

Caraterização funcional de um sistema de bombas de efluxo na resistência e virulência de *Aliarcobacter butzleri*

Inês Margarida Cardoso Martins

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

Orientadora: Doutora Susana Margarida Paraíso Ferreira
Co-orientadoras: Prof. Doutora Fernanda da Conceição Domingues
Doutora Mónica Alexandra de Sousa Oleastro

junho de 2022

Declaração de Integridade

Eu, Inês Margarida Cardoso Martins, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M11039 de Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades 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 29 /06 /2022

(assinatura conforme Cartão de Cidadão ou preferencialmente
assinatura digital no documento original se naquele mesmo formato)

Dedicatória

À minha irmã e aos meus pais

Vocês são o melhor de mim.

Agradecimentos

A terminar esta etapa, não poderia deixar de agradecer a quem me acompanhou, apoiou e incentivou para que todos os dias me superasse. Reconheço a sorte de ter as pessoas certas ao meu lado.

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha orientadora, Doutora Susana Ferreira, não só por me ter aceite no seu grupo de trabalho, como também pelo acompanhamento permanente, a constante disponibilidade, apoio, preocupação e transmissão de conhecimentos ao longo deste ano. Obrigada por ter acreditado sempre em mim, foi um privilégio poder aprender consigo.

Agradeço às minhas co-orientadoras, Professora Doutora Fernanda Domingues e Doutora Mónica Oleastro, por toda a disponibilidade demonstrada, toda a atenção e todos os conselhos e ajuda para que melhorasse sempre o meu trabalho.

Agradeço ainda a oportunidade de poder ter desenvolvido este trabalho no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior e a colaboração com o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Gostaria também de agradecer aos meus colegas de laboratório, em especial à Cristiana, por partilharem comigo os momentos bons, pelo apoio nos dias mais desafiantes e por toda a amizade e ajuda ao longo dos últimos meses.

Por último, mas não menos importante, gostaria de agradecer à minha família por estarem sempre presentes e serem o meu porto seguro e o meu maior apoio. Agradeço toda a paciência, a compreensão, o amor e a coragem que me transmitem todos os dias. Nunca conseguirei colocar em palavras o quão agradecida sou por vos ter.

Resumo

O género *Aliarcobacter* pertence à família *Arcobacteraceae*, com nove espécies validamente publicadas. Entre elas, a espécie *Aliarcobacter butzleri* é considerada o quarto microrganismo *Campylobacter-like* mais frequentemente encontrado em amostras de fezes diarreicas humanas, e foi ainda incluída na lista de microrganismos considerados um risco moderado para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas de Alimentos. Nos últimos anos, têm sido descritas taxas cada vez mais elevadas de multirresistência a diferentes antimicrobianos em isolados desta bactéria, sendo o efluxo de compostos através de bombas de efluxo um dos mecanismos de resistência considerado como relevante. De facto, informação prévia sugere a presença de diversos sistemas putativos de efluxo no genoma deste enteropatógeno emergente, cuja caracterização aponta para um potencial papel nos seus mecanismos de resistência e virulência. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de bombas de efluxo na resistência e virulência de *A. butzleri*, com foco no potencial papel de uma bomba de efluxo do tipo ABC. Para tal, neste trabalho começou-se por estudar o papel de bombas de efluxo em 24 estirpes de *A. butzleri* de diferentes origens através da avaliação do seu perfil de resistência a antibióticos, desinfetantes, metais e outros antimicrobianos, e da determinação do seu perfil de acumulação de brometo de etídio. Os resultados foram correlacionados, tendo sido demonstrado o papel que as bombas de efluxo têm na resistência de *A. butzleri*, com foco na resistência a ciprofloxacina e eritromicina. Seguidamente, e após caracterização *in silico* do transportador YbhFSR, foi construído um mutante, utilizando uma estirpe naturalmente transformável e com perfil de multirresistência reconhecido (*A. butzleri* AB 28/11), através da inativação do gene responsável pela ligação de ATP, *ybhF*, por mutagénese insercional e transformação natural. Após confirmada a construção da estirpe mutante e assegurado que a mutação não modificou o crescimento bacteriano, foi avaliado o perfil de resistência da estirpe nativa e mutante a diferentes agentes antimicrobianos, o que demonstrou que a bomba de efluxo YbhFSR pode ter influência na resistência ao cloreto de benzalcónio, brometo de etídio e cádmio, tendo ainda como potenciais substratos desta bomba de efluxo a ampicilina, eritromicina, cloranfenicol, acriflavina, cobre, manganês, zinco e sódio. Para além disso, foi ainda avaliada a influência da bomba de efluxo YbhFSR na acumulação intracelular de compostos, nomeadamente de brometo de etídio, através de um método de fluorescência, cujos resultados obtidos indicaram um aumento da acumulação de brometo de etídio ligeiro por parte da estirpe mutante em comparação à estirpe parental, demonstrando um potencial papel da bomba de efluxo

YbhFSR na extrusão de compostos tóxicos de *A. butzleri*. Por último, avaliou-se o efeito da interrupção do gene *ybhF* no perfil de virulência de *A. butzleri*, verificando-se que o sistema de efluxo em estudo não tem um papel na motilidade, capacidade de formação de biofilme, suscetibilidade ao stress oxidativo ou capacidade da adesão e invasão em células Caco-2, mas a estirpe mutante apresenta resistência ao soro humano contrariamente à estirpe parental. Em suma, neste trabalho foi demonstrada a relevância das bombas de efluxo na resistência de *A. butzleri*, tendo sido evidenciado o papel da bomba de efluxo YbhFSR na multirresistência desta espécie, pelo que, ainda que careça de estudos complementares, o presente estudo contribuiu para a compreensão dos mecanismos de resistência e virulência de *A. butzleri*.

Palavras-chave

Aliarcobacter butzleri; Bombas de efluxo ABC; Resistência; Virulência.

Abstract

The genus *Aliarcobacter* belongs to the *Arcobacteraceae* family, comprising nine validly published species. Among them, the species *Aliarcobacter butzleri* is considered the fourth most frequently found *Campylobacter-like* microorganism in human diarrheal stool samples and has also been included in the list of microorganisms considered a moderate risk to human health by the International Commission on Microbiological Specifications for Food. Increasing rates of multidrug resistance to different antimicrobials have been described in *A. butzleri* isolates, with efflux pumps being one of the described resistance mechanisms. In fact, previous information suggests the presence of several putative efflux systems in the genome of this emerging enteropathogen, whose characterization points to a potential role in its resistance and virulence mechanisms. Therefore, the objective of this work was to evaluate the role of the efflux pumps in the resistance and virulence of *A. butzleri*, focusing on the potential role of an ABC type efflux pump. To this end, it was first assessed the role of efflux pumps in 24 strains of *A. butzleri* from different origins through the evaluation of their resistance profile to antibiotics, disinfectants, metals and other antimicrobials, and the determination of their ethidium bromide accumulation profile. The results were correlated and the role that efflux pumps play in *A. butzleri* resistance was demonstrated, with a focus on ciprofloxacin and erythromycin resistance. Subsequently, after *in silico* characterization of the YbhFSR transporter, a mutant was constructed, using a naturally transformable strain with a recognized multiresistance profile (*A. butzleri* AB 28/11), by inactivating the gene responsible for ATP-binding, *ybhF*, by insertional mutagenesis and natural transformation. After confirming the construction of the mutant strain and ensuring that the mutation did not modify bacterial growth, the resistance profile of the native and mutant strains to different antimicrobial agents was evaluated, which demonstrated that the YbhFSR efflux pump may influence the resistance to benzalkonium chloride, ethidium bromide and cadmium, with ampicillin, erythromycin, chloramphenicol, acriflavine, copper, manganese, zinc and sodium being potential substrates for this efflux pump. In addition, the role of the efflux system in the intracellular accumulation of compounds, namely ethidium bromide, was evaluated using a fluorescence method. The results showed a slight increase in the accumulation of ethidium bromide by the mutant strain compared to the parental strain, demonstrating a potential role of the YbhFSR efflux pump in the extrusion of toxic compounds from *A. butzleri*. Finally, the effect of the *ybhF* gene interruption on the virulence profile of *A. butzleri* was evaluated, verifying that the efflux system under study

does not have a role in motility, biofilm formation capacity, susceptibility to oxidative stress or ability to adhere and invade Caco-2 cells, but the mutant strain shows resistance to human serum in contrast to the parental strain. In sum, this work demonstrated the relevance of efflux pumps in the resistance of *A. butzleri*, highlighting the role of the efflux pump YbhFSR in the multidrug resistance of this species. Although it lacks complementary studies, the present study contributed to understanding the mechanisms of resistance and virulence of *A. butzleri*.

Keywords

Aliarcobacter butzleri; ABC efflux pumps; Resistance; Virulence.

Índice

| | |
|---|----|
| Capítulo 1 - Introdução | 1 |
| 1.1. Gênero <i>Aliarcobacter</i> | 1 |
| 1.1.1. Evolução e Classificação taxonômica do gênero <i>Aliarcobacter</i> | 1 |
| 1.1.2. Características gerais de <i>Aliarcobacter</i> | 2 |
| 1.1.2.1. Características gerais de <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 3 |
| 1.2. Distribuição e vias de transmissão de <i>Aliarcobacter</i> | 5 |
| 1.2.1. Transmissão de <i>Aliarcobacter</i> através de alimentos | 6 |
| 1.2.2. Transmissão de <i>Aliarcobacter</i> através da água | 8 |
| 1.2.3. Transmissão de <i>Aliarcobacter</i> através de contacto com animais | 9 |
| 1.2.4. Presença de <i>Aliarcobacter</i> em humanos e transmissão pessoa-a-pessoa | 10 |
| 1.3. Patogenicidade e fatores de virulência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 12 |
| 1.3.1. Presença de genes putativos de virulência | 14 |
| 1.3.2. Capacidade de adesão e invasão | 14 |
| 1.3.3. Produção de toxinas | 16 |
| 1.3.4. Motilidade | 17 |
| 1.3.5. Produção de biofilmes | 18 |
| 1.3.6. Resposta imune do hospedeiro | 18 |
| 1.4. Resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 20 |
| 1.4.1. Resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> a antibióticos | 20 |
| 1.4.1.1. Mecanismos de resistência | 22 |
| 1.4.2. Resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> a metais pesados | 26 |
| 1.4.3. Bombas de efluxo | 29 |
| Capítulo 2 - Objetivos | 39 |
| Capítulo 3 – Materiais e Métodos | 41 |
| 3.1. Estirpes bacterianas incluídas no estudo | 41 |

| | | |
|---|--|----|
| 3.1.1. | Condições de armazenamento e crescimento das estirpes | 43 |
| 3.1.2. | Construção da estirpe mutante de efluxo de <i>Aliarcobacter butzleri</i> AB 28/11..... | 43 |
| 3.1.2.1. | Extração de DNA genômico..... | 44 |
| 3.1.2.2. | Obtenção do fragmento de DNA transformante | 44 |
| 3.1.2.3. | Transformação Natural | 49 |
| 3.1.2.4. | Confirmação da mutagênese | 50 |
| 3.2. | Análise Bioinformática da bomba de efluxo YbhFSR | 51 |
| 3.3. | Avaliação do perfil de resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> e da influência da bomba de efluxo YbhFSR na sua resistência..... | 52 |
| 3.3.1. | Perfil de suscetibilidade antimicrobiana | 52 |
| 3.3.2. | Ensaio de acumulação de brometo de etídio..... | 56 |
| 3.4. | Determinação das curvas de crescimento das estirpes parental e mutante. | 57 |
| 3.5. | Avaliação da influência da bomba de efluxo YbhFSR na virulência de <i>Aliarcobacter buzleri</i> | 57 |
| 3.5.1. | Condições de crescimento e preparação das suspensões bacterianas..... | 57 |
| 3.5.2. | Motilidade | 57 |
| 3.5.3. | Capacidade de formação de biofilmes | 58 |
| 3.5.4. | Suscetibilidade ao stress oxidativo | 58 |
| 3.5.5. | Suscetibilidade ao soro humano | 59 |
| 3.5.6. | Adesão e Invasão em células Caco-2..... | 60 |
| Capítulo 4 – Resultados e Discussão | | 63 |
| 4.1. | Avaliação do perfil de resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 63 |
| 4.1.1. | Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana..... | 63 |
| 4.1.1.1. | Determinação do perfil de suscetibilidade a antibióticos, desinfetantes, acriflavina e brometo de etídio | 64 |
| 4.1.1.2. | Determinação do perfil de suscetibilidade a metais..... | 69 |
| 4.1.2. | Ensaio de acumulação de brometo de etídio..... | 73 |

| | | |
|--|--|-----|
| 4.1.3. | Correlação entre os resultados de acumulação de brometo de etídio e perfis fenotípicos de resistência | 75 |
| 4.2. | Análise bioinformática da bomba de efluxo YbhFSR | 77 |
| 4.3. | Construção da estirpe mutante | 82 |
| 4.3.1. | Confirmação da mutagênese | 85 |
| 4.4. | Efeito da interrupção do gene <i>ybhF</i> no crescimento bacteriano | 86 |
| 4.5. | Impacto da inativação da bomba de efluxo YbhFSR na resistência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 88 |
| 4.5.1. | Determinação da concentração mínima inibitória de agentes antimicrobianos para as estirpes parental e mutante | 89 |
| 4.5.2. | Ensaio de acumulação de brometo de etídio para as estirpes parental e mutante | 92 |
| 4.6. | Influência da inativação da bomba de efluxo YbhFSR na virulência de <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 94 |
| 4.6.1. | Efeito da deleção do gene <i>ybhF</i> na motilidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 94 |
| 4.6.2. | Impacto da inativação do gene <i>ybhF</i> na capacidade de formação de biofilmes de <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 96 |
| 4.6.3. | Impacto da interrupção do gene <i>ybhF</i> na suscetibilidade ao stress oxidativo em <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 98 |
| 4.6.4. | Repercussão da inativação do gene <i>ybhF</i> na suscetibilidade ao soro humano em <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 99 |
| 4.6.5. | Efeito da interrupção do gene <i>ybhF</i> na capacidade de <i>Aliarcobacter butzleri</i> aderir e invadir células Caco-2 | 101 |
| Capítulo 5 - Conclusões | | 103 |
| Capítulo 6 – Perspetivas futuras | | 105 |
| Bibliografia | | 107 |
| Apêndice I..... | | 131 |
| Apêndice II | | 135 |
| Apêndice III..... | | 139 |

Lista de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática de alguns dos mecanismos de virulência de *Aliarcobacter* em células epiteliais intestinais, nomeadamente a capacidade de citotoxicidade, adesão, invasão, inflamação mediada pela secreção de interleucina 8 (IL-8), diminuição da expressão de claudinas nas junções apertadas com disfunção da barreira epitelial e aumento do transporte paracelular. Adaptado de (Collado and Figueras, 2011).

Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de resistência a antibióticos numa bactéria de Gram-negativo. Adaptado de (Allen et al., 2010).

Figura 3 – Ilustração esquemática das seis superfamílias de bombas de efluxo distintas e a sua localização na membrana celular de bactérias de Gram-negativo, com exemplos de sistemas de efluxo identificados na bactéria *Acinetobacter baumannii*. Adaptado de (Kornelsen and Kumar, 2021).

Figura 4 – Ilustração esquemática da troca entre as duas conformações de um transportador do tipo ABC, MalK em *Escherichia coli*, aquando da ligação de ATP. Adaptado de (Moussatova et al., 2008).

Figura 5 – Organização genómica da bomba de efluxo YbhFSR. Estão apresentadas *open reading frames* com a sua direção de transcrição indicada pelas setas, estando abaixo das setas indicado o locus de *Aliarcobacter butzleri* RM 4018. A amarelo está marcado o gene responsável pelo processo energético da bomba de efluxo em estudo.

Figura 6 – Representação esquemática da digestão do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli* pelas enzimas de restrição BamHI e KpnI para obtenção da cassette *aphA-3*.

Figura 7 – Representação esquemática da construção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*, Fragmentos A e B. A amarelo encontram-se representados os adaptadores adicionados aos oligonucleótidos iniciadores de forma a permitir a hibridização nas regiões que flanqueiam a cassette *aphA-3*.

Figura 8 – Representação esquemática da construção do fragmento de DNA transformante, Fragmento C.

Figura 9 – Representação esquemática da interrupção do gene *ybhF* pelo fragmento de DNA transformante.

Figura 10 – Acumulação de brometo de etídio após 60 minutos de incubação para as 24 estirpes *Aliarcobacter butzleri* em estudo. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão das médias de três replicados, em pelo menos três dias independentes.

Figura 11 – Árvore filogenética de YbhF usando o método *neighbor-joining* (NJ). Foram incluídas proteínas representativas de transportadores ABC contendo domínios de ligação ao nucleótido e respetivos componentes membranares de *Aliarcobacter butzleri*, *Streptomyces rimosus* e *Strptomyces peucetius*, bem como componentes de membrana interna de bombas de efluxo pertencentes à superfamília RND de *Aliarcobacter butzleri* e *Escherichia coli*.

Figura 12 – Representação da análise de domínios conservados de YbhF, através do software Conserved Domains, NCBI.

Figura 13 – Previsão dos domínios transmembranares de YbhF (A), YbhS (B) e YbhR (C), usando o software DeepTMHMM.

Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose representativa do resultado da extração do plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*. M: marcador de peso molecular Bioron 1Kb DNA Ladder; A: plasmídeo pUC18-K2, contendo a cassette *aphA-3*.

Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos da digestão do plasmídeo pUC18-K2 com as enzimas BamHI e KpnI. M: marcador de peso molecular Bioron 1Kb DNA Ladder; A: produtos da digestão enzimática do plasmídeo pUC18-K2, apontando a seta para a banda correspondente ao produto de interesse, a cassette *aphA-3*.

Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos de PCR correspondentes à amplificação dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*. M: marcador de peso molecular Bioron 100 pb Plus DNA Ladder A: Fragmento A; B: Fragmento B.

Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose representativa do produto de PCR correspondente à junção dos fragmentos hibridizantes A e B com a cassette *aphA-3*. M: marcador de peso molecular Bioron 1Kb DNA Ladder; A: Fragmento C.

Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos de PCR correspondentes à amplificação do gene *ybhF* na estirpe parental e do fragmento de DNA transformante na estirpe mutante.

Figura 19 – Curvas de crescimento da estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutada AB 28/11 Δ *ybhF*. Resultados apresentados como média \pm desvio padrão de dois ensaios independentes.

Figura 20 – Acumulação de brometo de etídio ao longo de 60 minutos de incubação para a estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e estirpe mutante AB 28/11 Δ *ybhF*.

Figura 21 – Capacidade de motilidade das estirpes parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e mutante AB 28/11 Δ *ybhF*, às 24 e 48 horas de incubação. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $P > 0,05$ pelo Teste *t student*.

Figura 22 – Capacidade de formação de biofilme das estirpes parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e mutante AB 28/11 Δ *ybhF*, após 48 horas de incubação, em condições de aerobiose e microaerofilia. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão das médias de quaduplicados de pelo menos três ensaios independentes. ns: $P > 0,05$ pelo Teste *t student*.

Figura 23 – Suscetibilidade ao stress oxidativo das estirpes parental *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e mutante AB28/11 Δ *ybhF*, após 48 horas de incubação, induzido por (A) peróxido de hidrogénio e (B) metil viologénio. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $P > 0,05$ pelo Teste *t student*.

Figura 24 – Suscetibilidade da estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutante AB 28/11 Δ *ybhF* ao soro humano, ao longo de 90 minutos de incubação. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão das médias de pelo menos três ensaios independentes.

Figura 25 – Ensaio de adesão e invasão para a estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutante AB 28/11 Δ *ybhF*, na linha celular Caco-2. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão das médias considerando triplicados em pelo menos três ensaios independentes. ns: $P > 0,05$ pelo Teste *t student*.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Espécies pertencentes ao género *Aliarcobacter*, bem como o ano, local e autor do seu isolamento.

Tabela 2 – Identificação, origem e data de isolamento das 24 estirpes de *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo.

Tabela 3 – Identificação da sequência de cada oligonucleótido iniciador usado para amplificação dos fragmentos hibridizantes, e tamanho do fragmento correspondente amplificado.

Tabela 4 – Identificação dos agentes antimicrobianos incluídos na determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Aliarcobacter butzleri*, bem como a respetiva fórmula química, marca do reagente, grau de pureza e solvente usado para a sua diluição.

Tabela 5 – Concentração mínima inibitória, em µg/mL, de antibióticos, desinfetantes, germicida e substrato de bombas de efluxo para as 24 estirpes de *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo e estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 como estirpe controlo do ensaio.

Tabela 6 – Perfil de multirresistência a antibióticos para as 24 estirpes *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo.

Tabela 7 – Concentração mínima inibitória, em mM, de metais para as 24 estirpes *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo e estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 como estirpe controlo do ensaio.

Tabela 8 – Resultados obtidos a partir da utilização do programa SOSUIGramN para avaliação da localização e tamanho das proteínas constituintes da bomba de efluxo YbhFSR.

Tabela 9 – Previsão da superfamília à qual pertence a proteína YbhF através do software Batch Web CD-Search tool, NCBI, tendo em conta a sequência de aminoácidos codificada pelo gene *ybhF* da estirpe *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11.

Tabela 10 – Concentração mínima inibitória, em µg/mL, de antibióticos, desinfetantes, germicida e substrato de bombas de efluxo para a estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutante AB 28/11Δ*ybhF*.

Tabela 11 – Concentração mínima inibitória, em mM, de metais para a estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutante AB 28/11Δ*ybhF*.

Lista de Acrónimos

| | |
|--------|--|
| ABC | Do inglês “ <i>Adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette</i> ” |
| ACR | Acriflavina |
| AMP | Ampicilina |
| ATP | Do inglês “ <i>Adenosine Triphosphate</i> ” |
| BA | Do inglês “ <i>Blood Agar</i> ” |
| BHI | Do inglês “ <i>Brain Heart Infusion</i> ” |
| BrEt | Brometo de Etídio |
| CHL | Do inglês “ <i>Chloramphenicol</i> ” |
| CHX | Clorohexidina |
| CIP | Ciprofloxacina |
| CLBZ | Cloreto de Benzalcónio |
| CMI | Concentração Mínima Inibitória |
| CTX | Cefotaxima |
| DO | Densidade Ótica |
| DMEM | Do inglês “ <i>Dulbecco’s modified Eagle medium</i> ” |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | Desoxirribonucleotídeos trifosfatados |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| ERY | Do inglês “ <i>Erythromycin</i> ” |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Suscetibility Testing |
| gDNA | DNA genómico |
| GEN | Gentamicina |
| IL-8 | Interleucina 8 |
| KAN | Do inglês “ <i>Kanamycin</i> ” |
| LB | Do inglês “ <i>Luria-Bertani</i> ” |
| LOS | Lipooligossacarídeos |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| MATE | Do inglês “ <i>Multidrug and toxic compound extrusion</i> ” |
| MDR | Do inglês “ <i>Multidrug resistance</i> ” |

| | |
|------|--|
| MFP | Do inglês “ <i>Membrane Fusion Protein</i> ” |
| MFS | Do inglês “ <i>Major facilitator Superfamily</i> ” |
| MOI | Do inglês “ <i>Multiplicity of infection</i> ” |
| NBD | Do inglês “ <i>Nucleotide Binding Domains</i> ” |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| PACE | Do inglês “ <i>Proteobacterial antimicrobial compound efflux</i> ” |
| pb | Pares de bases |
| PBS | Do inglês “ <i>Phosphate Buffered Saline</i> ” |
| PCR | Do inglês “ <i>Polimerase Chain Reaction</i> ” |
| RND | Do inglês “ <i>Resistance-nodulation-cell-division</i> ” |
| SMR | Do inglês “ <i>Small multidrug resistance</i> ” |
| TAE | Tris Acetato-EDTA |
| TB | Do inglês “ <i>Terrific Broth</i> ” |
| TMD | Do inglês “ <i>Transmembrane Domains</i> ” |
| TSA | Do inglês “ <i>Tryptone Soy Agar</i> ” |
| TSB | Do inglês “ <i>Tryptone Soy Broth</i> ” |
| UFC | Unidades Formadoras de Colônias |

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Género *Aliarcobacter*

1.1.1. Evolução e Classificação taxonómica do género *Aliarcobacter*

O género *Aliarcobacter* pertence atualmente à ordem *Campylobacterales*, família *Arcobacteraceae* (Waite et al., 2017), sendo-lhe reconhecidas nove espécies distintas isoladas de diferentes origens (Tabela 1).

Desde 2009, praticamente todos os anos têm sido reconhecidas novas espécies pertencentes ao género historicamente desenvolvido como *Arcobacter*, isoladas a partir dos mais variados ambientes e/ou hospedeiros, pelo que se prevê que a tendência de aumento do número de espécies propostas ao género se mantenha futuramente, sendo que atualmente são já reconhecidas 35 espécies (On et al., 2021).

A diversidade de espécies com características distintas que têm vindo a ser incluídas neste género, pelos critérios que foram sendo propostos por diferentes autores, levou a que fosse colocada em causa a sua classificação e taxonomia entre a comunidade científica.

De uma análise genómica comparativa realizada por Waite e os seus colaboradores em 2017, surgiu a proposta de reclassificação da classe *Epsilonproteobacteria* para a classe *Campylobacteria*, em que o género *Arcobacter*, que até então pertencia à família *Campylobacteraceae*, juntamente com os géneros *Campylobacter* e *Sulfurospirillum*, passaria a pertencer à família *Arcobacteraceae nov.*, da ordem *Campylobacterales*, e do filo *Epsilonbactaraeota phyl. nov.* (Waite et al., 2017, 2018). A modificação taxonómica que alocou *Arcobacter* na nova família *Arcobacteraceae* foi validada somente em 2020 (Oren and Garrity, 2020) integrando o filo *Campylobacterota phy nov.* (Oren and Garrity, 2021).

Pérez-Cataluña e os seus colaboradores, em 2018, procederam à reavaliação taxonómica das espécies de *Arcobacter* através de uma abordagem que incorporou técnicas de sequenciação de nova geração, integrando a genómica na taxonomia. Neste estudo foi identificada uma elevada variabilidade genómica aliada a uma combinação de diversas características fenotípicas do género *Arcobacter*, que justificou a sua divisão em pelo menos seis géneros distintos, entre os quais o género *Aliarcobacter*. Este género inclui, até ao momento, as espécies *Aliarcobacter butzleri*, *Aliarcobacter cryaerophilus*, *Aliarcobacter skirrowii*, *Aliarcobacter cibarius*, *Aliarcobacter thereius*, *Aliarcobacter*

trophiarum, *Aliarcobacter faecis*, *Aliarcobacter lanthieri* e *Aliarcobacter vitoriensis* (Tabela 1) (Pérez-Cataluña et al., 2018, 2019).

Tabela 1 – Espécies pertencentes ao género *Aliarcobacter*, bem como o ano, local e autor do seu isolamento.

| Espécie | Ano | Origem | Referência |
|------------------------------------|------------|------------------------------|------------------------------------|
| <i>Aliarcobacter cryaerophilus</i> | 1985 | Fetos bovinos | (Neill et al., 1985) |
| <i>Aliarcobacter butzleri</i> | 1991 | Amostras de fezes diarreicas | (Kiehlbauch et al., 1991) |
| <i>Aliarcobacter skirrowii</i> | 1992 | Fluído prepucial de touros | (Vandamme et al. 1992b) |
| <i>Aliarcobacter cibarius</i> | 2005 | Carcaças de frango | (Houf et al., 2005) |
| <i>Aliarcobacter thereius</i> | 2009 | Fetos suínos e patos | (Houf et al., 2009) |
| <i>Aliarcobacter trophiarum</i> | 2011 | Fezes suínas | (De Smet et al., 2011) |
| <i>Aliarcobacter lanthieri</i> | 2015 | Estrume de suínos e bovinos | (Whiteduck-Leveillee et al., 2015) |
| <i>Aliarcobacter faecis</i> | 2016 | Águas residuais | (Whiteduck-léveillé et al., 2016) |
| <i>Aliarcobacter vitoriensis</i> | 2020 | Cenouras e águas residuais | (Alonso et al. 2020) |

Ainda que o debate acerca da classificação taxonómica das espécies e géneros da família *Arcobacteraceae* continue a dividir os membros da comunidade científica, a nomenclatura proposta por Perez-Cataluña et al. (2018) mantém-se como a atualmente válida, pelo que será a adotada no presente trabalho, em que será considerado o género *Aliarcobacter* e as suas espécies.

1.1.2. Características gerais de *Aliarcobacter*

As bactérias pertencentes ao género *Aliarcobacter* são bacilos Gram-negativos curvos, helicoidais ou em forma de S, cujas dimensões variam entre 1 a 3 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de largura. Não formam esporos e todas as espécies apresentam como

característica a presença de um único flagelo polar, responsável por lhes conferir motilidade (Pérez-Cataluña et al., 2018).

Sendo bactérias Gram-negativo, é de salientar a superior complexidade inerente à sua parede celular, constituída por uma membrana externa, pelo espaço periplasmático e peptidoglicano. À membrana externa, que é composta por lipossacarídeos e proteínas como porinas, transportadores e recetores, segue-se uma fina camada de peptidoglicano e a membrana plasmática, formada por fosfolípidos e proteínas integrais. Para além da resistência intrínseca conferida a estas bactérias devido à presença da membrana externa, que atua como uma barreira de permeabilidade contra antibióticos hidrofílicos, proteínas e enzimas periplasmáticas, este complexo pode ainda ser atravessado por bombas de efluxo, que contribuem para o aumento da sua resistência e virulência, através do transporte de toxinas e antimicrobianos para o exterior do microrganismo (Willey et al., 2007).

As espécies que compõem o género *Aliarcobacter* são quimiorganotróficas, oxidase e catalase positivas e variáveis para a urease. Para além disso, são positivas para a hidrólise de indoxil acetato e não têm a capacidade de produzir pigmentos fluorescentes. Relativamente ao seu metabolismo, não têm aptidão para utilizar carboidratos como fonte de energia, mas são habitualmente capazes de reduzir nitrato a nitrito (Pérez-Cataluña et al., 2018, 2019).

O crescimento dos microrganismos do género *Aliarcobacter* ocorre no intervalo de temperaturas entre os 15 °C e os 42 °C e num amplo intervalo de pH, que pode variar entre 5,5 e 8,0, apresentando um crescimento ótimo a um pH de 6,0 a 7,5, dependendo das diferentes espécies (Cervenka, 2007). Não ocorre crescimento na presença de NaCl a 4%, de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (0,04% m/V) ou de glicina (1% m/V), contudo, algumas espécies têm a capacidade de crescer na presença de safranina (0,05% m/V) ou oxgall (1% m/V) e algumas espécies são sensíveis a cefoperazona (Pérez-Cataluña et al., 2018, 2019).

Ainda que as características gerais do género possam variar de acordo com a espécie, a espécie referência do género *Aliarcobacter* foi definida como *Aliarcobacter cryaerophilus* (Pérez-Cataluña et al., 2018, 2019).

1.1.2.1. Características gerais de *Aliarcobacter butzleri*

De entre as nove espécies integradas no género *Aliarcobacter*, o foco deste trabalho direcionar-se-á para *Aliarcobacter butzleri*, pelo que importa abordar com maior detalhe as suas características.

De acordo com a descrição de Vandamme em 1992 e consolidado por Pérez-Cataluña aquando da revisão da taxonomia do género *Arcobacter* em 2018, *Aliarcobacter butzleri* apresenta 0,2 a 0,4 µm de largura e 1 a 3 µm de comprimento, com colónias de 2 a 4 mm de diâmetro após 3 dias de incubação em placas de Blood Agar (BA), predominantemente redondas e esbranquiçadas (Pérez-Cataluña et al., 2018; Vandamme et al., 1992b).

Embora a estirpe inicialmente tomada como referência (*A. butzleri* LMG 10828^T) apresente crescimento a 42 °C, um estudo com a estirpe de *A. butzleri* designada NCTC 12481, também proveniente de isolados humanos, descreve o intervalo entre 15 e 37 °C como o ótimo para o crescimento de *A. butzleri*, em que se verifica um decréscimo significativo do crescimento acima dos 37 °C e ausência de crescimento a partir dos 40 °C. Ainda no mesmo estudo foi detetado crescimento para o intervalo de pH entre 5,0 a 8,5, ainda que o crescimento ótimo tenha sido verificado na gama de pH entre 6,0 e 8,0, a uma temperatura ideal de 30 °C (Hilton et al., 2001).

No que se refere à atividade enzimática e para além das características fenotípicas do género a que pertence, a maioria das estirpes de *A. butzleri* é catalase positiva, ainda que com uma atividade fraca, reduz nitrato a nitrito e é positiva para a hidrólise do indoxil acetato. Contrariamente, é variável com tendência para ser negativa para a urease e negativa para o teste de produção de H₂S a partir de cisteína (Vandamme et al., 1992b).

De entre as espécies do género previamente designado como *Arcobacter*, os três primeiros genomas a serem integralmente sequenciados pertencem à espécie *Aliarcobacter butzleri*. O primeiro genoma totalmente sequenciado de *A. butzleri* foi o da estirpe RM4018, relativo a um isolado clínico humano. Desta sequenciação, à parte de muitos outros dados relevantes, foi possível inferir o tamanho do genoma em causa, 2341251 pb, tendo-se caracterizado por ter sido o segundo maior genoma sequenciado de *Epsilonproteobacteria* até à data, bem como o conteúdo de G+C, de 27% (Miller et al., 2007).

Recentemente têm sido publicados estudos que providenciam informações adicionais acerca desta espécie. Isidro et al. (2020) realizou uma análise genómica comparativa de 49 estirpes de *A. butzleri* isoladas de diferentes ambientes. Dos dados providenciados, destaca-se a confirmação do carácter variável da atividade da enzima urease, e o tamanho do genoma de *A. butzleri* entre 2,07 e 2,58 Mpb, com uma composição em G+C de 26,9% (Isidro et al., 2020). Fanelli et al. (2020) realizou uma análise taxogenómica de dois genomas de *A. butzleri* da qual é sugerida a hipótese de definir subespécies dentro do género que reflitam a fonte de isolamento, ainda que esta seja uma teoria que careça da sequenciação e análise de um maior número de genomas de *A. butzleri* para que possa

ser validada. Ainda no mesmo estudo, a abordagem utilizada pelos investigadores confirmou que nenhuma das estirpes incluídas no trabalho metabolizam carboidratos, no entanto, algumas usam ácidos orgânicos e aminoácidos como fontes de carbono (Fanelli et al., 2020).

1.2. Distribuição e vias de transmissão de *Aliarcobacter*

A ocorrência de *Aliarcobacter* tem vindo a ser descrita em múltiplos ambientes e hospedeiros, nomeadamente em alimentos de origem animal, alimentos em fase de processamento, água, animais selvagens e domésticos e humanos. Ainda que as infeções por espécies de *Aliarcobacter* tenham como principais sintomas diarreia aquosa persistente e cólicas abdominais, estas infeções foram já associadas também a bacteremias, enterocolites, peritonites e febre (Collado and Figueras, 2011).

