH$ ) e o anião superóxido ( $O_2\bullet^-$ ) (Kashef & Hamblin, 2017). A acumulação destas ROS no interior das células bacterianas provocam danos no DNA, oxidação de ácidos gordos e lípidos e dos aminoácidos das proteínas, e a este conjunto de efeitos adversos é dado o nome de stress oxidativo (Hong, 2010). Devido a isto, as bactérias que crescem na presença de oxigénio sofrem adaptações para se protegerem do ataque feito pelas ROS, produzindo enzimas de desintoxicação oxidante como a superóxido dismutase, catalase e alquilhidroperóxido redutase (Flint et al., 2016). Nos últimos anos, alguns estudos têm vindo a associar a exposição a antibióticos com o aumento da produção de ROS e consequentemente com o aumento do stress oxidativo que está associado aos efeitos letais dos agentes antimicrobianos, sendo que alguns consideram que as respostas ao stress oxidativo podem contribuir para a resistência a antibióticos (Dwyer et al., 2009; Ferreira et al., 2018; Poole, 2012).

Devido a isto, e a fim de verificar se a aquisição espontânea de resistência (Figura 13) e a indução de elevados níveis de resistência *in vitro* à eritromicina (Figura 14) afetavam a capacidade de sobrevivência das estirpes de *Al. butzleri* ao stress oxidativo, procedeu-se à avaliação da resistência ao stress oxidativo produzido pelo  $H_2O_2$ , um composto capaz de produzir o radical hidróxilo e pelo metil de viologénio, um gerador do superóxido, ou seja, compostos que ativam duas diferentes vias de desintoxicação nas células bacterianas (Comtois et al., 2003).

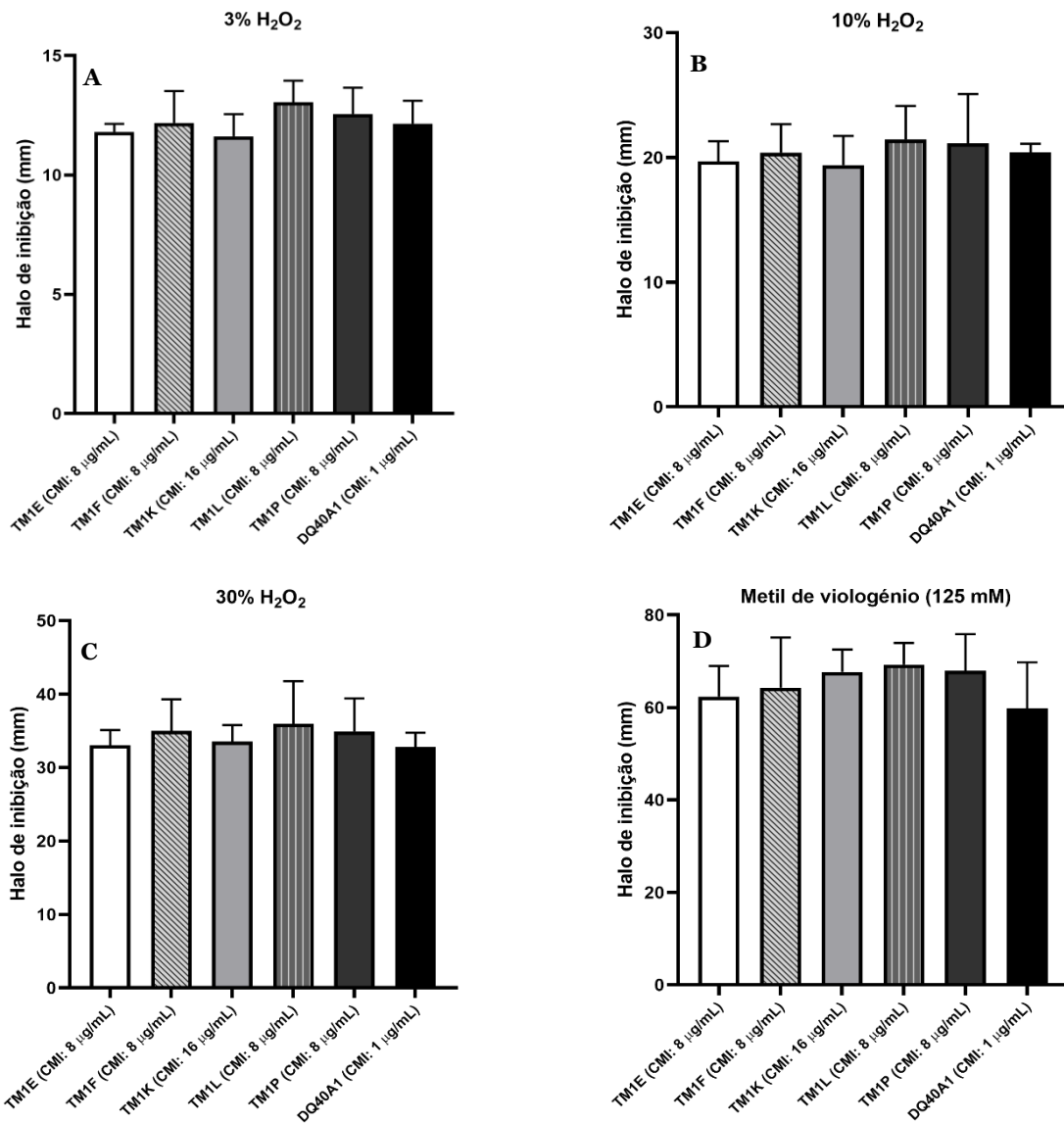


Figura 13: Representação gráfica das zonas de inibição para as estirpes de *Al. butzleri* resistentes e nativa, na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio (A: 3% de peróxido de hidrogénio; B: 10% de peróxido de hidrogénio; C: 30% de peróxido de hidrogénio e de D: Metil de violeténio (a 125 mM)). Os dados representados são referentes à média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. A análise estatística realizada pelo teste *one-way* ANOVA.

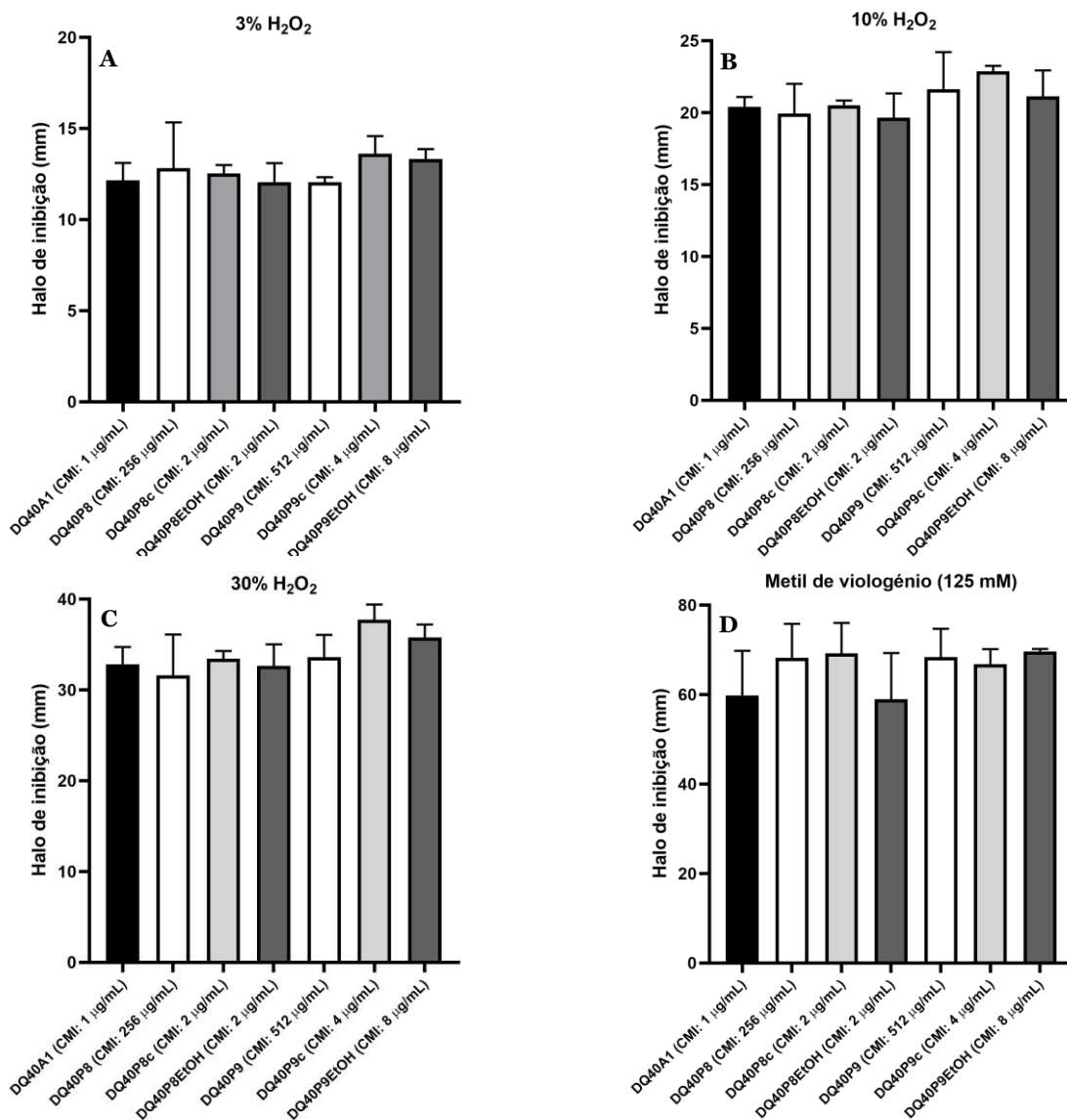


Figura 14: Representação gráfica das zonas de inibição para as evoluções 8 e 9 e da estirpe nativa DQ40A1, na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogénio (A: 3% de peróxido de hidrogénio; B: 10% de peróxido de hidrogénio; C: 30% de peróxido de hidrogénio; D: Metil viologénio a 125 mM). Os dados representados são referentes à média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. A análise estatística realizada pelo teste one-way ANOVA.

Através da análise dos resultados obtidos pode-se verificar que não existiram diferenças significativas nas zonas de inibição em nenhuma das condições testadas, o que significa que a aquisição de resistência à eritromicina, não afetou a capacidade das estirpes sobreviverem ao stress oxidativo provocado tanto pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como pelo metil de viologénio.