De entre as espécies do género, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são consideradas as mais relevantes em saúde pública devido à sua associação com doença animal e humana (Ferreira et al., 2016), tendo *A. butzleri* sido considerada um perigo moderado para a saúde humana pela Comissão Internacional de Especificações Microbiológicas de Alimentos (ICMSF, 2018). Infeções por estas bactérias associam-se a cólicas, bacteremias e septicemias em humanos e a abortos e mastites em animais (Sousa et al., 2019; Ferreira et al., 2017b). Devido à sua frequência em ambientes tão distintos como os descritos, estes dois microrganismos são classificados como patógenos emergentes alimentares e zoonóticos (Collado and Figueras, 2011). Particularmente, *A. butzleri* é descrita como a espécie mais prevalente e importante do ponto de vista epidemiológico do género. É a espécie mais associada a casos de enterite, com principal sintoma diarreia aquosa e persistente (Vandenberg et al., 2004; Collado et al., 2013; Ferreira et al., 2014a).

Outras espécies têm vindo a ser isoladas de diversas fontes, no entanto, uma vez que não existe um método de isolamento e deteção padrão para as espécies de *Aliarcobacter*, a sua prevalência pode estar a ser subestimada (Webb et al., 2016; Ferreira et al., 2016).

Apesar de a ingestão de água e alimentos contaminados ser considerada a via de transmissão mais habitual, e de terem sido já relatados vários surtos relacionados, as vias de transmissão não estão claramente estudadas e associação entre a fonte com a doença humana não está muitas das vezes identificada de forma explícita.

1.2.1. Transmissão de *Aliarcobacter* através de alimentos

A distribuição de *Aliarcobacter* tem sido amplamente estudada na cadeia alimentar, dado o consumo de alimentos contaminados ser uma das mais prováveis fontes de transmissão dos microrganismos pertencentes a este género a humanos (Collado and Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016). Estas espécies têm a robustez de serem resistentes em condições de stress e de armazenamento de alimentos, pelo que a sua presença é descrita ao longo das várias etapas da cadeia alimentar, seja em alimentos crus, alimentos prontos a comer e alimentos em fase de processamento e produção fabril (Ferreira et al., 2019b).

A maioria dos estudos foca-se na prevalência de espécies de *Aliarcobacter* em carnes, particularmente carnes de aves, sendo também habitualmente encontradas em carnes de suínos e bovinos. A contaminação neste subconjunto alimentar é sugerida pelo facto de, por um lado, no processo de abate e desmanche de animais o contacto de carcaças e fezes possa levar a contaminações cruzadas em matadouros e, por outro lado, que a sua contaminação possa ocorrer na manipulação durante a venda a retalho. Estas são as razões pelas quais os produtos de origem animal são considerados uma das principais fontes de transmissão de infeções por *Aliarcobacter* (Collado and Figueras, 2011; Ferreira et al., 2017b).

Em Portugal, a presença de espécies do género, designado à altura *Arcobacter*, foi estudada em alimentos recolhidos do comércio a retalho tendo-se verificado uma prevalência geral de 60,5%, em que a maior frequência pertenceu à categoria de carnes frescas de aves de capoeira (92,0%), seguida de peixe fresco (68,0%), legumes embalados prontos para consumo (47,6%), carne suína fresca (45,8%) e, por último, carne bovina fresca (42,1%) (Vicente-Martins et al., 2018). Adicionalmente, entre as amostras positivas para as espécies do género em causa, a espécie mais frequente foi *A. butzleri* (58,5%), seguida por *A. cryaerophilus* (35,8%) e *A. skirrowii* (5,7%). A diversidade de espécies encontradas foi maior em peixe, possivelmente devido à poluição da água do mar por fezes e esgotos que posteriormente poderão entrar em contacto com alimentos a ser consumidos (Vicente-Martins et al., 2018; Ferreira et al., 2016).

Uma vez que são vários os membros deste género nativos de ambientes marinhos, e considerando a sua prevalência em ambientes aquáticos, é possível inferir a ingestão de peixe e molusco contaminados como uma importante via de transmissão. A prevalência de espécies *Aliarcobacter* em alimentos provenientes do mar tem sido amplamente descrita em múltiplos estudos, nos quais é apresentado um intervalo entre 14,7 e 73,7% de amostras positivas, em que *A. butzleri* é a espécie mais prevalente nos estudos considerados (Collado et al., 2009, 2014; Fernandez et al., 2015; Laishram et al., 2016;

Leoni et al., 2017; Levican et al., 2014; Mottola et al., 2016; Nieva-Echevarria et al., 2013; Salas-Massó et al., 2016).

Também em laticínios e produtos lácteos foi detetada a presença de *Aliarcobacter*, destacando-se a elevada capacidade de sobrevivência das espécies *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* no processamento e armazenamento destes alimentos (Ferreira et al., 2017a; Giacometti et al., 2013; 2015).

A presença de espécies *Aliarcobacter* em vegetais embalados, designadamente espinafre, alface, rúcula, repolho, entre outros, gera uma preocupação acrescida do ponto de vista de transmissão desta bactéria no sentido em que sendo alimentos crus prontos para consumo não requerem uma etapa de preparação que envolva a lavagem, desinfecção ou cozedura dos mesmos, que poderia minimizar o risco de infeção antes do consumo. No seguimento desta reflexão, também os produtos lácteos, nomeadamente o leite e o queijo, e alguns alimentos provenientes do mar, como o marisco, tornam a sua ingestão um risco maior para a saúde humana, já que são ingeridos usualmente sem processamento posterior à sua produção, sem confeção ou são mal cozinhados (González and Ferrús, 2011; González et al., 2017; Ferreira et al., 2016).

Para além da deteção de *Aliarcobacter* em alimentos crus, há estudos que descrevem a contaminação por espécies deste género em alimentos prontos a consumir, como foi o caso de um estudo desenvolvido em restaurantes de Bangkok, onde foi verificada a prevalência de *A. butzleri* de 13% por refeição ingerida, aumentando esta frequência para 75% quando são consumidas 10 refeições (Teague et al., 2010).

Apesar de nem sempre ser possível associar a presença do microrganismo a casos de surto, um estudo efetuado nos EUA estabeleceu a relação entre a deteção de *A. butzleri* em frango assado com um surto de origem alimentar num casamento, sustentando o princípio do consumo de alimentos contaminados como uma provável via de transmissão (Lappi et al., 2013).

Considerando o potencial patogénico desta espécie, torna-se importante implementar ações preventivas para reduzir a sua prevalência ao longo da cadeia alimentar, como a melhoria das medidas de higiene por parte dos agricultores ou o reforço de higiene nas fábricas de processamento de alimentos (Mateus et al., 2021a).

1.2.2. Transmissão de *Aliarcobacter* através da água

Diversas espécies de *Aliarcobacter* têm vindo a ser isoladas de diferentes tipos de amostras ambientais de água, como água do mar, lagos, rios, águas residuais e águas de nascente, em inúmeros países por todo o mundo.

Da meta-análise efetuada por Venâncio et al. (2022) e tendo sido considerados dados de 70 estudos, foi observada uma prevalência global de espécies pertencentes à família *Arcobacteraceae* de 69,2% em diferentes tipos de amostras de águas, com a América do Sul a deter a prevalência mais elevada entre continentes (Venâncio et al., 2022). Das informações fornecidas neste estudo, é ainda importante destacar a prevalência de *A. butzleri* (58,3%), tendo esta sido a espécie mais prevalente entre as espécies pertencentes a esta família, seguida de *A. cryaerophilus* (42,5%), duas das espécies mais frequentemente associadas a doença humana.

A frequência de isolamento das espécies deste género em amostras hídricas, em que *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* se evidenciam como as mais comumente isoladas, tem sido diretamente associada a contaminação fecal, sendo que a maior diversidade genotípica ocorre em amostras mais afetadas por esgotos urbanos manifestando níveis mais elevados de indicadores fecais (Collado et al., 2008, 2010). No entanto, não foi detetada a presença de nenhuma das espécies em causa em água clorada, pelo que é possível inferir a cloração contínua como um método de bloqueio à propagação destes microrganismos através de água contaminada (Collado et al., 2010).

Para além disso, Van Driessche and Houf (2008) demonstraram que a sobrevivência de *Aliarcobacter* em ambientes aquáticos é influenciada pela temperatura e existência de matéria orgânica, tendo sido constatado que *A. butzleri* pode permanecer viável a 4 ou 7 °C por 250 dias quando na presença de matéria orgânica (Van Driessche and Houf, 2008). Fera et al. demonstrou ainda que *A. butzleri* tem a capacidade de sobreviver em água do mar através da indução de um estado viável, mas não cultivável, que lhe permite sobreviver cerca de 270 dias em condições de ausência de nutrientes. A aptidão de sobrevivência em condições de escassez de nutrientes e em baixas temperaturas destacam o seu elevado carácter patogénico, dando relevância à água como via de transmissão de uma infeção por *Aliarcobacter* (Fera et al., 2008).

São vários os relatos de surtos consequentes da ingestão de água contaminada por *Aliarcobacter*. Em todos eles, os indivíduos afetados relataram distúrbios gastrointestinais, tendo sido apontada como causa provável a contaminação fecal de água potável e a presença de contaminantes microbiológicos das instalações de tratamentos de águas residuais e fossas sépticas transportados por uma elevada

precipitação na região de um dos surtos descritos (Fong et al., 2007; Kopilović et al., 2008; Rice et al., 1999). Ainda que muitas vezes sejam identificadas espécies de *Aliarcobacter* em águas ou fezes humanas durante surtos relatados, nem sempre é possível identificar o microrganismo detetado como agente etiológico. Todavia, descrições como as mencionadas apoiam o consumo de águas contaminadas como uma das mais importantes vias de transmissão de espécies do género *Aliarcobacter*.

1.2.3. Transmissão de *Aliarcobacter* através de contacto com animais

Ainda que a presença de *Aliarcobacter* tenha sido identificada no trato intestinal e amostras fecais de vários animais, este nem sempre possui a capacidade de causar doença (Ho et al., 2006; Collado and Figueras, 2011). Em caso de doença, associa-se frequentemente a diarreia, mastites e abortos (Ferreira et al., 2016).

Estirpes de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* têm vindo a ser isoladas de abortos fetais e placentas de origem bovina, suína e ovina, sendo *A. cryaerophilus* a espécie mais frequentemente relacionada a abortos em animais (Logan et al., 1982; Neil et al., 1985; On et al., 2002; Collado and Figueras, 2011). Embora algumas destas espécies tenham sido associadas a casos de abortos bovinos, também já foram isoladas de fluídos prepuciais de bovinos saudáveis e fluídos vaginais de vacas isentas de problemas de reprodução (Gill et al., 1983; Kabeya et al., 2003). Também *A. thereius* já foi isolado de amostras de rins e fígados de abortos espontâneos suínos (Houf et al., 2009). On et al. (2002) após terem detetado espécies de *Aliarcobacter* em leitões vivos e saudáveis, sugeriu que, apesar de algumas estirpes poderem ter um papel primário em abortos e distúrbios reprodutivos, outras tratam-se apenas de patógenos oportunistas que ao invés de serem a causa primária da doença têm um papel no seu decurso (On et al., 2002).

À parte dos problemas relacionados com a reprodução, *A. butzleri* tem sido isolado de fezes diarreicas de suínos, bovinos, cavalos e primatas não humanos, enquanto *A. skirrowii* tem sido associado a casos de diarreia e colites hemorrágicas em bovinos e ovinos (Ho et al., 2006; Anderson et al., 1993).

Um outro exemplo de que a presença de *Aliarcobacter* em animais não representa necessariamente o desenvolvimento de doença, podendo estas bactérias serem detetadas em animais saudáveis, é a frequência de espécies de *Aliarcobacter* em amostras fecais de aves domésticas, isto é, galinhas, patos, perus ou gansos domésticos, sem qualquer comprovação de doença nestes animais, pelo que se sugerem estas aves como reservatórios naturais de *Aliarcobacter* (Atabay et al., 2008).

De entre os estudos que focam a prevalência de *Aliarcobacter* em diferentes amostras biológicas de animais domésticos, têm sido descritas prevalências que variam entre 2 e 79% para espécies deste género, destacando-se *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* como as mais frequentemente isoladas (Fera et al., 2009; Houf et al., 2008; Fernández et al., 2007; Aydin et al., 2007; Bojanić et al., 2019). Assim, os estudos efetuados sugerem que o contacto próximo do humano com os animais de estimação, nomeadamente o contacto com as suas fezes ou saliva, é um risco de infeção por *Aliarcobacter*, pelo que se torna uma outra potencial via de transmissão.

Um número menor de estudos acerca da prevalência destas bactérias em animais selvagens foram realizados, embora já tenham sido isoladas a partir de pombos, ratos, avestruzes, rinocerontes, coelhos, gazelas, zebras ou guaxinins, entre outros (Hamir et al., 2004; Di Francesco et al., 2014; Shange et al., 2020). Ainda que comumente não estabeleçam um contacto próximo com humanos, muitos destes animais partilham com eles o ambiente urbano e suburbano, representando, por isso, um risco significativo para a disseminação destas bactérias (Collado and Figueras, 2011).

Para além da sua presença em animais selvagens, foram já identificadas espécies de *Aliarcobacter* em animais exóticos. Exemplo disso é a investigação de Gilbert e seus colaboradores em 2019, que foca a deteção destes microrganismos em répteis e destaca o isolamento de *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, tendo *A. butzleri* sido identificada em lagartos, cobras e tartarugas (Gilbert et al., 2019).

1.2.4. Presença de *Aliarcobacter* em humanos e transmissão pessoa-a-pessoa

De entre as espécies de *Aliarcobacter*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* são as espécies com maior associação à doença humana. Mais especificamente, *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* têm sido comumente associados a enterite e ocasionalmente a bacteremia, e *A. skirrowii* a casos de diarreia (Ferreira et al., 2016). No entanto, também *A. thereius* foi isolado a partir de amostras de fezes de dois pacientes com diagnóstico de enterocolite, sendo que nenhum dos dois apresentou co-deteção com nenhum outro microrganismo (Van den Abeele et al., 2014). Para além disso, outros sintomas associados a infeções por espécies deste género incluem cólicas abdominais, peritonite e febre. À semelhança do que acontece em animais, também em humanos é detetada a presença destas bactérias em indivíduos saudáveis, e, na maioria dos casos, a doença é autolimitada pelo que não necessita de tratamento com antibióticos (Collado and Figueras, 2011).

Ainda que o primeiro isolamento de uma espécie de *Aliarcobacter* a partir de amostras humanas tenha sido *A. cryaerophilus* (Tee et al., 1988), *A. butzleri* é a espécie mais frequentemente isolada de amostras humanas, sendo considerada o quarto organismo *Campylobacter-like* mais comum em amostras de fezes diarreicas humanas (Collado et al., 2013; Ferreira et al., 2014a; Prouzet-Mauléon et al., 2006; Samie et al., 2007; Vandenberg et al., 2004).

Quando é considerado o isolamento de espécies de *Aliarcobacter* em amostras fecais humanas por métodos de cultura, a prevalência destes microrganismos varia entre 0,1% e 2,4%. No entanto, esta prevalência aumenta para 1,2% a 12,9% quando são usados métodos moleculares (Collado and Figueras, 2011). Neste sentido, importa atentar um estudo de Samie et al. de 2007, que por detecção molecular direta em 322 amostras de fezes humanas relatou uma prevalência de 6,2% para *A. butzleri*, 2,9% para *A. cryaerophilus* e 1,9% para *A. skirrowii*, apesar de não ter conseguido associar nenhuma destas espécies à diarreia apresentada pelos doentes (Samie et al., 2007). Por outro lado, no estudo de Vandenberg e os seus colaboradores, um estudo com maior poder amostral, foi constatada uma prevalência de 0,1% para *A. butzleri* e *A. cryaerophilus* e uma relação entre a presença de *A. butzleri* e diarreia persistente ou aquosa (Vandenberg et al., 2004).

Num estudo efetuado em Portugal com foco na prevalência e diversidade de *Aliarcobacter*, onde foram analisadas 298 amostras de fezes diarreicas, foi detetada a presença de espécies deste género em 1,7% das amostras, em que 1,3% corresponderam a amostras positivas de *A. butzleri* e 0,3% de *A. cryaerophilus*, com uma maior incidência em crianças comparativamente a adultos, com uma frequência de 2,2% e 0,9%, respetivamente (Ferreira et al., 2014a).

Também características do hospedeiro, nomeadamente o seu estado imunológico, podem ter um papel determinante na infeção por *Aliarcobacter* em humanos, como acontece em infeções por outros microrganismos (Samie et al., 2007; Fera et al., 2010).

A sugestão de transmissão pessoa-a-pessoa advém de um surto ocorrido numa escola italiana em 1983, onde 10 crianças que frequentavam anos escolares diferentes e uma professora relataram cólicas abdominais recorrentes, febre e ausência de resposta a antibióticos, tendo sido detetada a presença de *A. butzleri* em amostras fecais de todos os pacientes (Vandamme et al., 1992a). Um outro caso que sustenta esta possibilidade foi relatado por On et al. em 1995, quando uma mãe de 35 anos sem evidências de doença deu à luz um recém-nascido com bacteremia por *A. butzleri*, sendo sugerida uma possível

transmissão *in utero* (On et al., 1995). Esta descrição adiciona a hipótese de transmissão vertical ou transplacentária como uma provável via de transmissão pessoa-a-pessoa.

1.3. Patogenicidade e fatores de virulência de *Aliarcobacter butzleri*

De entre as espécies de *Aliarcobacter*, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, têm-se destacado como as bactérias mais patogênicas para humanos e animais pela diversidade de ambientes e/ ou hospedeiros onde a sua presença já foi descrita, nomeadamente em alimentos, água e meio ambiente (Ferreira et al., 2014b). Estão principalmente associadas a enterites e bacteremias, sendo *A. butzleri* considerado um patógeno emergente e a espécie com maior prevalência em casos clínicos, com sintomatologia comumente associada a diarreias persistentes e cólicas abdominais (Ferreira et al., 2016).

Apesar de a relação entre *A. butzleri* e doença humana estar estabelecida, muito acerca da sua patogenicidade e dos seus fatores de virulência precisa de ser esclarecido de forma a tornar claro quais os mecanismos de virulência capazes de desencadear uma infeção por este microrganismo e, conseqüentemente, proceder à sua prevenção e controlo.

Modelos *in vitro* e *in vivo* têm sido usados para elucidar os potenciais mecanismos de virulência desta bactéria, alguns dos quais representados na figura 1, sendo que a grande maioria dos estudos incidem na sua capacidade de adesão, capacidade de invasão, citotoxicidade, presença de genes putativos de virulência e capacidade de formação de biofilmes (Collado and Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016).

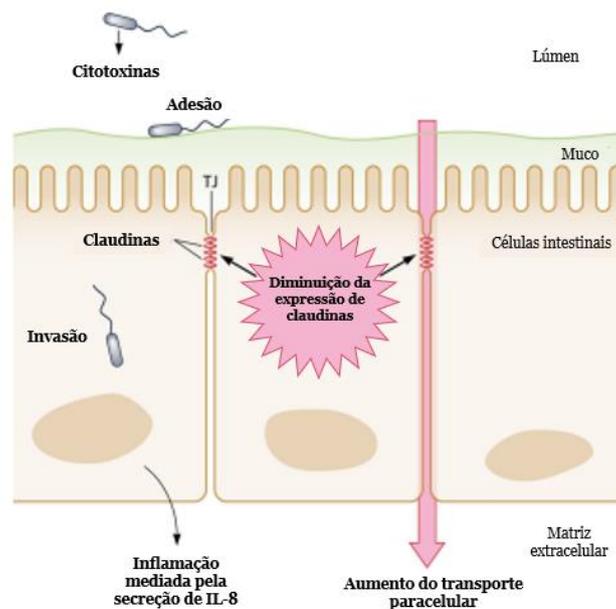


Figura 1 – Representação esquemática de alguns dos mecanismos de virulência de *Aliarcobacter* em células epiteliais intestinais, nomeadamente a capacidade de citotoxicidade, adesão, invasão, inflamação mediada pela secreção de interleucina 8 (IL-8), diminuição da expressão de claudinas nas junções apertadas com disfunção da barreira epitelial e aumento do transporte paracelular. Adaptado de (Collado and Figueras, 2011).

Os estudos *in vitro* realizados têm apontado para uma capacidade de adesão e invasão a células eucarióticas de origem animal e humana e para a produção de toxinas capazes de danificar as células do hospedeiro de *A. butzleri* (Brückner et al., 2020; Bruegge et al., 2014; Ferreira et al., 2014b; Karadas et al., 2016). Os estudos *in vivo* são mais escassos e são representados sobretudo por modelos animais, dos quais os estudos com murganhos representam o maior número, embora já tenham sido também realizados estudos com peixes, suínos, aves, entre outros (Wesley et al., 1996; Wesley et al., 1999; Adesiji et al., 2011; Açik et al., 2016; Gözl et al., 2015).

Para além dos estudos *in vitro* e *in vivo*, a sequenciação completa do genoma de várias estirpes de *A. butzleri* permitiu identificar vários potenciais marcadores úteis para a compreensão dos seus mecanismos de virulência (Isidro et al., 2020; Miller et al., 2007).

Ainda que seja consensual que *A. butzleri* se destaca entre as espécies *Aliarcobacter* pelo seu perfil patogénico, existem algumas divergências no que diz respeito à sua patogenicidade nos diferentes estudos desenvolvidos, provavelmente devido à utilização de estirpes de distintas origens e diferentes linhas celulares, pelo que se torna relevante aprofundar esta temática e esclarecer as disparidades encontradas, dando continuidade aos estudos *in vitro* e *in vivo* de forma a clarificar o papel destas bactérias como patógenos intestinais.

1.3.1. Presença de genes putativos de virulência

De entre os genes putativos de virulência em *A. butzleri*, são nove os habitualmente mais estudados: *cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *hecA*, *hecB* e *irgA*. Dos genes destacados, *cadF* e *cj1349* codificam para proteínas de membrana externa, que promovem o contacto das bactérias com as células hospedeiras por adesão à fibronectina, sendo que o gene *cadF* codifica para uma proteína que induz a internalização de células bacterianas; o gene *ciaB* associa-se a invasão de células hospedeiras em *Campylobacter*; o gene *mviN* codifica para uma proteína ligada à síntese de peptidoglicano; *pldA* e *tlyA* são genes que codificam para a fosfolipase A e exotoxina hemolisina A, respetivamente; o gene *hecA* codifica para uma hemaglutinina filamentosa, que é uma proteína que pertence à classe das adesinas e que possui um papel em patógenos de animais e plantas, e o gene *hecB* codifica uma proteína associada à ativação da hemolisina; por último, o gene *irgA* codifica uma proteína de membrana externa regulada por ferro (Ferreira et al., 2014b; Ferreira et al., 2016; Miller et al., 2007; Zambri et al., 2019).

Diversos estudos têm analisado a presença destes genes de virulência putativos em estirpes de diversas origens, demonstrando uma heterogeneidade da distribuição destes, sendo, no entanto, seis dos nove genes (*cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*) detetados na maioria das estirpes de *A. butzleri* analisadas (Doudah et al., 2012; Karadas et al., 2013; Tabatabaei et al., 2014).

Além de comprovarem a existência de diversos genes putativos de virulência, os estudos relatados indicam ainda *A. butzleri*, em particular, como uma espécie potencialmente patogénica.

Mais recentemente, a sequenciação de um maior número de estirpes de *A. butzleri* tem sido importante no estabelecimento de uma relação entre as suas características fenotípicas e o seu genoma, dando continuidade ao trabalho desenvolvido por Miller, em 2007, aquando da sequenciação do genoma de *A. butzleri* RM 4018 e consequente identificação da presença dos vários genes putativos de virulência (Fanelli et al., 2019, 2020; Isidro et al., 2020; Miller et al., 2007)

1.3.2. Capacidade de adesão e invasão

A adesão tem um papel preponderante na patogenicidade bacteriana no sentido em que é uma etapa necessária para induzir a infeção, seguida pela colonização dos tecidos e, em alguns casos, pela invasão bacteriana das células do hospedeiro, que pode ser seguida de multiplicação intracelular e consequente disseminação para outros tecidos. Se por um lado o microrganismo patogénico tem como objetivo invadir o hospedeiro e resistir à sua

resposta imune, causando danos às células e multiplicando-se, o hospedeiro tenta despromover e resistir à infecção através de diversas estratégias, criando uma interação entre microrganismo/hospedeiro que definirá o processo de desenvolvimento ou não de doença (Lu and Walker, 2001; Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006).

Considerando o papel que a adesão tem no estabelecimento da infecção, e apesar do número de estudos genéticos ser reduzido, muitas investigações têm focado a capacidade de adesão de *A. butzleri*, demonstrada em várias linhas celulares, nomeadamente Hep-2, HeLa, INT407, Caco-2, IPI-21, HT-29, HT-29/B6 e IPEC-J2. Adicionalmente, foi demonstrado que a mesma estirpe tem capacidade de aderir ou invadir diferentes linhas celulares (Collado and Figueras, 2011; Ferreira et al., 2016).

O mecanismo pelo qual *A. butzleri* pode causar diarreia, um dos principais sintomas associados à infecção por este microrganismo, foi elucidado por Bücker et al. (2009) que demonstraram que esta bactéria foi capaz de alterar as proteínas de junção apertada e induzir a diminuição da resistência epitelial em células de carcinoma de cólon humano, HT-29/B6, através do aumento da permeabilidade macromolecular pela via paracelular (Bücker et al., 2009). Desta forma, foi detetada uma expressão reduzida de proteínas de claudina-1, -5 e -8 de junção apertada das células epiteliais, provocando diarreia através de um mecanismo de fluxo de vazamento. Outra investigação de Karadas e os seus colaboradores (Karadas et al., 2016) demonstrou, adicionalmente, que linhas celulares epiteliais derivadas de suínos são mais resistentes a *A. butzleri* comparativamente a linhas celulares humanas, devendo-se este facto a uma maior eficiência de ligação dos recetores correspondentes em células humanas, o que pode explicar a hipótese que considera *A. butzleri* comensal em vários hospedeiros, excetuando humanos.

Por outro lado, a invasão é o mecanismo pelo qual as bactérias evitam ambientes desfavoráveis induzidos pelo hospedeiro, tais como o pH, sangue ou células do sistema imunológico (Pizarro-Cerdá and Cossart, 2006). Ao entrarem nas células-alvo, adquirem não só capacidade de sobrevivência como de replicação e disseminação para outros tecidos, conseguindo estabelecer a infecção. Embora as duas proteínas homólogas encontradas em *A. butzleri* associadas à invasão em *Campylobacter* sejam codificadas por *ciaB* e *iamA*, não foi ainda possível comprovar uma correlação direta entre a invasão e a presença destes genes de virulência para *A. butzleri* (Isidro et al., 2020).

Relativamente à capacidade de adesão e invasão em linhas celulares do intestino humano, designadamente Caco-2 e HT-29, Karadas et al. (2013) demonstraram que todos os isolados de *A. butzleri* analisados possuíram capacidade de adesão e invasão nas células Caco-2, enquanto apenas quatro dos seis isolados testados apresentaram

capacidade de adesão às células HT-29 e três capacidade de invasão na mesma linha celular (Karadas et al., 2013). Apesar de todos os isolados evidenciarem a presença de genes de adesão e invasão, estes dados apontam para fenótipos diferentes entre estirpes, sugerindo, assim, que a virulência da espécie seja dependente da estirpe em questão. Um outro estudo de Levican e dos seus colaboradores (2013), demonstrou a capacidade de invasão em células Caco-2 de várias espécies de *Aliarcobacter*, das quais *A. butzleri* se destacou como uma das espécies cujas estirpes, isoladas de fontes caracterizadas por contaminação fecal, se manifestaram mais invasivas e com maior número de genes de virulência (*cadF*, *cj1349*, *irgA* e *hecA*) (Levican et al., 2013).

Recuperando o estudo português supracitado, que para além da análise da presença de genes putativos de virulência, destaca o potencial patogénico de *A. butzleri* ao demonstrar que uma inflamação pré-existente não teve um efeito significativo na capacidade de adesão, bem como ao mostrar que os isolados de *A. butzleri* em estudo revelaram capacidade de sobreviver no espaço intracelular de células Caco-2 e induzir uma regulação positiva, estimulando a capacidade de secreção de IL-8, um mediador da resposta imune (Ferreira et al. 2014b).

1.3.3. Produção de toxinas

A produção de toxinas é outro mecanismo através do qual algumas bactérias podem estabelecer uma infeção bem-sucedida, podendo induzir diretamente secreções epiteliais, danificar as células epiteliais ou a função da barreira intestinal, recrutar células secundárias ou mediadores, como macrófagos, linfócitos e mastócitos, que desencadeiam secreção intestinal, inflamação e/ou dano. Podem estar associadas à parede celular e serem designadas endotoxinas, como os lipopolissacarídeos (LPS) ou lipoproteínas ligadas à membrana externa, ou serem secretadas pelas bactérias e passando a ser denominadas de exotoxinas (Guerrant et al., 1999; Rudkin et al., 2017).

O efeito citotóxico em *A. butzleri* tem sido descrito por vários autores em diversos isolados desta espécie, bem como em isolados de outras espécies de *Aliarcobacter*, para múltiplas linhas celulares, como Vero, CHO, HeLa, INT407 e HT-29/B6, sugerindo ainda que *A. butzleri* tem capacidade de produzir tanto endotoxinas como exotoxinas (Ferreira et al., 2016; Johnson and Murano, 2002; Musmanno et al., 1997; Villarruel-López et al., 2003).

LPS e lipooligosacarídeos (LOS) são componentes da membrana externa da maioria das bactérias de Gram-negativo, conhecidos por representarem um papel importante na sua patogenicidade, agindo não só como determinantes de virulência, como também lhes

conferindo uma maior resistência a antibióticos, sais biliares ou detergentes. Para além de *clusters* relacionados com a biossíntese de LOS, foi ainda descrita a presença dos genes *waaC* e *waaF* no genoma de *A. butzleri*. O gene *waaC* codifica uma heptosiltransferase envolvida na biossíntese de LOS e *waaF* uma heptosiltransferase lipopolissacarida, responsável por catalisar a transferência de frações de açúcar de moléculas dadoras ativadas para moléculas aceitadoras específicas formando ligações glicosídicas. Desta forma, mutações nestes genes poderiam representar um aumento da sua patogenicidade e uma maior suscetibilidade a detergentes, sais biliares e antibióticos hidrofóbicos, tal como foi descrito em *Campylobacter*, ainda que seja uma hipótese que carece de estudos adicionais (Kanipes et al., 2006).

1.3.4. Motilidade

A motilidade das bactérias permite-lhes detetar sinais ambientais, localizar nutrientes, colonizar os seus nichos preferenciais, invadir as células do hospedeiro, induzir a secreção de proteínas e formação de biofilmes, que no seu conjunto terá uma implicação importante na sua sobrevivência (Haiko and Westerlund-Wikström, 2013; Josenhans and Suerbaum, 2002).

Em *A. butzleri*, bactéria móvel por meio de um único flagelo polar, este é composto por dois segmentos principais. O primeiro engloba diferentes estruturas e proteínas, das quais os anéis da membrana interna, um sistema de secreção do tipo 3, uma haste proximal, um anel na camada de peptidoglicano e na membrana externa, proteínas acessórias descritas em células bacterianas de outros géneros e uma proteína de ligação. O segundo segmento corresponde ao filamento extracelular e é composto por duas subunidades de flagelina, nomeadamente a proteína flagelina principal, FlaA, e a proteína flagelina secundária, FlaB. As flagelinas têm sido descritas como importantes fatores de virulência e alvos primários para o sistema imunológico (Chaban et al., 2018; Isidro et al., 2020; Medina et al., 2019). Num estudo de 2020 com o objetivo de expandir o conhecimento acerca da patogenicidade deste patógeno intestinal, Isidro et al. procederam a uma caracterização do viruloma de *A. butzleri* (Isidro et al., 2020). De acordo com a análise genómica realizada, existem 34 genes que codificam para proteínas flagelares, em que 20 e oito genes estão agrupados em duas regiões genómicas e seis outros genes foram encontrados fora do *cluster*.

A motilidade tem sido associada à migração bacteriana no muco em *C. jejuni*, de forma a alcançar microambientes mais propícios à sua sobrevivência e proliferação. Ainda que não tenha sido comprovada esta correlação entre a motilidade e a viscosidade do meio

em *A. butzleri*, foi descrito mais recentemente que a motilidade flagelar desta espécie é mais condicionada pela viscosidade do meio do que em *C. jejuni* (Chaban et al., 2018). À semelhança do estudado para outros microrganismos, também em *A. butzleri* foi estudada a hipótese de que uma maior motilidade se associar a maiores taxas de invasão (Bruegge et al., 2014).

1.3.5. Produção de biofilmes

Os biofilmes são descritos como comunidades multicelulares organizadas capazes de aderir a superfícies, são consideradas estruturas ubíquas de natureza heterogênea e habitualmente unidas a superfícies bióticas ou abióticas, embora também possam ser encontradas na superfície de líquidos. A matriz de biofilme que envolve as bactérias funciona como um reservatório, aumenta a sua sobrevivência, impede a ação de antibióticos, tem um efeito protetor relativamente aos mecanismos de defesa do hospedeiro, beneficia a sua colonização e torna-as tolerantes a condições adversas e antimicrobianos (Berne et al., 2018; Krzyżek et al., 2020).

Tendo isto em conta, a formação de biofilmes por parte de *A. butzleri* tem sido alvo de estudo, tendo esta bactéria sido isolada de biofilmes de diversas origens, como carapaças de animais, superfícies de instalações, tubagens de água e matadouros. Desde 2009, *A. butzleri* tem sido indicado como um microrganismo formador de biofilmes moderado a fraco por Ferreira e coautores e Kjeldgaard et al., sendo que num estudo deste último autor, foi descrita a capacidade de formar biofilmes numa vasta gama de temperaturas, entre 5 e 37 °C (Ferreira et al., 2013; Kjeldgaard et al., 2009). Mais recentemente, um estudo que incluiu 38 estirpes *A. butzleri* demonstrou uma capacidade de formação de biofilme de 67% em isolados de aves, 62,5% em estirpes isoladas a partir de alimentos de comércio a retalho e 8% em isolados de ambiente de queijaria (Chaves et al., 2021).

Apesar de ter sido detetada em *A. butzleri* a presença de proteínas e genes homólogos relacionados com a produção de biofilmes noutras bactérias, não está ainda explícita a correlação entre essa presença e a sua influência na formação de biofilmes nesta espécie.

1.3.6. Resposta imune do hospedeiro

A entrada de um patógeno gastrointestinal no hospedeiro provoca o início de uma cascata de interações entre o patógeno, o hospedeiro e a microbiota intestinal residente, que tem como objetivo a indução de uma resposta imune adequada. Em mamíferos, o sistema imunológico é subdividido em sistema imune inato e adaptativo. Enquanto a

resposta imune inata proporciona a primeira linha de defesa contra uma infecção bacteriana mediando a morte direta do patógeno ou inibindo a sua replicação através da produção de moléculas imunológicas como citocinas ou quimiocinas, as barreiras físicas do hospedeiro, isto é, a pele e as mucosas, protegem-no contra a entrada de novos patógenos bacterianos. Por outro lado, a imunidade inata estimula a imunidade adaptativa, caracterizada por ser específica do patógeno através de linfócitos T e B, que coordenam uma resposta mais persistente e memorizada (Kumar et al., 2013; Shepherd and McLaren 2020; Kunisawa and Kiyono, 2013).