Os resultados obtidos são idênticos aos apresentados por Ferreira e colaboradores num estudo onde foi testada a sobrevivência de estirpes de *Al. butzleri*, resistentes e suscetíveis

à ciprofloxacina, na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 5 minutos, no qual não se verificaram alterações significativas na sobrevivência das estirpes (Ferreira et al., 2018).

Em relação à evolução 8, tendo em consideração o aumento de expressão do gene *areB*, demonstrado pela estirpe DQ40P8, seria de esperar que existisse um aumento da resistência ao stress oxidativo uma vez que existem estudos que sugerem que exista uma associação entre a presença de bombas de efluxo e a resistência a compostos indutores de stress oxidativo (Bogomolnaya et al., 2013; Jeon et al., 2011; Mateus et al., 2021b). Contudo, outros estudos sugerem que nem todos os sistemas de efluxo estão envolvidos na extrusão destes compostos, como é o caso de um estudo realizado em *Al. butzleri* no qual se tentou avaliar o papel das bombas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI, na extrusão de compostos indutores de stress oxidativo. O estudo referido concluiu que, dois dos três mutantes testados, os que possuíam o gene *areB* e *areG* inativados, não demonstraram diferenças significativas na resistência ao stress oxidativo, quando comparados com a estirpe parental. Além disso, apenas a estirpe mutante que possuía o gene *areE* inativado, apresentava uma diminuição da resistência ao stress oxidativo provocado pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% e 30%) (Mateus et al., 2021b).

À semelhança do que foi verificado na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (125 mM), as estirpes resistentes à eritromicina também não demonstraram diferenças significativas na resistência ao stress oxidativo provocado pelo metil de viologénio. Em *Salmonella enterica*, foi observado que o aumento da expressão da bomba de efluxo MdsABC, pertencente à família RND, conduzia a um aumento da resistência ao stress induzido por metil de viologénio nas diversas concentrações testadas ( Song et al., 2015). No entanto, considerando o trabalho de Mateus e colaboradores em *Al. butzleri*, não se verificaram diferenças significativas na resistência ao stress provocado por este composto e a inativação das bombas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI (Mateus et al., 2021b), validando que a sobreexpressão do sistema AreABC não tenha levado a uma modificação na suscetibilidade das estirpes ao metil de viologénio. Com base no resultado do nosso estudo e noutros, serão necessários mais estudos de modo a esclarecer quais os mecanismos que estão associados à resistência ao stress oxidativo induzido por metil de viologénio em *Al. butzleri*.

## **4.5. Avaliação da robustez de estirpes de *Aliarcobacter butzleri* após aquisição espontânea e indução de resistência *in vitro* à eritromicina**

Estudos sugerem que a aquisição de resistência a antibióticos pode levar ao aparecimento de mutações que são muitas vezes associadas a custos de adaptação, quando se compara as estirpes resistentes com as estirpes parentais. Contudo, esses custos de adaptação podem ser atenuados por mutações compensatórias (Melnik et al., 2015; Ferreira et al., 2018). Devido a isto, foram realizados diversos ensaios a fim de avaliar de que forma os diferentes graus de resistência à eritromicina modificavam a robustez das estirpes de *Al. butzleri*.

### **4.5.1. Avaliação da motilidade**

O facto de *Al. butzleri* possuir um flagelo confere a esta bactéria motilidade, característica que poderá estar associada ao processo de colonização em *Al. butzleri*, sendo por isso associada à patogenicidade da bactéria (Chaban et al., 2015; Ferreira et al., 2018; Lin et al., 2003). Uma vez que a aquisição de resistência a antibióticos pode levar a uma alteração na capacidade de movimento das estirpes em estudo, foi efetuada a avaliação da motilidade da estirpe nativa, DQ40A1, das estirpes TM1 e das evoluções 8 e 9, a fim de verificar se a aquisição de resistência à eritromicina tinha efeitos na virulência das estirpes. Para tal, avaliou-se o halo de motilidade de cada estirpe após 48 horas de incubação e as médias dos resultados obtidos após, pelo menos, três ensaios independentes estão esquematizados na Figura 15 e na Figura 16.

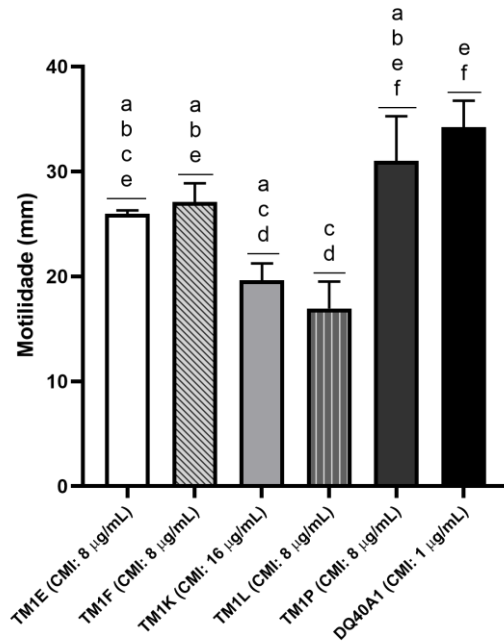


Figura 15: Representação gráfica do halo de motilidade (em mm) da estirpe nativa DQ40A1 e das estirpes resistentes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P, às 48 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA. Colunas marcadas com letras diferentes eram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

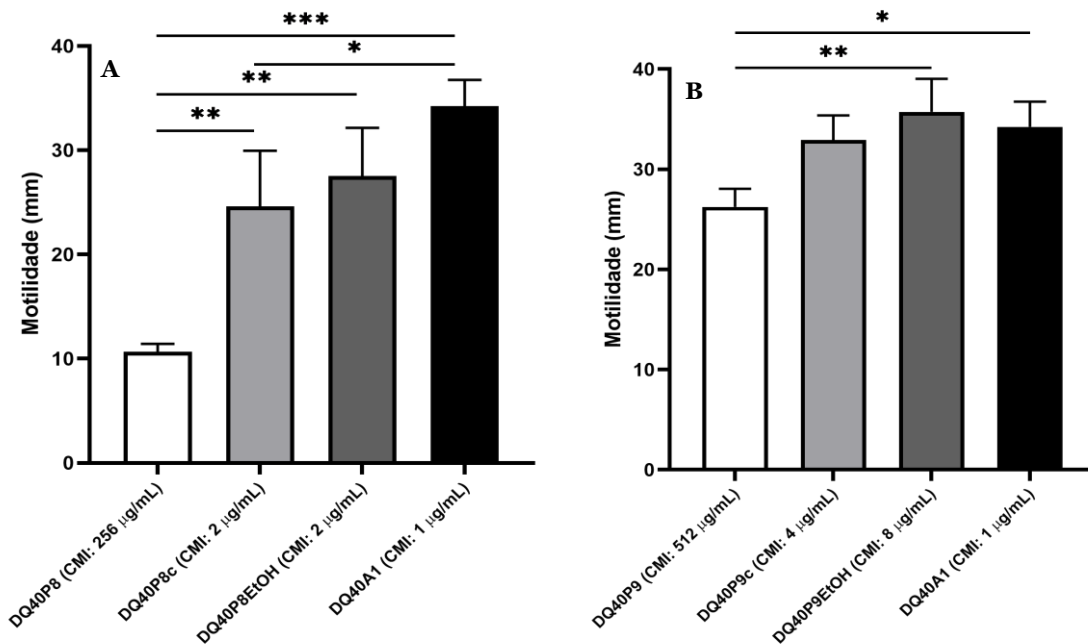


Figura 16: Representação gráfica do halo de motilidade (em mm) da estirpe nativa DQ40A1 e das três estirpes que integram as evoluções 8 e 9 após 48 horas de incubação. A: evolução 8 e estirpe nativa; b: evolução 9 e estirpe nativa. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as estirpes; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

A partir da análise dos resultados obtidos (Figura 15), pode-se observar que, no geral, todas as estirpes sofreram uma diminuição significativa na motilidade em relação à DQ40A1, com exceção da estirpe TM1P (8µg/ml). As estirpes TM1K (16µg/ml) e TM1L (8µg/ml) foram as estirpes onde a redução da motilidade foi mais acentuada, sendo que esse valor passou de 34,2 mm, valor da motilidade da estirpe nativa, para 19,6 mm e 17,0 mm, respectivamente. Tais valores representam uma redução entre 1,7 - 2 vezes na motilidade destas estirpes.

No que diz respeito às evoluções 8 e 9 (Figura 16), analisando os resultados obtidos, à semelhança do que foi verificado nas estirpes TM1, pode-se verificar que as estirpes de ambas as evoluções demonstraram uma diminuição da motilidade, à exceção da estirpe DQ40P9EtOH que apresentou um ligeiro aumento da motilidade em relação à estirpe nativa, no entanto esse aumento não foi significativo. Em relação às duas estirpes altamente resistentes, foi possível observar que, a estirpe DQ40P8 foi a que apresentou uma maior redução da motilidade, cerca de 3,2 vezes, quando comparada com a estirpe nativa, enquanto a estirpe DQ40P9 apresentou uma redução da motilidade de cerca de 1,3 vezes, quando comparada com a estirpe nativa, apresentando valores semelhantes aos obtidos para as estirpes TM1E e TM1F e também para as duas estirpes controle da evolução 8 e à estirpe Dq40P9c. Esta diferença observada entre a estirpe DQ40P8 e a DQ40P9 pode ser explicada pelo aparecimento de mutações.

Os resultados obtidos nestes ensaios estão de acordo com os observados num estudo que avaliou o efeito da resistência a macrólidos em *C. jejuni*, no qual se verificou uma diminuição significativa da motilidade das estirpes resistentes aos três macrólidos em estudo em relação à estirpe nativa. Este estudo concluiu que a alteração da motilidade das estirpes não estava associada a nenhuma mutação nos locais de ação dos macrólidos, mas sim que o próprio agente antimicrobiano provocava alterações fenotípicas nas estirpes (Almofti et al., 2011). Outros dois estudos, no qual foi avaliada a motilidade de estirpes de *C. jejuni* e de *P. aeruginosa* resistentes a macrólidos e fluoroquinolonas, concluíram que a aquisição de resistência a estes antibióticos levava a uma diminuição da motilidade das estirpes (Zeitouni et al., 2013).