À semelhança do que se observa para *Campylobacter* (Zilbauer et al., 2008), é sugerido que a resposta imune do hospedeiro contribua para a resolução de infecções por *A. butzleri* em casos de enterite e bacteremia humanos, que têm uma natureza autolimitada, ocorrendo regularmente dias após o início dos sintomas (Fernández et al., 2004; Lappi et al., 2013).

Para além disso, outra resposta imune importante contra infecções bacterianas é dada pela atividade antibacteriana do complemento presente no soro. Ao estudar a suscetibilidade de isolados de *A. butzleri* provenientes de diversas fontes, Wilson et al. (2010) constatou que este microrganismo é altamente suscetível ao soro humano normal, mas que a sua sobrevivência aumenta em soros com níveis deficientes em complemento, demonstrando a importância da atividade biocida mediada pelo complemento (Wilson et al., 2010). A suscetibilidade ao soro em diferentes graus observada pode sugerir que, tal como foi descrito para *C. jejuni*, estirpes de origem sistémica podem ser mais resistentes à atividade biocida do complemento do que estirpes com outra localização (Keo et al., 2011; Ferreira et al., 2016).

A IL-8 é um fator quimiotático com atuação no processo inflamatório recrutando células do sistema imunitário para o local da inflamação, estando a sua secreção associada a sintomatologia de diarreia e eliminação de infecção (Ferreira et al., 2016). Um estudo de 2014, realizado por Ferreira et al., demonstrou uma secreção elevada de IL-8 em células Caco-2 nas seis estirpes de *A. butzleri* em estudo, com uma expressão maior nas estirpes humanas (Ferreira et al., 2014b). Estes resultados mostraram-se independentes da capacidade de adesão e invasão das estirpes em estudo, tal como havia sido observado previamente por Ho et al. (Ho et al., 2007), sugerindo-se que o desenvolvimento de inflamação local pode ser mais conveniente à sobrevivência desta bactéria do que a invasão celular, já que a par do referido, estirpes com maior associação a diarreia persistente possuem menor capacidade de invasão. Para além da produção de IL-8, uma outra investigação, desta vez usando ratinhos deficientes de IL-10, relatou que *A. butzleri* estimula ainda a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1, -6, -12 e TNF- α e que,

apesar de o mecanismo ainda não estar totalmente explícito, o sistema imune inato pode reconhecer este microrganismo através de recetores “*toll like*” (Gölz et al., 2015).

A lactoferrina é uma glicoproteína libertada por neutrófilos quando estes entram em contacto com patógenos invasivos, atuando diretamente na limitação da proliferação microbiana e ajudando na proliferação e diferenciação de células imunitárias do hospedeiro, modulando desta forma a imunidade inata e adaptativa (Adlerova et al., 2008). A lactoferrina tem sido descrita como indicador fecal da inflamação intestinal, útil no prognóstico e monitorização da mesma (Chen et al., 2011). Um estudo acerca da prevalência de *Aliarcobacter* e espécies de outros géneros em amostras fecais demonstrou que 55% das amostras positivas para *A. butzleri* apresentavam níveis elevados de lactoferrina, comprovando a sua associação com a infeção provocada por estas bactérias (Samie et al., 2007).

1.4. Resistência de *Aliarcobacter butzleri*

1.4.1. Resistência de *Aliarcobacter butzleri* a antibióticos

O uso de antibióticos tem reduzido as taxas de mortalidade e morbidade em infeções bacterianas, tornando-se imprescindível do ponto de vista de saúde pública, no sentido em que permite não só prolongar como melhorar a qualidade de vida animal e humana (Radlinski and Conlon, 2018). No entanto, a sua eficácia tem vindo a diminuir ao longo dos anos devido ao uso excessivo de antibióticos na agricultura e medicina humana e veterinária, contribuindo para o aparecimento de microrganismos resistentes aos antimicrobianos. Atualmente, e ainda que tenham começado a ser postos em ação planos de controlo do uso de antibióticos em diversos países, o problema inerente a resistências a antibióticos atingiu proporções inéditas e são agora descritas bactérias com mecanismos de multirresistências, ameaçando severamente a saúde pública (Alam et al., 2019).

Relativamente a espécies do género *Aliarcobacter*, já foram registadas resistências a antimicrobianos tanto de estirpes humanas como animais. Os estudos realizados neste âmbito têm-se focado em estudos de suscetibilidade a antibióticos em três espécies, *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii*, que destacam a resistência intrínseca ao género (Ferreira et al., 2016). A falta de estudos dificulta a avaliação da frequência e tendência da resistência destes microrganismos em todo o mundo, o que sustenta a necessidade de dar continuidade aos estudos desenvolvidos, realizar novas investigações e aprofundar a compreensão dos mecanismos relacionados com a resistência microbiana.

Ainda que as infecções por espécies do género *Aliarcobacter* não requeiram habitualmente o uso de antimicrobianos para a sua resolução devido à natureza autolimitante que as caracteriza, o recurso a estas moléculas pode ser necessário em situações específicas, cujo prolongamento ou gravidade dos sintomas assim o justifiquem (Collado and Figueras, 2011).

Ferreira et al. (2019) procederam a uma revisão sistemática seguida de uma meta-análise, que sintetizou quantitativamente a prevalência geral de resistência antimicrobiana de isolados de *Arcobacter*, considerando a definição histórica do género. Nesta análise foram incluídos os antibióticos mais frequentemente usados no tratamento de infecções por espécies deste género, selecionados de cinco classes de antibióticos distintas. Dos resultados obtidos, foi observado que *Arcobacter* spp. apresentou maior intervalo de resistência, variando entre 69,3 a 99,2%, para as penicilinas enquanto para as cefalosporinas foi constatado um intervalo entre 30,5 e 97,4%. Relativamente à classe das quinolonas, as espécies em estudo apresentaram menor taxa de resistência à norfloxacin e ciprofloxacina, ambas quinolonas de segunda geração, e à levofloxacina, quinolona de terceira geração, comparativamente com o ácido nalidíxico, que se trata de uma quinolona de primeira geração. Considerando a classe dos macrólidos, foram consideradas no estudo a eritromicina, azitromicina e espiramicina, tendo-se obtido taxas de resistência estimadas de 10,7%, 39,8% e 26,5%, respetivamente; por último, o intervalo de resistência a tetraciclina, que variou entre 1,8 e 12,9%, demonstrou ser maior do que o intervalo de resistência a aminoglicosídeos, variando entre 0,8 a 7,1%. Relativamente às taxas de resistência à ciprofloxacina e levofloxacina, e apesar de os resultados deverem ser analisados cuidadosamente devido às variáveis existentes entre estudos, este estudo salientou ainda a tendência crescente de resistência a estas duas moléculas, associando-a à pressão seletiva causada pelo uso generalizado de antibióticos, particularmente na criação de gado, onde o uso de antibióticos é mais frequente (Ferreira et al., 2019b).

No caso particular de uma infecção por *A. butzleri* em que seja recomendado o tratamento com antibióticos, é usual recomendar-se à utilização de fluoroquinolonas, tetraciclina e aminoglicosídeos, como a gentamicina, canamicina e estreptomicina (Chieffi et al., 2020). Contudo, cada vez mais têm vindo a ser descritas resistências desta bactéria a diversos antibióticos, com relatos de que algumas estirpes de *A. butzleri* são resistentes a diversos antibióticos incluindo os recomendados (Dekker et al., 2019; Isidro et al., 2020; Vicente-Martins et al., 2018; Yesilmen et al., 2014). De entre os estudos mencionados, foi descrito uma percentagem de resistência à tetraciclina de 100 e 95,4% e uma variação entre 40,9 e 55,8% de frequência de resistência à ciprofloxacina. No

entanto, as diferenças na frequência de estirpes *A. butzleri* resistentes nestas investigações são bastante acentuadas para a eritromicina (variando entre 0 e 100%), ácido nalidíxico (variando entre 21,9 e 100%) e para o cloranfenicol (variando entre 2,3 e 87,7%).

Recuperando a meta-análise levada a cabo por Ferreira et al. (2019), *A. butzleri* foi a espécie em estudo que demonstrou maior resistência à ampicilina, amoxicilina/ ácido clavulânico, cefalotina, azitromicina e levofloxacin, contrastando com a suscetibilidade observada à eritromicina, gentamicina, tetraciclina, estreptomicina, enrofloxacin e doxiciclina (Ferreira et al., 2019a).

Todavia, torna-se difícil a comparação de resultados de diferentes estudos devido ao número reduzido de estirpes incluídas nas investigações e aos métodos distintos usados para testar a suscetibilidade antimicrobiana. São vários os autores que relatam esta falta de padronização, que prejudica uma avaliação inequívoca e comparável da suscetibilidade antimicrobiana de *A. butzleri*. Apesar disso, é evidente a elevada taxa de multirresistência apresentada por isolados animais e humanos, produtos alimentares e meio ambiente desta espécie, verificando-se taxas que variam entre 20 a 93,8% (Ferreira et al., 2013; Kabeya et al., 2004; Rathlavath et al., 2017; Shah et al., 2013; Šilha et al., 2017; Vicente-Martins et al., 2018).

Assim, importa aprofundar a compreensão dos mecanismos de resistência a antibióticos em *A. butzleri*, de forma a perceber como pode a eficácia de ação dos antimicrobianos ser potenciada e o tratamento da infeção por esta bactéria ser alcançado.

1.4.1.1. Mecanismos de resistência

A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos está a aumentar e a causar preocupação do ponto de vista de saúde pública, traduzindo-se em infeções bacterianas recorrentes e de difícil resolução que requerem antimicrobianos específicos, caros e tóxicos, pelo que a resistência a antibióticos é descrita como um dos grandes problemas em medicina do século XXI (López et al., 2007). Tem sido apontada como causa principal a pressão seletiva criada pelo uso excessivo de antibióticos na medicina veterinária e humana (McDermott et al., 2002), tornando-se importante estudar quais os mecanismos de ação das diferentes classes de antibióticos, bem como os mecanismos de ação que as bactérias abrangem e que se traduzem em mecanismos de resistência.

Os antibióticos pertencentes às diferentes classes podem ter diversos alvos celulares, tais como os processos de tradução, transcrição, replicação do DNA e síntese da parede celular. Cada classe de antibióticos tem habitualmente um alvo específico preferencial,

por exemplo: os β -lactâmicos, onde se incluem as cefalosporinas, carbapenemos e penicilinas, têm como alvo a inibição da síntese da parede celular; por outro lado, os aminoglicosídeos, tetraciclina e macrólidos interferem na síntese de proteínas; as rifamicinas são potentes inibidoras da transcrição; as quinolonas agem como inibidores da síntese de DNA por ligação à enzima DNA girase; e por último, as sulfonamidas são responsáveis pela inibição da síntese de ácido fólico (Petchiappan and Chatterji, 2017).

Em contrapartida, perceber quais os mecanismos de resistência adquiridos pelas bactérias para impedir a ação dos antibióticos das diversas classes, torna-se um passo crucial para o desenvolvimento de medidas de combate a essa resistência. As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a antibióticos, tendo sido identificados nos últimos anos genes responsáveis pela aquisição da resistência, ou podem adquiri-la por mutações cromossômicas e/ ou pela transferência horizontal de genes de outras bactérias (Petchiappan and Chatterji, 2017).

Assim, a resistência a agentes antimicrobianos como forma de sobrevivência das bactérias pode ser desenvolvida por três vias principais, designadamente a modificação do antibiótico, a modificação do alvo do antibiótico ou a alteração da sua concentração intracelular por diminuição do seu influxo ou aumento do seu efluxo (Petchiappan and Chatterji, 2017), como a figura 2 representa.

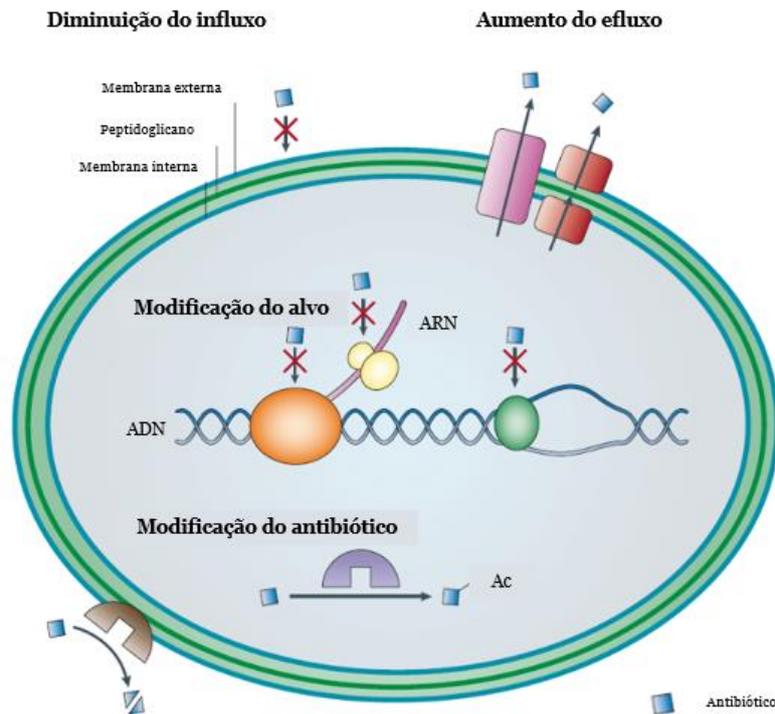


Figura 2 – Representação esquemática dos mecanismos de resistência a antibióticos numa bactéria de Gram-negativo. Adaptado de (Allen et al., 2010).

A modificação de antibióticos é a estratégia de resistência das bactérias em que o objetivo se traduz na sua modificação ou inativação de forma a limitar a ligação da molécula ao seu alvo, por hidrólise através da expressão de enzimas de degradação ou por enzimas que adicionam grupos funcionais ao antibiótico (Petchiappan and Chatterji, 2017). As bactérias contêm genes que codificam para enzimas que atuam no antibiótico, alterando a sua afinidade ao alvo e reduzindo a sua eficácia, sendo este mecanismo característico por induzir resistência a diferentes classes de antibióticos, entre as quais os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, fenicóis e macrólidos. Exemplos concretos destas enzimas são as β -lactamases, que degradam β -lactâmicos, e as fosfotransferases, as acetiltransferases ou nucleotidiltransferases, que têm a capacidade de modificar aminoglicosídeos (Blair et al., 2015).

Outro mecanismo de defesa bacteriano contra a ação de antimicrobianos passa pela modificação dos alvos de antibióticos, podendo dever-se a mutações, modificações ou proteção do alvo de forma a interferir na ligação entre o antibiótico e o alvo. Por um lado, as mutações espontâneas em componentes celulares que, não afetando a sua atividade, podem inibir a ligação do antibiótico, sendo as fluoroquinolonas um exemplo de uma classe de antibióticos onde este mecanismo é aplicado. Por outro lado, as bactérias têm ainda a capacidade de sintetizar moléculas semelhantes ao alvo, que se ligam ao

antibiótico fazendo com que este não se ligue ao alvo original e não exerça a sua função e atividade. Por último, a célula pode ainda ligar grupos funcionais aos alvos do antibiótico, que se tornam uma barreira física à sua ligação, sendo esta a estratégia adotada frequentemente no combate à classe dos macrólidos por parte das bactérias (Petchiappan and Chatterji, 2017).

Para além da presença de genes responsáveis por conferir diferentes capacidades de resistência a antibióticos às bactérias, as diferenças estruturais relativas à parede celular em bactérias de Gram-negativo e de Gram-positivo influenciam a eficácia dos antibióticos. Um dos mecanismos com maior impacto em bactérias de Gram-negativo é a diminuição de permeabilidade devido à presença da membrana externa, que se traduz numa barreira de proteção contra antibióticos hidrofílicos, tratando-se, por isso, de um mecanismo de resistência intrínseco a estas bactérias (Petchiappan and Chatterji, 2017; Peterson and Kaur, 2018). Dependendo do tamanho das moléculas de antibióticos polares, estes podem atravessar a membrana externa e entrar na célula através de difusão por proteínas membranares designadas porinas. Pode acontecer que a entrada de antibiótico na célula seja limitada pela aquisição de mecanismos de regulação da sua passagem, como no caso de regulação negativa de porinas, de mutações nos seus genes ou de substituição destas por canais mais seletivos, provocando uma diminuição do influxo, isto é, da entrada de antibiótico na célula e, conseqüentemente, uma diminuição da sua concentração intracelular (Blair et al., 2015).

O efluxo de antimicrobianos é um outro mecanismo de resistência bacteriana, em que as bombas de efluxo são responsáveis pela exportação de agentes tóxicos da bactéria para o meio extracelular, dos quais se destacam antibióticos, toxinas e metais pesados. Este efluxo pode ser aumentado no caso de mutação que resulta em sobreexpressão destas bombas, fazendo com que um microrganismo que era suscetível a um determinado fármaco, passe a apresentar-lhe resistência. Esta é uma estratégia adotada tanto por bactérias de Gram-negativo como de Gram-positivo, e que pode ocorrer em sinergia com os outros mecanismos descritos, inibindo a atividade do antibiótico no interior da célula (Allen et al., 2010; Peterson and Kaur, 2018).

Um mecanismo de inativação do antibiótico identificado em *A. butzleri*, foi a identificação de três β -lactamases putativas, aquando da primeira sequenciação do genoma de *A. butzleri* RM 4018, trabalho onde também foi descrita a presença do operão *IrgAB* como reforço da resistência a β -lactâmicos, e que foi associado à alteração de tolerância à penicilina em *Staphylococcus* (Miller et al., 2007). Mais recentemente, quando Isidro et al. (2020) procederam à análise de 49 estirpes de *A. butzleri*, foram identificados três genes codificantes para β -lactamases (*bla1-bla3*), estando um deles

potencialmente associado à resistência à ampicilina (*bla3*). Foi ainda proposto que a resistência ao cloranfenicol se deve à presença dos genes *cat3* e *wbpD*, que codificam para a cloranfenicol acetiltransferase, embora não existam evidências que mostrem uma relação direta entre a resistência e a presença do gene (Isidro et al., 2020).

O mecanismo de modificação do alvo do antibiótico pode ainda estar na base da resistência às fluoroquinolonas em *A. butzleri*, tendo esta resistência sido associada a mutações pontuais na região determinante de resistência a quinolonas do gene *gyrA* que codifica uma subunidade da DNA girase (Abdelbaqi et al., 2007; Ferreira et al., 2016). Neste caso, as mutações pontuais referidas, especificamente na posição 254 deste gene, resultaram numa modificação de citosina para timina que originou uma transição de treonina para isoleucina na posição 85 da proteína correspondente (Abdelbaqi et al., 2007). Para além disso, a resistência à eritromicina em *A. butzleri* foi associada a uma truncatura na proteína reguladora TetR relacionada a polimorfismos de um único nucleótido ou inserções, tendo esta sido a primeira descrição de um determinante genético associado a resistência à eritromicina na espécie (Isidro et al., 2020; Ferreira et al., 2021).

Adicionalmente foram sido descritos nos últimos anos outros determinantes de resistência a antimicrobianos no genoma de várias estirpes de *A. butzleri*, como genes homólogos de codificantes de proteínas responsáveis pelo efluxo de macrólidos (*macA* e *macB*), da proteína de resistência à fosmidomicina (*fsr*), da proteína de resistência à tetraciclina (*tetA*), da proteína de resistência à biciclomicina (*bcr*), resistência à polimixina (*arnA*, *arnB*, *eptA*), resistência à metilicina (*hlpA*), resistência à mupirocina (*ileS*), resistência à ciprofloxacina e ampicilina (*relE*), resistência à estreptomicina (*sttH*) e resistência à bacitracina (*uppP*) (Fanelli et al., 2019, 2020; Isidro et al., 2020).

1.4.2. Resistência de *Aliarcobacter butzleri* a metais pesados

Os metais pesados estão presentes no meio ambiente e as atividades geológicas ou antropológicas podem acelerar consideravelmente a sua libertação e acumulação em diversos ambientes, incluindo solos agrícolas e urbanos (Brandt et al., 2010; Zhang et al., 2018). Uma vez que estes compostos não são biodegradáveis, permanecem no meio ambiente por longos períodos de tempo, pelo que a sua exposição constante pode gerar mecanismos de resistência em diversas espécies bacterianas (Xavier et al., 2019).

À semelhança do que acontece para a resistência a antibióticos, também não existem até ao momento protocolos padronizados para testar a suscetibilidade microbiana a metais

pesados, pelo que não estão estabelecidas referências que permitam classificar estirpes bacterianas em resistentes ou sensíveis a metais pesados.

Nos últimos anos tem vindo a ser descrita uma correlação entre a resistência a antibióticos e metais pesados para outras bactérias, como *Salmonella Typhimurium* (Yu et al., 2017), *Listeria monocytogenes* (Mata et al., 2000), *Pseudomonas aeruginosa* (Caille et al., 2007) e *Burkholderia cepacia* (Hayashi et al., 2000). Todavia, em *A. butzleri*, esta tem sido uma temática pouco explorada.

Tendo em conta a exposição das bactérias a metais pesados no meio ambiente, a indução ou co-seleção da resistência a metais pesados e a um ou mais antibióticos pode ser inferida por: (i) resistência por co-seleção quando diferentes genes que codificam para resistência a antibióticos e metais compartilham uma localização próxima, como em elementos genéticos móveis dos quais se destacam os plasmídeos, podendo ser transferidos juntos horizontalmente; (ii) por meio de seleção cruzada, quando o mesmo elemento genético codifica para resistência a antibióticos e metais, como as bombas de efluxo do tipo de resistência a múltiplos fármacos (MDR do inglês *Multidrug Resistance*); (iii) ou via co-regulação, quando genes de resistência a antibióticos e metais partilham o mesmo sistema regulatório (Baker-Austin et al., 2006; Yu et al., 2017). Para além disso, foi sugerido que a produção de biofilme está também envolvida nesta correlação, por ser um ambiente propício à transferência horizontal de genes, por dificultar a difusão de antimicrobianos, onde são englobados tanto antibióticos como metais pesados, e por representar um ambiente complexo, onde estão envolvidos mecanismos adicionais (Chieffi et al., 2020).

Como referido, em *A. butzleri* o conhecimento acerca da suscetibilidade desta espécie a metais pesados é ainda limitado, tendo sido investigado pela primeira vez por Schroeder et al. (1996), que apenas testou a sua suscetibilidade para apenas um sal de um metal pesado (cloreto de cádmio) (Schroeder-Tucker et al., 1996) usando o método de difusão em disco. Também Otth et al. (2005) e Fanelli et al. (2020) avaliaram o perfil de suscetibilidade a metais pelo método de diluição em agar (Fanelli et al., 2020; Otth et al., 2005). Otth et al. (2005), após definirem como ponto de corte de referência valores de concentrações mínimas inibitórias superiores a 1 mM para identificação de uma estirpe *A. butzleri* resistente a metais, classificaram todas as 50 estirpes de *A. butzleri* em estudo como suscetíveis a sais de mercúrio, prata e crómio, e resistentes a sais de níquel, chumbo, ferro, manganês, molibdénio e cobalto. Fanelli et al. (2020) observaram que também as duas estirpes que estudaram demonstraram ser sensíveis ao crómio e cádmio e resistentes aos sais de molibdato, cobalto, zinco e cobre, tendo sugerido que a

resistência a estes metais pode estar correlacionada com a resistência β -lactâmicos, cloranfenicol e tetraciclina.

Para além do supracitado, a análise genómica de diferentes estirpes desta espécie tem fornecido informações adicionais relativas à resistência a metais pesados em *A. butzleri*. Em estudos de Fanelli et al., de 2019 e 2020, foi identificada a presença de 27 genes relacionados com resistência a metais pesados, apesar desta correlação ainda não estar devidamente explícita (Fanelli et al., 2019, 2020). Alguns destes genes relacionam-se com sistemas de bombas de efluxo ou codificam proteínas de transporte, potencialmente conferindo, por exemplo, resistência ao arsénio (*arsB*), mercúrio (*merT*), zinco (*zntB*), cobre (*copA*, *copZ*), ou combinações de dois ou mais metais pesados, como cobalto, zinco, cádmio, prata, cobre, níquel e magnésio (*corC*, *rcnA*, *cadA*, *czcB*, *czcD*, genes relacionados a bombas de efluxo). Além disso, os autores identificaram a presença de genes codificantes para proteínas específicas de resistência a metais, como a proteína arsenato redutase (*arsC*), pressupondo-se estar relacionada à resistência ao arsénio, um repressor transcricional sensível ao cobre (*csor*) e uma cinase (*cusS*) que se podem ser importantes na tolerância ao cobre.

Posteriormente, foi publicado um estudo em que os autores apostaram numa abordagem *in silico* para procederem à previsão de resistência a metais pesados em *A. butzleri*, corroborando os resultados descritos por Fanelli e coautores (Müller et al., 2020b).

Na análise *in silico* supracitada, foi ainda detetada no genoma de estirpes de *A. butzleri* a presença de um sistema de transporte do tipo ABC para o molibdénio, que havia sido já descrito em *E. coli* e *Staphylococcus carnosus* (Neubauer et al., 1999; Rech et al., 1995) e em *A. butzleri* recentemente (Fanelli et al., 2020). Esta evidência, juntamente com o facto de os transportadores do tipo ABC poderem ligar uma grande variedade de compostos, dos quais metais, evidencia uma potencial correlação entre os sistemas de efluxo ABC e processos envolvidos na destoxificação de metais.

Antecipa-se, assim, que, tendo em conta os mecanismos de aquisição de resistência a antimicrobianos por parte das bactérias, associado a uma atividade antrópica cada vez mais arriscada do ponto de vista da poluição ambiental com metais pesados, poderá conduzir a um aumento de microrganismos com resistências simultâneas a antibióticos e a metais pesados.

1.4.3. Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são estruturas proteicas situadas na membrana da célula que têm como função manter compostos tóxicos em níveis que não sejam prejudiciais às bactérias (Sousa et al., 2019).

Apesar de estarem presentes tanto em bactérias de Gram-positivo, como em bactérias de Gram-negativo, a resistência mediada por efluxo em bactérias de Gram-negativo apresenta-se como um problema de maior complexidade devido à estrutura do seu revestimento celular (Petchiappan and Chatterji, 2017). De uma análise genômica, foi constatado que as bombas de efluxo constituem 6 a 18% de todos os transportadores encontrados na bactéria e os genes que codificam para a classe de proteínas que compõem as bombas de efluxo estão sobretudo localizados no cromossoma ou em plasmídeos (Kumar and Schweizer, 2005).

As bombas de efluxo podem ser integradas em seis famílias, descritas em procariontes e representadas na figura 3, com base na similaridade da sua sequência, substrato específico, número de componentes, número de regiões transmembranares e fonte de energia usada: a superfamília “Adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette” (ABC); a superfamília “Major facilitator” (MFS); a família “Resistance-nodulation-cell-division” (RND); a família “Multidrug and toxic compound extrusion” (MATE); a pequena família “Small multidrug resistance” (SMR); e a mais recentemente descrita, a família “Proteobacterial antimicrobial compound efflux” (PACE) (Blanco et al., 2016; Garcia et al., 2022).

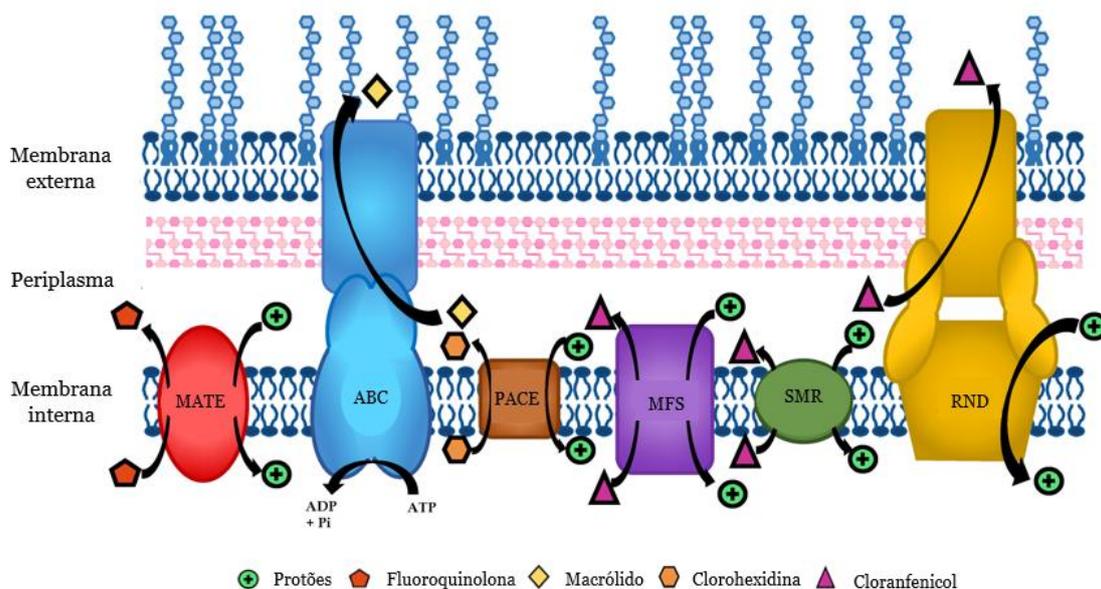


Figura 3 – Ilustração esquemática das seis superfamílias de bombas de efluxo distintas e a sua localização na membrana celular de bactérias de Gram-negativo, com exemplos de sistemas de efluxo identificados na bactéria *Acinetobacter baumannii*. Adaptado de (Kornelsen and Kumar, 2021).

Quanto ao número de componentes que compõe as bombas de efluxo, estas podem ser constituídas por um único componente, como acontece em bactérias de Gram-positivo, em que os sistemas de efluxo compreendem apenas um polipéptido na membrana citoplasmática, ou por múltiplos componentes, como se observa em muitos dos sistemas de efluxo de bactérias de Gram-negativo, como os da família RND que têm uma estrutura tripartida composta por um transportador ativo localizado na membrana interna, uma proteína de fusão de membrana periplasmática e um canal de membrana externa (Fernández and Hancock, 2012). Estes sistemas podem ser classificados como específicos, no caso de expelirem apenas uma classe de antibióticos, ou como bombas de efluxo inespecíficas, que correspondem a bombas de efluxo de resistência a múltiplos fármacos (MDR), que estão associadas não só a resistência a antibióticos, como também de múltiplos substratos, dos quais se destacam biocidas ou sais biliares. Para além de presentes em todas as células vivas, os genes que codificam bombas de efluxo do tipo MDR pertencem ao genoma do núcleo bacteriano, no sentido em que a maioria dos membros de uma determinada espécie abrigam as mesmas bombas de efluxo, e são redundantes, sendo que uma única célula bacteriana geralmente contém mais de 10 bombas de efluxo diferentes (Alcalde-Rico et al., 2016).

Para além disso, uma vez que os substratos são transportados contra um gradiente de concentração, requerendo energia, as bombas de efluxo podem ser classificadas com base na forma como adquirem essa energia em primárias, se retiram energia da hidrólise

de adenosina trifosfato (ATP), ou secundárias, caso a energia seja proveniente de gradientes químicos formados por prótons e íons (Sharma et al., 2019).

Os transportadores da família MFS constituem o sistema de efluxo mais relevante em bactérias de Gram-positivo e exportam compostos, entre eles açúcares, metabolitos, aniões e fármacos, para o meio extracelular através de quatro tipos de transporte: “uniporte”, “simporte” de soluto/ catião (H^+ ou Na^+), “antiporte” de soluto/ H^+ e “antiporte” de soluto/ soluto. Trata-se de uma família grande e diversificada que pode ser dividida em três subfamílias, a DHA1, responsável por exportar açúcares, aminoácidos, gradientes protônicos e antibióticos, a DHA2, que em contraste transporta uma quantidade de substratos mais restrita onde se incluem sais biliares e corantes, e a DHA3, que ao contrário das subfamílias DHA1 e DHA2, que estão presentes em procariontes e eucariontes, se encontra apenas em procariontes e tem a capacidade de expelir antibióticos, como macrólidos e tetraciclinas. Relativamente à sua estrutura, são descritas 12 a 14 hélices transmembranares que formam uma estrutura compacta, com quatro das hélices voltadas para o interior e as restantes a formar uma cavidade interna, responsável pelo transporte de compostos lipofílicos, sendo proposto um modelo de acesso alternado designado de “*rocker-switch*” para o transporte do substrato (Kumar and Schweizer, 2005; Sun et al., 2014).

Os transportadores da família SMR têm um tamanho mais reduzido, consistindo em cerca de 110 resíduos de aminoácidos e contendo quatro hélices transmembranares. Estes realizam a extrusão de compostos, dos quais se destacam corantes, catiões e fármacos, através da força motriz proteômica. Estão presentes em diversas bactérias, pensando-se inicialmente que como trímeros, no entanto, surgiram agora novas evidências que também existem como tetrâmeros (Kumar and Schweizer, 2005).

Anteriormente considerados pertencentes à superfamília MFS, os membros da família MATE são agora reconhecidos como uma família distinta das restantes seis famílias de bombas de efluxo já que, apesar de apresentarem topologia semelhante às proteínas MFS, não apresentam homologia na sua sequência proteica, o que justifica a separação. Estruturalmente, estas proteínas possuem aproximadamente 450 resíduos de aminoácidos e contêm 12 hélices transmembranares. Detêm como característica principal a utilização do gradiente de Na^+ como fonte de energia para transportar corantes catiónicos ou antibióticos, como por exemplo fluoroquinolonas (Kumar and Schweizer, 2005).

As bombas de efluxo da família RND são habitualmente codificadas por genes cromossômicos, apesar de ter sido já relatado um transportador RND num plasmídeo

em *E. coli* (Hansen et al., 2004). Estas bombas de efluxo estão presentes exclusivamente em bactérias de Gram-negativo e o efluxo do substrato é realizado através de um mecanismo de “antiporte” substrato/ H⁺. Entre os substratos destes sistemas temos biocidas, corantes, metais pesados, detergentes, solventes orgânicos, toxinas, subprodutos metabólicos e antibióticos, sendo que todas as bombas desta família estão associadas a transporte de múltiplos compostos, conferindo-lhes um caráter associado a multirresistência a antimicrobianos. Desta forma, as bombas de efluxo da família RND desempenham um papel importante na resistência adquirida e intrínseca de bactérias de Gram-negativo, em sinergia com a barreira desempenhada pela membrana externa. Estes sistemas de efluxo são constituídos por um complexo formado por três proteínas interligadas: uma proteína transportadora de membrana interna com 12 segmentos transmembranares e dois *loops* periplasmáticos, que contêm resíduos de aminoácidos responsáveis pelo reconhecimento de substratos; uma proteína de fusão membranar indispensável ao funcionamento do sistema, e uma proteína de membrana externa. Cada componente deste sistema tripartido é essencial, pelo que a ausência de um dos três torna o complexo disfuncional. Assim, este é um dos sistemas de efluxo de resistência múltipla a fármacos considerado clinicamente mais relevante. Aquando da sua sobreexpressão, as bactérias apresentam níveis de efluxo que se refletem em níveis de resistência significativos, conseguindo exportar uma elevada diversidade de substratos (Kumar and Schweizer, 2005; Puvanendran et al., 2018).