Deste modo, os resultados obtidos sugerem que a aquisição de resistência à eritromicina pode causar mutações que levam a que haja um custo de adaptação para as estirpes resistentes ou somente uma alteração fenotípica que seja responsável por esta característica, fazendo com que estas diminuam algumas das suas capacidades como é o caso da motilidade (Melnik et al., 2015). Contudo, não foi possível observar uma relação direta entre o aumento da CMI para a eritromicina e a diminuição da motilidade.

#### 4.5.2. Avaliação da formação de biofilme

Os biofilmes são conjuntos de células microbianas que estão associadas a uma superfície de forma irreversível formando uma matriz protetora, facilitando a sobrevivência, resistência e disseminação pelo meio ambiente, e tornando mais difícil a desinfecção de superfícies, tendo por isso, um papel importante na patogenicidade das bactérias (Donlan, 2002; Ferreira et al., 2018; Kjeldgaard et al., 2009).

Com o intuito de avaliar o efeito da aquisição de resistência à eritromicina na formação de biofilme procedeu-se à análise da capacidade de formação de biofilme pelas estirpes de *Al. butzleri* em estudo. Os resultados obtidos a partir da leitura da absorvância a 570 nm de, pelo menos, três ensaios independentes estão representados nas Figuras 17 e 18.

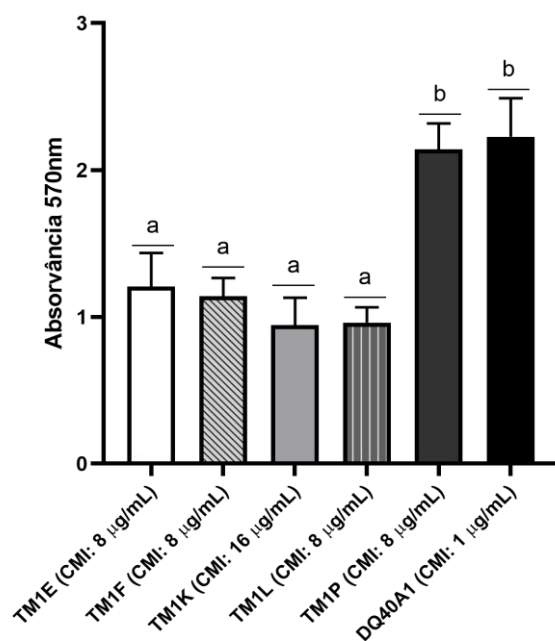


Figura 17: Representação gráfica da formação de biofilme, obtida pela leitura da absorvância a 570 nm da estirpe nativa DQ40A1 e das estirpes resistentes TM1E, TM1F, TM1K, TM1L e TM1P, às 48 horas de incubação. Os valores apresentados correspondem à média e erro padrão da média de pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA. Colunas marcadas com letras diferentes apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ).

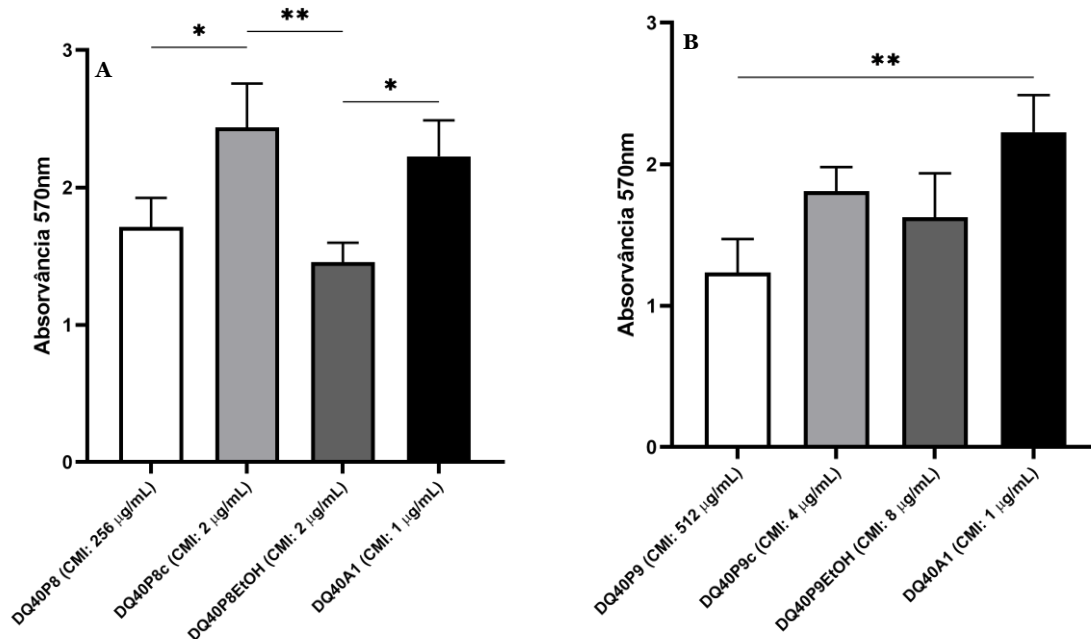


Figura 18: Representação gráfica da formação de biofilme, obtida pela leitura da absorvância a 570 nm da estirpe nativa DQ40A1 e das três estirpes que integram as evoluções 8 e 9 após 48 horas de incubação. A: evolução 8 e estirpe nativa; B: evolução 9 e estirpe nativa. Os valores apresentados correspondem à média e erro padrão da média de, pelo menos, três ensaios independentes. Os resultados foram analisados usando o teste *one-way* ANOVA. Os asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas na comparação entre as estirpes; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

Usando o método de classificação descrito por Stepanovic (2007) (Stepanovic et al., 2007), todas as estirpes analisadas são fortes formadoras de biofilme. No entanto, ao comparar a capacidade de formação de biofilme da estirpe nativa com as estirpes TM1 (Figura 17), pode-se observar que todas sofreram uma diminuição significativa da capacidade de formação de biofilme, à exceção da estirpe TM1P que não apresentou alteração significativa.

Em relação às estirpes das evoluções 8 e 9 (Figura 18), a análise dos resultados mostrou que ambas as estirpes altamente resistentes apresentaram uma redução da capacidade de formação de biofilme, sendo que apenas a estirpe DQ40P9 apresentou uma diminuição significativa quando comparada com a estirpe nativa. Em relação às estirpes controle de ambas as populações, foi possível observar uma ligeira diminuição da capacidade de formação de biofilme na maioria das estirpes, sendo que a estirpe DQ40P8EtOH foi a única a apresentar uma alteração significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada com a estirpe nativa. Esta diminuição acentuada demonstrada pela estirpe DQ40P8EtOH pode ser devida a mutações induzidas pela exposição ao etanol que levaram a que, na ausência desta substância, a estirpe em questão fique em desvantagem quando comparada com estirpes não expostas, apresentando assim uma menor produção de biofilme (Blanco et al.,

2019). Apesar das alterações verificadas, não foi possível encontrar uma associação entre o aumento da CMI para a eritromicina com a alteração da capacidade de formação de biofilme.

Os resultados obtidos estão de acordo com o apresentado por um estudo realizado com isolados de *A. baumannii* onde foi reportado que estirpes com resistência a antibióticos eram formadoras de biofilme mais fracas do que estirpes não resistentes (Qi et al., 2016). No entanto, outros estudos apresentaram resultados diferentes nomeadamente, um estudo realizado com isolados de *Al. butzleri* no qual, estirpes com maior CMI para a eritromicina e para a ciprofloxacina, demonstrando maior capacidade de formação de biofilme (Ferreira, Queiroz, et al., 2014) ou similarmente em estirpes de *C. jejuni*, resistentes à ciprofloxacina (quatro estirpes) e ao ácido nalidíxico (quatro estirpes), no qual foi possível observar um aumento da capacidade de formação de biofilme em todas as estirpes resistentes testadas (Whelan et al., 2019). Existem ainda estudos que não reportaram nenhuma alteração na capacidade de formação de biofilme como um estudo, no qual foram avaliadas as diferenças na formação de biofilme entre estirpes de *Al. butzleri* resistentes e suscetíveis à ciprofloxacina, onde não se verificaram alterações significativas, sendo sugerido que a aquisição de resistência à ciprofloxacina podia ser compensada com mutações adaptativas (Ferreira et al., 2018).

Em suma, os resultados obtidos no nosso estudo sugerem que algumas das estirpes em estudo podem ter sofrido mutações que alteraram as funções da membrana celular, nomeadamente a capacidade de adesão, o que pode ter conduzido à diminuição da formação de biofilme por uma diminuição da adesão inicial (Yoon et al., 2015). No entanto mais estudos seriam necessários para compreender melhor a correlação entre a aquisição de resistência à eritromicina e a capacidade de formação de biofilme.

#### 4.5.3. Avaliação da sobrevivência em modelos alimentares

Como referido anteriormente, *Al. butzleri* é um patógeno encontrado frequentemente em alimentos como frango, legumes e produtos lácteos. Deste modo, para avaliar se isolados de *Al. butzleri* resistentes à eritromicina possuem alguma alteração que favoreça o crescimento destas nos alimentos, mesmo que estes se encontrem nas condições naturais de refrigeração, foi avaliada a sobrevivência das estirpes em estudo em quatro modelos alimentares, leite magro, leite gordo, suco de alface e suco de frango, armazenados a 4 °C durante 14 dias e os resultados foram comparados com a estirpe nativa. Este ponto pode ser relevante para avaliar se esta capacidade de sobrevivência pode justificar a baixa taxa de isolamento de estirpes de *A. butzleri* com elevados níveis de resistência a eritromicina a partir de amostras de vários ambientes.