Em 2013, foi demonstrada a presença de uma nova bomba de efluxo em *Acinetobacter*, capaz de transportar para o meio extracelular cloro-hexidina, no entanto, tem sido sugerido que as bombas de efluxo pertencentes à família PACE estão envolvidas em mais do que o efluxo de biocidas (Hassan et al., 2013, 2015). O seu mecanismo ainda não está esclarecido devido à indisponibilidade de informações estruturais para qualquer um dos membros pertencentes a esta família. No entanto, prevê-se que as bombas em questão contenham quatro hélices transmembranares, dispostas em dois domínios de pares transmembranares bacterianos, e que as suas proteínas sejam pequenas e atuem como oligómeros na membrana interna, embora a oligomerização ainda não tenha sido comprovada. Para além disso, foi demonstrado que o transporte através da membrana interna requer a utilização de um gradiente eletroquímico de prótons (Kornelsen and Kumar, 2021).

Por último, as bombas de efluxo da família ABC podem ser divididas em 52 subfamílias e transportam uma grande variedade de substâncias, incluindo açúcares, aminoácidos, iões, fármacos, polissacáridos e proteínas. A particularidade dos transportadores do tipo ABC em relação às demais famílias de bombas de efluxo reside no facto de todos

conterem uma topologia similar, composta por dois domínios transmembranares (TMDs do inglês *transmembrane domains*), que habitualmente formam a via de passagem do substrato, e dois domínios citoplasmáticos de ligação a nucleótidos (NBDs do inglês *nucleotide binding domains*), responsáveis pelo processo energético da bomba, isto é, usam a energia libertada pela hidrólise de ATP para extrudir o substrato através da membrana (Orelle et al., 2019). Trata-se de uma família cujas bombas de efluxo estão presentes em todas as células, mas são raras em bactérias, encontrando-se na membrana plasmática e organelos, sendo a bomba LmrA de *Lactococcus lactis* o exemplo melhor caracterizado. Estas são consideradas transportadores complexos multiproteicos localizados na membrana plasmática da bactéria. O transportador proteico é constituído por quatro domínios distintos, em que dois são domínios transmembranares (TMDs) e os outros dois domínios são domínios de ligação a nucleótidos citoplasmáticos (NBDs), que estão associados entre si, e aos domínios incorporados na membrana. Em bactérias, é frequente estas bombas de efluxo terem um domínio transmembranar fundido a um domínio de ligação a nucleótidos e podem formar homodímeros ou heterodímeros, de acordo com a espécie bacteriana em questão. Ao contrário dos NBDs, os TMDs apresentam alguma variabilidade estrutural entre transportadores ABC, seja na sua sequência primária, tamanho, arquitetura ou número das hélices transmembranares (Moussatova et al., 2008). Ainda que o número de hélices transmembranares possa variar entre oito e 20 para importadores e 12 para exportadores do tipo ABC, são descritos tipicamente seis segmentos transmembranares em exportadores deste tipo (Hollenstein et al., 2007; Jones et al., 2009; Linton and Higgins, 2007). Em contraste, os NBDs são altamente conservados entre transportadores ABC e apresentam os motivos Walker A e B e um motivo de assinatura específico que define a superfamília ABC. Assim, quando se dá a ligação de ATP, a sua hidrólise e consequente libertação de ADP são induzidas alterações conformacionais nos NBDs, cuja energia mecânica é transmitida aos TMDs de forma a translocar o substrato (Moussatova et al., 2008). Assim, é sugerido que consoante a presença ou não de ATP, existam duas conformações principais entre os domínios de ligação a nucleótidos e os domínios transmembranares, opostas e nas quais o sítio de ligação ao substrato é alternativamente acessível para os lados interno e externo da membrana. As duas conformações incluem a formação de um dímero fechado ao ligar duas moléculas ATP e a dissociação num dímero aberto pela hidrólise de ATP e libertação de fosfato inorgânico (Pi) e difosfato de adenosina (ADP). A troca entre as duas conformações induz alterações conformacionais, resultando na translocação do substrato (Kumar and Schweizer, 2005; Orelle et al., 2019) (Figura 4).

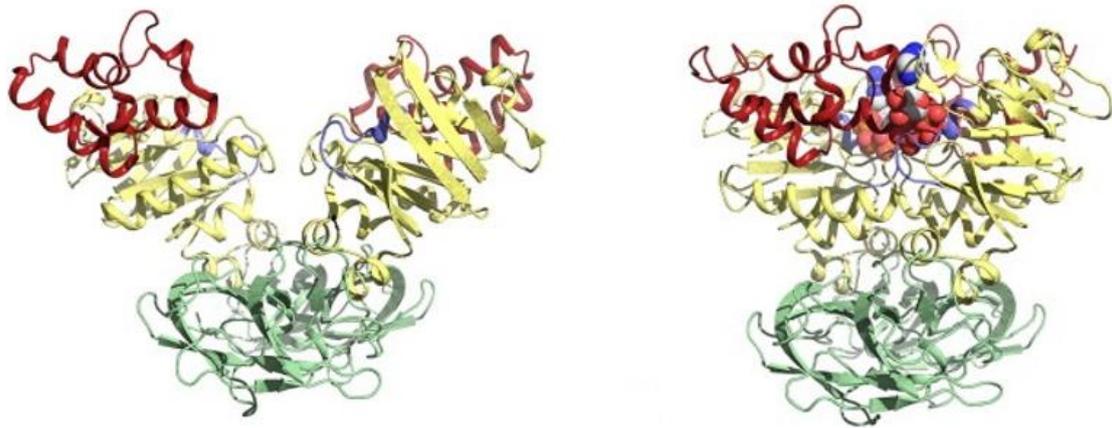


Figura 4 – Ilustração esquemática da troca entre as duas conformações de um transportador do tipo ABC, MalK em *Escherichia coli*, aquando da ligação de ATP. Adaptado de (Moussatova et al., 2008).

Explorando as bombas de efluxo da família ABC, grupo de estudo abordado no presente trabalho, o primeiro transportador caracterizado desta superfamília foi LmrA em *Lactococcus lactis*, que funciona como um homodímero em que cada monómero é constituído por um domínio transmembranar com seis hélices transmembranares e um domínio de ligação a nucleótidos. Já em *E. coli*, a presença deste sistema foi associada a resistência a uma grande diversidade de compostos de diferentes categorias, como etídio, rodamina 6 G e daunorrubicina (Van Veen et al., 1996).

DrrAB é um sistema de efluxo do tipo ABC em *Streptomyces peucetius*, capaz de exportar daunorrubicina e doxorrubicina, dois antibióticos usados como agentes anticancerígenos, produzidos por esta bactéria, Hoechst 33342 e brometo de etídio (Guilfoile and Hutchinson, 1991). Em *Mycobacterium tuberculosis*, foi descrito que o transportador homólogo confere um fenótipo de resistência a vários compostos estruturalmente não relacionados (Choudhuri et al., 2002). No entanto, em contraste com LmrA, onde cada monómero é um domínio transmembranar fundido a um domínio de ligação a nucleótido, DrrA é uma única subunidade de domínio de ligação a nucleótido e DrrB é uma subunidade de domínio transmembranar com oito hélices incorporadas (Ciocchini et al., 2004).

Focando sistemas de efluxo em que os seus domínios formam heterodímeros, o sistema LmrCD é exemplificativo desta situação, e demonstrou ser um importante transportador associado a multirresistência em *L. lactis*, cuja expressão está sob controlo do repressor transcricional LmrR, pelo que a sua ligação a fármacos reduz a afinidade pelo promotor e induz a expressão da bomba de efluxo (Lubelski et al., 2006). Num outro caso, o sistema de efluxo PatAB em *E. coli*, associado a múltipla resistência a antibióticos em

Streptococcus pneumoniae, demonstrou que apenas o heterodímero se torna funcional para o efluxo de antimicrobianos e que PatAB favorece trifosfato de guanosina (GTP) como fonte de energia para a extrusão dos compostos. Curiosamente, em *Streptococcus pneumoniae*, foi observado que também o tratamento com fluoroquinolonas aumentou substancialmente as concentrações de GTP (Orelle et al., 2018; Robertson et al., 2005).

Em *A. butzleri*, foi detetada a presença de um sistema putativo de efluxo (EP10) que partilha homologia com o transportador YbhGFSR descrito previamente em *E. coli* (Isidro et al., 2020; Yamanaka et al., 2016). No caso de *E. coli*, o sítio de ligação ao substrato corresponde à bomba de efluxo YbhFSR, da família de bombas de efluxo ABC, em que a proteína YbhF tem dois NBDs, coincidindo com o domínio de ligação ao nucleótido, enquanto as proteínas YbhS e YbhR correspondem a componentes membranares e YbhG pertence à família de proteínas de fusão de membrana (MFP, do inglês *Membrane Fusion Protein*). No desenvolvimento da investigação em questão, procedeu-se à caracterização do gene *ybhF*, importante para propiciar informações acerca da família de bombas de efluxo ABC. Assim, tendo em conta a estrutura de YbhFSR, este transportador revelou ser um bom modelo para o estudo dos diferentes domínios de um transportador do tipo ABC, da sua interação aquando da ligação de ATP e da translocação do substrato quando a energia é transferida para o TMD (Feng et al., 2020). Para além da informação estrutural, o trabalho de Feng et al. (2020) demonstrou ainda o papel ativo deste transportador no efluxo da tetraciclina e no transporte $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$.

Apesar de a resistência a antibióticos ser alvo de maior atenção quando o tema são as bombas de efluxo, tem sido cada vez mais reconhecido o papel que as estas estruturas podem ter na virulência, como na colonização e sobrevivência da bactéria no hospedeiro (Alcalde-Rico et al., 2016).

Um dos exemplos de mecanismos de patogenicidade associados a bombas de efluxo é a comunicação célula a célula, processo conhecido como *quorum sensing* em bactérias. Durante este processo as moléculas secretadas precisam de atravessar a membrana celular de forma a aumentar a sua concentração extracelular e tem sido sugerido que as bombas de efluxo do tipo MDR podem estar envolvidas nesse transporte. *Pseudomonas aeruginosa* é exemplo de um patógeno capaz de produzir diversos fatores de virulência, muitos dos quais associados ao processo de *quorum sensing*. Alguns trabalhos têm demonstrado que a expressão de diferentes bombas de efluxo, tais como a bomba de efluxo MexAB-OprM do tipo RND, pode ter impacto nas redes de regulação de *quorum sensing* neste microrganismo, tendo mutantes que sobreexpressam esta bomba de efluxo apresentado falhas na produção de vários fatores de virulência e na resposta de *quorum sensing* (Evans et al., 1998). Este evento pode dever-se ao facto de a expressão

constitutiva elevada da bomba de efluxo referida provocar a extrusão do autoindutor 3-oxo-C12-HSL (Alcalde-Rico et al., 2016), capaz de atuar como quimiotático para neutrófilos e induzir a expressão de proteínas de adesão e recetores de imunoglobulinas implicados no reconhecimento e localização de infeções microbianas (Smith et al., 2001; Wagner et al., 2007). Para além disso, pode também induzir a apoptose de neutrófilos e macrófagos (Erickson et al., 2002; Middleton et al., 2002), tendo já sido demonstrado que mutantes de *mexAB-OprM* em *Pseudomonas aeruginosa* são avirulentos em ratos e na linha celular MDCK desta bomba de efluxo (Hirakata et al., 2002).

No caso das bactérias entéricas, foi demonstrado que o efluxo de vários compostos antimicrobianos derivados do hospedeiro, como sais biliares, permite a colonização e promove a adaptação bacteriana ao trato intestinal. O sistema mais bem estudado capaz de conferir resistência aos sais biliares é um sistema de efluxo AcrAB-TolC pertencente à família RND em *E. coli*, que é também um dos principais contribuintes para a resistência intrínseca aos antibióticos neste organismo. Neste caso, foi demonstrado que em modelos animais, *E. coli* com deleção dos genes *acrB* e *acrC* são menos capazes de aderir ou invadir células fagocíticas, e mutantes de *acrB* têm menor capacidade de crescimento em ambiente anaeróbico e motilidade reduzida (Thanassi et al., 1997).

Outro mecanismo que interliga os sistemas de efluxo e a virulência em bactérias está associado com a resposta ao stress oxidativo, produzido no hospedeiro durante a fagocitose. Por exemplo, a bomba de efluxo da família ABC, MacAB, é necessária para a sobrevivência de *Salmonella enterica*, quando esta bactéria é exposta a espécies reativas de oxigénio, tendo sido observado que mutantes do gene *macAB* demonstram uma diminuição do seu crescimento na presença destas espécies reativas, comparativamente com a estirpe nativa (Bogomolnaya et al., 2013).

As bombas de efluxo podem ter um impacto direto na virulência, onde se destaca o caso de *Mycobacterium tuberculosis*, cujo genoma codifica para 13 proteínas do tipo RND, designadas como MmpL, implicadas no transporte de lípidos a serem incorporados na parede celular, fornecendo proteção contra agentes externos e contribuindo para a sua virulência (Neyrolles and Guilhot, 2011).

Tendo em conta o potencial papel dos sistemas de efluxo na resistência a antimicrobianos em *A. butzleri*, Isidro et al. (2020) procedeu recentemente à análise comparativa do genoma de 49 estirpes desta espécie, tendo sido detetada a presença de 19 sistemas putativos de efluxo pertencentes a diferentes famílias e envolvendo um total de 56 genes (Isidro et al., 2020). Dez desses sistemas encontraram-se presentes em todos genomas, contrastando com os restantes nove, dos quais três pertencentes à família ABC e dois à

família RND de bombas de efluxo, que se apresentaram apenas em algumas estirpes. Neste estudo, foi estabelecida a função ou homologia prevista para cada gene, tendo sido possível sugerir uma associação entre mutações que levaram à codificação de uma proteína truncada do regulador transcricional associado ao sistema EP16 do tipo RND, TetR, e a resistência à eritromicina, demonstrando pela primeira vez a relação entre o sistema EP16 e a resistência à eritromicina (Isidro et al., 2020). De facto, este estudo veio destacar o potencial envolvimento das bombas de efluxo na resistência a antimicrobianos em *A. butzleri*. Este potencial foi reforçado pela correlação da inibição dos sistemas de efluxo da bactéria, usando um inibidor de bombas de efluxo, com uma diminuição da resistência a antibióticos (Ferreira et al., 2021).

A contribuição fisiológica do sistema de efluxo pertencente à família RND, AreABC (EP16), previamente associado à resistência à eritromicina, para a resistência antimicrobiana de *A. butzleri* foi posteriormente explorada. Neste estudo foi possível identificar *areR* (da família tetR) como regulador transcricional putativo, associado em particular à resistência aos macrólidos. Para além de evidenciar a elevada diversidade de substratos da bomba de efluxo AreABC, este trabalho destacou de forma geral as bombas de efluxo como elementos importantes no desenvolvimento de resistência a múltiplos antimicrobianos em *A. butzleri* (Ferreira et al., 2021).

No seguimento da avaliação da contribuição na resistência e virulência de sistemas de efluxo pertencentes à família RND, foram construídos mutantes para três sistemas de efluxo, AreABC, AreDEF e AreGHI, através da inativação do gene que codifica a proteína da membrana interna desses sistemas (Mateus et al., 2021b). Quanto ao perfil de resistência bacteriana, foi observado que os mutantes das três bombas de efluxo foram mais suscetíveis a antibióticos, biocidas ou sais biliares do que a estirpe parental, bem como apresentaram uma maior acumulação de brometo de etídio, inferindo-se um potencial papel das três bombas de efluxo na extrusão de diferentes antimicrobianos. No que toca à virulência bacteriana, apesar de o crescimento bacteriano não ter sofrido diminuição, foi observado um aumento na suscetibilidade ao stresse oxidativo, enquanto apenas o mutante para a bomba de efluxo AreGHI mostrou um papel relevante na sobrevivência ao stresse biliar. Para além disso, todas as estirpes mutantes evidenciaram um comprometimento na capacidade de formação de biofilmes, foram mais suscetíveis ao soro humano e tornaram-se menos aderentes às células epiteliais intestinais Caco-2 (Mateus et al., 2021b). Estes resultados apontam uma vez mais para uma contribuição destes sistemas de efluxo não só na resistência antimicrobiana de *A. butzleri*, como também na sua virulência.

Para além da constatação da presença de vários genes codificantes para bombas de efluxo das diferentes famílias, obtida pela análise das sequências disponíveis em bancos de dados públicos, a sequenciação de um maior número de genomas de *A. butzleri* tem permitido aprofundar o conhecimento acerca do efluxo como mecanismo de resistência desta espécie a vários antimicrobianos. Apesar disso, muito acerca deste mecanismo está ainda inexplorado e insuficientemente compreendido, pelo que o foco do papel potencial que as bombas de efluxo podem ter na resistência e virulência de *A. butzleri* se destaca cada vez mais como de extrema relevância para o combate ao crescimento exponencial observado atualmente de microrganismos multirresistentes, e, conseqüentemente, com impacto futuro na medicina veterinária e humana.

É perceptível que as bombas de efluxo possuem um papel importante no desenvolvimento de resistências a antimicrobianos, pelo que se torna crucial dar continuidade aos estudos de compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de aquisição de resistência bacteriana, contrariando o desconhecimento e inexploração associados a esta temática.

Capítulo 2 - Objetivos

Aliarcobacter butzleri é um enteropatógeno emergente largamente distribuído em diversos ambientes e/ou hospedeiros. Em humanos associa-se a casos de enterites e bacteremias, tendo sido incluído na lista de microrganismos considerados como um perigo moderado para a saúde humana. Apesar de ser descrito um aumento da sua multirresistência a antimicrobianos, comprometendo, assim, o tratamento de infecções graves causadas por esta bactéria e contribuindo para a disseminação de resistências, os mecanismos envolvidos na resistência e virulência de *A. butzleri* permanecem inexplorados. A análise de 49 genomas de *A. butzleri* efetuada previamente pelo grupo sugere a presença de diversos sistemas putativos de efluxo no seu genoma, com relevância não só na resistência, como também na virulência da bactéria. Assim, o objetivo deste trabalho de investigação passou pela avaliação do papel de bombas de efluxo na resistência e virulência de *A. butzleri*, com foco na caracterização funcional de uma bomba de efluxo do tipo ABC, visando elucidar o seu potencial impacto não só na resistência ou tolerância a diversos antimicrobianos, como também em características fisiológicas da bactéria e associadas à virulência.

Para dar resposta ao objetivo proposto, definiram-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o perfil de resistência de 24 estirpes de *A. butzleri* a diferentes antimicrobianos;
- Construir uma estirpe mutante através da interrupção do gene codificante da proteína associada à ligação de ATP no transportador YbhFSR, o gene *ybhF*, por uma cassette de resistência a um antibiótico;
- Analisar a influência da interrupção do gene *ybhF* no crescimento bacteriano, comparativamente com o crescimento apresentado pela estirpe parental;
- Avaliar o efeito da inativação do gene *ybhF* na resistência de *A. butzleri* a antibióticos, metais pesados e biocidas, e na acumulação intracelular de compostos;
- Avaliar o impacto da deleção do gene *ybhF* em diversos mecanismos de virulência de *A. butzleri*, nomeadamente na motilidade, capacidade de formação de biofilme, suscetibilidade ao stress oxidativo e ao soro humano e capacidade de adesão e invasão *in vitro* na linha celular epitelial intestinal humana Caco-2.

Capítulo 3 – Materiais e Métodos

3.1. Estirpes bacterianas incluídas no estudo

Para avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de *A. butzleri*, foram selecionadas 24 estirpes de diversas origens (Tabela 2). A escolha das estirpes teve como objetivo a obtenção de representatividade de estirpes de *A. butzleri* de diversas origens no estudo. Assim, tendo sido selecionadas estirpes de vários ambientes e amostras, como ambientes de matadouros e amostras de aves (Ferreira et al., 2013), carnes e vegetais prontos a consumir (Vicente-Martins et al., 2018), leite cru e amostras de ambiente de fábricas de laticínios (Ferreira et al., 2017a), isolados de águas de rios (Isidro et al., 2020) e isolados humanos, cujos genomas foram recentemente sequenciados no trabalho de Isidro et al. (2020), excetuando os isolados humanos *INSA 2808*, *INSA 3800* e *INSA 4015*. Para além disso, o estudo supracitado de Isidro et al. (2020) demonstrou em 21 das estirpes incluídas neste trabalho uma ampla gama de perfis de resistência e detetou a presença de um elevado número de genes codificantes para sistemas putativos de efluxo de diferentes famílias (Isidro et al., 2020).

Das estirpes em estudo, *A. butzleri* AB 28/11 foi a estirpe selecionada para proceder à avaliação do papel das bombas de efluxo na virulência e resistência antimicrobiana, através da construção de uma estirpe mutante. A seleção desta estirpe deve-se a: (i) ao seu perfil de resistência a antimicrobianos, (ii) à presença de diversos sistemas putativos de efluxo no seu genoma, nomeadamente a bomba de efluxo EP10 de interesse no presente trabalho e homóloga à bomba YbhFSR, (iii) e ao facto de ser uma estirpe naturalmente transformável (Bonifácio et al., 2021; Isidro et al., 2020).

Tabela 2 – Identificação, origem e data de isolamento das 24 estirpes de *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo.

| Nome da estirpe | Origem | Data de isolamento | Referência |
|-----------------|--|--------------------|--------------------------------|
| 2003/1426* | Fezes diarreicas humanas | 2003 | (Ferreira et al., 2014) |
| INSA 2808 | Pneumonia adquirida na comunidade e insuficiência cardíaca aguda descompensada | 2017 | Não publicado |
| INSA 3800 | Leucopenia humana | 2019 | Não publicado |
| INSA 4015 | Fezes diarreicas humanas, vômitos e cólicas abdominais | 2020 | Não publicado |
| A 10-3* | Águas fluviiais | 2016 | (Isidro et al., 2020) |
| A 11-1* | Águas fluviiais | 2016 | (Isidro et al., 2020) |
| AB 17/11* | Superfície de equipamento de matadouro de aves | 2011 | (Ferreira et al., 2013) |
| AB 22/11* | Superfície de matadouro | 2011 | (Ferreira et al., 2013) |
| AB 28/11* | Carcaça de aves | 2011 | (Ferreira et al., 2013) |
| AB 42/11* | Carcaça de aves | 2011 | (Ferreira et al., 2013) |
| AB 45/11* | Carcaça (rebanho) | 2011 | (Ferreira et al., 2013) |
| CR 42-4* | Carne de aves | 2015 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| CR 46-1* | Peixe | 2015 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| CR 50-2* | Carne de aves | 2015 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| CR 60-4* | Carne bovina | 2015 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| CR 64-1* | Carne de aves | 2015 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| CR 89-1* | Carne de aves | 2016 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| CR 89-2* | Carne de aves | 2016 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| CR 113-2* | Legumes prontos para consumo | 2016 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| CR 114-3* | Carne de aves | 2016 | (Vicente-Martins et al., 2018) |
| DQ 20dA1* | Leite de cabra | 2015 | (Ferreira et al., 2017a) |
| DQ 31A1* | Leite de ovelha | 2015 | (Ferreira et al., 2017a) |
| DQ 40A1* | Superfície de equipamento de fábrica de laticínios | 2015 | (Ferreira et al., 2017a) |
| DQ 64A1* | Superfície de equipamento de fábrica de laticínios | 2015 | (Ferreira et al., 2017a) |

*Estirpes com sequenciação total do genoma

Para além das estirpes de *A. butzleri* referidas, foi usada uma estirpe de *Escherichia coli* contendo o plasmídeo pUC18-K2 e a estirpe de *E. coli* ATCC 25922 como controlo de ensaios de determinação da concentração mínima inibitória (CMI) dos antimicrobianos testados no estudo.

3.1.1. Condições de armazenamento e crescimento das estirpes

As estirpes foram preservadas em tubos criogênicos em meio Brain Heart Infusion (BHI) com 20% (v/v) de glicerol à temperatura de -80 °C. Aquando da utilização das estirpes, estas foram inoculadas em meio Tryptone Soy Agar (TSA) e incubadas em condições de aerobiose a 30 °C durante 24 a 48 horas. Após incubação, as placas inoculadas foram guardadas a 4 °C, por um período máximo de duas semanas.

Antes de cada ensaio, cada estirpe foi previamente inoculada em meio TSA por 24 horas a 30 °C em condições de aerobiose.

No caso dos ensaios de virulência, decorridas as 24 horas, foram realizadas pré-culturas com 16 horas em 10 mL de Tryptone Soy Broth (TSB) com uma densidade ótica a 620 nm (DO_{620nm}) inicial de 0,02 e incubadas num agitador orbital a 30 °C e 100 rpm, em aerobiose.

Para determinação das curvas de crescimento das estirpes em estudo, após o processo descrito para os ensaios de virulência, cada pré-cultura foi usada para iniciar 20 mL da cultura correspondente com uma DO_{620nm} inicial de 0,02, tendo as culturas sido incubadas nas mesmas condições que as pré-culturas até findo o ensaio.

Para determinação do perfil de acumulação de brometo de etídio de cada estirpe, culturas a meio da fase exponencial de crescimento bacteriano de cada estirpe foram preparadas.

3.1.2. Construção da estirpe mutante de efluxo de *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11

Para proceder à avaliação da função da bomba de efluxo YbhFSR em estudo, foi construída uma estirpe mutante da estirpe de *A. butzleri* AB 28/11 por mutagénesis insercional. Para que fosse possível inativar a bomba de efluxo em questão de forma a avaliar o seu contributo na resistência e virulência desta bactéria, o gene *ybhF* (Figura 5) foi interrompido por um fragmento que contém uma cassete de resistência à canamicina *aphA-3*, presente no plasmídeo pUC18-K2 em *E. coli*.

Assim, foi necessária a construção de um fragmento de DNA exógeno contendo regiões homólogas às regiões a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *ybhF*, flanqueando a cassete *aphA-3*, e a sua incorporação no genoma bacteriano pelo processo de transformação natural.

EP10 YbhFSR



Figura 5 – Organização genômica da bomba de efluxo YbhFSR. Estão apresentadas *open reading frames* com a sua direção de transcrição indicada pelas setas, estando abaixo das setas indicado o locus de *Aliarcobacter butzleri* RM 4018. A amarelo está marcado o gene responsável pelo processo energético da bomba de efluxo em estudo.

3.1.2.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi necessária para proceder à amplificação das regiões a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *ybhF*, para que fossem obtidos os fragmentos de hibridização com a cassette *aphA-3*.

Para isso, a estirpe AB 28/11 foi inoculada em meio TSA suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado e incubada a 30 °C durante 24 horas. Decorridas 24 horas, a biomassa celular foi ressuspensa em água mili Q estéril e a extração do DNA genômico foi realizado de acordo com as indicações do fabricante do kit usado, Genomic DNA Kit Bacteria (Grisp, Portugal), tendo posteriormente sido determinada a sua concentração e pureza num nanoespectrofotómetro (IMPLEN, Alemanha).

3.1.2.2. Obtenção do fragmento de DNA transformante

Uma vez que o plasmídeo pUC18-K2 presente em *Escherichia coli* contém a cassette *aphA-3*, responsável por conferir resistência à canamicina, procedeu-se à sua produção e extração através de um kit comercial.

Assim, estirpe de *E. coli*, portadora do plasmídeo pUC18-K2, foi inoculada em meio Luria Bertani (LB) agar com 30 µg/mL de canamicina, e incubada durante 24 horas a 37 °C, em condições de aerobiose. Posto isto, foi necessário realizar uma pré-cultura da estirpe em 62,5 mL de meio líquido Terrific Broth (TB) (24 g/L de extrato de levedura, 12 g/L de triptona, 5 g/L de glicerol, 0,72 M de fosfato dipotássico) e suplementado com 30 µg/mL de canamicina. A pré-cultura foi incubada num agitador orbital a 37 °C e agitação de 250rpm, até ter sido atingida a densidade ótica a 600 nm (DO_{600nm}) de 2,6. A partir da pré-cultura, foi iniciada uma cultura com DO_{600nm} inicial de 0,2 em 125 mL no mesmo meio, durante 16 horas e nas condições usadas na pré-cultura.

Seguidamente ao processo de crescimento da estirpe de *E. coli*, as células provenientes da cultura realizada foram recuperadas através de centrifugação (Hettich, Mikro 200R) a 5500

×g, durante 20 minutos a 4 °C, tendo o sobrenadante sido descartado e o depósito celular usado para extração do plasmídeo, com recurso ao kit MaxiPrep (NZYtech, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. O plasmídeo obtido foi depois quantificado e a sua pureza foi determinada num nanoespectrofotómetro.

Extraído o plasmídeo pUC18-K2, este foi digerido usando as enzimas de restrição BamHI e KpnI para obtenção da cassette *aphA-3*, situada entre os dois sítios de restrição (Figura 6).

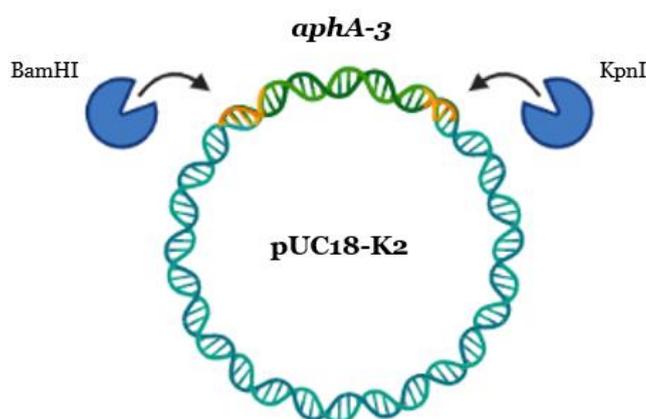


Figura 6 – Representação esquemática da digestão do plasmídeo pUC18-K2 de *Escherichia coli* pelas enzimas de restrição BamHI e KpnI para obtenção da cassette *aphA-3*.

Para a digestão do plasmídeo, foi realizada uma mistura reacional num volume final de 20 µL, composta por 10 U de cada uma das enzimas, BamHI e KpnI (Bioron, Alemanha), 2 µL de tampão K (10×) (Bioron, Alemanha) e 2 µg de plasmídeo purificado, completando-se o volume com água ultrapura. A reação foi incubada a 37 °C durante 1 hora (Biorad, Thermal Cycler, Estados Unidos da América), tendo a digestão enzimática sido verificada através da realização de uma eletroforese em gel de agarose de 0,6% (m/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) a 1×, corado com Green Safe Premium (NZYtech, Portugal). O produto da digestão foi aplicado no gel, bem como o marcador de peso molecular, e a corrida decorreu durante 30 minutos a 120 V. Depois do gel ter sido revelado sob luz ultravioleta num transiluminador (UVITEC, Reino Unido), a banda de tamanho correspondente à cassette *aphA-3* foi excisada e purificada utilizando o kit GRS PCR & Gel Band Purification (Grisp, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. Por último, foi determinada a concentração da cassette obtida e a sua pureza num nanoespectrofotómetro.

De forma a favorecer o processo de recombinação homóloga, a cassette *aphA-3* purificada deve ser flanqueada por regiões homólogas às do gene que se pretende inativar.

Para isso, foi necessário proceder à amplificação da região a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *ybhF* por reações em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “*Polymerase chain reaction*”), usando os seus oligonucleótidos iniciadores (Tabela 3). Adicionalmente, para que a hibridização destes fragmentos com a cassette se processasse de forma eficaz, foram adicionadas pequenas sequências complementares aos oligonucleótidos iniciadores, que facilitaram a união destes com a cassette de resistência à canamicina *aphA-3*, por complementaridade. Assim, a amplificação dos fragmentos do gene *ybhF* foi efetuada através da utilização de dois conjuntos de oligonucleótidos iniciadores: *ybhF_A1* e *ybhF_A2* para amplificação da região a jusante do codão de iniciação, relativo ao Fragmento A, e *ybhF_B1* e *ybhF_B2* para amplificação da região do codão stop do gene *ybhF*, correspondente ao Fragmento B (Figura 7).

Tabela 3 – Identificação da sequência de cada oligonucleótido iniciador usado para amplificação dos fragmentos hibridizantes, e tamanho do fragmento correspondente amplificado.

| Fragmento hibridizante | Designação do oligonucleótido iniciador | Sequência do oligonucleótido iniciador (5' para 3') | Tamanho do fragmento (pb) |
|------------------------|---|---|---------------------------|
| Fragmento A | <i>ybhF_A1</i> | AGC CCC TAC TTT TGG TGA ATT | 438 |
| | <i>ybhF_A2</i> | <i>TTA TTC CTC CTA GTT AGT CAT CAC AAT</i> TTT GAG CCT CAT CCA | |
| Fragmento B | <i>ybhF_B1</i> | <i>TAC CTG GAG GGA ATA ATG AAC TCT ATT</i> GGT TAT ATG GCG CA | 220 |
| | <i>ybhF_B2</i> | ACA GAA CAT GCA AGT GAG AGT C | |

Nota: Encontram-se identificadas a itálico as sequências adaptadoras para ligação à cassette de resistência *aphA-3*.



Figura 7 – Representação esquemática da construção dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*, Fragmentos A e B. A amarelo encontram-se representados os adaptadores adicionados aos oligonucleótidos iniciadores de forma a permitir a hibridização nas regiões que flanqueiam a cassette *aphA-3*.

A mistura reacional necessária à amplificação dos fragmentos foi composta por 4 μL de Phusion HF Buffer (5 \times) (Thermo Fisher Scientific), 0,2 mM de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs), 0,5 μM de cada oligonucleótido iniciador correspondente a cada par (ybhF_A1 e ybhF_A2 para amplificação do Fragmento A ou ybhF_B1 e ybhF_B2 para amplificação do Fragmento B, Tabela 2), 0,4 U da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μL) (Thermo Fisher Scientific), 2 μL de DNA genómico (gDNA) da estirpe *A. butzleri* AB 28/11, e água ultrapura até perfazer um volume de 20 μL .

Depois de preparadas, as misturas reacionais foram incubadas num termociclador de acordo com um programa constituído por diversos ciclos a diferentes temperaturas, otimizado para cada reação. O programa otimizado começou pelo passo de desnaturação inicial a 98 °C durante 30 segundos, seguido de 30 ciclos compostos por um passo de desnaturação a 98 °C durante 10 segundos, um passo de hibridização a 59 °C durante 15 segundos e um passo de extensão a 72 °C durante 15 segundos, e, por último, terminou com uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos.

De seguida, os produtos amplificados foram carregados num gel de agarose 1% (m/v) em tampão TAE (1 \times), corado com Green Safe Premium, assim como um marcador de pesos moleculares. A corrida da eletroforese decorreu durante 30 minutos a 120 V, tendo, posteriormente, o gel sido revelado sob luz ultravioleta num transiluminador para confirmação da presença das bandas de tamanho correspondente à amplificação de cada um dos fragmentos.

Seguiu-se a purificação dos produtos de PCR amplificados a partir de várias reações, correspondentes aos Fragmentos A e B, com o kit GRS PCR & Gel Band Purification (Grisp, Portugal) segundo as instruções do fabricante, e a determinação da sua concentração e pureza num nanoespectrofotómetro.

A etapa de construção do fragmento de DNA transformante, correspondente ao Fragmento C, terminou com a ligação dos fragmentos hibridizantes, Fragmentos A e B, com a cassette *aphA-3*, baseada na homologia criada entre as extremidades dos produtos de PCR amplificados e a cassette (Figura 8).

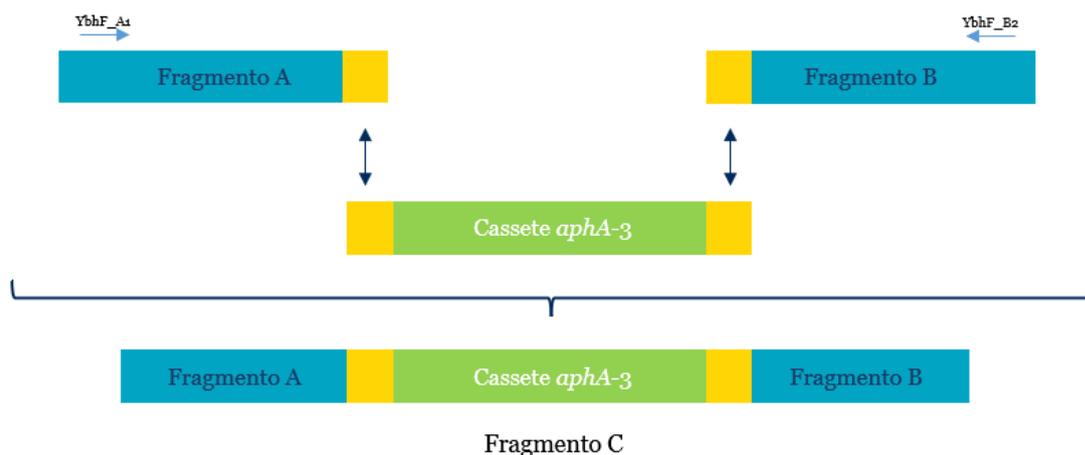


Figura 8 – Representação esquemática da construção do fragmento de DNA transformante, Fragmento C.

A ligação do fragmento a jusante do codão de iniciação (Fragmento A) com a cassete *aphA-3* e o fragmento a montante do codão stop (Fragmento B) foi realizada pela técnica de PCR. Para tal, foi preparada uma mistura reacional constituída por 4 μL de Phusion HF Buffer (5 \times), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 μM do oligonucleótido iniciador *ybhF_A1* e *ybhF_B2*, 0,4 U da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/ μL), 25 ng de cada um dos produtos de PCR purificados (Fragmentos A e B), 25 ng de cassete *aphA-3* purificada, e água ultrapura até totalizar um volume final de 20 μL .

À semelhança do sucedido para a amplificação dos fragmentos hibridizantes, também a mistura reacional associada à amplificação do Fragmento C foi incubada num termociclador e sujeita a um programa otimizado para a reação em causa, que incluiu uma desnaturação inicial a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 segundos, seguida de 35 ciclos compostos por um passo inicial de desnaturação a 98 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 segundos, hibridização a 59 $^{\circ}\text{C}$ durante 15 segundos e um passo de extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 90 segundos, tendo, por fim, sido complementado com um passo de desnaturação final a 72 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos.

De forma a confirmar a presença da banda de tamanho correspondente ao produto de amplificação da junção dos Fragmentos A e B com a cassete, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (m/v), tendo o gel sido revelado como descrito anteriormente.

No passo seguinte procedeu-se à purificação do Fragmento C com o kit GRS PCR & Gel Band Purification (Grisp, Portugal) de acordo as instruções do fabricante. Após purificação, a amostra obtida foi quantificada com o auxílio de um nanoespectrofotómetro, bem como foi avaliada a sua pureza.

3.1.2.3. Transformação Natural

Com o objetivo de avaliar a função de uma bomba de efluxo numa estirpe, pode construir-se uma estirpe mutante do gene dessa bomba ou de uma subunidade da mesma. Neste trabalho, a avaliação da contribuição da bomba de efluxo YbhFSR na resistência e virulência de *A. butzleri* foi realizada através da construção de um mutante onde existe a interrupção do gene *ybhF*, o gene responsável pelo processo energético da bomba em estudo, de forma a inativar a bomba de efluxo em questão e dar resposta ao objetivo principal. Assim, foi construída a estirpe mutante da bomba de efluxo YbhFSR em que, por mutagênese insercional, o gene *ybhF* foi interrompido por uma cassette de resistência a um antibiótico, e o DNA exógeno, isto é, o DNA transformante previamente desenvolvido, foi incorporado no genoma da estirpe *A. butzleri* AB 28/11 através do processo de transformação natural (Figura 9).

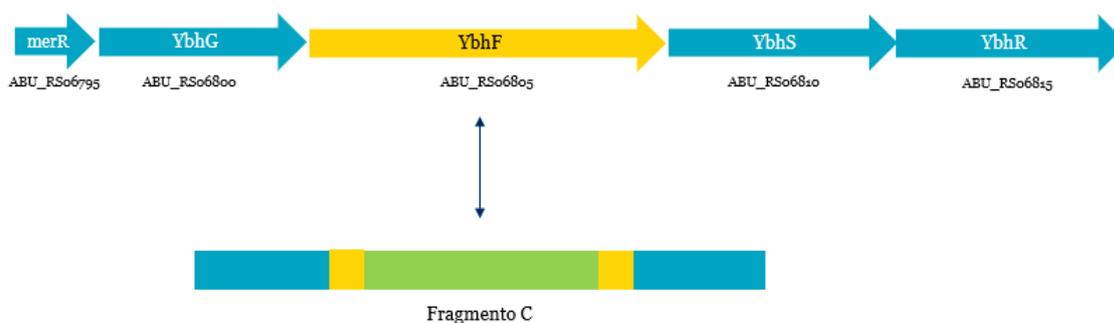


Figura 9 – Representação esquemática da interrupção do gene *ybhF* pelo fragmento de DNA transformante.

O processo de transformação natural em meio sólido foi iniciado pela inoculação da estirpe *A. butzleri* AB 28/11 em meio TSA suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado e a sua incubação a 30 °C durante 24 horas em atmosfera de microaerofilia, constituída por 6% de O₂, ± 7,1% de CO₂ e 3,6% de H₂ (Anoxomat AN2CTS, Mart Microbiology B.V., Alemanha). Volvidas 24 horas, a biomassa foi ressuspensa em 200 µL de meio TSB e, posteriormente, foi preparada uma suspensão com 5 x 10⁹ Unidade Formadora de Colónias por mL (UFC/mL) em 200 µL de TSB. A suspensão preparada foi transferida para uma nova placa de meio TSA suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado, e esta foi incubada durante 4 horas a 30 °C, em condições de microaerofilia. Após este período, procedeu-se à aplicação de cerca de 2,5 µg de DNA transformante previamente obtido, e cuja construção se encontra descrita no ponto 3.1.2.2., e de 40 µL de água ultrapura estéril, como controlo negativo, em duas zonas distintas da superfície da placa incubada. A placa foi, de seguida, reincubada nas mesmas condições por 8 horas. Seguidamente, as células

relativas ao ensaio, bem como as células do controlo negativo, foram transferidas para uma nova placa de meio TSA suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado, que foi incubada a 30 °C em microaerofilia durante 18 horas. Para terminar o processo de transformação natural, ressuspenderam-se as células em 200 µL de meio TSB, tendo a suspensão sido aplicada numa nova placa de meio TSA suplementada com 5% de sangue de cavalo e 50 µg/mL de canamicina, pela técnica de espalhamento. A placa inoculada foi, por fim, incubada nas mesmas condições de temperatura e atmosfera dos restantes passos do ensaio, durante 5 dias, tempo após o qual foi observada para a presença de colónias representativas de mutantes.

3.1.2.4. Confirmação da mutagénese

Realizado o processo de transformação natural, importou verificar se a interrupção do gene *ybhF* da bomba de efluxo em estudo foi eficaz.

Inicialmente, foram selecionadas algumas das colónias isoladas da placa de meio de TSA suplementada com sangue e antibiótico proveniente do último passo do processo de transformação natural para uma nova placa de meio com composição semelhante para aumento da biomassa, tendo esta sido incubada a 30 °C por 24 horas sob condições de microaerofilia. Posto isto, as células foram ressuspensas em 200 µL de água ultrapura estéril de forma a dar início ao método de extração de gDNA por fervura. Este procedimento consistiu na incubação da suspensão efetuada a 100 °C durante 10 minutos e na sua centrifugação a 8000 ×g durante 3 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido e usado num PCR para amplificação do gene em estudo e, conseqüentemente, para verificação da inserção do DNA transformante no genoma da estirpe usada.

A mistura reacional foi composta por 4 µL de Phusion HF Buffer (5×), 0,2 mM de dNTPs, 0,5 µM do oligonucleótido iniciador *ybhF_A1* e *ybhF_B2*, 0,4 U da enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/µL), 2 µL de gDNA da estirpe transformada, tendo-se ajustado o volume final de 20 µL com água ultrapura. Adicionalmente, e como controlo positivo da reação, foi usado gDNA da estirpe parental em estudo. As reações foram incubadas num termociclador e sujeitas ao programa descrito para amplificação do Fragmento C.

Com o objetivo de proceder à análise e comparação dos tamanhos das sequências amplificadas para a estirpe mutante e parental, os produtos obtidos do último passo referido, bem como o marcador de pesos moleculares, foram carregados num gel de agarose de 1% (m/v) e revelado como descrito anteriormente.

Analisado o gel, as estirpes mutantes foram armazenadas de acordo com o procedimento descrito no ponto 3.1.1., para a sua utilização nos ensaios subsequentes.

Complementarmente, a região específica do gene *ybhF* em estudo no genoma da estirpe mutante foi sujeita à técnica de sequenciação pelo método de Sanger para comprovação da mutação provocada aquando da execução do processo de transformação natural.

3.2. Análise Bioinformática da bomba de efluxo YbhFSR

Antes de iniciar a análise bioinformática do sistema YbhFSR, as sequências nucleotídicas foram traduzidas em sequências proteicas através da ferramenta online ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>), de forma a poderem ser utilizadas nos diferentes softwares usados ao longo da análise.

Para avaliação da localização e tamanho das proteínas constituintes da bomba de efluxo em estudo, procedeu-se à utilização do software SOSUIGramN (https://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosuiagramn/sosuiagramn_submit.html). De seguida, com recurso ao programa Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>), foram avaliadas as propriedades físico-químicas básicas da proteína YbhF.

Seguidamente, foram realizados alinhamentos sucessivos das sequências referentes às três proteínas da bomba de efluxo YbhFSR de cada uma das 24 estirpes de *A. butzleri* incluídas no estudo, recorrendo ao software MEGA 11, de forma a serem percebidas potenciais diferenças nas sequências de aminoácidos entre estirpes.

De forma a proceder-se a uma previsão do tipo de proteína, a sequência de YbhF foi testada no software online Batch Web CD-Search tool (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>).

Após obtenção das sequências proteicas a partir da base de dados NCBI, foram realizados vários alinhamentos da sequência de YbhF e outras proteínas através do software MEGA 11. Recorrendo ao mesmo software, foram calculadas as distâncias genéticas e foi construída uma árvore filogenética usando o método *neighbor-joining (NJ)* com 1000 replicações.

Para que fosse possível identificar os domínios conservados de YbhF, foi utilizada a ferramenta online Conserved Domains, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

Por último, de modo a efetuar uma previsão da estrutura das proteínas que compõem a bomba de efluxo YbhFSR, foi usado o programa DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>).

3.3. Avaliação do perfil de resistência de *Aliarcobacter butzleri* e da influência da bomba de efluxo YbhFSR na sua resistência

3.3.1. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana

Para caracterização da suscetibilidade antimicrobiana de uma bactéria são habitualmente realizados ensaios *in vitro* de determinação da CMI a um determinado agente antimicrobiano, definida como a concentração mínima desse mesmo agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Neste trabalho, a avaliação do perfil de suscetibilidade do grupo de estirpes de *A. butzleri* em estudo foi determinada através da realização de ensaios de determinação de CMI a diversos agentes antimicrobianos pelo método de diluição em agar. A par desta avaliação para o grupo de 24 estirpes de *A. butzleri* em análise, foi também avaliado o impacto da inativação da bomba de efluxo YbhFSR na resistência deste microrganismo, pelo que foi ainda incluída neste ensaio a estirpe mutante do gene *ybhF* para comparação com o perfil de suscetibilidade da estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11.

Foram incluídos como agentes antimicrobianos, cujas características se encontram apresentadas na tabela 4, metais, sobretudo metais pesados, antibióticos representativos de cada uma das classes de antibióticos, desinfetantes, a acriflavina como germicida e o brometo de etídio como substrato de bombas de efluxo.

Assim, no dia precedente ao dia do ensaio, foram inoculadas em placas de meio TSA as estirpes em estudo, bem como a estirpe *E. coli* ATCC 25922 usada como controlo do ensaio, e incubadas a 30 °C em condições de aerobiose. Para além disso, foram preparadas previamente placas de meio TSA com concentrações crescentes de cada composto a testar, que foram armazenadas a 4 °C até à sua utilização.

Aquando da realização do ensaio, de forma a normalizar a densidade de inóculo, foram suspensas colónias de cada estirpe numa solução salina de 0,85% de NaCl (m/v) e ajustada a densidade de cada suspensão a 0,5 unidades de McFarland. Seguidamente, cada

suspensão preparada foi diluída de 1:10 na solução usada para a sua preparação e foram inoculados 2 μ L na superfície de cada placa de meio TSA com diferentes concentrações de cada um dos compostos em estudo. As placas foram incubadas a 30 °C em condições de aerobiose por 48 horas, tempo após o qual foi anotada a CMI de cada composto para cada estirpe, definida como a concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento da estirpe quando visualizado a olho nu. Como controle de crescimento as estirpes foram inoculadas em placa de TSA sem suplementação antimicrobiana. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente.

Tabela 4 – Identificação dos agentes antimicrobianos incluídos na determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Aliarcobacter butzleri*, bem como a respetiva fórmula química, marca do reagente, grau de pureza e solvente usado para a sua diluição.

| Agente Antimicrobiano | | Composto usado | Fórmula química | Marca do Reagente | % Pureza | Solvente | |
|-----------------------|------------------------|---|---|---|-------------------|------------------|------------------|
| Metals | Metals Pesados | Cádmio | Cloreto de cádmio (anidroso) | CdCl ₂ | Sigma | 99,4 | H ₂ O |
| | | Chumbo | Acetato de chumbo trihidratado | C ₄ H ₆ O ₄ Pb.3H ₂ O | Riedel-de Haën | 99,5 | H ₂ O |
| | | Cobalto | Cloreto de cobalto hexahidratado | CoCl ₂ .6H ₂ O | Sigma | 100,0 | H ₂ O |
| | | Cobre | Cloreto de cobre dihidratado | CuCl ₂ .2H ₂ O | Riedel-de Haën | 99,0 | H ₂ O |
| | | Crómio | Dicromato de potássio | K ₂ Cr ₂ O ₇ | Sigma | 99,5 | H ₂ O |
| | | Manganês | Cloreto de manganês | Cl ₂ Mn.4H ₂ O | Acros Organics | 99,0 | H ₂ O |
| | | Mercúrio | Cloreto de mercúrio | Cl ₂ Hg | VWR | 99,5 | H ₂ O |
| | | Molibdénio | Molidbato de sódio dihidratado | Na ₂ MoO ₄ | Sigma | 99,5 | H ₂ O |
| | | Níquel | Sulfato de níquel hexahidratado | NiO ₄ S.6H ₂ O | Fluka Chemika | 99,0 | H ₂ O |
| | | Prata | Nitrato de prata | AgNO ₃ | Labkem | 99,9 | H ₂ O |
| | | Zinco | Sulfato de zinco heptahidratado | O ₄ SZn.7H ₂ O | VWR | 100,0 | H ₂ O |
| | | Lítio | Cloreto de lítio | CLi | AppliChem | 99,0 | H ₂ O |
| | | Sódio | Cloreto de sódio | NaCl | Fisher Scientific | 99,5 | H ₂ O |
| Desinfetantes | Clorohexidina | Solução de digluconato de clorohexidina | C ₃₄ H ₅₄ Cl ₂ N ₁₀ O ₁₄ | Sigma | 20,0 | H ₂ O | |
| | Cloreto de benzalcónio | Cloreto de benzalcónio | C ₆ H ₅ CH ₂ N(CH ₃) ₂ RCI (R=C ₈ H ₁₇ a C ₁₈ H ₃₇) | Sigma-Aldrich | 64,1 | H ₂ O | |

Tabela 4 – Identificação dos agentes antimicrobianos incluídos na determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana de *Aliarcobacter butzleri*, bem como a respetiva fórmula química, marca do reagente, grau de pureza e solvente usado para a sua diluição (continuação).

| | Agente Antimicrobiano | Composto usado | Fórmula química | Marca do Reagente | % Pureza | Solvente | |
|--------------|--------------------------------|-----------------------|---------------------------|--|------------------|-----------------|-------------------------|
| Antibióticos | β-lactâmicos | Ampicilina | Ampicilina (sal de sódio) | C ₁₆ H ₁₈ N ₃ O ₄ SNa | NZYTech | 100,0 | Tampão fosfato pH 8 |
| | | Cefotaxima | Cefotaxima (sal de sódio) | C ₁₆ H ₁₆ N ₅ NaO ₇ S ₂ | Acros Organics | 95,0 | H ₂ O |
| | Aminoglicosídeos | Canamicina | Sulfato de canamicina | C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ ·H ₂ SO ₄ | Fisher Chemical | 100,0 | H ₂ O |
| | | Gentamicina | Sulfato de gentamicina | C ₁₉ H ₄₀ N ₄ O ₁₀ S | Sigma-Aldrich | 100,0 | H ₂ O |
| | Quinolonas | Ciprofloxacina | Ciprofloxacina | C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃ | Fluka Biochemika | 98,0 | NaOH e H ₂ O |
| | Tetraciclina | Tetraciclina | Tetraciclina | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ ·xH ₂ O | Sigma-Aldrich | 98,0 | Etanol 95% |
| | Macrólidos | Eritromicina | Eritromicina | C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃ | Sigma-Aldrich | 100,0 | Etanol 95% |
| | Fenicóis | Cloranfenicol | Cloranfenicol | C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅ | Fluka BioChemika | 99,0 | Etanol 95% |
| | Germicida | Acriflavina | Acriflavina | C ₁₄ H ₁₄ ClN ₃ | Sigma | 100,0 | H ₂ O |
| | Substrato das bombas de efluxo | Brometo de Etídio | Brometo de Etídio | C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ | Sigma | 100,0 | H ₂ O |

Uma vez que não existem recomendações acerca dos valores de pontos de corte de referência para *A. butzleri*, os valores de pontos de corte adotados para os antibióticos testados foram os descritos pela European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) para *Campylobacter* no caso da tetraciclina (>2 µg/mL), da ciprofloxacina (>0,5 µg/mL) e *Campylobacter coli* no caso da eritromicina (>8 µg/mL), na ausência de pontos de corte para *Campylobacter* spp. usaram-se os de *Enterobacteriales* para a ampicilina (>16 µg/mL), cefotaxima (>2 µg/mL), gentamicina (>2 µg/mL), e cloranfenicol (>8 µg/mL).

3.3.2. Ensaios de acumulação de brometo de etídio

Com o intuito de dar continuidade à avaliação do perfil de resistência de *A. butzleri*, foram realizados ensaios de acumulação do fluorocromo, brometo de etídio, para o conjunto das 24 estirpes de *A. butzleri* previamente identificado, bem como para estirpe mutante do gene *ybhF* para comparação com o perfil de acumulação de brometo de etídio apresentado pela estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11.

Decorrido o processo descrito na secção 3.1.1., as células foram recolhidas a partir das culturas a meio da fase exponencial de crescimento de cada estirpe por centrifugação a 10000 ×g durante 5 minutos, lavadas com tampão fosfato salino pH 7,2 (PBS) e ressuspendidas de forma a obter uma DO_{620nm} de 0,4. Preparadas as suspensões bacterianas, 50 µL foram adicionados numa microplaca de 96 poços preta de fundo claro para fluorescência (Greiner Bio-one) de forma a ser obtido, juntamente com PBS e 2 µL de brometo de etídio (100 µg/mL), um volume final de 100 µL em cada poço. Após incubação da microplaca a 30 °C durante 10 minutos, o brometo de etídio foi adicionado a cada poço para uma concentração final de 2 µg/mL e, imediatamente depois da sua adição, deu-se início à medição da fluorescência das amostras com recurso a um fluorímetro leitor de microplacas (SpectraMax, Alemanha), com leituras durante 60 minutos em intervalos de 1 minuto, a comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 e 600 nm, respetivamente. Como controlo de autofluorescência foram incluídos poços com 50 µL de suspensão celular e 50 µL de PBS e como controlo de fluorescência do brometo de etídio foram utilizados poços com 98 µL de PBS e 2 µL da solução de brometo de etídio (100 µg/mL). Cada ensaio foi executado em triplicados e pelo menos três vezes de forma independente.

3.4. Determinação das curvas de crescimento das estirpes parental e mutante

De forma a dar resposta ao objetivo inicial, importou garantir que a mutação introduzida na fase de construção da estirpe mutante não afetou o seu perfil de crescimento. Assim, foi determinada a curva de crescimento da estirpe mutante, a par da estirpe parental.

As duas estirpes cresceram conforme descrito no ponto 3.1.1. e, ao longo do ensaio, foram recolhidas amostras de cada uma das culturas de 2 em 2 horas e efetuadas leituras da DO_{620nm} , até ser atingida a fase estacionária das duas estirpes, com leitura da última amostra às 24 horas. Com o intuito de analisar os resultados obtidos, foram construídas curvas de crescimento das leituras de DO_{620nm} em função do tempo decorrido ao longo do ensaio. Este procedimento foi realizado, pelo menos, três vezes de forma independente.

3.5. Avaliação da influência da bomba de efluxo YbhFSR na virulência de *Aliarcobacter butzleri*

3.5.1. Condições de crescimento e preparação das suspensões bacterianas
Para os ensaios de virulência realizados, as estirpes cresceram conforme descrito no ponto 3.1.1. sendo preparada a pré-cultura que foi depois usada para preparar suspensões celulares com DO_{620nm} a 0,2 ($\sim 10^9$ UFC/mL) ou 0,02 ($\sim 10^8$ UFC/mL) dependendo do ensaio em questão. A contagem de células cultiváveis correspondente a cada DO_{620nm} foi previamente estimada através da realização de diluições sucessivas decimais e contagem das células cultiváveis em placas de meio TSA, incubadas a 30 °C durante 48 horas, em condições de aerobiose. Para preparação das suspensões celulares, as células foram recolhidas por centrifugação a 8000 $\times g$ durante 5 minutos a partir das pré-culturas, e ressuspensas em meio TSB, no volume necessário para que fosse atingida a DO_{620nm} pretendida.

3.5.2. Motilidade

Como mencionado anteriormente, a motilidade é um dos fatores de virulência descritos para *A. butzleri*, pelo que se tornou relevante avaliar o impacto da inativação do gene *ybhF* neste importante fator de virulência.

Depois do processo de crescimento descrito no ponto 3.1.1., as células foram recolhidas a partir da pré-cultura da estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutante, centrifugadas durante 5 minutos a 8000 ×g e ressuspendidas em meio TSB, ajustando a DO_{620nm} para 0,02, isto é, aproximadamente 10⁸ UFC/mL. Seguidamente, foram inoculados 5 µL da suspensão de cada estirpe através de perfuração vertical no centro de uma placa de meio TSA semi-sólida (0,4% de agar). As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 horas em condições de aerobiose, tendo sido medidos os halos de motilidade das estirpes às 24 e 48 horas. O ensaio foi realizado três vezes de forma independente.

3.5.3. Capacidade de formação de biofilmes

A capacidade de formação de biofilmes é uma aptidão frequentemente associada à persistência bacteriana no hospedeiro, tornando-se importante para o estudo da virulência de uma bactéria a sua análise.

Para isso, as duas estirpes em estudo cresceram de acordo com o exposto na secção 3.1.1., tendo sido ajustadas as suas suspensões a um DO_{620nm} de 0,2, isto é, aproximadamente 10⁹ UFC/mL. Seguidamente, procedeu-se à inoculação de uma placa de 24 poços de poliestireno (VWR) com 1 mL de cada suspensão bacteriana, tendo sido usados como controlo negativo poços contendo apenas meio TSB. Depois da incubação da placa durante 48 horas a 30 °C em condições de microaerofilia, o meio de cada poço foi removido e a placa foi incubada durante uma hora a 55 °C. Volvida a hora de incubação, o biofilme foi corado com 1 mL de violeta de cristal a 0,1% (m/v) em água desionizada e incubado à temperatura ambiente por 15 minutos. Depois, os poços foram lavados três vezes com água destilada e secos a 55 °C durante 15 minutos. De seguida, o violeta de cristal ligado foi solubilizado com 1 mL de solução contendo 30% de metanol e 10% de ácido acético. Por último, de forma a quantificar a formação de biofilme, foi lida a absorvância das amostras a 570 nm com recurso a um leitor de microplacas (Biorad, xMark). Cada ensaio foi executado com oito replicados em três ensaios independentes.

3.5.4. Suscetibilidade ao stress oxidativo

Para além do papel de extrusão responsável por conferir a esta bactéria resistência a vários antimicrobianos, as bombas de efluxo podem ter um papel importante na fisiologia bacteriana, estando-lhes descrita uma provável responsabilidade na resistência ao stress oxidativo.

De forma a avaliar o efeito da inativação do gene *ybhF* na suscetibilidade ao stress oxidativo, foi testada a resistência das estirpes parental e mutante a peróxido de hidrogénio e metil viologénio através de ensaios de difusão em disco. Para isso, e realizado o processo de crescimento descrito na secção 3.1.1., as células foram recolhidas a partir de cada uma das pré-culturas por centrifugação a 8000 ×g durante 5 minutos e ressuspendidas em meio TSB de forma a serem obtidas suspensões celulares com DO_{620nm} de 0,02. Cada suspensão celular foi usada para inocular uma placa com meio TSA por espalhamento com recurso a uma zaragatoa e, de seguida, foi colocado um disco de difusão estéril de 6 mm no centro da placa previamente carregado com 5 µL de 3, 10 e 30% (v/v) de peróxido de hidrogénio e 5 µL de metil viologénio com concentração de 125 mM (m/v). As placas foram incubadas em condições de aerobiose a 30 °C durante 48 horas, tempo após o qual foram medidos os halos de inibição de crescimento bacteriano. Este ensaio foi realizado pelo menos três vezes e de forma independente.

3.5.5. Suscetibilidade ao soro humano

Com o objetivo de avaliar a capacidade bactericida do soro humano na estirpe parental e mutante e, assim, poder concluir acerca do efeito da inativação da bomba de efluxo YbhFSR na suscetibilidade ao soro humano, procedeu-se à realização do ensaio de morte do soro.

O sangue usado foi doado por três indivíduos adultos saudáveis, sendo mantido à temperatura ambiente por cerca de 30 minutos para que coagulasse. Posteriormente, o soro foi separado através de uma centrifugação a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, tendo sido posteriormente agrupadas e congeladas alíquotas em tubos criogénicos estéreis à temperatura de -80 °C até ser requerida a sua utilização.

Decorrido o processo de crescimento da estirpe *A. butzleri* AB 28/11 parental e mutante descrito na secção 3.1.1., as células foram recolhidas por centrifugação a 8000 ×g durante 5 minutos e ressuspendidas em meio TSB, preparando-se suspensões celulares com concentração final de aproximadamente 10⁷ UFC/ mL com 90% de soro. Como controlo, o soro foi substituído por soro inativado (30 minutos a 56 °C). As suspensões preparadas foram incubadas a 30 °C durante todo o ensaio e, aos 0, 15, 30, 45 e 60 minutos de exposição ao soro, foram recolhidas amostras para que fossem realizadas diluições decimais sucessivas em meio TSB, seguidas da inoculação de 10 µL de cada diluição em placas de meio TSA. Após incubação das placas a 30 °C durante 48 horas, em condições de aerobiose, foram contadas as células cultiváveis de cada estirpe e respetivo controlo

nos tempos de exposição ao soro referidos. O ensaio foi realizado pelo menos três vezes de forma independente para cada uma das estirpes.

3.5.6. Adesão e Invasão em células Caco-2

Tendo em conta o papel que a capacidade de adesão e invasão têm na patogenicidade bacteriana, cruciais para uma infecção e colonização bem-sucedidas, procedeu-se com o estudo do impacto da inativação da bomba de efluxo YbhFSR na virulência de *A. butzleri*. Para isso, tratando-se de um patógeno com capacidade de infetar o trato gastrointestinal e estando descrita a relevância de sistemas de efluxo na sobrevivência bacteriana no trato gastrointestinal, foram realizados ensaios de adesão e invasão *in vitro* na linha celular epitelial intestinal humana Caco-2.

As células Caco-2 cresceram em frascos de cultura com meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) *high glucose* a pH 7,2 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino, 1% (v/v) de aminoácidos não essenciais, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina, incubados a 37 °C em 5% CO₂ e com mudança de meio de dois em dois dias até ser atingida a confluência de aproximadamente 80%. Antes da realização do ensaio, as células foram tripsinizadas e procedeu-se à contagem das células viáveis. Posto isto, as células foram semeadas a 9×10^4 células por poço em placas de poliestireno de 24 poços e incubadas durante 7 dias a 37 °C e nas condições atmosféricas previamente referidas.

As duas estirpes cresceram nas condições descritas no ponto 3.1.1. e, de seguida, foram recolhidas por centrifugação a 8000 ×g durante 5 minutos, lavadas e ressuspensas no meio usado para as células Caco-2, mas ausente de antibiótico e pré-aquecido a 37 °C. Com o objetivo de confirmar a densidade de cada uma das suspensões preparadas foram realizadas diluições sucessivas decimais, que foram inoculadas em placas de meio TSA para posterior contagem.

Antes de iniciar o ensaio, foram tripsinizadas as células de dois poços da placa previamente semeada, representativos dos poços com posição no centro e periferia da placa, tendo-se procedido à contagem das células viáveis de forma a estimar o número médio de células por poço. De seguida, as células dos restantes poços foram lavadas com 500 µL de PBS duas vezes e foram adicionados 500 µL de cada uma das suspensões bacterianas a cada poço, a uma DO_{620nm} de cerca de 10⁷ UFC por poço, correspondendo a uma multiplicidade de infecção (MOI) de aproximadamente 100. Seguidamente, procedeu-se à incubação da placa durante 3 horas nas condições acima referidas, para que fosse permitida a ocorrência de adesão e invasão.

Decorrido este período, as células foram lavadas 3 vezes com 500 µL de PBS estéril de modo a remover as bactérias que não ligaram, tendo o número de bactérias que interagiram (aderentes e internalizadas) sido determinado através da lise das células Caco-2 com 500 µL de Triton X-100 a 0,1% (v/v), seguida da realização de diluições sucessivas decimais e contagem em placas com meio TSA.

Para avaliação da invasão bacteriana, volvidas as 3 horas de incubação e etapas de lavagem supracitadas, foram adicionados 500 µL do meio usado para as células Caco-2 contendo 125 µg/mL de gentamicina a cada poço da placa de 24 poços, seguindo-se uma hora de incubação de forma a matar as bactérias extracelulares. Depois da hora de incubação, as células foram lisadas pela adição de 500 µL de Triton X-100 a 0,1% (v/v) e o número de bactérias intracelulares libertadas foi determinado através da realização de diluições sucessivas decimais e contagem em placas de meio TSA. Adicionalmente, procedeu-se à contagem das bactérias intracelulares libertadas em placas de TSA onde foi realizado o método de espalhamento direto do lisado proveniente de cada poço.

Todas as placas de meio TSA usadas para posterior contagem bacteriana no ensaio de adesão e invasão foram incubadas em condições de aerobiose a 30 °C durante 48 horas. O ensaio foi realizado em triplicados por pelo menos 3 vezes de forma independente.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Avaliação do perfil de resistência de *Aliarcobacter butzleri*

As bombas de efluxo são proteínas membranares que contribuem para a multirresistência em bactérias. Dos mecanismos de resistência conhecidos para *A. butzleri*, destaca-se o efluxo de compostos através de bombas de efluxo como um dos mecanismos mais relevantes na inibição da ação de antimicrobianos e dos mais estudados como alvo para o combate contra infeções.

Tendo em conta o potencial papel dos sistemas de efluxo na resistência a antimicrobianos em *A. butzleri*, Isidro et al. (2020) analisou a sua presença aquando de uma análise genómica comparativa de 49 genomas de *A. butzleri*. Esta análise permitiu a identificação 19 sistemas putativos de efluxo pertencentes às diferentes famílias de bombas de efluxo existentes. Dos sistemas detetados, 10 estão presentes no genoma de todas as 49 estirpes *A. butzleri* analisadas, dos quais quatro pertencentes à superfamília MFS, um à família SMR, três sendo transportadores do tipo ABC e os restantes sendo membros da superfamília RND. Os restantes nove sistemas que demonstraram não ser partilhados por todas as estirpes pertenciam às famílias RND, ABC e MFS (Isidro et al., 2020). Este vasto repertório de bombas de efluxo aponta de facto para a relevância destes sistemas.

Assim, como objetivo inicial deste trabalho, procurou avaliar-se o perfil de resistência de um grupo de 24 estirpes de *A. butzleri* e correlacioná-lo com uma potencial variação da atividade dos sistemas de efluxo. Para isso, começou-se por estudar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana, através de ensaios de determinação de concentrações mínimas inibitórias a uma vasta gama de antimicrobianos, cujos resultados foram correlacionados com ensaios de acumulação de brometo de etídio, de forma a concluir-se acerca do potencial papel de bombas de efluxo na tolerância ou resistência a antimicrobianos.

4.1.1. Determinação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana

A resistência a múltiplos agentes antimicrobianos tem sido frequentemente descrita em *A. butzleri*, ainda que os mecanismos envolvidos tenham sido pouco explorados até ao momento (Ferreira et al., 2019a). Em bactérias de Gram-negativo, a extrusão de

compostos por bombas de efluxo é considerada um mecanismo de resistência relevante, havendo um consenso acerca do seu papel na multirresistência bacteriana.

Assim, iniciou-se por um estabelecimento do perfil de suscetibilidade antimicrobiana a um diversificado grupo de antimicrobianos, através da determinação da sua CMI pelo método de diluição em agar.