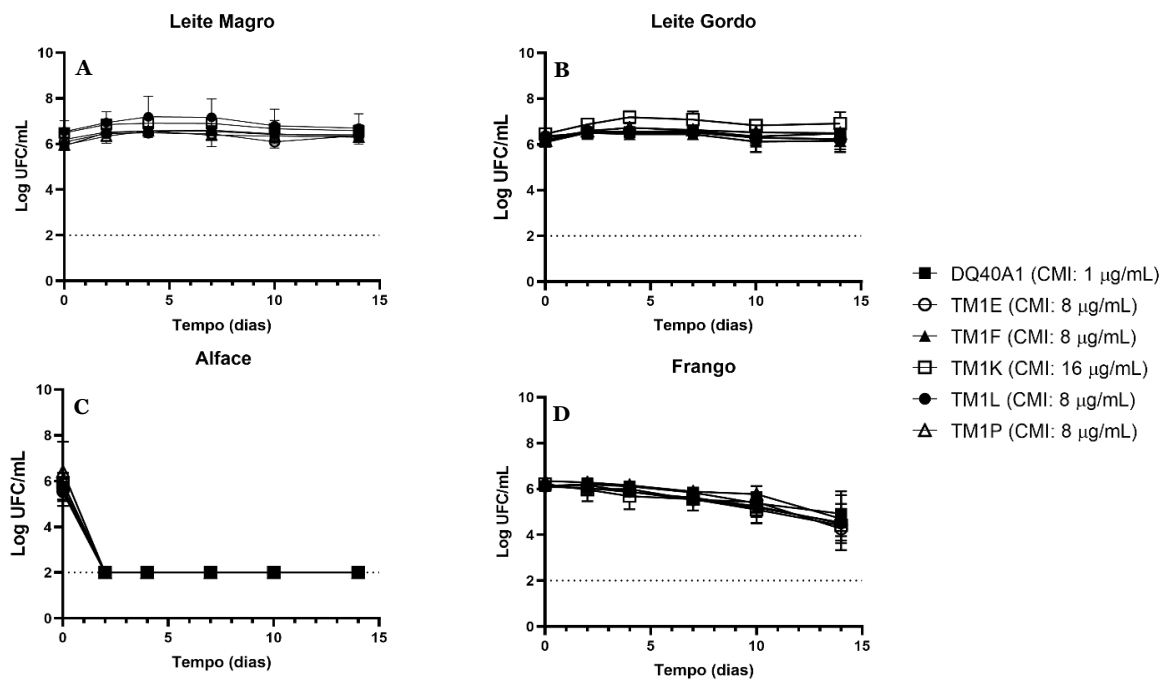


Figura 19: Representação gráfica da sobrevivência das estirpes em quatro modelos alimentares conservados a 4 °C durante 14 dias A: Sobrevivência em leite magro; B: Sobrevivência em leite gordo; C: Sobrevivência em suco de frango; D: sobrevivência em suco de alface. A linha a tracejado representa o limite de detecção do ensaio. Os dados representados são referentes à média e erro padrão da média de, pelo menos, dois ensaios independentes. A análise dos gráficos foi efetuada pelo teste estatístico *two-way* ANOVA.

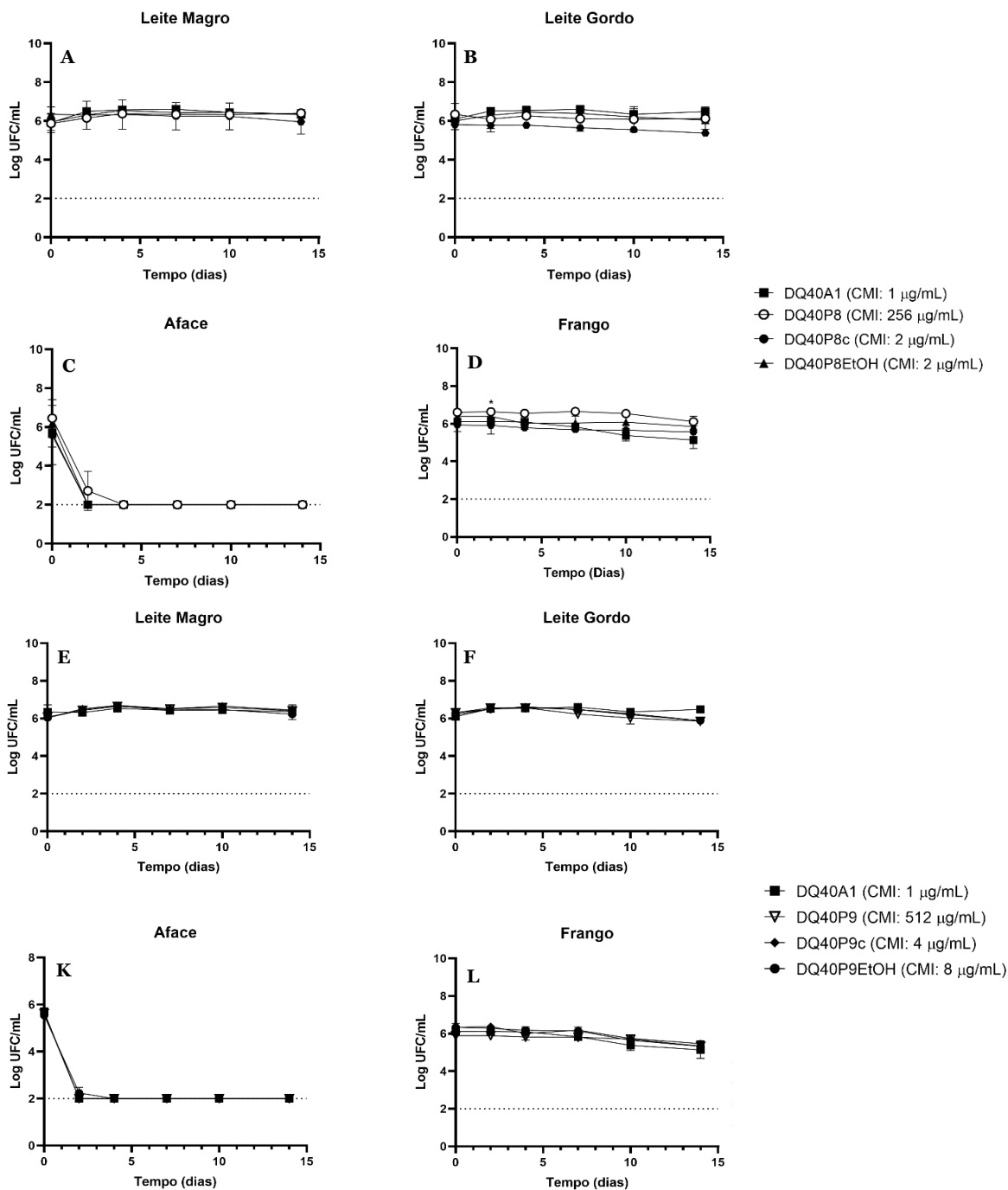


Figura 20: Representação gráfica da sobrevivência das estirpes da evolução 8, da evolução 9 e da estirpe nativa em quatro modelos alimentares, conservados a 4 °C durante 14 dias. Evolução 8: A: Sobrevivência em leite magro; B: Sobrevivência em leite gordo; C: Sobrevivência em suco de alface; D: sobrevivência em suco de frango. Evolução 9: E: Sobrevivência em leite magro; F: Sobrevivência em leite gordo; K: Sobrevivência em suco de alface; L: Sobrevivência em suco de frango. A linha a tracejado representa o limite de detecção do ensaio. Os dados representados são referentes à média e erro padrão da média de, pelo menos, 2 ensaios independentes. A análise dos gráficos foi efetuada pelo teste estatístico *two-way* ANOVA.

No geral, os modelos alimentares nos quais as estirpes de *Al. butzleri* apresentaram melhor capacidade de sobrevivência foram o modelo de leite magro (Figura 19A, 20A e

20E) e o de leite gordo (Figura 19B, 20B e 20F) sendo que, ao longo dos 14 dias de ensaio, o perfil de sobrevivência das estirpes resistentes foi idêntico ao perfil da estirpe nativa. Resultados idênticos foram reportados em 2014, num estudo que relevou que *Al. butzleri* foi capaz de sobreviver durante 6 dias em leite ultrapasteurizado armazenado a 4 °C no entanto, à semelhança do que se verificou no nosso estudo, a esta temperatura *Al. butzleri* não apresentou crescimento ao longo do tempo (Giacometti et al., 2014).

Em relação à inoculação das estirpes em suco de alface iceberg, foi possível observar que a partir do segundo dia de ensaio apenas foi possível detetar colónias de uma das estirpes em estudo, sendo que as restantes já não apresentavam crescimento detetável pelo método utilizado (Figura 19C, 20C e 20K). Embora a estirpe resistente, DQ40P8 fosse a única a sobreviver após dois dias do início do ensaio, a diferença entre ela e as restantes estirpes não se mostrou significativa. Anteriormente, já se tinha verificado a dificuldade de sobrevivência desta bactéria em alimentos de origem vegetal, sendo que três estirpes de *Al. butzleri* deixaram de ser detetadas 24 ou 48 horas após o início do ensaio em puré de maçã e pera (Lee & Choi, 2013). Um outro estudo também realizado em *Al. butzleri* que usou alface iceberg como modelo alimentar reportou que após 24 horas de ensaio ocorreu uma diminuição considerável das UFC/mL desta bactéria (Batista, 2020).

No que diz respeito à sobrevivência das estirpes em suco de frango (Figuras 19D, 20D e 20L) é possível observar que ao longo dos 14 dias de ensaio todas as estirpes em estudo apresentam uma ligeira diminuição das UFC/mL. Apesar de o perfil apresentado pelas estirpes ser praticamente idêntico ao longo de todo o ensaio, no dia dois existe uma diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre o perfil de sobrevivência da estirpe DQ40P8 e o da DQ40A1, uma vez que a estirpe altamente resistente à eritromicina apresenta um número de UFC/mL superior ao apresentado pela estirpe nativa. Um perfil similar de sobrevivência de *Al. butzleri* em frango foi descrito anteriormente num estudo que utilizou frango como modelo alimentar para avaliar a resistência de *Al. butzleri* a baixas temperaturas, no qual foi possível detetar uma diminuição na concentração da bactéria 3 dias após o início do ensaio no entanto, 9 dias depois ainda era possível detetar a presença de *Al. butzleri* no modelo alimentar armazenado a 4 °C (Badilla-Ramirez et al., 2016). A partir destes resultados concluímos que *Al. butzleri* é capaz de sobreviver em condições de armazenamento natural do frango. Um dos factos que pode contribuir para esta sobrevivência são os nutrientes constituintes do frango que conferem proteção à bactéria no entanto, o decréscimo observado na concentração das bactérias em estudo pode ser explicado pelo consumo de nutrientes presentes no meio e pela acumulação de metabolitos ao longo do ensaio (Badilla-Ramirez et al., 2016; Birk et al., 2004).