4.1.1.1. Determinação do perfil de suscetibilidade a antibióticos, desinfetantes, acriflavina e brometo de etídio

Numa primeira fase, foi focada a determinação da CMI a antibióticos, tendo sido incluído pelo menos um antibiótico representativo de cada uma de diversas classes de antibióticos, a dois desinfetantes, à acriflavina como germicida e ao brometo de etídio como substrato das bombas de efluxo, para as estirpes *A. butzleri* em estudo (Tabela 5). Uma vez que não existem recomendações de pontos de corte para *A. butzleri*, foram adotados os valores de referência de resistência a antibióticos para *Campylobacter* ou *Enterobacteriales*, segundo a EUCAST. Exceção-se desta análise a canamicina, não tendo sido possível distinguir as estirpes resistentes uma vez que os respetivos valores de ponto de corte não estão referenciados para este antibiótico.

Tabela 5 – Concentração mínima inibitória, em µg/mL, de antibióticos, desinfetantes, germicida e substrato de bombas de efluxo para as 24 estirpes de *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo e estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 como estirpe controlo do ensaio.

| Estirpes de <i>A. butzleri</i> | CMI (µg/mL) | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|-------------|-----|-----|-------|-------|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|
| | AMP | CTX | KAN | GEN | CIP | TET | ERY | CHL | CLBZ | CHX | ACR | BrEt |
| 2003/1426 | 32 | 16 | 1 | ≤0,25 | ≤0,03 | 8 | ≤1 | 64 | 16 | 0,5 | 8 | 16 |
| INSA 2808 | 16 | 8 | 0,5 | ≤0,25 | 32 | 16 | 32 | 128 | 128 | 1 | >64 | >128 |
| INSA 3800 | 2 | 2 | 2 | ≤0,25 | ≤0,03 | 2 | 2 | 64 | 8 | 0,5 | 8 | ≤4 |
| INSA 4015 | 64 | 64 | 1 | ≤0,25 | 0,06 | 16 | 2 | 128 | 128 | 2 | 64 | 64 |
| A 10-3 | 16 | 32 | 2 | 0,5 | 8 | 8 | 2 | 128 | 16 | 0,5 | 16 | 8 |
| A 11-1 | 8 | 16 | 2 | 0,5 | ≤0,03 | 8 | ≤1 | 128 | 8 | 0,5 | 8 | 8 |
| AB 17/11 | 8 | 16 | 2 | ≤0,25 | 8 | 8 | 2 | 64 | 64 | 0,5 | 16 | 8 |
| AB 22/11 | 64 | 32 | 2 | 0,5 | 0,125 | 16 | 2 | 128 | 64 | 2 | 32 | 64 |
| AB 28/11 | 64 | 32 | 2 | 0,5 | 16 | 8 | 32 | 128 | 64 | 1 | 32 | 64 |
| AB 42/11 | 64 | 32 | 2 | ≤0,25 | 16 | 8 | 2 | 128 | 64 | 1 | 16 | 32 |
| AB 45/11 | 32 | 8 | 1 | ≤0,25 | 0,25 | 8 | ≤1 | 64 | 32 | 1 | 8 | 8 |
| CR 42-4 | 32 | 16 | 2 | ≤0,25 | 0,25 | 8 | >32 | 64 | 32 | 0,5 | 64 | 32 |
| CR 46-1 | 32 | 32 | 2 | ≤0,25 | ≤0,03 | 4 | ≤1 | 16 | 8 | 0,5 | 16 | 8 |
| CR 50-2 | 8 | 16 | 2 | 0,5 | 32 | 4 | 32 | 32 | 32 | 0,5 | 32 | 16 |
| CR 60-4 | 16 | 16 | 2 | 0,5 | 0,06 | 8 | ≤1 | 32 | 16 | 0,5 | 16 | 32 |
| CR 64-1 | 16 | 16 | 2 | 0,5 | 0,25 | 8 | 32 | 64 | 64 | 2 | 64 | >128 |
| CR 89-1 | 16 | 16 | 2 | 0,5 | 0,06 | 8 | 4 | 32 | 16 | 1 | 32 | 64 |
| CR 89-2 | 64 | 32 | 2 | 0,5 | 8 | 8 | ≤1 | 64 | 64 | 1 | 16 | 16 |
| CR 113-2 | 16 | 16 | 2 | ≤0,25 | ≤0,03 | 4 | ≤1 | 64 | 16 | 0,5 | 8 | 16 |
| CR 114-3 | 64 | 32 | 2 | 0,5 | 8 | 8 | 4 | 16 | 16 | 1 | 16 | 8 |
| DQ 20dA1 | 64 | 64 | 2 | ≤0,25 | 16 | 16 | 2 | 128 | 128 | 2 | 32 | 32 |

Tabela 5 – Concentração mínima inibitória, em µg/mL, de antibióticos, desinfetantes, germicida e substrato de bombas de efluxo para as 24 estirpes *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo e estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 como estirpe controlo do ensaio (continuação).

| Estirpes de <i>A. butzleri</i> | CMI (µg/mL) | | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-------------|-----------|-------|-----------|----------|-----------|----------|------------|-------|-------|--------|---------|
| | AMP | CTX | KAN | GEN | CIP | TET | ERY | CHL | CLBZ | CHX | ACR | BrEt |
| DQ 31A1 | 64 | 64 | 2 | 0,5 | 0,06 | 16 | 4 | 128 | 128 | 2 | 64 | 64 |
| DQ 40A1 | 8 | 8 | 1 | 0,5 | ≤0,03 | 4 | 2 | 32 | 32 | 0,5 | 8 | 8 |
| DQ 64A1 | 8 | 8 | 4 | 0,5 | ≤0,03 | 4 | ≤1 | 32 | 8 | 0,5 | 8 | ≤4 |
| <i>E. coli</i> ATCC 25922 | 8 | ≤1 | 8 | 1 | ≤0,03 | 2 | >32 | 8 | 128 | 0,5 | 64 | >128 |
| Ponto de corte usado | >16 | >2 | - | >2 | >0,5 | >2 | >8 | >8 | - | - | - | - |
| CMI ₅₀ | 16 | 16 | 2 | 0,5 | 0,125 | 8 | 2 | 64 | 32 | 0,5 | 16 | 16 |
| CMI ₉₀ | 64 | 64 | 2 | ≤0,25 | 16 | 16 | 32 | 128 | 128 | 2 | 64 | 64 |
| Intervalo de CMI | 2-64 | 2-64 | 0,5-4 | ≤0,25-0,5 | ≤0,03-32 | 2-16 | ≤1->32 | 16-128 | 8-128 | 0,5-2 | ≤4->64 | ≤4->128 |
| Número de estirpes resistentes (%) | 12 (50,0) | 23 (95,8) | - | 0 (0) | 9 (37,5) | 23 (95,8) | 5 (20,8) | 24 (100,0) | - | - | - | - |

AMP: Ampicilina; CTX: Cefotaxima; KAN: Canamicina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; TET: Tetraciclina; ERY: Eritromicina; CHL: Cloranfenicol; CLBZ: Cloreto de Benzalcónio; CHX: Cloroheixidina; ACR: Acriflavina; BrEt: Brometo de Etídio. CMI₅₀ e CMI₉₀: CMI às quais 50 e 90% das estirpes de *A. butzleri*, respetivamente, são inibidas pelo antimicrobiano.

Todas as estirpes demonstraram ser resistentes ao cloranfenicol, 95,8% à cefotaxima e tetraciclina (n=23), 50,0% à ampicilina (n=12), 37,5% à ciprofloxacina (n=9) e 20,8% à eritromicina (n=5). Por outro lado, todas as estirpes em estudo se revelaram suscetíveis à gentamicina. Os resultados encontram-se em linha com o que tinha sido descrito anteriormente para alguns antibióticos também aqui usados para 21 das estirpes analisadas (Isidro et al., 2020).

Apesar de ser evidente uma tendência para que as estirpes com CMI's superiores dos antibióticos mantenham CMI's mais elevadas para os restantes agentes antimicrobianos, não é possível a análise da percentagem de estirpes resistentes aos desinfetantes, acriflavina e brometo de etídio, uma vez que não estão estabelecidos pontos de corte de referência que permitam classificá-las como resistentes ou suscetíveis a estes compostos.

Em linha com o previamente descrito, apesar do reduzido número de estirpes suscetíveis aos β -lactâmicos, a resistência à ampicilina foi associada à presença de uma β -lactamase semelhante a OXA-15 na maioria das estirpes de *A. butzleri* usadas neste estudo (Isidro et al., 2020). Das 21 estirpes usadas neste trabalho cujos dados genómicos se encontram acessíveis, foi observada a presença de uma β -lactamase semelhante a OXA-15 nas 11 estirpes resistentes à ampicilina, e a sua ausência em 8 das 10 estirpes cujo fenótipo não apresenta resistência a este antibiótico. À correspondência efetuada, excetuam-se as estirpes CR 113-2 e DQ 64A1, que apesar de possuírem o gene referido segundo os dados do seu genoma, não apresentaram o fenótipo de resistência a este antibiótico.

A resistência associada à classe de tetraciclina é habitualmente determinada pela ação de bombas de efluxo, pela modificação da região 16S rRNA no sítio de ligação ou proteção de ligação ao ribossoma. Em termos genéticos, Fanelli et al. (2020) e seus colaboradores identificaram a presença do gene *tetA*, codificante para uma proteína associada a resistência à tetraciclina (Fanelli et al., 2020). A resistência descrita em *A. butzleri* para este antibiótico é bastante variada, no entanto, a percentagem de estirpes resistentes obtidas neste trabalho vai de encontro não só às taxas de suscetibilidade descritas para isolados de produtos alimentares (Vicente-Martins et al., 2018), como é demonstrativa da tendência de aumento de resistência a este antibiótico relatada na meta-análise efetuada por Mateus et al. (Mateus et al., 2021a). No entanto, estes dados devem ser considerados com precaução, dado que o valor de ponto de corte usado pode estar desviado relativamente àquela que é a realidade de *A. butzleri*.

No caso da ciprofloxacina, a resistência a este antibiótico tem sido associada com a presença de mutações pontuais na região determinante de resistência às quinolonas no gene *gyrA* que resultam numa modificação de citosina para timina, originando uma

transição de treonina para isoleucina na proteína correspondente para todas as estirpes resistentes, como havido sido descrito previamente (Abdelbaqi et al., 2007; Ferreira et al., 2016; Isidro et al., 2020). Esta correspondência relativa a suscetibilidade ou resistência foi observada em 21 das estirpes de *A. butzleri* usadas neste trabalho, quando analisando os dados do seu genoma (Isidro et al., 2020).

A resistência à eritromicina é um exemplo claro do envolvimento das bombas de efluxo na resistência a antimicrobianos. Tal como descrito anteriormente, foram detetadas mutações que levaram à codificação de uma proteína truncada do regulador transcricional (AreR) associado ao sistema EP16, posteriormente designado de AreABC, no genoma de todas as estirpes resistentes à eritromicina, destacando o papel de sistemas putativos de efluxo na resistência a macrólidos (Isidro et al., 2020; Ferreira et al., 2021). Atentando os dados do genoma das 21 estirpes de *A. butzleri* sequenciadas aquando do trabalho de Isidro et al., (2020) e da sequenciação do gene *areR* da estirpe *INSA 2808* por Ferreira et al., 2021, a associação entre a presença das mutações referidas e a resistência à eritromicina foi estabelecida nas cinco estirpes resistentes a este antibiótico, observando-se a ausência de mutações nas 17 estirpes restantes, suscetíveis à eritromicina.

Tal como sucedido para a classe de β -lactâmicos em que o número elevado de estirpes resistentes não permite uma associação coerente entre fenótipo-genótipo, a taxa de resistência de 100% apresentada para o cloranfenicol, como antibiótico representativo da classe de fenicóis, impossibilitou uma associação entre o fenótipo e o genótipo para as estirpes em estudo. Apesar de identificado um determinante de resistência, o gene *cat* codificante para uma acetiltransferase associada à resistência ao cloranfenicol no genoma de *A. butzleri*, não foi possível estabelecer uma relação entre a sua presença e os valores da CMI deste antibiótico (Isidro et al., 2020).

Tendo em conta que uma estirpe pode ser classificada como multirresistente quando apresenta resistência a três ou mais classes de antibióticos distintas, pode concluir-se que 23 (96%) das estirpes *A. butzleri* em estudo apresentam um perfil de multirresistência, apresentando diversos perfis fenotípicos de resistência (Tabela 6).

Estes dados vão de encontro ao descrito anteriormente, onde entre isolados de diversas origens, como origem animal, alimentar, ambiental ou humana, foram expostas frequências de resistências a múltiplas classes de antibióticos elevadas (Fanelli et al., 2020; Ferreira et al., 2013; Šilha et al., 2017; Vicente-Martins et al., 2018).

Tabela 6 – Perfil de multirresistência a antibióticos para as 24 estirpes *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo.

| Perfil de resistência | Estirpes de <i>A. butzleri</i> |
|------------------------------|--|
| AMP, CTX, TET, CHL | 2003/1426, INSA 4015, AB 22/11, AB 45/11, CR 46-1, DQ 31A1 |
| AMP, CTX, CIP, TET, ERY, CHL | AB 28/11 |
| CHL | INSA 3800 |
| AMP, CTX, CIP, TET, CHL | AB 42/11, CR 89-2, CR 114-3, DQ 20dA1 |
| CTX, TET, CHL | A 11-1, CR 60-4, CR 89-1, CR 113-2, DQ 40A1, DQ 64A1 |
| CTX, CIP, TET, CHL | A 10-3, AB 17/11 |
| AMP, CTX, TET, ERY, CHL | CR 42-4 |
| CTX, TET, ERY, CHL | CR 64-1 |
| CTX, CIP, TET, ERY, CHL | INSA 2808, CR 50-2 |

É ainda de destacar a necessidade do estabelecimento de pontos de corte de referência internacionais para antimicrobianos em *Aliarcobacter*, bem como de um método padronizado para avaliação da sua suscetibilidade antimicrobiana, de forma a possibilitar a comparação de resultados entre trabalhos (Chieffi et al., 2020; Ferreira et al., 2016; Ferreira et al., 2019a).

4.1.1.2. Determinação do perfil de suscetibilidade a metais

Tendo em consideração o facto de *A. butzleri*, por um lado, ser um microrganismo ubiquitário, podendo ser isolado a partir de diversos ambientes e hospedeiros pelo que facilmente se propicia o seu contacto com metais acumulados em diferentes ecossistemas por longos períodos de tempo, e, por outro, o conhecimento acerca do seu crescimento na presença de metais ser ainda muito limitado contrariamente ao já explorado noutras espécies bacterianas, tornou-se relevante para a avaliação do perfil de resistência de *A. butzleri* a inclusão de um grupo diferenciado de agentes antimicrobianos, os metais (Tabela 7).

Tabela 7 – Concentração mínima inibitória, em mM, de metais para as 24 estirpes *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo e estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 como estirpe controle do ensaio.

| Estirpes de <i>A. butzleri</i> | CMI (mM) | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------|----------|----|-----|-------|-------|-----|-------|-----|----|------|-----|----|-----|
| | Cd | Pb | Co | Cu | Cr | Mn | Hg | Mo | Ni | Ag | Zn | Li | Na |
| 2003/1426 | 0,03 | 4 | 0,5 | 0,125 | 0,007 | 0,5 | 0,003 | 32 | 1 | 0,01 | 0,5 | 16 | 128 |
| INSA 2808 | 0,03 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 2 | 0,003 | 32 | 1 | 0,01 | 0,5 | 16 | 128 |
| INSA 3800 | 0,03 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 2 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 16 | 256 |
| INSA 4015 | 0,03 | 8 | 0,5 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 0,5 | 16 | 256 |
| A 10-3 | 0,06 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 2 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| A 11-1 | 0,06 | 8 | 0,5 | 1 | 0,01 | 2 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 0,5 | 16 | 128 |
| AB 17/11 | 0,06 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 2 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 16 | 256 |
| AB 22/11 | 0,5 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 2 | 16 | 256 |
| AB 28/11 | 0,25 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| AB 42/11 | 0,03 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 0,5 | 16 | 256 |
| AB 45/11 | 0,03 | 8 | 1 | 1 | 0,01 | 2 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| CR 42-4 | 0,06 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 0,5 | 16 | 256 |
| CR 46-1 | 0,5 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 16 | 256 |
| CR 50-2 | 0,06 | 8 | 0,5 | 0,5 | 0,01 | 2 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 16 | 256 |
| CR 60-4 | 0,25 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | >64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| CR 64-1 | 0,25 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | >64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| CR 89-1 | 0,25 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| CR 89-2 | 0,06 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| CR 113-2 | 0,125 | 8 | 1 | 0,5 | 0,007 | 2 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 16 | 256 |
| CR 114-3 | 0,06 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| DQ 20dA1 | 0,03 | 8 | 0,5 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 0,5 | 32 | 128 |
| DQ 31A1 | 0,03 | 8 | 0,5 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 0,5 | 16 | 128 |
| DQ 40A1 | 0,03 | 8 | 0,5 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 0,5 | 16 | 256 |
| DQ 64A1 | 0,03 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 16 | 256 |

Tabela 7 – Concentração mínima inibitória, em mM, de metais para as 24 estirpes *Aliarcobacter butzleri* incluídas no estudo e estirpe *Escherichia coli* ATCC 25922 como estirpe controlo do ensaio (continuação).

| CMI (mM) | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | Cd | Pb | Co | Cu | Cr | Mn | Hg | Mo | Ni | Ag | Zn | Li | Na |
| E. coli ATCC 25922 | 2 | 16 | 1 | 2 | 0,125 | 16 | 0,003 | >64 | 1 | 0,06 | 2 | >64 | 512 |
| CMI ₅₀ | 0,06 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 16 | 256 |
| CMI ₉₀ | 0,25 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| Intervalo de CMI | 0,03-0,5 | 4-8 | 0,5-1 | 0,125-1 | 0,007-0,01 | 0,5-4 | 0,003 | 32->64 | 1 | 0,01 | 0,5-2 | 16-32 | 128-256 |

Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Co: Cobalto; Cu: Cobre; Cr: Crómio; Mn: Manganês; Hg: Mercúrio; Mo: Molibdénio; Ni: Níquel; Ag: Prata; Zn: Zinco; Li: Lítio; Na: Sódio. CMI₅₀ e CMI₉₀: CMI às quais 50 e 90% das estirpes de *A. butzleri*, respetivamente, são inibidas pelo metal.

Perante os dados obtidos, é notória uma diferença entre os intervalos de CMI's identificadas para os diferentes metais incluídos no estudo, sendo evidente um intervalo de concentrações mais elevadas, como é o caso do que sucede para o chumbo, manganês, molibdénio, lítio ou sódio, comparativamente com a gama de concentrações obtida para metais como o cádmio, crómio, mercúrio ou prata, cujas concentrações se verificam baixas. Tendo em atenção esta análise, podem prever-se diferentes níveis de suscetibilidade aos diversos metais pesados. Apesar disso, não existem protocolos padronizados para avaliação da suscetibilidade bacteriana a metais pesados, assim como não existem pontos de corte de referência que permitam classificar esta bactéria como resistente ou suscetível a metais pesados.

Até ao momento, a suscetibilidade *in vitro* de *A. butzleri* a metais pesados apenas foi avaliada por Schroeder-Tucker et al. (1996), que somente testou a suscetibilidade a um sal de metal pesado, Otth et al. (2005), que como critério interpretativo um CMI > 1mM para classificar os 50 isolados incluídos no seu estudo como resistentes aos metais pesados e incluiu o estudo de nove metais pesados, e por Fanelli et al. (2020), que adotou o método e o ponto de corte descritos por Otth et al. e seus colaboradores para avaliar a suscetibilidade a alguns metais pesados em cinco estirpes de *A. butzleri* e adicionou ao relatório de estudo três diferentes metais pesados (Fanelli et al., 2020; Otth et al., 2005; Schroeder-Tucker et al., 1996).

Aplicando o ponto de corte definido por Otth et al. (2005) para classificação de uma estirpe como resistente, todas as estirpes estudadas seriam classificadas como suscetíveis ao ião cádmio, cobalto, cobre, crómio, mercúrio, níquel e prata, e resistentes ao ião chumbo, molibdénio, lítio e sódio. No entanto, o mercúrio demonstrou ser o metal pesado mais ativo ao inibir o crescimento de todas as estirpes a uma concentração de 0,003 mM e o molibdénio, lítio e sódio como os compostos com menor atividade inibitória. É assim perceptível que, ao contrário do observado para a avaliação da suscetibilidade de *A. butzleri* a antibióticos, não são detetadas diferenças tão evidentes entre as CMI's de metais para as diferentes estirpes.

Os resultados obtidos são concordantes com os resultados de Otth et al. (2005) e Fanelli et al. (2020), ainda que os valores de concentrações mínimas inibitórias sejam, de forma geral, inferiores. Esta evidência era esperada e justifica-se pelo facto de no presente trabalho terem sido preparados os compostos tendo em consideração a concentração final do ião metálico e não do sal do respetivo ião, de forma a reduzir a interferência do sal, o que não foi feito por Otth et al. (2005) e Fanelli et al. (2020).

Adicionalmente, poderiam ser detetadas pequenas diferenças devido ao uso de condições de incubação diferentes das usadas nas investigações dos dois autores, bem como, possivelmente, devido à utilização de diferentes sais para análise do mesmo ião metálico.

Este trabalho torna-se, assim, relevante para a temática da suscetibilidade de *A. butzleri* a metais, englobando uma gama vasta, sobretudo de metais pesados, bem como inclui um elevado número de estirpes *A. butzleri* de uma diversidade de origens superior às incluídas nas investigações supracitadas.

Genes associados a resistência a metais e antibióticos podem co-existir juntos em elementos móveis como ilhas genómicas, plasmídeos ou elementos transponíveis, sendo que a sua ligação genética poderá determinar a sua co-resistência ou co-seleção e o risco de transferência horizontal entre bactérias (Bengtsson-Palme and Larsson, 2015; Zhao et al., 2019). Nos estudos de Fanelli et al. (2019, 2020), foi descrita uma correlação entre a resistência a vários metais pesados e a resistência a β -lactâmicos, cloranfenicol e tetraciclina, e sugerida a presença de alguns genes relacionados com sistemas de bombas de efluxo ou codificantes para proteínas de transporte associados, conferindo-lhes responsabilidade no desenvolvimento de resistência a metais pesados (Fanelli et al., 2019, 2020). Para além disso, foi também identificado em estirpes *A. butzleri* um *cluster* putativo de genes de resistência ao cobre e arsénio, um sistema de transporte do tipo ABC para o molidbémio e um mecanismo de extrusão de cádmio, zinco e cobalto (Müller et al., 2020a). No estudo de Isidro et al. (2020), em que foram incluídos dados genómicos de 21 estirpes de *A. butzleri* usadas neste trabalho, foram identificadas proteínas codificadas por alguns dos genes mencionados nos estudos referenciados, nomeadamente as proteínas CsoR, ModB, MopA, CzcA, CzcR, ZntB, CorC e uma outra proteína associada a resistência ao arsénio (ABU_RS02800) (Isidro et al., 2020).

4.1.2. Ensaios de acumulação de brometo de etídio

De forma a avaliar a atividade de bombas de efluxo em *A. butzleri*, foram realizados ensaios de acumulação intracelular de brometo de etídio no grupo de estirpes selecionado para o estudo.

O brometo de etídio é um substrato de bombas de efluxo bem caracterizado e indicado como o mais frequentemente usado para monitorizar a atividade de bombas de efluxo fluorometricamente em bactérias de Gram-negativo. Trata-se de uma molécula biocompatível, que em condições controladas e bem definidas, não afeta a viabilidade ou funções celulares (Rodrigues et al., 2008). Uma vez que o brometo de etídio emite um sinal de fluorescência baixo fora da bactéria, mas aumentado quando se liga ao DNA

intracelularmente, torna-se possível obter uma medida da atividade das bombas de efluxo através do aumento da fluorescência ao longo do tempo (Barfour et al., 2021). A intensidade de fluorescência medida representa, desta forma, um equilíbrio entre o influxo do fluorocromo por difusão passiva para o meio intracelular e o seu transporte ativo mediado pelas bombas de efluxo para o meio extracelular, tornando-se útil para o estudo da cinética do transporte de brometo de etídio e para a distinção entre as estirpes bacterianas capazes de expressar de forma mais ou menos notória as suas bombas de efluxo (Jernaes and Steen, 1994; Paixão et al., 2009).

Assim, procedeu-se à avaliação da cinética de acumulação deste substrato para as 24 estirpes *A. butzleri* ao longo de 60 minutos (Anexo 1), convertendo-se os resultados obtidos no gráfico de barras representado na figura 10, onde se representam os valores de fluorescência aos 60 min de incubação para cada uma das estirpes, para que sejam visualizados e comparados de forma mais acessível.

Apesar de se observar um aumento de fluorescência dependente do tempo para qualquer uma das estirpes (Anexo 1), pela análise do gráfico, é manifestamente visível uma diferença na intensidade de fluorescência entre estirpes, tornando-se possível a distinção deste grande grupo em três subgrupos de estirpes tendo em conta a fluorescência apresentada aos 60 minutos. De forma simplificada, pode ser observado um grupo com uma maior atividade de bombas de efluxo, que apresenta valores de fluorescência inferiores quando comparado com o grupo com uma menor atividade de bombas de efluxo, onde se constata valores de fluorescência superiores, ou seja, onde a acumulação intracelular de brometo de etídio é mais elevada. Para além destes dois grupos, é ainda notório um terceiro subgrupo composto pelas restantes estirpes, com valores de fluorescência intermédios.

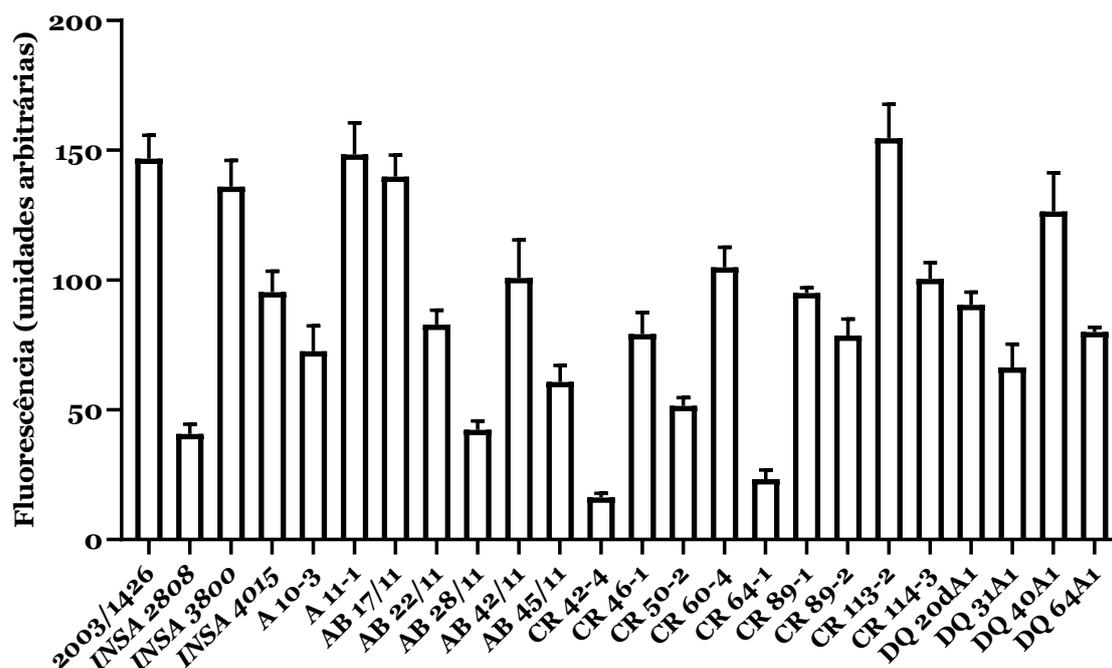


Figura 10 – Acumulação de brometo de etídio após 60 minutos de incubação para as 24 estirpes *Aliarcobacter butzleri* em estudo. Os resultados apresentados correspondem à média \pm erro padrão das médias de três replicados, em pelo menos três dias independentes.

No grupo de estirpes com maior atividade das bombas de efluxo incluem-se as estirpes *INSA 2808*, *AB 28/11*, *CR 42-4*, *CR 50-2* e *CR 64-1*, com valores de fluorescência inferiores a 50 unidades arbitrárias. No extremo oposto, as estirpes *2003/1426*, *INSA 3800*, *A 11-1*, *AB 17/11*, *CR 60-4*, *CR 113-2* e *DQ 40A1* integram o grupo com menor atividade das bombas de efluxo, apresentando valores de fluorescência superiores a 100 unidades arbitrárias. As restantes estirpes podem ser agrupadas num subgrupo cujos valores de fluorescência se situam entre 50 e 100 unidades arbitrárias.

4.1.3. Correlação entre os resultados de acumulação de brometo de etídio e perfis fenotípicos de resistência

Tendo em consideração a potencial correlação entre o efluxo e a resistência a antibióticos, os subgrupos de estirpes agrupadas, de acordo com o valor de fluorescência apresentado aos 60 minutos de incubação, foram associados com os perfis de resistência adquiridos, após determinação de concentrações mínimas inibitórias a antibióticos.

Ainda que se verifique uma elevada percentagem de estirpes resistentes aos β -lactâmicos, cloranfenicol e tetraciclina (Tabela 5), a resistência à eritromicina e à

ciprofloxacina destacam-se como os principais fatores diferenciadores na distinção de perfis de resistência entre as estirpes (Tabela 6).

Desta análise foi observado que, ao grupo de estirpes cuja atividade de bombas de efluxo é maior, ou seja, que apresentam valores de acumulação de brometo de etídio mais baixos (Figura 10), correspondem os perfis de resistência com maior número de resistências associadas (Tabela 6). Particularmente, a presença de resistência à eritromicina ou resistência simultânea à eritromicina e à ciprofloxacina foi identificada em todas as estirpes pertencentes ao subgrupo que apresenta valores de fluorescência inferiores ou iguais a 50 unidades arbitrárias. Analisando a associação entre fenótipo-genótipo, e considerando a análise prévia efetuada, é possível identificar mutações que levaram à codificação de uma proteína truncada do regulador transcricional (AreR) associado ao sistema AreABC nas cinco estirpes resistentes à eritromicina que integram o grupo com maior atividade de bombas de efluxo neste trabalho. No que diz respeito à associação entre mutações pontuais no gene *gyrA* e o fenótipo de resistência a quinolonas, foi possível identificar mutações no referido gene nas duas estirpes resistentes à ciprofloxacina pertencentes a este grupo. No entanto, e apesar de duas das estirpes integrantes deste grupo demonstrarem ser suscetíveis e não possuírem a mutação em causa, os valores das CMIs deste antibiótico são tendencialmente superiores para este grupo de estirpes comparativamente aos casos em que a acumulação é maior, o que demonstra o papel que as bombas de efluxo possuem na resistência de *A. butzleri* (Isidro et al., 2020).

Em contraste, foi notado que ao subgrupo que apresenta valores de fluorescência mais elevados aquando da realização de ensaios de acumulação de brometo de etídio (Figura 10) corresponde um perfil de resistência com menor número de resistências associadas e valores de CMIs inferiores aos valores apresentados pelas restantes estirpes (Tabelas 5 e 6). Neste grupo é possível verificar a ausência de resistência à eritromicina ou ciprofloxacina para qualquer uma das estirpes, o que se associa com a ausência das mutações referidas anteriormente nas proteínas AreR e GyrA. A esta afirmação excetua-se a estirpe AB 17/11 que, apesar de possuir um dos valores mais elevados de acumulação de brometo de etídio, se revelou resistente à ciprofloxacina, devido à mutação descrita no gene *gyrA* encontrada no seu genoma (Isidro et al., 2020).

As relações tiradas, que dizem respeito ao perfil de resistência a antibióticos e, portanto, às CMIs obtidas para esse grupo de agentes antimicrobianos, podem ser extrapoladas para o conjunto de compostos referentes aos desinfetantes, acriflavina e brometo de etídio onde, apesar de não ser possível enumerar diferentes perfis de resistência devido à ausência de pontos de corte de referência para estes compostos, é notória a conservação

geral da tendência de obtenção de CMIs inferiores para as estirpes com menor atividade de bombas de efluxo e superiores para as estirpes agrupadas para uma maior atividade de bombas de efluxo.

Exemplificando, esta evidência pode ser demonstrada pelos resultados obtidos para duas estirpes de origem humana incluídas no estudo. Por um lado, a estirpe *A. butzleri* INSA 2808 apresenta um dos valores mais baixos de acumulação de brometo de etídio entre as 24 estirpes *A. butzleri* analisadas, e, simultaneamente, valores de CMIs bastante elevadas não só para os antibióticos, como também para os desinfetantes, acriflavina e brometo de etídio, destacando-se mesmo em alguns dos compostos pelos valores mais elevados em relação às restantes estirpes. Mantendo a mesma linha de observação, no extremo oposto deste raciocínio, é encontrada a estirpe *A. butzleri* INSA 3800, que detém um dos valores de fluorescência mais elevados de todas as estirpes e os valores de CMIs mais reduzidos para muitos dos compostos testados, apresentando resistência para apenas um agente antimicrobiano testado e a única estirpe *A. butzleri* em estudo não classificada como multirresistente.

Em suma, e tendo em conta que a correlação demonstrada neste exemplo se aplica às restantes estirpes de cada subgrupo, pode concluir-se, assim, um papel relevante das bombas de efluxo na resistência de *A. butzleri*, como descrito anteriormente pelo nosso grupo (Isidro et al., 2020; Ferreira et al., 2021; Mateus et al., 2021b). Torna-se também importante salientar os resultados obtidos para a estirpe *A. butzleri* AB 28/11, que destacam o perfil de multirresistência e superior atividade de bombas de efluxo. Estes indicativos apoiam, assim, a sua utilização para construção de uma estirpe mutante para avaliar, numa etapa posterior do presente trabalho, o papel da bomba de efluxo YbhFSR na resistência e virulência de *A. butzleri*.

4.2. Análise bioinformática da bomba de efluxo YbhFSR

As bombas de efluxo codificadas por proteínas pertencentes à superfamília de transportador ABC são responsáveis por transportar uma ampla variedade de substratos e estão distribuídas em quase todas as espécies. Da análise genómica comparativa realizada recentemente por Isidro e seus colaboradores em que foram incluídos 49 genomas de *A. butzleri*, foi detetada a presença de 19 sistemas putativos de efluxo e a existência de 56 genes codificantes de bombas de efluxo (Isidro et al., 2020). Dos sistemas putativos de efluxo identificados, três sistemas putativos de efluxo pertencentes

à família ABC, identificados como EP5, EP6 e EP10 foram identificados, apresentando o último homologia com o transportador YbhGFSR descrito previamente em *E. coli* (Yamanaka et al., 2016). Tendo sido observado que alguns dos genes se encontram organizados em operões com homologia para transportadores de efluxo do tipo ABC, foi selecionado um operão para análise no presente trabalho. O operão em questão é denominado *ybiH-ybhGFSR* e inclui o gene que codifica para a proteína de membrana interna YbhG e três genes codificantes para o transportador YbhFSR, codificado pelo gene *ybhF* com 1701 pb, o gene *ybhS* com 1089 pb e o gene *ybhR* com 1092 pb (Isidro et al., 2020; Yamanaka et al., 2016). Da análise da sua sequência, foi sugerido que YbhF apresenta dois NBDs, sugerindo-se ser a componente de ligação ao ATP, enquanto YbhS e YbhR se preveem componentes transmembranares (Feng et al., 2020).

De forma a proceder-se a uma avaliação da localização e tamanho das proteínas que constituem a bomba de efluxo em estudo, foi usado o software SOSUIGramN, sendo os resultados apresentados na tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos a partir da utilização do programa SOSUIGramN para avaliação da localização e tamanho das proteínas constituintes da bomba de efluxo YbhFSR.

| Proteína | Localização | Tamanho (aminoácidos) |
|-----------------|--------------------|----------------------------------|
| YbhF | Citoplasma | 566 |
| YbhS | Membrana interna | 362 |
| YbhR | Membrana interna | 363 |

Procedeu-se, de seguida, a uma avaliação básica das propriedades físico-químicas da proteína YbhF através do software Protparam. Como resultados destaca-se o facto de o gene *ybhF* codificar uma proteína de 566 aminoácidos com um peso molecular de 63,58 kDa e um ponto isoelétrico teórico de 5,97.

Ao alinhar as três proteínas constituintes da bomba de efluxo YbhFSR de cada uma das 24 estirpes de *A. butzleri* estudadas através do uso do software MEGA 11, podem verificar-se algumas diferenças entre a sequência de aminoácidos da estirpe AB 28/11, estirpe tomada como referência nesta análise, e a sequência proteica das restantes estirpes (Anexo 2). No caso da proteína YbhF, a disparidade observada vai até 1,59%, correspondente a 9 em 566 aminoácidos, observando-se a maior diferença entre as sequências proteicas das estirpes AB 28/11 e CR 42-4. A disparidade encontrada para a sequência de aminoácidos de YbhS e YbhR segue a mesma tendência, isto é, uma baixa

variação na sequência de aminoácidos da estirpe AB 28/11 e restantes estirpes, variando até aproximadamente 1,65% e 1,66% de dissimilaridade, respetivamente. Adicionalmente, importa referir que nesta análise foi identificada a existência de um codão stop no gene *ybhF* da estirpe AB 42/11, bem como foi verificada a presença do gene *ybhR* no genoma da estirpe DQ 40A1, embora com alelo indeterminado, tal como já havia sido descrito (Isidro et al., 2020).

Através da utilização de um software de previsão do tipo de proteína, Batch Web CD-Search tool (NCBI), prevê-se que YbhF seja uma proteína exportadora pertencente à família de transportadores ABC, tal como indicado na tabela 9.

Tabela 9 – Previsão da superfamília à qual pertence a proteína YbhF através do software Batch Web CD-Search tool, NCBI, tendo em conta a sequência de aminoácidos codificada pelo gene *ybhF* da estirpe *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11.

| Aminoácidos | | E-Value | Bitscore | Denominação da superfamília |
|-------------|-----|--------------------------|----------|-----------------------------|
| De | A | | | |
| 17 | 555 | 3,79252e ⁻¹³⁷ | 420,298 | ABC2_perm_RbbA superfamily |
| 321 | 545 | 5,0356e ⁻⁸² | 258,391 | CcmA superfamily |
| 324 | 541 | 5,35342e ⁻⁷² | 229,564 | P-loop_NTPase superfamily |
| 331 | 545 | 7,29865e ⁻⁷⁰ | 226,888 | drrA superfamily |
| 297 | 548 | 3,79782e ⁻⁴⁴ | 159,996 | PRK13536 superfamily |
| 314 | 545 | 1,21858e ⁻²⁵ | 108,284 | 40850658_otr superfamily |
| 312 | 530 | 3,8617e ⁻¹⁴ | 71,6734 | ABC_ATP_DarD superfamily |

De seguida, e após obtenção das sequências proteicas a partir da base de dados NCBI, foram realizados vários alinhamentos da sequência de YbhF e outras proteínas através do software MEGA 11, tendo sido construída a árvore filogenética representada na figura 11. Atentando à figura, é possível observar que YbhF forma um subcluster com um transportador de efluxo de heme, CcmA de *A. butzleri*, e com uma ATPase associada ao ribossoma, RbbA de *A. butzleri*. Além disso, YbhF agrupa também com o transportador de efluxo de doxorrubicina e daunorrubicina, DrrA de *Streptomyces peucetius*, e o transportador de efluxo de oxitetraciclina, OtrC de *Streptomyces rimosus*. Este é um resultado expectável visto que DrrA e OtrC NBD se tratam das subunidades de domínio de ligação a nucleótido dos sistemas de efluxo correspondentes, tal como se pressupõe ser YbhF na bomba de efluxo YbhFSR.

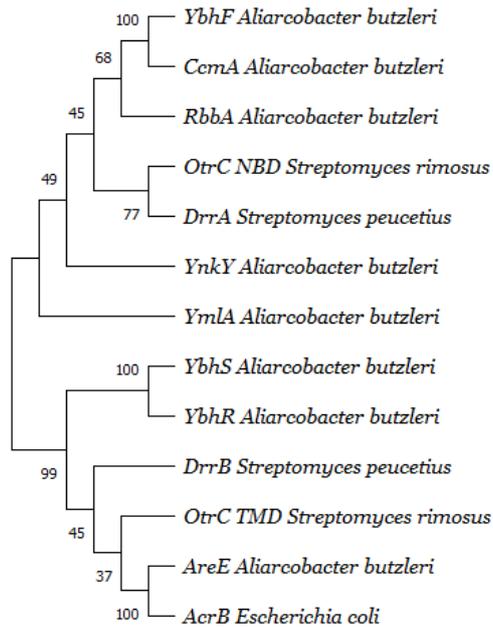


Figura 11 – Árvore filogenética de YbhF usando o método *neighbor-joining* (NJ). Foram incluídas proteínas representativas de transportadores ABC contendo domínios de ligação ao nucleótido e respectivos componentes membranares de *Aliarcobacter butzleri*, *Streptomyces rimosus* e *Streptomyces peucetius*, bem como componentes de membrana interna de bombas de efluxo pertencentes à superfamília RND de *Aliarcobacter butzleri* e *Escherichia coli*.

Como referido anteriormente, e sendo típico das subunidades de ligação ao ATP conterem motivos de sequência conservados importantes no desempenho de funções do transportador, YbhF contém dois domínios de ligação ao ATP (Feng et al., 2020). Usando a ferramenta online da plataforma NCBI, Conserved Domains, foi possível identificar os domínios conservados de Walker A, Q-loop e Walker B, e os motivos de assinatura de D-loop e o motivo Switch, assinalados na figura 12. Estando estes motivos relacionados com a hidrólise e ligação de ATP, como discutido anteriormente, a análise de domínios conservados de YbhF sugere esta proteína como pertencente a um transportador ABC.

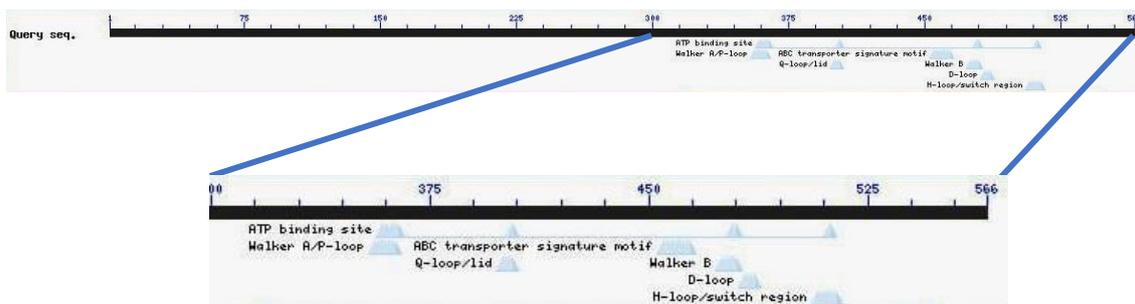


Figura 12 – Representação da análise de domínios conservados de YbhF, através do software Conserved Domains, NCBI.

De modo a prever a estrutura das proteínas que constituem a bomba de efluxo YbhFSR foi usado o programa DeepTMHMM. Os resultados obtidos e representados na figura 13 demonstram a ausência de domínios transmembranares codificados pela proteína YbhF, contrastando com a presença de seis segmentos transmembranares α -helicoidais nas proteínas YbhS e YbhR, sugerindo que o transportador YbhFSR forma as unidades estruturais ($\{TMD\}_2$ - $\{NBD_2\}$), identificando-se a estrutura característica das bombas de efluxo do tipo ABC.

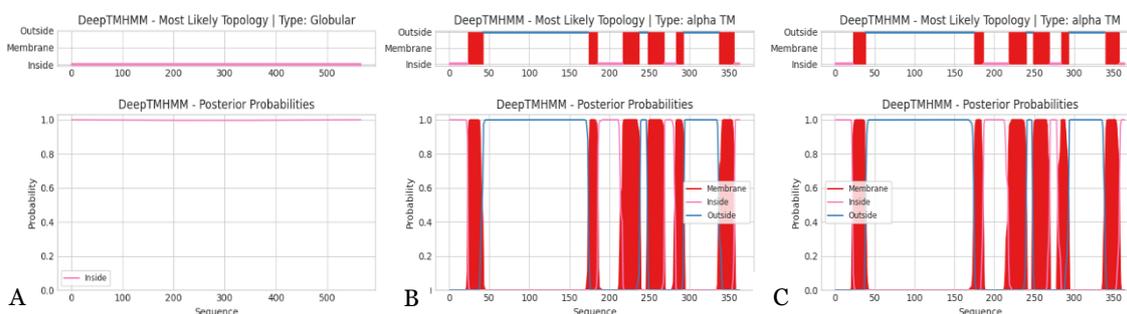


Figura 13 – Previsão dos domínios transmembranares de YbhF (A), YbhS (B) e YbhR (C), usando o software DeepTMHMM.

No seu conjunto, os dados fornecidos pelos softwares usados nesta análise *in silico* permitem identificar a bomba de efluxo YbhFSR de *A. butzleri* como um potencial transportador da família ABC.

4.3. Construção da estirpe mutante

Tendo em conta que um dos principais objetivos deste trabalho foi a avaliação da função da bomba de efluxo pertencente à família de bombas de efluxo *ATP-binding cassette* (ABC) na resistência e virulência de *A. butzleri*, a etapa de construção do mutante da bomba de efluxo YbhFSR foi considerada o ponto de partida, crucial para dar resposta aos objetivos específicos definidos para este trabalho.

O gene *ybhF*, em concreto, possui dois domínios de ligação a nucleótidos e é o componente responsável pela ligação ao ATP, cuja energia libertada aquando da sua hidrólise permite a translocação de substratos através da bomba de efluxo. Assim, é presumível que se este gene for eliminado, o transportador perde a sua fonte de energia e a capacidade de transferência dos substratos (Feng et al., 2020). Por isto, na estirpe mutante procedeu-se à interrupção do gene *ybhF*, por mutagénesse insercional. Assim, foi iniciada a construção do fragmento de DNA transformante destinado a interromper o gene *ybhF* e conferir resistência à canamicina, de modo a selecionar, na etapa do processo de transformação natural, os clones positivos, sujeitos a posterior confirmação por PCR e sequenciação.

Para tal, primeiramente procedeu-se à etapa de produção e extração do plasmídeo pUC18-K2, presente em *Escherichia coli*, contendo a cassette de resistência à canamicina, *aphA-3*. Na figura 14 pode observar-se a banda correspondente ao plasmídeo, com tamanho de aproximadamente 3500 pb, indicativa de que a sua extração foi realizada com sucesso.

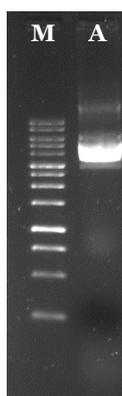


Figura 14 – Eletroforese em gel de agarose representativa do resultado da extração do plasmídeo pUC18-K2 de *E. coli*. M: marcador de peso molecular Bioron 1Kb DNA Ladder; A: plasmídeo pUC18-K2, contendo a cassette *aphA-3*.

Extraído o plasmídeo, tornou-se necessária a sua digestão com as enzimas de restrição BamHI e KpnI para obtenção da cassete *aphA-3*. Depois da sua incubação a 37 °C durante uma hora, foi possível separar os produtos da reação através de uma eletroforese em gel de agarose, tal como se observa na figura 15, em que a banda correspondente à cassete *aphA-3* apresenta o peso molecular mais baixo, de cerca de 850 pb. De seguida, a banda de interesse foi excisada e purificada com recurso a um kit comercial de purificação de gel de eletroforese.

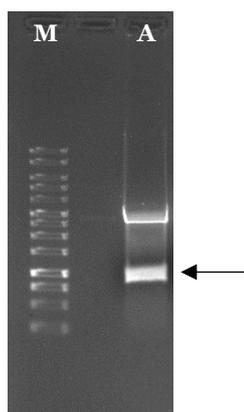


Figura 15 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos da digestão do plasmídeo pUC18-K2 com as enzimas BamHI e KpnI. M: marcador de peso molecular Bioron 1Kb DNA Ladder; A: produtos da digestão enzimática do plasmídeo pUC18-K2, apontando a seta para a banda correspondente ao produto de interesse, a cassete *aphA-3*.

A segunda etapa deste processo consistiu, após extração do gDNA da estirpe parental, na construção dos fragmentos homólogos e junção destes com a cassete de resistência à canamicina, formando o fragmento de DNA transformante. Assim, e usando o gDNA da estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11 como molde, os fragmentos a jusante do codão de iniciação e a montante do codão stop do gene *ybhF* foram amplificados através da técnica de PCR. Na figura 16 encontram-se representadas através de uma eletroforese em gel de agarose, as bandas correspondentes à amplificação dos fragmentos A e B com 438 e 220 pb, respetivamente.

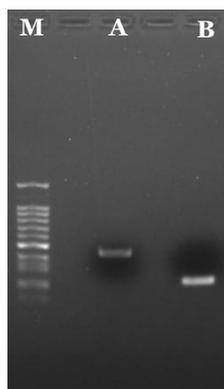


Figura 16 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos de PCR correspondentes à amplificação dos fragmentos hibridizantes com a cassette *aphA-3*. M: marcador de peso molecular Bioron 100 pb Plus DNA Ladder A: Fragmento A; B: Fragmento B.

De seguida, e mantendo a técnica usada para amplificação dos fragmentos hibridizantes, prosseguiu-se com a ligação destes com a cassette, formando o fragmento de DNA transformante de cerca de 1508 pb, cuja banda representativa pode ser observada na figura 17, indicando de que a construção do Fragmento C foi bem-sucedida.

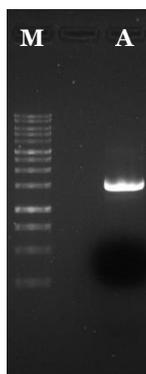


Figura 17 – Eletroforese em gel de agarose representativa do produto de PCR correspondente à junção dos fragmentos hibridizantes A e B com a cassette *aphA-3*. M: marcador de peso molecular Bioron 1Kb DNA Ladder; A: Fragmento C.

Na etapa seguinte, o fragmento construído foi usado para realizar o processo de transformação natural na estirpe *A. butzleri* AB 28/11. Trata-se de um mecanismo de transferência horizontal de genes e caracteriza-se pela absorção, incorporação e expressão funcional de DNA extracelular no genoma de bactérias competentes. Esta competência foi descrita em várias espécies bacterianas, no entanto, o primeiro estudo descritivo do método em *A. butzleri*, que demonstrou que esta se trata de uma bactéria naturalmente competente por transformação, é bastante recente. Nesse que é um trabalho previamente

desenvolvido pelo grupo, foi não só demonstrado o processo por dois procedimentos diferentes, em meio sólido e em meio bifásico, como foram ainda avaliadas as condições externas que mais favorecem a eficácia do método (Bonifácio et al., 2021).

Tirando partido da resistência a antibióticos conferida pela incorporação espontânea de material genético pelo método de transformação natural em meio sólido, a estirpe de *A. butzleri* AB 28/11 foi sujeita ao procedimento descrito na secção 3.1.2.3., tendo-se observado o surgimento de algumas colónias transformadas na placa de meio seletivo quando decorridos 5 dias de incubação, comprovando a competência desta espécie e corroborando a indicação de *A. butzleri* AB 28/11 como uma estirpe naturalmente transformável.

4.3.1. Confirmação da mutagénese

Para confirmar a recombinação homóloga do fragmento de DNA transformante no genoma da estirpe mutante e, por conseguinte, a interrupção do gene em estudo, procedeu-se à amplificação da região específica do genoma onde se situava o gene *ybhF* a partir do gDNA das colónias presentes na placa de meio seletivo usada no processo de transformação natural, e do gDNA da estirpe parental para comparação. O resultado da eletroforese em gel de agarose da corrida dos produtos de PCR amplificados encontra-se representado na figura 18. Por comparação do tamanho das bandas resultantes da amplificação dos fragmentos pode concluir-se que a estirpe mutante incorporou o fragmento de DNA transformante, tendo o gene sido interrompido pela cassette de resistência à canamicina e dando origem à amplificação de um fragmento de cerca de 1508 pb, em oposição à amplificação do gene intacto na estirpe parental com 1245 pb.

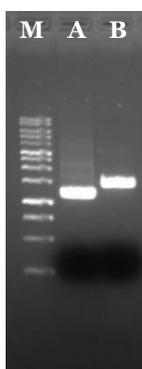


Figura 18 – Eletroforese em gel de agarose representativa dos produtos de PCR correspondentes à amplificação do gene *ybhF* na estirpe parental e do fragmento de DNA transformante na estirpe mutante. MM: marcador de peso molecular Bioron 1Kb DNA Ladder; A: Fragmento amplificado a partir do gDNA da estirpe parental; B: Fragmento amplificado a partir do gDNA da estirpe mutante.

Adicionalmente, a sequenciação da região do gene *ybhF* na estirpe mutante pelo método de Sanger permitiu ainda a confirmação de que a mutação inserida no seu genoma foi bem conseguida, validando o resultado de PCR obtido.

Desta forma, e concluindo-se a interrupção do gene *ybhF*, a estirpe mutante foi denominada de AB 28/11 Δ *ybhF*.

Tendo em conta os resultados apresentados, torna-se plausível supor-se a inativação da bomba de efluxo YbhFSR, uma vez que foi cumprida a interrupção do gene responsável pelo seu processo energético e, conseqüentemente, essencial para a sua função.

4.4. Efeito da interrupção do gene *ybhF* no crescimento bacteriano

Diversos estudos mostraram que a deleção de um gene pertencente a uma bomba de efluxo pode afetar o crescimento bacteriano, apontando como possível justificação a diminuição da extrusão de compostos tóxicos para fora da célula, provocando a sua acumulação intracelular e culminando numa diferença do perfil de crescimento celular entre a estirpe parental e a estirpe mutante (Alcalde-Rico et al., 2016). Especificamente em transportadores do tipo ABC, vários foram os trabalhos que relataram um crescimento mais lento ou uma entrada na fase de morte mais rápida para estirpes mutantes de sistemas de efluxo pertencentes a esta família noutras espécies bacterianas (Asai et al., 2018; Dulyayangkul et al., 2020; Garvey and Piddock, 2008).

De modo a avaliar o efeito da inativação do gene *ybhF* no crescimento bacteriano, procedeu-se à construção de curvas de crescimento para a estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11 e para a estirpe mutante construída. Atentando as curvas de crescimento apresentadas na figura 19, observa-se que a estirpe mutante exibe uma curva de crescimento similar comparativamente à curva de crescimento apresentada pela estirpe parental, não sendo observadas alterações significativas de crescimento. Para além disso, observa-se ainda que o meio da fase exponencial coincide para ambas as estirpes, a cerca de 5 horas de crescimento.

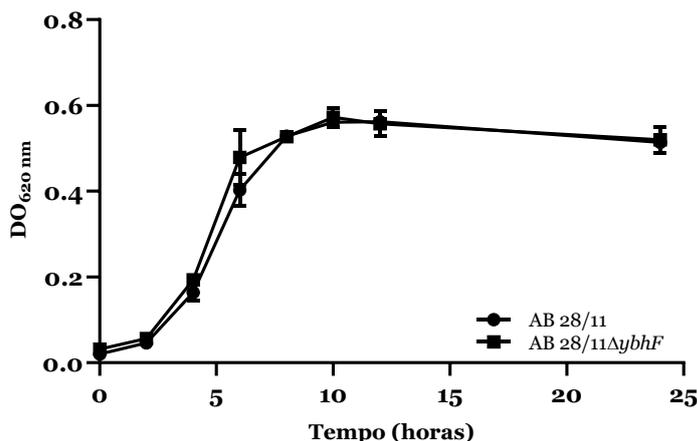


Figura 19 – Curvas de crescimento da estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respectiva estirpe mutada AB 28/11ΔybhF. Resultados apresentados como média ± desvio padrão de dois ensaios independentes.

Este comportamento é consistente com o descrito em outros estudos, onde foi demonstrado que mutações em genes que codificam para proteínas envolvidas no funcionamento de bombas de efluxo pertencentes à família ABC não afetam o perfil de crescimento bacteriano. É o caso do trabalho de Ma et al (2019), que em *Streptococcus suis* verificou que a estirpe cujo transportador do tipo ABC, SstFEG, foi inativado, apresentou uma ligeira diferença de crescimento durante a fase exponencial, mas manteve o perfil de crescimento e pontos máximos de crescimentos idênticos ao da estirpe parental (Ma et al., 2019). Para além desta investigação, variados são os estudos que, com o objetivo de avaliar o papel de bombas de efluxo da família de transportadores ABC em diversas espécies bacterianas, demonstraram um crescimento indistinguível entre as estirpes mutantes comparativamente às estirpes parentais aquando da análise dos seus perfis de crescimento (De Siena et al., 2020; Dulyayangkul et al., 2020; Lin et al., 2014; Shirshikova et al., 2021; Wang et al., 2016). Os resultados obtidos não corroboram, assim, os estudos anteriormente referenciados, que descrevem um crescimento desigual em estirpes mutantes de sistemas de efluxo pertencentes a esta família noutras espécies bacterianas (Asai et al., 2018; Dulyayangkul et al., 2020; Garvey and Piddock, 2008).

Em *A. butzleri* importa atentar a análise do perfil de crescimento de estirpes mutantes construídas em diferentes estudos, cujo objetivo foi avaliar o papel de três bombas de efluxo todas pertencentes à superfamília RND. Aquando da avaliação do papel da bomba de efluxo AreABC, a inativação do gene *areB* nas estirpes mutantes, não coincidentes com a estirpe mutada no presente trabalho, resultou numa diminuição do seu

crescimento relativamente às nativas (Silva, 2017; Ferreira et al., 2021). Por outro lado, os outros estudos mencionados, ambos utilizando a estirpe *A. butzleri* AB 28/11 para avaliação do papel dos sistemas das bombas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI, demonstraram que inativando o gene codificante para a proteína de membrana interna dos sistemas referidos, ocorre uma ligeira diminuição no crescimento das estirpes mutantes construídas (Mateus, 2019; Nunes, 2020; Mateus et al., 2021b). Ainda assim, a diminuição observada não foi significativa, tendo-se concluído perfis de crescimento idênticos entre as estirpes parentais e mutantes e corroborando a hipótese de que a deleção dos genes em causa não afeta significativamente o perfil de crescimento bacteriano.

Assim, tendo em conta os resultados obtidos, concordantes com os resultados descritos nos estudos supracitados, pode concluir-se que a deleção do gene *ybhF* em *A. butzleri* não afeta o crescimento bacteriano, pelo que resultados doravante obtidos dever-se-ão somente à mutação provocada aquando da construção da estirpe mutante e não a uma modificação do seu perfil de crescimento.

4.5. Impacto da inativação da bomba de efluxo YbhFSR na resistência de *Aliarcobacter butzleri*

As bombas de efluxo do tipo ABC transportam uma grande diversidade de substratos através da membrana, tais como iões ou pequenas moléculas como aminoácidos, açúcares, xenobióticos, ou mesmo vitaminas, péptidos ou proteínas e polissacáridos.

Em bactérias de Gram-negativo, à extrusão de uma grande diversidade de substratos está associada a estrutura tripartida das bombas de efluxo, contribuindo para a resistência a múltiplos fármacos e comprometendo o tratamento de infeções graves. Para além da estrutura tripartida associada tipicamente às bombas de efluxo pertencentes à superfamília de bombas de efluxo RND, as bombas de efluxo do tipo ABC podem formar uma estrutura tripartida com transportadores de membrana interna pertencentes à família MFS (Neuberger et al., 2018), como acontece no sistema YbhGFSR previamente discutido.

Apesar de a maioria dos transportadores ABC exibir uma grande especificidade para os respetivos substratos específicos ou grupo de compostos relacionados, está relatada a existência de transportadores ABC associados a multirresistência com poliespecificidade, conseguindo acomodar uma grande variedade de substratos não

relacionados entre si. Assim, e apesar de os membros de bombas de efluxo do tipo RND deterem um papel predominante na associação com multirresistência em bactérias de Gram-negativo e a importância dos transportadores do tipo ABC ter vindo a ser sub-representada, tem cada vez mais sido descrita a existência de transportadores ABC capazes de conferir multirresistência em bactérias, estando envolvidos na sua resistência intrínseca e adquirida (Lubelski et al., 2007).

4.5.1. Determinação da concentração mínima inibitória de agentes antimicrobianos para as estirpes parental e mutante

A contribuição da bomba de efluxo YbhFSR na resistência de *A. butzleri* foi avaliada pela determinação da CMI de vários agentes antimicrobianos distintos, que incluíram antibióticos, desinfetantes, germicida, substrato de bombas de efluxo e metais. A realização de ensaios de determinação da CMI a diferentes antimicrobianos permite não só avaliar a influência da inativação da bomba de efluxo YbhFSR na resistência desta bactéria, como também inferir acerca dos potenciais substratos desta bomba.

De forma geral, e tendo em conta os resultados da determinação de CMI a antibióticos, acriflavina e brometo de etídio apresentados na tabela 10, é perceptível o aumento de suscetibilidade da estirpe mutante AB 28/11 Δ ybhF, comparativamente com a estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11 em vários compostos testados.

As diferenças observadas apontam para que, de entre os 12 compostos testados, os substratos da bomba de efluxo YbhFSR sejam o cloreto de benzalcónio e o brometo de etídio, para os quais as concentrações mínimas inibitórias foram notoriamente reduzidas na estirpe mutante, comparativamente com as CMIs obtidas para a estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11. Adicionalmente, também a ampicilina, eritromicina, cloranfenicol e acriflavina podem corresponder a potenciais substratos desta bomba de efluxo uma vez que, ainda que de forma menos evidente, a CMI para estes agentes antimicrobianos sofreu uma redução de 2×CMI em relação à estirpe nativa.

É ainda perceptível o aumento indubitável da CMI da canamicina na estirpe mutante, de 32 vezes em relação à CMI da estirpe parental, expectável pela inserção da cassete *aphA-3* aquando da construção da estirpe mutante, comprovando o sucesso da mutagenese insercional e da transformação natural descrita na secção 4.3.1..

O ligeiro aumento de resistência detetado para a tetraciclina confronta os dados apresentados por Feng et. al (2020), que indicam a tetraciclina como o substrato do transportador YbhFSR com maior relevância entre os antibióticos em *E. coli*.

Em *A. butzleri*, a avaliação do papel de bombas de efluxo na resistência desta bactéria foi também efetuada através da construção de estirpes mutantes de três bombas de efluxo da família RND, AreABC, AreDEF e AreGHI. Nas investigações correspondentes, constatou-se um papel relevante das bombas de efluxo AreABC e AreGHI, contrariamente à menor influência da bomba de efluxo AreDEF na extrusão de compostos tóxicos para o meio extracelular (Ferreira et al., 2021; Mateus et al., 2021b). Apesar de se tratarem de bombas de efluxo pertencentes à superfamília RND, em contraste com o transportador do tipo ABC em estudo, as investigações indicam uma contribuição distinta de diferentes bombas de efluxo na multirresistência de *A. butzleri*, sugerindo que diferentes bombas de efluxo possam, simultaneamente, ter um papel funcional ativo na extrusão dos diversos agentes antimicrobianos.

Tabela 10 – Concentração mínima inibitória, em µg/mL, de antibióticos, desinfetantes, germicida e substrato de bombas de efluxo para a estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutante AB 28/11ΔybhF.

| Estirpe de <i>A. butzleri</i> | CMI (µg/mL) | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------|-----|-----|-----|-----|-----------|-----------|------------|-----------|-----|-----------|-----------|
| | AMP | CTX | KAN | GEN | CIP | TET | ERY | CHL | CLBZ | CHX | ACR | BrEt |
| AB 28/11 | 64 | 32 | 2 | 0,5 | 16 | 8 | 32 | 128 | 64 | 1 | 32 | 64 |
| AB 28/11ΔybhF | 32 | 32 | 64 | 0,5 | 16 | 16 | 16 | 64 | 16 | 1 | 16 | 16 |

AMP: Ampicilina; CTX: Cefotaxima; KAN: Canamicina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; TET: Tetraciclina; ERY: Eritromicina; CHL: Cloranfenicol; CLBZ: Cloreto de Benzalcónio; CHX: Clorohexidina; ACR: Acriflavina; BrEt: Brometo de Etídio. Os valores a negrito indicam um aumento ou diminuição do valor da CMI entre a estirpe parental e mutante.

Tabela 11 – Concentração mínima inibitória, em mM, de metais para a estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutante AB 28/11ΔybhF.

| Estirpe de <i>A. butzleri</i> | CMI (mM) | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-------------|----|----|-------------|------|----------|-------|----|----|------|------------|----|------------|
| | Cd | Pb | Co | Cu | Cr | Mn | Hg | Mo | Ni | Ag | Zn | Li | Na |
| AB 28/11 | 0,25 | 8 | 1 | 0,5 | 0,01 | 4 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 1 | 32 | 256 |
| AB 28/11ΔybhF | 0,03 | 8 | 1 | 0,25 | 0,01 | 2 | 0,003 | 64 | 1 | 0,01 | 0,5 | 32 | 128 |

Cd: Cádmio; Pb: Chumbo; Co: Cobalto; Cu: Cobre; Cr: Crómio; Mn: Manganês; Hg: Mercúrio; Mo: Molibdénio; Ni: Níquel; Ag: Prata; Zn: Zinco; Li: Lítio; Na: Sódio. Os valores a negrito indicam uma diminuição do valor da CMI entre a estirpe parental e mutante.

Perante os dados apresentados na tabela 11, é notório um aumento acentuado da suscetibilidade da estirpe mutante ao cádmio, com uma redução de oito vezes a CMI da estirpe nativa, e de forma menos explícita, ao cobre, manganês, zinco e sódio, tendo as concentrações mínimas inibitórias sido reduzidas para metade dos valores observados para a estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11.

Os resultados obtidos para o metal sódio vão de encontro aos dados apresentados na única investigação referente ao estudo do transportador YbhFSR, realizada em *E. coli*, que identifica a função de transporte de Na⁺ (Li⁺) a este transportador, especificando-lhe o transporte do tipo “antiporte” Na⁺ (Li⁺)/H⁺ (Feng et al., 2020).

Assim, e apesar de não se registar uma mudança fenotípica de resistente para suscetível a nenhum dos antimicrobianos, pode supor-se que a bomba de efluxo YbhFSR reconhece uma vasta gama de substratos. No entanto, esta observação indica que a bomba de efluxo em análise não é a única envolvida no efluxo destes compostos para o exterior da célula, podendo ter um papel menos expressivo na multirresistência de *A. butzleri* que outras bombas de efluxo presentes no seu genoma, que detêm um papel ativo no efluxo destes agentes antimicrobianos.

4.5.2. Ensaio de acumulação de brometo de etídio para as estirpes parental e mutante

Para que fosse possível confirmar se as diferenças observadas nos ensaios de determinação de CMIs dos antimicrobianos estão associadas a mudanças funcionais no sistema de efluxo YbhFSR e são consequência da perda de efluxo provocada, foram realizados ensaios de acumulação intracelular de brometo de etídio na estirpe mutante, cujos resultados foram comparados com os resultados obtidos para a estirpe parental *A. butzleri* AB 28/11.

Pela análise dos resultados demonstrados na figura 20, é perceptível um aumento da fluorescência dependente do tempo para as duas estirpes em questão, constatando-se um ligeiro aumento de fluorescência ao longo do tempo para a estirpe mutante comparativamente ao aumento de fluorescência apresentada pela estirpe nativa. Este aumento torna-se mais evidente a partir do minuto 30, acentuando a tendência de afastamento das duas curvas e a diferença de fluorescência emitida pelas duas estirpes.

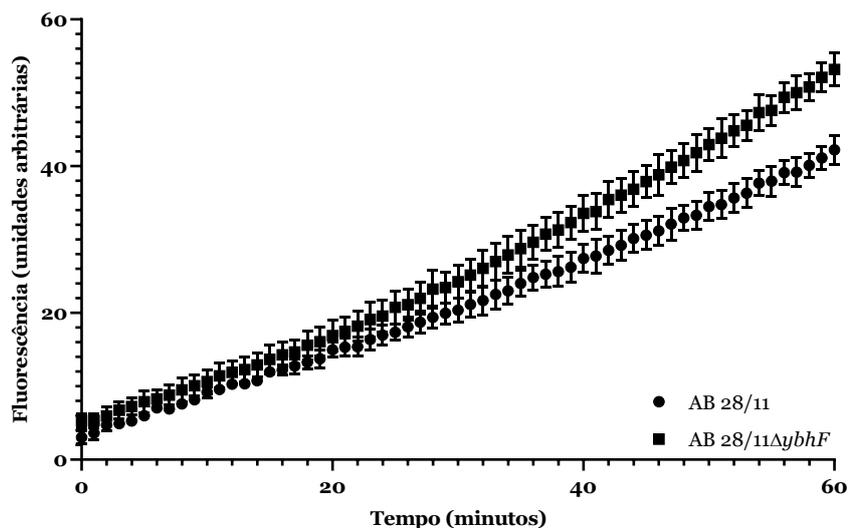


Figura 20 – Acumulação de brometo de etídio ao longo de 60 minutos de incubação para a estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e estirpe mutante AB 28/11ΔybhF.

Este aumento de fluorescência para a estirpe AB 28/11ΔybhF correlaciona-se com uma acumulação intracelular de brometo de etídio, o que é consistente com o evidenciado em trabalhos anteriores. Em *A. butzleri*, esta evidência foi também descrita, não só reforçando o papel funcional da bomba de efluxo AreABC no efluxo de compostos tóxicos (Ferreira et al., 2021), como também focando o papel de duas outras bombas de efluxo pertencentes à superfamília de bombas de efluxo RND (Mateus et al., 2021b). Nesse trabalho, foi também usada a estirpe AB 28/11 para construção de estirpes mutantes das bombas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI, que apresentaram valores de fluorescência bastante superiores aos valores apresentados pela estirpe nativa aquando da realização de ensaios de acumulação de brometo de etídio, demonstrando o papel funcional destes sistemas de efluxo em *A. butzleri* (Mateus et al., 2021b).