Em suma, após a análise das estirpes em estudo, podemos verificar que a indução de resistência à eritromicina não teve efeitos significativos na sobrevivência das estirpes nos modelos alimentares testados, não se apresentando como uma justificção para a baixa frequência de isolamento de *Al. butzleri* com elevados níveis de resistência. No entanto, ainda existe um número muito reduzido de estudos que relacionam a resistência a antibióticos e a sobrevivência de bactérias em modelos alimentares nas condições normais de armazenamento. Por este motivo, mais estudos são necessário para entender completamente a correlação entre o aumento da resistência a antibióticos e a sobrevivência das estirpes em matrizes alimentares.

## Capítulo 5: Conclusões

*Aliarcobacter butzleri* é uma espécie pertencente ao gênero *Aliarcobacter*, que se encontra atualmente inserida na família *Arcobactereaceae*, e na ordem *Campylobacterales*. Esta bactéria encontra-se vastamente distribuída pelo meio ambiente, estando associada a enterites, bacteremias e septicemias em humanos, sendo que o consumo de água ou alimentos contaminados se apresentam como as principais potenciais vias de transmissão. Apesar de as doenças provocadas por esta espécie serem normalmente autolimitadas, perante situações de sintomatologia persistente a utilização de antibióticos é aconselhada, sendo os macrólidos uma classe que tem sido apontada como recomendada. Nos últimos anos tem-se verificado o aparecimento de uma frequência baixa a moderada de resistência à eritromicina, contudo existe um déficit de informação em relação aos mecanismos envolvidos na aquisição de resistência, sendo que, até ao momento, apenas foi apontado que a resistência de *Al. butzleri* a macrólidos estará associada a mutações no gene repressor da transcrição *areR*, que afeta a expressão da bomba de efluxo AreABC.

Assim, neste trabalho, foi inicialmente foi determinada a frequência de mutação espontânea de três estirpes, a estirpe nativa (DQ40A1) e dois mutantes (DQ40A1 $\Delta$ *areB* e DQ40A1\_*trunc\_**areR*) e os resultados obtidos sugerem que o aumento de expressão do sistema de efluxo Are ABC pode aumentar a frequência de mutação nesta espécie. Quando se avaliou a taxa de mutação espontânea da estirpe nativa de *Al. butzleri*, através de um ensaio de flutuação, foi possível classificar a estirpe nativa de *Al. butzleri* como fracamente hipermutável para a eritromicina. No caso de se proceder à indução de elevados níveis de resistência à eritromicina *in vitro*, através da exposição a concentrações crescente de antibiótico durante, aproximadamente 25 dias, foi possível obter três evoluções de estirpes altamente resistentes à eritromicina, onde este perfil de elevada resistência se manteve estável em duas das evoluções 8 e 9, que apresentaram CMI de 256 µg/mL e 512 µg/mL, respetivamente.

Com este trabalho foi possível observar que, na ausência de antibiótico, as estirpes resistentes à eritromicina, provenientes do ensaio de flutuação e da evolução de resistência *in vitro* a este agente antimicrobiano, demonstraram que a aquisição de resistência ao mesmo pode ter custos de adaptação para as bactérias que levam a alterações no perfil de crescimento das mesmas, contudo esses custos podem ser diminuídos pelo possível aparecimento de mutações compensatórias. Neste trabalho, foi possível verificar que, quando na presença de eritromicina, todas as estirpes resistentes apresentaram uma maior capacidade de crescimento na presença de antibiótico. Através

da determinação de desenvolvimento de resistências cruzadas foi possível concluir que a aquisição de resistência à eritromicina provocava também alterações na suscetibilidade das estirpes à tetraciclina e à ciprofloxacina sendo essas alterações mais visíveis nas estirpes das evoluções 8 e 9, uma vez que estas passam por um processo de aquisição de resistência mais prolongado. Estes perfis fenotípicos de diminuição de suscetibilidade a antibióticos podem estar correlacionados com um aumento de expressão dos sistemas de efluxo, dado que as estirpes resistentes apresentavam uma diminuição de acumulação de BrEt. De facto, no caso das estirpes da evolução 8, verificou-se que a DQ40P8 apresentava um aumento de cerca de 50 vezes na expressão do gene *areB*, associando a um aumento da expressão dos sistemas de efluxo AreABC. Este resultado pode ser explicado pela mutação no gene repressor da transcrição, *areR*, detetada na análise da sequenciação completa do genoma. Para além desta mutação, a sequenciação completa do genoma da estirpe DQ40P8 também levou à identificação de mutações pontuais nos genes que codificam para as proteínas ribossomais L4 e L22, que podem estar associadas a este elevado nível de resistência à eritromicina.

Quando se avaliou a influência da aquisição de resistência à eritromicina na robustez das estirpes verificou-se que houve custos de adaptação para as estirpes em estudo, o que levou a uma diminuição da motilidade e da capacidade de formação de biofilme, no entanto não foi possível observar uma correlação direta entre o aumento da CMI para a eritromicina e a diminuição de robustez. No que diz respeito à sobrevivência em modelos alimentares, não se verificaram alterações significativas na capacidade de sobrevivência de nenhuma das estirpes em estudo nos modelos alimentares testados.

Em suma, com este trabalho foi possível verificar que os sistemas de efluxo podem ter um papel determinante na aquisição de resistência à eritromicina e que, a diminuição da suscetibilidade a alguns agentes antimicrobianos e a diminuição da robustez apresentada pelas estirpes resistentes poderá estar associada ao facto de não se encontrarem no meio ambiente estirpes com elevados níveis de resistência à eritromicina.

## Capítulo 6: Perspetivas futuras

Tendo em consideração a importância do estudo dos mecanismos de resistência associados a *Al. butzleri* e o papel que os sistemas de efluxo parecem ter na aquisição de resistência à eritromicina nesta espécie, será relevante aprofundar o papel das bombas de efluxo AreABC na aquisição de resistência aos macrólidos através da realização de mais estudos complementares aos efetuados neste trabalho, nomeadamente:

- Avaliar a expressão da bomba de efluxo AreABC em mutantes provenientes dos ensaios de flutuação, de modo a confirmar o papel deste sistema na resistência a macrólidos.
- Avaliar quais os efeitos que a exposição continuada a concentrações crescente de etanol pode ter na expressão dos sistemas de efluxo.
- Efetuar a sequenciação completa do genoma das restantes estirpes usadas neste estudo.

## Capítulo 7: Bibliografia

- Abdelbaqi, K., Menard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P., & Megraud, F. (2007). Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 49(3), 337-345.
- AlMatar, M., Albarri, O., Makky, E. A., & Köksal, F. (2021). Efflux pump inhibitors: new updates. *Pharmacological Reports*, 73(1), 1-16.
- Almofti, Y. A., Dai, M., Sun, Y., Hao, H., Liu, Z., Cheng, G., & Yuan, Z. (2011). The physiologic and phenotypic alterations due to macrolide exposure in *Campylobacter jejuni*. *International Journal of Food Microbiology*, 151(1), 52-61.
- Alonso, R., Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Romalde, J. L., Figueras, M. J., & Fernandez-Astorga, A. (2020). *Aliarcobacter vitoriensis* sp. nov., isolated from carrot and urban wastewater. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(4), 126091.
- Alves, A. R. M. (2018). *Contribuição de mutações genéticas no gene gyrA para a resistência a fluoroquinolonas por Arcobacter butzleri* [Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior]. Repositório da UBI. [https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/9993/1/6580\\_14031.pdf](https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/9993/1/6580_14031.pdf)
- Anderson, K. F., Kiehlbauch, J. A., Anderson, D. C., McClure, H. M., & Wachsmuth, I. K. (1993). *Arcobacter (Campylobacter) butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population. *Infection and Immunity*, 61(5), 2220-2223.
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2014). Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7), 465-478.
- Andersson, D. I., & Levin, B. R. (1999). The biological cost of antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 2(5), 489-493.
- Andersson, D. I., Patin, S. M., Nilsson, A. I., & Kugelberg, E. (2007). The biological cost of antibiotic resistance. Em: R. A. Bonono., & M. Tolmasky (Eds), *Enzyme-Mediated Resistance to Antibiotics: Mechanisms, Dissemination, Prospects for Inhibition*, 339-348. ASM Press, Washinton DC.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5-16.
- Atabay, H. I., Unver, A., Sahin, M., Otlu, S., Elmali, M., & Yaman, H. (2008). Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese (*Anser anser*). *Veterinary Microbiology*, 128(3-4), 400-405.

- Atabay, H. I., Waino, M., & Madsen, M. (2006). Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *International Journal of Food Microbiology*, 109(1-2), 139-145.
- Badilla-Ramirez, Y., Fallas-Padilla, K. L., Fernandez-Jaramillo, H., & Arias-Echandi, M. L. (2016). Survival capacity of *Arcobacter butzleri* inoculated in poultry meat at two different refrigeration temperatures. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 58, 22.
- Baquero, M. R., Nilsson, A. I., Turrientes Mdel, C., Sandvang, D., Galán, J. C., Martínez, J. L., Frimodt-Møller, N., Baquero, F., & Andersson, D. I. (2004). Polymorphic mutation frequencies in *Escherichia coli*: emergence of weak mutators in clinical isolates. *Journal of Bacteriology*, 186(16), 5538-5542.
- Batista, C. C. (2020). *Sobrevivência de Arcobacter butzleri quando sujeito a condições de stress*. [Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior]. Repositório da UBI. [https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/10541/1/7374\\_15769.pdf](https://ubibliorum.ubi.pt/bitstream/10400.6/10541/1/7374_15769.pdf)
- Birk, T., Ingmer, H., Andersen, M. T., Jorgensen, K., & Brondsted, L. (2004). Chicken juice, a food-based model system suitable to study survival of *Campylobacter jejuni*. *Letters in Applied Microbiology*, 38(1), 66-71.
- Björkholm, B., Sjölund, M., Falk, P. G., Berg, O. G., Engstrand, L., & Andersson, D. I. (2001). Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14607-14612.
- Bjorkman, J., Nagaev, I., Berg, O. G., Hughes, D., & Andersson, D. I. (2000). Effects of environment on compensatory mutations to ameliorate costs of antibiotic resistance. *Science*, 287(5457), 1479-1482.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 42-51.
- Blanco, P., Corona, F., & Martinez, J. L. (2019). Mechanisms and phenotypic consequences of acquisition of tigecycline resistance by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(11), 3221-3230.
- Bogomolnaya, L. M., Andrews, K. D., Talamantes, M., Maple, A., Ragoza, Y., Vazquez-Torres, A., & Andrews-Polymenis, H. (2013). The ABC-type efflux pump MacAB protects *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from oxidative stress. *mBio*, 4(6), e00630-00613.
- Bolinger, H., & Kathariou, S. (2017). The current state of macrolide resistance in *Campylobacter* spp.: trends and impacts of resistance mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(12), e00416-17.

- Brückner, V., Fiebiger, U., Ignatius, R., Friesen, J., Eisenblätter, M., Höck, M., Alter, T., Bereswill, S., Gözl, G., & Heimesaat, M. M. (2020). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in human stool samples derived from out- and inpatients: the prospective German *Arcobacter* prevalence study Arcopath. *Gut Pathogens*, *12*, 21.
- Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., & Schulzke, J. D. (2009). *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *The Journal of Infectious Diseases*, *200*(5), 756-764.
- Cagliero, C., Maurel, M. C., Cloeckert, A., & Payot, S. (2007). Regulation of the expression of the CmeABC efflux pump in *Campylobacter jejuni*: identification of a point mutation abolishing the binding of the CmeR repressor in an *in vitro*-selected multidrug-resistant mutant. *FEMS Microbiology Letters*, *267*(1), 89-94.
- Camarena, L., Bruno, V., Euskirchen, G., Poggio, S., & Snyder, M. (2010). Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA-sequencing. *PLoS Pathogens*, *6*(4), e1000834.
- Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *46*, 91-103.
- Chieffi, D., Fanelli, F., & Fusco, V. (2020). *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *19*(4), 2071-2109.
- Collado, L., & Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(1), 174-192.
- Collado, L., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2009). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *Journal of Food Protection*, *72*(5), 1102-1106.
- Collado, L., Gutierrez, M., Gonzalez, M., & Fernandez, 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*(4), 434-436.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., & Figueras, M. J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*, *10*(6), 1635-1640.
- Comtois, S. L., Gidley, M. D., & Kelly, D. J. (2003). Role of the thioredoxin system and the thiol-peroxidases Tpx and Bcp in mediating resistance to oxidative and nitrosative stress in *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, *149*(1), 121-129.

- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L., & Houf, K. (2011). *Arcobacter trophiarum* sp. Nov., isolated from fattening pigs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(2), 356-361.
- Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *British Journal of Pharmacology*, 174(18), 2967-2983.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease*, 8(9), 881-890.
- Doudah, L., de Zutter, L., Baré, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., Van den Abeele, A. M., & Houf, K. (2012). Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* species isolated from humans and animals. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 735-741.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 523-539.
- Dwyer, D. J., Kohanski, M. A., & Collins, J. J. (2009). Role of reactive oxygen species in antibiotic action and resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 482-489.
- El Meouche, I., & Dunlop, M. J. (2018). Heterogeneity in efflux pump expression predisposes antibiotic-resistant cells to mutation. *Science*, 362(6415), 686-690.
- European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. (2022). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. Disponível online: <https://www.eucast.org>
- Fallahchay, S., Bahador, N., & Ghane, M. (2021). Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from environmental samples and determination of their pathogenic gene expression under different physicochemical conditions. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(5), 3963-3974.
- Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D., & Pennisi, M. G. (2009). Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. In Southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, 106(5), 1661-1666.
- Fernández, H., Vera, F., & Villanueva, M. P. (2007). Especies de *Arcobacter* y *Campylobacter* en aves y mamíferos del sur de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 39(2), 163-165.
- Fernandez, H., Villanueva, M. P., Mansilla, I., Gonzalez, M., & Latif, F. (2015). *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 145-147.
- Ferreira, S., Correia, D. R., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2018). *Arcobacter butzleri* Ciprofloxacin Resistance: Point Mutations in DNA Gyrase A and Role on Fitness Cost. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 915-922.

- Ferreira, S., & Domingues, F. C. (2016). The antimicrobial action of resveratrol against *Listeria monocytogenes* in food-based models and its antibiofilm properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(13), 4531-4535.
- Ferreira, S., Julio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2014). Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(3), 220-225.
- Ferreira, S., Luis, A., Oleastro, M., Pereira, L., & Domingues, F. C. (2019b). A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. Antibiotic resistance. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 130-139.
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. (2019a). Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain. *Current Opinion in Food Science*, 26, 9-17.
- Ferreira, S., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2017). Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* sp. In a dairy plant. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1019-1026.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2014). Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*, 76, 19-25.
- Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2016). Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*: A review. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(3), 364-383.
- Ferreira, S., Silva, A. L., Tomas, J., Mateus, C., Domingues, F. C., & Oleastro, M. (2021). Characterization of AreABC, an RND-Type Efflux System Involved in Antimicrobial Resistance of *Aliarcobacter butzleri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(9), e0072921.
- Ferreira, S., Silva, F., Queiroz, J. A., Oleastro, M., & Domingues, F. C. (2014). Resveratrol against *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*: activity and effect on cellular functions. *International Journal of Food Microbiology*, 180, 62-68.
- Flint, A., Butcher, J., & Stintzi, A. (2016). Stress Responses, Adaptation, and Virulence of Bacterial Pathogens During Host Gastrointestinal Colonization. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 4-2.
- Fong, T. T., Mansfield, L. S., Wilson, D. L., Schwab, D. J., Molloy, S. L., & Rose, J. B. (2007). Massive microbiological groundwater contamination associated with a waterborne outbreak in Lake Erie, South Bass Island, Ohio. *Environmental Health Perspectives*, 115(6), 856-864.
- Foster, P. L. (2006). Methods for determining spontaneous mutation rates. *Methods Enzymol*, 409, 195-213. Doi:10.1016/S0076-6879(05)09012-9

- Fyfe, C., Grossman, T. H., Kerstein, K., & Sutcliffe, J. (2016). Resistance to Macrolide Antibiotics in Public Health Pathogens. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(10), a025395.
- Giacometti, F., Lucchi, A., Manfreda, G., Florio, D., Zanoni, R. G., & Serraino, A. (2013). Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* in an artisanal dairy plant in Italy. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), 6665-6669.
- Giacometti, F., Serraino, A., Pasquali, F., De Cesare, A., Bonerba, E., & Rosmini, R. (2014). Behavior of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* in ultrahigh-temperature, pasteurized, and raw cows milk under different temperature conditions. *Foodborne Pathogens and Disease*, 11(1), 15-20.
- Gilbert, M. J., Kik, M., Timmerman, A. J., Severs, T. T., Kusters, J. G., Duim, B., & Wagenaar, J. A. (2014). Occurrence, diversity, and host association of intestinal *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* in reptiles. *PLoS One*, 9(7), e101599.
- Golla, S. C., Murano, E. A., Johnson, L. G., Tipton, N. C., Cureington, E. A., & Savell, J. W. (2002). Determination of the occurrence of *Arcobacter butzleri* in beef and dairy cattle from Texas by various isolation methods. *Journal of Food Protection*, 65(12), 1849-1853.
- Gomes, C., Martinez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldan, L., Pons, M. J., & Ruiz, J. (2017). Macrolide resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*: Focus on azithromycin. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 1-30.
- Gomes, C., Pons, M. J., Magallon-Tejada, A., Durand, D., Lluque, A., Mosquito, S., Riveros, M., Mercado, E., Prada, A., Ochoa, T. J., & Ruiz, J. (2013). *In vitro* development and analysis of *Escherichia coli* and *Shigella boydii* azithromycin-resistant mutants. *Microbial Drug Resistance*, 19(2), 88-93.
- González, A., & Ferrús, M. A. (2011). Study of *Arcobacter* spp. Contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 311-314.
- González, I., García, T., Fernández, S., & Martín, R. (2011). Current status on *Arcobacter* research: an update on DNA-based identification and typing methodologies. *Food Analytical Methods*, 5(5), 956-968.
- Haas, C. E., Nix, D. E., & Schentag, J. J. (1990). *In vitro* selection of resistant *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(9), 1637-1641.
- Hao, H., Yuan, Z., Shen, Z., Han, J., Sahin, O., Liu, P., & Zhang, Q. (2013). Mutational and transcriptomic changes involved in the development of macrolide resistance in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), 1369-1378.

- Heimesaat, M. M., Alter, T., Bereswill, S., & Gözl, G. (2016). Intestinal expression of genes encoding inflammatory mediators and gelatinases during *Arcobacter butzleri* infection of gnotobiotic Il-10 deficient mice. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 6(1), 56-66.
- Heimesaat, M. M., Karadas, G., Alutis, M., Fischer, A., Kühl, A. A., Breithaupt, A., Göbel, U. B., Alter, T., Bereswill, S., & Golz, G. (2015). Survey of small intestinal and systemic immune responses following murine *Arcobacter butzleri* infection. *Gut Pathogens*, 7, 28.
- Higgins, R., Messier, S., Daignault, D., & Lorange, M. (1999). *Arcobacter butzleri* isolated from a diarrhoeic non-human primate. *Laboratory Animals*, 33(1), 87-90.
- Hong, H. J. (2010). Studying gene induction of glycopeptide resistance using gene swapping. Em: S. H. Gillespie., T. D. McHugh (eds.), *Antibiotic Resistance Protocols. Methods in Molecular Biology*. 642, 45-62. Humana Press, Nova York.
- Houf, K., De Smet, S., & Baré, J. D., S. (2008). Dogs as carriers of the emerging pathogen *Arcobacter*. *Veterinary Microbiology*, 130(1-2), 208-213.
- Houf, K., Devriese, L. A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J. P., van Hoof, J., & Vandamme, P. (2004). Antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from humans and broilers. *Microbial Drug Resistance*, 10(3), 243-247.
- Houf, K., On, S. L., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S., & Vandamme, P. (2009). *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2599-2604.
- Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J., & Vandamme, P. (2005). *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(2), 713-717.
- Hsu, T. T., & Lee, J. (2015). Global Distribution and Prevalence of *Arcobacter* in Food and Water. *Zoonoses Public Health*, 62(8), 579-589.
- Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). (2002). *Microorganisms in food 7: microbiological testing in food safety management* (Vol. 7). Springer Science & Business Media
- Iovine, N. M. (2013). Resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni*. *Virulence*, 4(3), 230-240.
- Isidro, J., Ferreira, S., Pinto, M., Domingues, F. C., Oleastro, M., Gomes, J. P., & Borges, V. (2020). Virulence and antibiotic resistance plasticity of *Arcobacter butzleri*: Insights on the genomic diversity of an emerging human pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, 80, 104213.

- Jeon, B., Wang, Y., Hao, H., Barton, Y. W., & Zhang, Q. (2011). Contribution of CmeG to antibiotic and oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 79-85.
- Kanfer, I., Skinner, M. F., & Walker, R. B. (1998). Analysis of macrolide antibiotics. *Journal of Chromatography A*, 812(1-2), 255-286.
- Kannan, K., Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A. S. (2012). Selective protein synthesis by ribosomes with a drug-obstructed exit tunnel. *Cell*, 151(3), 508-520.
- Karadas, G., Bücker, R., Sharbati, S., Schulzke, J. D., Alter, T., & Gözl, G. (2016). *Arcobacter butzleri* isolates exhibit pathogenic potential in intestinal epithelial cell models. *Journal of Applied Microbiology*, 120(1), 218-225.
- Karadas, G., Sharbati, S., Hänel, I., Messelhäusser, U., Glocker, E., Alter, T., & Gözl, G. (2013). Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 583-590.
- Kashef, N., & Hamblin, M. R. (2017). Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resistance Updates*, 31, 31-42.
- Kern, M., Volz, J., & Simon, J. (2011). The oxidative and nitrosative stress defence network of *Wolinella succinogenes*: cytochrome c nitrite reductase mediates the stress response to nitrite, nitric oxide, hydroxylamine and hydrogen peroxide. *Environmental Microbiology*, 13(9), 2478-2494.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., & Wachsmuth, I. K. (1991). *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(2), 376-385.
- Kirst, H. A. (2002). Introduction to the macrolide antibiotics. Em: W. Schönfeld & H. A. Kirst (eds.), *In macrolide antibiotics* (1-13). Birkhäuser Verlag, Basel/Switzerland.
- Kjeldgaard, J., Jørgensen, K., & Ingmer, H. (2009). Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Food Microbiology*, 131(2-3), 256-259.
- Komora, N., Bruschi, C., Magalhães, R., Ferreira, V., & Teixeira, P. (2017). Survival of *Listeria monocytogenes* with different antibiotic resistance patterns to food-associated stresses. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 79-87.
- Kumar, A., & Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1486-1513.
- Lappi, V., Archer, J. R., Cebelinski, E., Leano, F., Besser, J. M., Klos, R. F., Medus, C., Smith, K. E., Fitzgerald, C., & Davis, J. P. (2013). An outbreak of foodborne illness

- among attendees of a wedding reception in Wisconsin likely caused by *Arcobacter butzleri*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(3), 250-255.
- Laurent, F., Lelièvre, H., Cornu, M., Vandenesch, F., Carret, G., Etienne, J., & Flandrois, J. P. (2001). Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(3), 277-283.
- Lea, D. E., & Coulson, C. A. (1949). The distribution of the numbers of mutants in bacterial populations. *Journal of Genetics*, 49(3), 264-285.
- Lee, C., Agidi, S., Marion, J. W., & Lee, J. (2012). *Arcobacter* in Lake Erie beach waters: an emerging gastrointestinal pathogen linked with human-associated fecal contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), 5511-5519.
- Lee, M. H., & Choi, C. (2013). Survival of *Arcobacter butzleri* in apple and pear purees. *Journal of Food Safety*, 33(3), 333-339.
- LeFrock, J. L., Prince, R. A., & Leff, R. D. (1982). Mechanism of action, antimicrobial activity, pharmacology, adverse effects, and clinical efficacy of cefotaxime. *Pharmacotherapy*, 2(4), 174-184.
- Levican, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, S. J., & 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), 4951-4957.
- Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337-418.
- Lin, J., Michel, L. O., & Zhang, Q. (2002). CmeABC functions as a multidrug efflux system in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(7), 2124-2131.
- Lin, J., Sahin, O., Michel, L. O., & 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), 4250-4259.
- Lin, J., Yan, M., Sahin, O., Pereira, S., Chang, Y. J., & Zhang, Q. (2007). Effect of macrolide usage on emergence of erythromycin-resistant *Campylobacter* isolates in chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(5), 1678-1686.
- Lovmar, M., Nilsson, K., Lukk, E., Vimberg, V., Tenson, T., & Ehrenberg, M. (2009). Erythromycin resistance by L4/L22 mutations and resistance masking by drug efflux pump deficiency. *The EMBO Journal*, 28(6), 736-744.
- Luangtongkum, T., Jeon, B., Han, J., Plummer, P., Logue, C. M., & Zhang, Q. (2009). Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiology*, 4(2), 189-200.

- Luria, S. E., & Delbruck, M. (1943). Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28(6), 491-511.
- Mandisodza, O., Burrows, E., & Nulsen, M. (2012). *Arcobacter* species in diarrhoeal faeces from humans in New Zealand. *The New Zealand Medical Journal*, 125(1353), 40-46.
- Martinez, J. L., & Baquero, F. (2000). Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1771-1777.
- Martins, M., Couto, I., Viveiros, M., & Amaral, L. (2010). Identification of efflux-mediated multi-drug resistance in bacterial clinical isolates by two simple methods. In: S. H. Gillespie, T. D. McHugh (eds.), *Antibiotic Resistance Protocols. Methods in Molecular Biology*, 642, 143-157. Humana Press, Nova York.
- Mateus, C., Martins, R., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F. C., Pereira, L., & Ferreira, S. (2021a). Prevalence of *Arcobacter*: From farm to retail – A systematic review and meta-analysis. *Food Control*, 128, 108177.
- Mateus, C., Nunes, A. R., Oleastro, M., Domingues, F. C., & Ferreira, S. (2021b). RND Efflux Systems Contribute to Resistance and Virulence of *Aliarcobacter butzleri*. *Antibiotics*, 10(7).
- Melnyk, A. H., Wong, A., & Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, 8(3), 273-283.
- Merga, J. Y., Royden, A., Pandey, A. K., & Williams, N. J. (2014). *Arcobacter* spp. isolated from untreated domestic effluent. *Letters in Applied Microbiology*, 59(1), 122-126.
- Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M., Ussery, D. W., Stolz, J. F., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Wang, G., Malek, J. A., Rogosin, A., Stanker, L. H., & Mandrell, R. E. (2007). The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *Plos One*, 2(12), e1358.
- Moreno, Y., Botella, S., Alonso, J. L., Ferrus, M. A., Hernández, M., & Hernández, J. (2003). Specific detection of *Arcobacter* and *Campylobacter* strains in water and sewage by PCR and fluorescent in situ hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1181-1186.
- Mottola, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Marchetti, P., Celano, G. V., Colao, V., Terio, V., Tantillo, G., Figueras, M. J., & 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, 33-37.
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiolical Spectrum*, 4(2), 4-2.

- Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C., & Ellis, W. A. (1985). Taxonomic position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(3), 342-356.
- Neu, H. C. (1992). The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257(5073), 1064-1073.
- On, S. L. W., Miller, W. G., Biggs, P. J., Cornelius, A. J., & Vandamme, P. (2020). A critical rebuttal of the proposed division of the genus *Arcobacter* into six genera using comparative genomic, phylogenetic, and phenotypic criteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(5), 126108.
- On, S. L. W., Stacey, A., & Smyth, J. (1995). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *Journal of Infection*, 31(3), 225-227.
- Oren, A., & Garrity, G. M. (2019). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(1), 5-9.
- Oren, A., & Garrity, G. M. (2020a). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), 1-5.
- Oren, A., & Garrity, G. M. (2020b). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), 2960-2966.
- Oth, L., Wilson, M., Cancino, R., & Fernández, H. (2004). *In vitro* susceptibility of *Arcobacter butzleri* to six antimicrobial drugs. *Archivos de medicina veterinaria*, 36(2), 207-210.
- Pejchalová, M., Žabčíková, S., Šilhová, L., Šilha, D., Brožková, I., & Haslova, M. (2016). Presence of *Arcobacter* species in pet cats and dogs in the Czech Republic. *Veterinárni medicína*, 61(8), 449-455.
- Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., & Figueras, M. J. (2018). Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: getting order from the chaos. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2077.
- Petchiappan, A., & Chatterji, D. (2017). Antibiotic Resistance: current perspectives. *Acs Omega*, 2(10), 7400-7409.
- Petersen, R. F., Harrington, C. S., Kortegaard, H. E., & On, S. L. (2007). A PCR-DGGE method for detection and identification of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* and related *Epsilobacteria* and its application to saliva samples from humans and domestic pets. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2601-2615.
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers,

- environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2928.
- Poole, K. (2012). Bacterial stress responses as determinants of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(9), 2069-2089.
- Pope, C. F., O'Sullivan, D. M., McHugh, T. D., & Gillespie, S. H. (2008). A practical guide to measuring mutation rates in antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(4), 1209-1214.
- Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A., & Mégraud, F. (2006). *Arcobacter butzleri*: underestimated enteropathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 307-309.
- Qi, L., Li, H., Zhang, C., Liang, B., Li, J., Wang, L., Du, X., Liu, X., Qiu, S., & Song, H. (2016). Relationship between antibiotic resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 483.
- Reeser, R. J., Medler, R. T., Billington, S. J., Jost, B. H., & Joens, L. A. (2007). Characterization of *Campylobacter jejuni* biofilms under defined growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1908-1913.
- Reis, S. F., Gullón, B., Gullón, P., Ferreira, S., Maia, C. J., Alonso, J. L., Domingues, F. C., & Abu-Ghannam, N. (2014). Evaluation of the prebiotic potential of arabinoxylans from brewer's spent grain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22), 9365-9373.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H., & Tanner, S. A. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in Applied Microbiology*, 28(1), 31-35.
- Rosche, W. A., & Foster, P. L. (2000). Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods*, 20(1), 4-17.
- Samie, A., Obi, C. L., Barrett, L. J., Powell, S. M., & 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(6), 558-566.
- Shuster, Y., Steiner-Mordoch, S., Alon Cudkowicz, N., & Schuldiner, S. (2016). A transporter interactome is essential for the acquisition of antimicrobial resistance to antibiotics. *PLoS One*, 11(4), e0152917.
- Šilha, D., Vacková, B., & Šilhová, L. (2019). Occurrence of virulence-associated genes in *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from foodstuff, water, and clinical samples within the Czech Republic. *Folia Microbiologica*, 64(1), 25-31.

- Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., & Harrison, M. A. (2007). Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29(4), 451-455.
- Song, S., Lee, B., Yeom, J. H., Hwang, S., Kang, I., Cho, J. C., Ha, N.C., Bae, J., Lee, K., & Kim, Y. H. (2015). MdsABC-mediated pathway for pathogenicity in *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Infection and Immunity*, 83(11), 4266-4276.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891-899.
- Teague, N. S., Srijan, A., Wongstitwilairoong, B., Poramathikul, K., Champathai, T., Ruksasiri, S., Pavlin, J., & Mason, C. J. (2010). Enteric pathogen sampling of tourist restaurants in Bangkok, Thailand. *Journal of Travel Medicine*, 17(2), 118-123.
- Tee, W., Baird, R., Dyall-Smith, M., & Dwyer, B. (1988). *Campylobacter cryaerophila* isolated from a human. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(12), 2469-2473.
- Tenson, T., Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 330(5), 1005-1014.
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Van Hende, J., & Houf, K. (2014). Prevalence of *Arcobacter* species among humans, Belgium, 2008-2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(10), 1731-1734.
- Van Driessche, E., & Houf, K. (2008). Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 443-451.
- Vandamme, P., & De Ley, J. (1991). Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 451-455.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H., & Lauwers, S. (1992b). Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(9), 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., & Goossens, H. (1992a). 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), 344-356.

- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranet, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J. P., & Vandamme, P. (2004). *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(10), 1863-1867.
- Vandenberg, O., Houf, K., Douat, N., Vlaes, L., Retore, P., Butzler, J. P., & Dediste, A. (2006). Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of non-*jejuni/coli* campylobacters and arcobacters from Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *57*(5), 908-913.
- Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A. S. (2018). How macrolide antibiotics work. *Trends in Biochemical Sciences*, *43*(9), 668-684.
- Venâncio, I., Luís, A., Domingues, F. C., Oleastro, M., Pereira, L., & Ferreira, S. (2022). The prevalence of *Arcobacteraceae* in aquatic environments: a systematic review and meta-analysis. *Pathogens*, *11*(2), 244.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, *40*(4), 277-283.
- Vicente-Martins, S., Oleastro, M., Domingues, F. C., & Ferreira, S. (2018). *Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: prevalence, genotyping and antibiotics resistance. *Food Control*, *85*, 107-112.
- Waite, D. W., Chuvochina, M. S., & Hugenholtz, P. (2019). Road Map of the Phylum *Campylobacterota*. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (1-11).
- Waite, D. W., Vanwonterghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, S. M., Simon, J., Campbell, B. J., Hanson, T. E., Woyke, T., Klotz, M. G., & Hugenholtz, P. (2017). Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.). *Frontiers in Microbiology*, *8*, 682.
- Wesley, I. V., & Schroeder-Tucker, L. (2011). Recovery of *Arcobacter* spp. from nonlivestock species. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, *42*(3), 508-512.
- Whelan, M. V. X., Ardill, L., Koide, K., Nakajima, C., Suzuki, Y., Simpson, J. C., & T, O. C. (2019). Acquisition of fluoroquinolone resistance leads to increased biofilm formation and pathogenicity in *Campylobacter jejuni*. *Scientific Reports*, *9*(1), 18216.
- Whiteduck-Leveillee, K., Whiteduck-Leveillee, 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., & Khan, I. U. H. (2015). *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*(8), 2709-2716.

- Whiteduck-Leveillee, K., Whiteduck-Leveillee, 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., & Khan, I. U. (2016). Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. *Systematic and Applied Microbiology*, *39*(2), 93-99.
- Willey, J. M., Sherwood, L. M., & Woolverton, C. J. (2007). *Prescott, Harley, and Klein`s Microbiology* (seventh ed.): Colin Wheatley/Janice Roerig-Blong.
- Woo, A. C., Faure, L., Dapa, T., & Matic, I. (2018). Heterogeneity of spontaneous DNA replication errors in single isogenic *Escherichia coli* cells. *Science Advances*, *4*(6), eaat1608.
- Wright, G. D. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *57*(10), 1451-1470.
- Yan, M., Sahin, O., Lin, J., & Zhang, Q. (2006). Role of the CmeABC efflux pump in the emergence of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* under selection pressure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *58*(6), 1154-1159.
- Yesilmen, S., Vural, A., Erkan, M. E., & Yildirim, I. H. (2014). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *188*, 11-14.
- Zeitouni, S., Guyard-Nicodeme, M., & Kempf, I. (2013). Comparison of adhesion, invasion, motility, and toxin production of *Campylobacter* strains and their resistant mutants. *Microbial Drug Resistance*, *19*(2), 130-137.
- Zhanel, G. G., Dueck, M., Hoban, D. J., Vercaigne, L. M., Embil, J. M., Gin, A. S., & Karlowsky, J. A. (2001). Review of macrolides and ketolides: focus on respiratory tract infections. *Drugs*, *61*(4), 443-498.
- Zheng, Q. (2018). A cautionary note on the mutation frequency in microbial research. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *809*, 51-55.

## Anexo I

Análise de *snippy* da sequenciação completa do genoma da estirpe nativa, DQ40A1 e de uma estirpe com elevada resistente à eritromicina, DQ40P8.

CHROM	POS	TYPE	REF	ALT	EVIDENCE	FTYPE	STRAND	NT_POS	AA_POS	EFFECT	PRODUCT
28197.58	44944	snp	A	G	G:109 A:0	CDS	-	726/990	242/329	synonymous_variant c.726T>C p.Asp242Asp	Methyltransferase type 12
28197.58	357337	snp	T	G	G:153 T:2	CDS	+	862/1551	288/516	missense_variant c.862T>G p.Tyr288Asp	Oligopeptide ABC transporter, periplasmic oligopeptide-binding protein OppA (TC 3.A.1.5.1)
28197.58	623538	snp	A	G	G:104 A:2	CDS	+	84/933	28/310	synonymous_variant c.84A>G p.Ala28Ala	Cysteine synthase (EC 2.5.1.47)
28197.58	660590	snp	A	T	T:171 A:1	CDS	-	1045/1938	349/645	missense_variant c.1045T>A p.Leu349Met	FIG00388051: hypothetical protein
<b>28197.58</b>	<b>683144</b>	<b>del</b>	<b>TCAATAGGTGGA</b>	<b>T</b>	<b>T:155 TCAATAGG TGG A:0</b>	<b>CDS</b>	<b>+</b>	<b>119/540</b>	<b>40/179</b>	<b>frameshift_variant c.119_129delCAATAGGTG GA p.Ser40fs</b>	<b>Transcriptional regulator, TetR family</b>
28197.58	1021197	snp	C	A	A:156 C:0	CDS	+	347/690	116/229	missense_variant c.347C>A p.Ala116Glu	Chemotaxis protein CheD
28197.58	1116091	ins	A	AATC	AATC:141 A:0	CDS	-	177/594	59/197	conservative_inframe_inserti on c.175_177dupGAT p.Asp59dup	hypothetical protein
28197.58	1141419	snp	A	C	C:98 A:1	CDS	-	1579/1581	527/526	stop_lost&splice_region_vari ant c.1579T>G p.Ter527Glyext*?	Methyl-accepting chemotaxis protein I (serine chemoreceptor protein)
<b>28197.58</b>	<b>1708810</b>	<b>del</b>	<b>CGGTGGTGGT</b>	<b>C</b>	<b>C:82 CGGTGGTG GT:0</b>	<b>CDS</b>	<b>+</b>	<b>169/612</b>	<b>57/203</b>	<b>conservative_inframe_de letion c.169_177delGGTGGTGG T p.Gly57_Gly59del</b>	<b>LSU ribosomal protein L4p (L1e)</b>
<b>28197.58</b>	<b>1710913</b>	<b>snp</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>T:133 C:0</b>	<b>CDS</b>	<b>+</b>	<b>251/333</b>	<b>84/110</b>	<b>missense_variant c.251C&gt;T p.Ala84Val</b>	<b>LSU ribosomal protein L22p (L17e)</b>

28197.58	1753503	snp	T	C	C:168 T:6	fasta_re cord	+			intragenic_variant n.1753503T>C	
28197.58	1753520	snp	A	C	C:169 A:13	fasta_re cord	+			intragenic_variant n.1753520A>C	
28197.58	1829442	snp	A	T	T:34 A:0	fasta_re cord	+			intragenic_variant n.1829442A>T	
28197.58	1842723	snp	G	C	C:127 G:0	fasta_re cord	+			intragenic_variant n.1842723G>C	
28197.58	1915622	ins	G	GAAT	GAAT:91 G:0	CDS	-	661/999	221/332	conservative_inframe_inserti on c.659_661dupATT p.Tyr220dup	DNA-directed RNA polymerase alpha subunit (EC 2.7.7.6)
28197.58	2042849	snp	T	A	A:15 T:0	fasta_re cord	+			intragenic_variant n.2042849T>A	
28197.58	2042856	snp	A	C	C:24 A:0	fasta_re cord	+			intragenic_variant n.2042856A>C	
28197.58	2042885	snp	G	T	T:40 G:0	CDS	+	13/300	mai/99	missense_variant c.13G>T p.Asp5Tyr	putative DNA- binding protein
28197.58	2080409	snp	G	A	A:19 G:0	fasta_re cord	+			intragenic_variant n.2080409G>A	
28197.58	2127484	snp	T	A	A:13 T:0	fasta_re cord	+			intragenic_variant n.2127484T>A	
28197.58	2234289	snp	C	T	T:48 C:0	fasta_re cord	+			intergenic_region n.2234289C>T	
28197.58	2286559	snp	T	G	G:125 T:0	CDS	+	586/1131	196/376	missense_variant c.586T>G p.Phe196Val	Methyl-accepting chemotaxis protein I (serine chemoreceptor protein)
28197.58	2298417	snp	A	G	G:43 A:0	fasta_re cord	+			intergenic_region n.2298417A>G	

**Análise específica do 23S rRNA:** Na zona das mutações típicas do domínio V do 23S, juntos aos 2 A existem 406 reads que alinham nesta zona. Então, no primeiro A que aparece a bold, há 4 reads que têm a letra C, o que é menos de 1% (4/406); No segundo A que aparece a bold, há 4 reads que têm a letra T (4/406) e 1 read que tem a letra C (1/406). Como está abaixo de 1% não me parece que tenha significado.

## Anexo II

Apresentação de parte do presente trabalho no XVI Annual CICS-UBI Symposium realizado na Covilhã, sob a forma de apresentação de poster.