Em suma, considerando a diminuição da capacidade de extrusão de brometo de etídio e, conseqüentemente, o aumento na fluorescência apresentada pela estirpe mutante AB 28/11ΔybhF comparativamente com a estirpe nativa, estes resultados comprovam o papel funcional da bomba YbhFSR no efluxo de *A. butzleri*, ainda que menos relevante que o papel funcional demonstrado para as bombas de efluxo pertencentes à superfamília de bombas de efluxo RND.

4.6. Influência da inativação da bomba de efluxo YbhFSR na virulência de *Aliarcobacter butzleri*

Para além do seu papel reconhecido na extrusão de diversos compostos, como antibióticos, desinfetantes ou mesmo metais pesados, e na aquisição de resistência a estes agentes antimicrobianos, as bombas de efluxo estão ainda envolvidas num variado número de processos fisiológicos bacterianos. Entre estes, a extrusão de metabolitos tóxicos e moléculas associadas ao processo de *quorum-sensing*, a modulação de motilidade e formação de biofilme são os processos mais estudados (Shirshikova et al., 2021). Adicionalmente, pode destacar-se a importância do estudo de outros importantes fatores, tais como a suscetibilidade ao soro humano ou a capacidade de adesão e invasão em células do hospedeiro, no caso de se tratar de um microrganismo que requeira essas competências para exercer uma colonização e infeção com sucesso.

Assim sendo, seguidamente traçou-se o perfil de virulência da estirpe mutante AB28/11 Δ *ybhF* através da avaliação de fatores de virulência determinantes em *A. butzleri*, tendo como objetivo concluir acerca do potencial papel funcional do transportador YbhFSR na virulência deste microrganismo.

4.6.1. Efeito da deleção do gene *ybhF* na motilidade de *Aliarcobacter butzleri*
Como mencionado anteriormente, a motilidade é um dos fatores de virulência descritos para *A. butzleri*, sendo esta capacidade justificada pela presença de um único flagelo polar (Ferreira et al., 2016; Chieffi et al., 2020). Para além disso, tem sido estabelecida uma relação entre a presença de várias bombas de efluxo de diferentes famílias e a motilidade como fator de virulência em diversas espécies bacterianas (Aendekerk et al., 2002; Buckner et al., 2016; Lin et al., 2015; Pérez-Varela et al., 2019).

Assim, uma vez que uma mudança na expressão de uma bomba de efluxo pode afetar a expressão de genes que codificam para o flagelo e, por consequência, influenciar a motilidade da estirpe, importou avaliar se a interrupção do gene *ybhF* provocou algum efeito na migração da estirpe mutante comparativamente à da estirpe parental.

Perante os resultados referentes aos ensaios de motilidade realizados para as duas estirpes em estudo e representados na figura 21, pode verificar-se uma redução do diâmetro de migração da estirpe mutante relativamente à estirpe parental tanto após 24 horas como após 48 horas de incubação, observando-se uma diminuição mais acentuada às 48 horas de ensaio. Apesar disso, não são detetadas diferenças estatísticas significativas, pelo que se conclui que ambas as estirpes têm um perfil de motilidade

idêntico, não tendo a inativação do gene *ybhF* tido impacto significativo na capacidade de motilidade de *A. butzleri*.

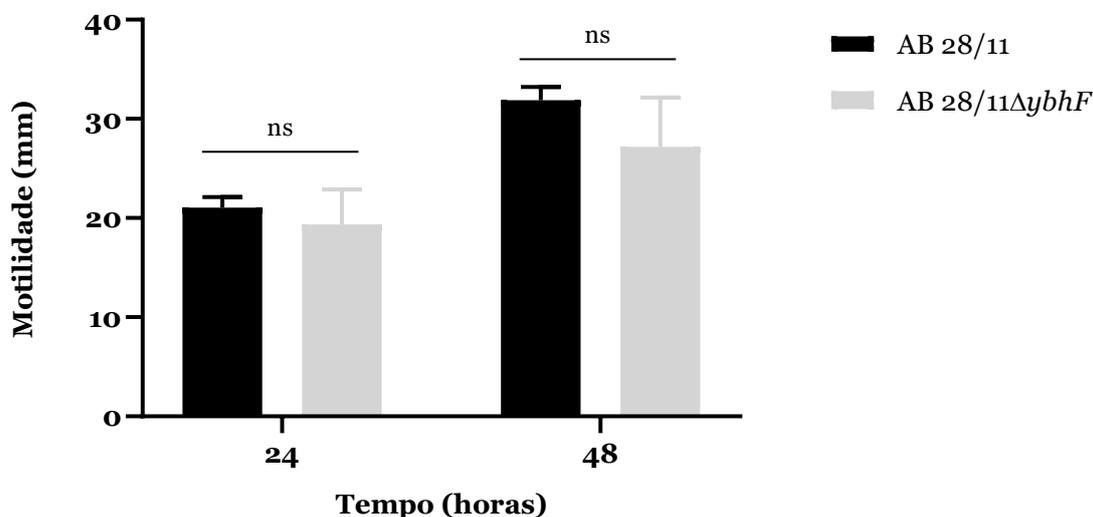


Figura 21 – Capacidade de motilidade das estirpes parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e mutante AB 28/11ΔybhF, às 24 e 48 horas de incubação. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $P > 0,05$ pelo Teste *t student*.

Estes resultados não vão de encontro ao descrito em investigações prévias para outras espécies bacterianas, onde tem sido descrita uma redução da motilidade em estirpes bacterianas mutantes de sistemas de efluxo do tipo ABC. No trabalho de Shirshikova e seus colaboradores, a inativação da bomba de efluxo MacAB em *Serratia marcescens*, previamente associada com a resistência a macrólidos noutras espécies bacterianas, provocou uma redução significativa da motilidade da estirpe mutante construída, que foi relacionada com a perda de flagelos funcionais na superfície da bactéria (Shirshikova et al., 2021). Num outro estudo com o objetivo de avaliar o papel de bombas de efluxo de diferentes famílias em *Acinetobacter baumannii* na virulência deste microrganismo, foi demonstrada uma diminuição da capacidade de motilidade de estirpes mutantes construídas após inativação de seis bombas de efluxo em estudo, das quais duas integram a família de transportadores ABC (Pérez-Varela et al., 2019). Para além dos estudos supracitados, importa ainda analisar este importante fator de virulência, essencial para a colonização e representativo de uma grande vantagem no estabelecimento de infeção, em *A. butzleri*. Recuperando o estudo levado a cabo por Mateus e seus colaboradores, importa atentar os resultados referentes à motilidade das estirpes mutantes AB28/11ΔareB, AB28/11ΔareE e AB28/11ΔareG, onde foi também demonstrada uma

redução do diâmetro de migração para todas as estirpes mutantes em comparação com o diâmetro de motilidade apresentado pela estirpe nativa, embora apenas a diminuição observada para a motilidade da estirpe AB 28/11 Δ *areG* tenha sido significativa (Mateus et al., 2021b).

De acordo com os resultados obtidos pode, assim, concluir-se que o transportador YbhFSR não tem um impacto relevante na motilidade em *A. butzleri*.

4.6.2. Impacto da inativação do gene *ybhF* na capacidade de formação de biofilmes de *Aliarcobacter butzleri*

Tal como descrito para motilidade, a capacidade de formação de biofilmes está também associada com a colonização e persistência de *A. butzleri*. Adicionalmente, e tal como se verifica para a capacidade de migração bacteriana, tem sido descrito um papel importante das bombas de efluxo na capacidade de formação de biofilme por várias espécies bacterianas (Baugh et al., 2012; Kvist et al., 2008; Matsumura et al., 2011).

Assim, tendo em consideração que a mudança na expressão de uma bomba de efluxo pode afetar a capacidade de produção de biofilmes, tornou-se importante focar a capacidade de formação de biofilmes da estirpe mutante comparativamente à estirpe parental *A. butzleri* AB28/11, como um relevante fator de virulência. Para isso, a formação de biofilmes foi quantificada pelo método colorimétrico usando violeta de cristal, tendo o ensaio sido realizado primeiramente em condições de aerobiose e, após constatação de que a formação de biofilme não é favorecida por esta condição, impossibilitando a obtenção de resultados como se observa na figura 22, foi adotada a condição de microaerofilia para a realização deste ensaio.

Como se observa na figura 22, não existe diferença significativa entre a formação de biofilme pela estirpe mutante AB 28/11 Δ *ybhF* em relação à estirpe parental.

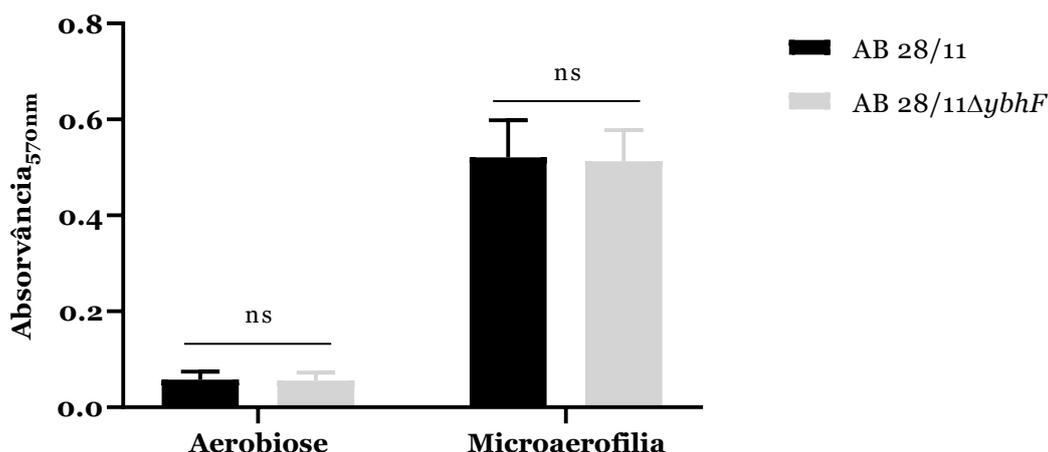


Figura 22 – Capacidade de formação de biofilme das estirpes parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e mutante AB 28/11ΔybhF, após 48 horas de incubação, em condições de aerobiose e microaerofilia. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão das médias de quadruplicados de pelo menos três ensaios independentes. ns: $P > 0,05$ pelo Teste *t student*.

Em transportadores da família ABC, vários são os estudos que comprovam uma redução na capacidade de formação de biofilmes provocada pela inativação de bombas de efluxo deste tipo. A bomba de efluxo MacAB é um caso reconhecido em várias espécies, tendo esta evidência sido descrita em *S. maltophilia*, *S. Typhimurium* e *S. marcescens* (Baugh et al., 2012; Lin et al., 2014; Shirshikova et al., 2021). Em *S. marcescens* e usando o método adotado no presente trabalho, a capacidade de formação de biofilme por parte da estirpe mutante de efluxo foi progressivamente reduzida após 48 e 72 horas de incubação, não tendo sido registadas diferenças entre estirpes às 24 horas de incubação (Shirshikova et al., 2021).

Em *A. butzleri*, a inativação das bombas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI, todas pertencentes à superfamília de bombas de efluxo RND, provocou uma redução significativa na formação de biofilme das estirpes mutantes de efluxo correspondentes comparativamente à estirpe nativa AB28/11 (Mateus et al., 2021b). Este facto pode ser facilmente compreendido pela capacidade reconhecida às bombas de efluxo RND de extrudir sinais de *quorum-sensing*, associados com o processo de comunicação intracelular e, conseqüentemente, com a formação de biofilme (Alcalde-Rico et al., 2016).

Estes resultados sugerem que as bombas de efluxo mencionadas são relevantes na formação de biofilme, ao contrário da bomba de efluxo YbhFSR, que não demonstrou ter um papel expressivo neste importante fator de virulência em *A. butzleri*.

4.6.3. Impacto da interrupção do gene *ybhF* na suscetibilidade ao stress oxidativo em *Aliarcobacter butzleri*

Para além do papel na resistência a antibióticos, as bombas de efluxo têm impacto na resistência ao stress oxidativo. Tem sido descrito o transporte de agentes indutores de stress oxidativo por parte de bombas de efluxo como tentativa de desintoxicação e prevenção dos possíveis danos causados pelas espécies reativas de oxigénio, originárias do stress oxidativo, em diversas espécies bacterianas (Mateus et al., 2021b).

Para avaliar o papel que a bomba de efluxo YbhFSR tem na extrusão de espécies reativas de oxigénio, foi testada a resistência das duas estirpes em estudo a peróxido de hidrogénio e a metil viologénio, dois compostos usados frequentemente na avaliação de suscetibilidade ao stress oxidativo em bactérias.

Atentando os resultados apresentados na figura 23, é possível constatar que a estirpe mutante AB28/11 Δ *ybhF* não apresenta diferença significativa no halo de inibição tanto para todas as concentrações de peróxido de hidrogénio testadas como para o metil viologénio, quando comparado com os dados obtidos para a estirpe parental *A. butzleri* AB28/11.

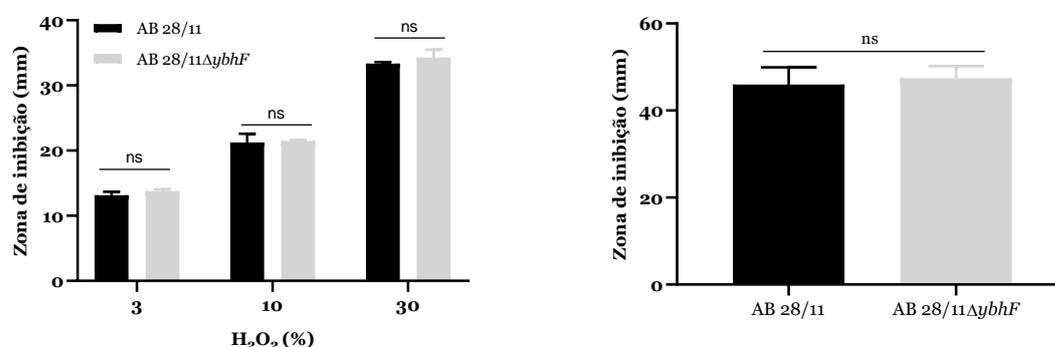


Figura 23 – Suscetibilidade ao stress oxidativo das estirpes parental *Aliarcobacter butzleri* AB28/11 e mutante AB28/11 Δ *ybhF*, após 48 horas de incubação, induzido por (A) peróxido de hidrogénio e (B) metil viologénio. Os dados estão apresentados como média \pm desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes. ns: $P > 0,05$ pelo Teste *t student*.

Em transportadores do tipo ABC, tem sido descrita a relação entre a extrusão de agentes indutores de stress oxidativo, como o peróxido de hidrogénio, e a sobrevivência bacteriana durante o processo de stress oxidativo, destacando o papel das bombas de efluxo na proteção contra este processo (Bogomolnaya et al., 2013; Lin et al., 2014; Shirshikova et al., 2021).

Os ensaios que avaliam o impacto da inativação de bombas de efluxo na suscetibilidade ao stress oxidativo em *A. butzleri* inserem-se em apenas um estudo. Nesse trabalho é demonstrado que, das três bombas pertencentes à família de bombas de efluxo RND selecionadas para análise, apenas a inativação da bomba AreDEF levou a um aumento significativo no diâmetro de inibição contra o peróxido de hidrogénio, enquanto que para o metil viologénio, os três mutantes das bombas de efluxo estudadas exibiram uma maior zona de inibição, comprovando um aumento na suscetibilidade ao stress oxidativo (Mateus et al., 2021b).

Ao contrário do que se evidencia para as bombas do tipo RND analisadas, a bomba YbhFSR parece ter um papel menos relevante na defesa contra o stress oxidativo em *A. butzleri*.

4.6.4. Repercussão da inativação do gene *ybhF* na suscetibilidade ao soro humano em *Aliarcobacter butzleri*

Tendo em conta a natureza autolimitante da infeção por *A. butzleri*, é plausível a suposição de que o sistema imunitário do hospedeiro contribua para a resolução da infeção, tal como sugerido em *C. jejuni* (Fernández et al., 2004; Lappi et al., 2013; Zilbauer et al., 2008). No entanto, este é também um patógeno que tem sido associado a bacteremias (Lau et al., 2002; On et al., 1995). Assim, de forma a avaliar os efeitos bactericidas do soro humano na estirpe parental e respetiva estirpe mutante, ou quanto à sua capacidade de sobrevivência, procedeu-se à realização de ensaios de suscetibilidade ao soro humano, apresentando-se os resultados obtidos na figura 24.

Como controlo do ensaio foi usado soro inativado, pelo que, tal como se observa, não são notados efeitos bactericidas para nenhuma das duas estirpes em estudo.

Contrariamente ao sucedido para a estirpe parental *A. butzleri* AB28/11, que apresenta uma redução significativa do número de células cultiváveis, logo aos 15 minutos de incubação e mantém-no até ao fim do ensaio, a estirpe mutante AB 28/11 Δ *ybhF* mostrou, de forma notória, a sua capacidade de sobrevivência ao longo de todo o ensaio, revelando um perfil de resistência ao soro humano.

Estes resultados não estão em concordância com os resultados obtidos previamente em mutantes de efluxo em *A. butzleri*, onde, para as estirpes onde foram inativadas as bombas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI, foi observado um aumento da suscetibilidade ao soro humano (Mateus et al., 2021b).

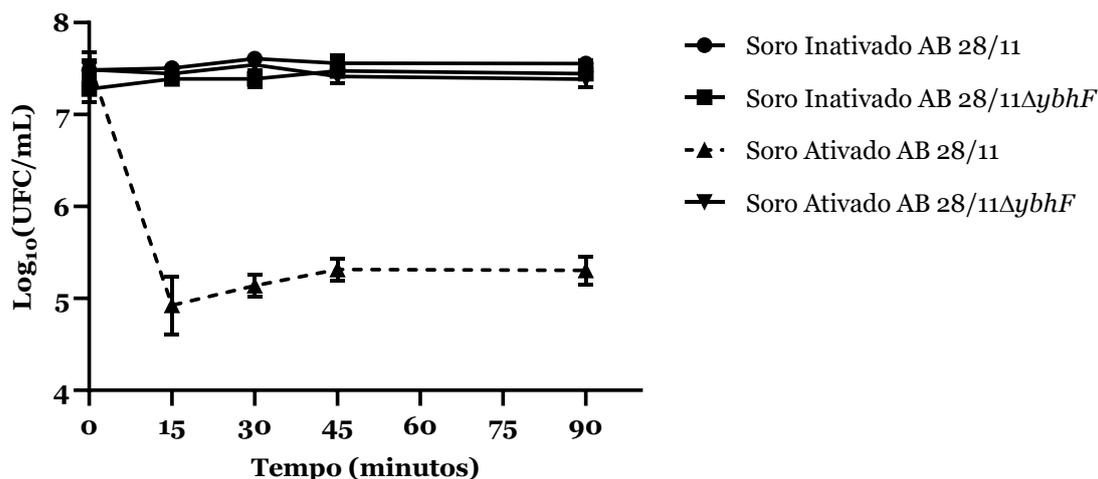


Figura 24 – Suscetibilidade da estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respectiva estirpe mutante AB 28/11ΔybhF ao soro humano, ao longo de 90 minutos de incubação. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão das médias de pelo menos três ensaios independentes.

Recentemente foi descrito em *A. baumannii* um mecanismo de virulência estrategicamente envolvido na indução de dano às células hospedeiras, a alteração da expressão de porinas. As porinas são proteínas presentes na membrana externa capazes de modular a permeabilidade celular. Em *A. baumannii* foi descrita a importância da porina OmpA em múltiplas funções, entre as quais se destaca a sua ligação ao fator H presente no soro humano, fazendo com que esta bactéria escape à morte mediada pelo sistema do complemento (Kim et al., 2009; Tiku, 2022). Tal como foi possível identificar a presença desta porina, é também sugerida a presença de outras porinas importantes para que, entre outras funções, possam conferir resistência contra o sistema do complemento e influenciar o desenvolvimento de resistência ao soro (Massari et al., 2003; Vogel and Frosch, 1999).

A resistência apresentada pela estirpe mutante AB 28/11ΔybhF torna-se, assim, um foco de estudo para esclarecimento do papel do transportador do tipo ABC na suscetibilidade ao soro de *A. butzleri*, pelo que esta investigação carece de estudos adicionais que suportem os resultados obtidos no presente trabalho. Ainda assim, as evidências demonstradas em *A. baumannii* e a correlação demonstrada entre a expressão de bombas de efluxo e porinas em várias espécies bacterianas (Alqumaizi et al., 2022; Xavier et al., 2010) sugerem a possibilidade de a inativação da bomba de efluxo YbhFSR ter tido um potencial impacto na expressão de porinas com funções associadas à ligação a moléculas do sistema do complemento, fazendo com que a estirpe mutante escape à morte por esta via e resista ao soro humano.

4.6.5. Efeito da interrupção do gene *ybhF* na capacidade de *Aliarcobacter butzleri* aderir e invadir células Caco-2

Tendo em conta que a capacidade de adesão e invasão são importantes fatores de virulência em *A. butzleri*, importou complementar o estudo do impacto da bomba de efluxo YbhFSR na virulência desta bactéria com a realização de ensaios de adesão e invasão na linha celular Caco-2, apresentando-se os resultados obtidos na figura 25.

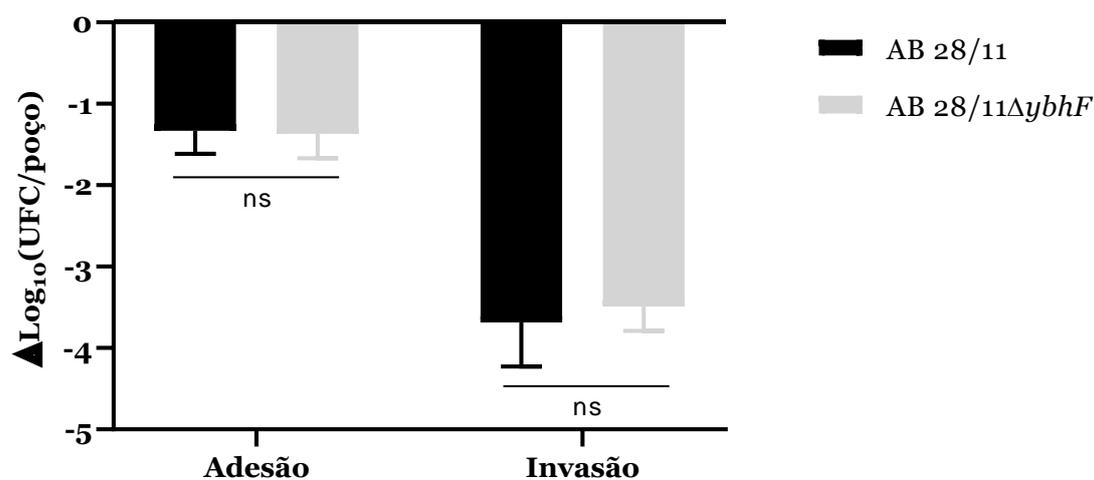


Figura 25 – Ensaios de adesão e invasão para a estirpe parental *Aliarcobacter butzleri* AB 28/11 e respetiva estirpe mutante AB 28/11ΔybhF, na linha celular Caco-2. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão das médias considerando triplicados em pelo menos três ensaios independentes. ns: P>0,05 pelo Teste *t student*.

Comparando com os valores de adesão e invasão para a estirpe parental *A. butzleri* AB28/11, os dados correspondentes obtidos para a estirpe mutante não demonstram a existência de diferenças significativas quando comparada a capacidade de adesão e invasão.

A par do sucedido para a análise de outros fatores, os dados relativos à avaliação deste fator de virulência não demonstram ter diferenças significativas que propusessem um perfil de adesão e invasão distinto entre as duas estirpes, impossibilitando a associação de um papel da bomba de efluxo YbhFSR na capacidade de adesão e invasão de *A. butzleri in vitro* na linha celular epitelial intestinal humana Caco-2. Um perfil diferente foi verificado anteriormente, para estirpes mutantes dos sistemas de efluxo AreABC, AreDEF e AreGHI, onde foi detetado que as estirpes mutantes se revelam menos aderentes às células do epitélio intestinal, mas não apresentam diferença no seu perfil de invasão (Mateus et al., 2021b). Contrariamente, noutros agentes patogénicos, como é o

caso de *Salmonella enterica*, foi indicado um efeito significativo de uma bomba de efluxo pertencente à superfamília RND, AcrAB-TolC, na capacidade de adesão e invasão deste microrganismo na linha celular intestinal embrionária humana INT 407, demonstrando uma redução notória destas capacidades aquando da inativação de genes codificantes para o sistema de efluxo estudado (Zhang et al., 2018).

Capítulo 5 - Conclusões

Aliarcobacter butzleri, é uma das espécies pertencentes ao género *Aliarcobacter*, pertencente atualmente à ordem *Campylobacterales* e inserido na família *Arcobacteraceae*. Trata-se de um microrganismo com ampla distribuição em diversos ambientes e com capacidade de colonizar diferentes hospedeiros, associando-se a enterites e bacteremias em humanos. Tendo em conta o aumento das taxas de multirresistências atribuídas a *A. butzleri*, e que o tratamento de infeções graves se encontra, assim, comprometido, torna-se relevante a compreensão dos mecanismos associados à resistência e virulência deste microrganismo. Assim, e tendo trabalho prévio do grupo indicado a presença de sistemas de bombas de efluxo com relevância não só na multirresistência da bactéria, como também na sua virulência, o objetivo geral deste trabalho consistiu na avaliação do papel de bombas de efluxo em *A. butzleri*, com foco numa bomba de efluxo putativa pertencente à família ABC.

Assim, pela avaliação do perfil de resistência de *A. butzleri* a antibióticos, desinfetantes, metais e outros antimicrobianos, e correlação com perfil de acumulação de brometo de etídio de 24 estirpes de diferentes origens, foi demonstrado o papel que as bombas de efluxo têm na resistência de *A. butzleri*, com foco na resistência a ciprofloxacina e eritromicina. Para além disso, foi ainda observado o perfil de multirresistência apresentado pela estirpe *A. butzleri* AB 28/11, bem como a superior atividade de bombas de efluxo presentes nesta estirpe, justificando, em parte, a sua utilização na fase de construção de uma estirpe mutante para avaliação do papel funcional de uma bomba de efluxo do tipo ABC na resistência e virulência de *A. butzleri*.

A análise bioinformática da bomba de efluxo YbhFSR demonstrou que dos três genes integrantes da bomba de efluxo, *ybhF* codifica para uma proteína citoplasmática, e cuja análise estrutural e filogenética de YbhF confirmou que esta se trata de uma proteína exportadora pertencente à família de transportadores ABC, representando a subunidade contendo regiões de ligação a ATP, responsável pelo processo energético da bomba de efluxo YbhFSR de *A. butzleri*.

Considerando a informação da análise bioinformática, prosseguiu-se com a avaliação da potencial influência da bomba de efluxo YbhFSR no perfil de resistência e virulência de *A. butzleri*. Para isso, foi contruída uma estirpe mutante em que se procedeu à inativação do gene responsável pela ligação de ATP, *ybhF*, por mutagenese insercional e transformação natural na estirpe *A. butzleri* AB 28/11. Verificado o sucesso da interrupção do gene *ybhF*, foi testado o seu impacto no crescimento bacteriano, não

tendo sido obtidas diferenças significativas de crescimento entre a estirpe parental e mutante. Seguidamente, pela determinação das CMI's verificou-se que a bomba de efluxo YbhFSR pode ter influência na resistência a diversos antimicrobianos, com especial relevância para o cloreto de benzalcônio, brometo de etídio e cádmio, tendo ainda como potenciais substratos desta bomba de efluxo a ampicilina, eritromicina, cloranfenicol, acriflavina, cobre, manganês, zinco e sódio.

No seguimento deste estudo, foi ainda avaliada a influência da bomba de efluxo YbhFSR na acumulação intracelular de compostos, nomeadamente de brometo de etídio, através de um método de fluorescência. Os resultados obtidos indicaram um aumento da acumulação de brometo de etídio ligeira por parte da estirpe mutante em comparação à estirpe parental, demonstrando um potencial papel da bomba de efluxo YbhFSR no efluxo de *A. butzleri*.

Por fim, avaliou-se o efeito da interrupção do gene *ybhF* no perfil de virulência de *A. butzleri*, verificando-se que o sistema de efluxo em estudo não tem um papel na motilidade, capacidade de formação de biofilme, suscetibilidade ao stress oxidativo ou capacidade da adesão e invasão em células Caco-2. No entanto, quando avaliada a suscetibilidade ao soro humano, foi detetada uma sobrevivência da estirpe mutante ao longo de todo o tempo de ensaio, contrastando com a suscetibilidade imediata demonstrada pela estirpe parental.

Em suma, neste trabalho foi demonstrada a relevância das bombas de efluxo na resistência de *A. butzleri*, tendo sido evidenciado o papel da bomba de efluxo YbhFSR. Os resultados sugerem ainda que a bomba de efluxo YbhFSR não possui um papel relevante na virulência de *A. butzleri*. Assim, e ainda que o presente estudo contribua para a compreensão dos mecanismos de resistência e virulência de *A. butzleri*, seria importante complementá-lo com estudos adicionais, bem como confirmar os resultados obtidos num maior número de estirpes.

Capítulo 6 – Perspetivas futuras

Tendo em consideração a necessidade de uma melhor compreensão dos mecanismos de resistência e virulência de *A. butzleri*, bem como a importância associada às bombas de efluxo nesta bactéria, sendo-lhes atribuído um potencial interesse na terapêutica contra infeções por este microrganismo, seria importante progredir com estudos em que seja aprofundada a temática abordada neste trabalho. Para além de alargar o número de transportadores do tipo ABC a estudar e de determinar outros mecanismos que possam estar envolvidos em sinergismo com as bombas de efluxo na resistência e virulência de *A. butzleri*, seria ainda interessante dar continuidade ao estudo do potencial papel da bomba de efluxo YbhFSR nestes dois processos, nomeadamente:

- Alargando o número de estirpes para avaliação do efeito da inativação da bomba de efluxo YbhFSR;
- Avaliando se a inativação da bomba de efluxo YbhFSR induz um aumento da expressão de outros sistemas de efluxo;
- Aprofundando a temática da resistência simultânea a antibióticos e metais pesados em *A. butzleri*, por exemplo através da realização de uma análise genómica com o objetivo de identificar proteínas específicas de resistência a metais no genoma de estirpes de *A. butzleri*, a ligação genética entre genes envolvidos na resistência a metais e a antibióticos, bem como proceder a uma identificação de bombas de efluxo que se localizem perto de genes envolvidos na resistência a antibióticos e reguladores transcricionais de deteção de metais;
- Complementando os estudos relativos aos resultados obtidos para o metal sódio na estirpe mutante, AB 28/11 Δ *ybhF*, e o transporte do tipo “antiporte” Na⁺(Li⁺)/H⁺, através da realização de curvas de crescimento na presença de diferentes concentrações de NaCl e LiCl;
- Avaliando uma possível interação entre a expressão da bomba de efluxo em estudo e putativas porinas em *A. butzleri*, e a resistência apresentada pela estirpe mutante, AB 28/11 Δ *ybhF*, ao soro humano.

Bibliografia

Abdelbaqi, K., Ménard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P., and Mégraud, F. (2007). Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 49(3), 337–345.

Açik, M. N., Yüksel, H., Ulucan, A., and Çetinkaya, B. (2016). The first experimental research on the pathogenicity of *Arcobacter butzleri* in zebrafish. *Veterinary Microbiology*, 189, 32–38.

Adesiji, Y. O., Emikpe, B. O., and Opalekunde, A. B. (2011). Histopathological and functional changes in the testicles of albino rats experimentally infected with *Arcobacter butzleri*. *Acta Medica Lituanica*, 18(3), 127–131.

Aendekerk, S., Ghysels, B., Cornelis, P., and Baysse, C. (2002). Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology*, 148(8), 2371–2381.

Alam, M. M., Islam, M., Wahab, A., and Billah, M. (2019). Antimicrobial resistance crisis and combating approaches. *Journal of Medicine (Bangladesh)*, 20(1), 38–45.

Alcalde-Rico, M., Hernando-Amado, S., Blanco, P., and Martínez, J. L. (2016). Multidrug efflux pumps at the crossroad between antibiotic resistance and bacterial virulence. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1483.

Adlerova, L., Bartoskova, A., Faldyna, M. (2008). Lactoferrin: a review. *Veterinarni Medicina*, 53, 457–468.

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

Alonso, R., Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Romalde, Jesús L., Figueras, M. José, and Fernandez-Astorga, A. (2020). *Aliarcobacter vitoriensis* sp. Nov., Isolated from carrot and urban wastewater. *Systematic and Applied Microbiology*, 43 (4), 126091.

Alqumaizi, K. I., Kumar, S., Anwer, R., and Mustafa, S. (2022). Differential Gene Expression of Efflux Pumps and Porins in Clinical Isolates of MDR *Acinetobacter baumannii*. *Life*, 12(3), 419.

- Anderson, K. F., Kiehlbauch, J. A., Anderson, D. C., McClure, H. M., and Wachsmuth, I. K. (1993). *Arcobacter* (*Campylobacter*) *butzleri*-associated diarrheal illness in a nonhuman primate population. *Infection and Immunity*, *61*(5), 2220–2223.
- Asai, T., Okamoto-Shibayama, K., Kikuchi, Y., and Ishihara, K. (2018). Characterization of a novel potential peptide import system in *Treponema denticola*. *Microbial Pathogenesis*, *123*, 467–472.
- Atabay, H. I., Unver, A., Sahin, M., Otlu, S., Elmali, M., and Yaman, H. (2008). Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese (*Anser anser*). *Veterinary Microbiology*, *128*(3–4), 400–405.
- Aydin, F., Gümüşsoy, K. S., Atabay, H. I., Iça, T., and Abay, S. (2007). Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(1), 27–35.
- Baker-Austin, C., Wright, M. S., Stepanauskas, R., and McArthur, J. V. (2006). Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, *14*(4), 176–182.
- Barfour, A. F., Mensah, A. Y., Asante-Kwatia, E., Danquah, C. A., Anokwah, D., Adjei, S., Baah, M. K., and Mensah, M. L. K. (2021). Antibacterial, Antibiofilm, and Efflux Pump Inhibitory Properties of the Crude Extract and Fractions from *Acacia macrostachya* Stem Bark. *Scientific World Journal*, *2021*, 5381993.
- Baugh, S., Ekanayaka, A. S., Piddock, L. J. V., and Webber, M. A. (2012). Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(10), 2409–2417.
- Bengtsson-Palme, J., and Larsson, D. G. J. (2015). Antibiotic resistance genes in the environment: Prioritizing risks. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(6), 396.
- Berne, C., Ellison, C. K., Ducret, A., & Brun, Y. V. (2018). Bacterial adhesion at the single-cell level. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(10), 616–627.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B., and Martinez, J. L. (2016). Bacterial multidrug efflux pumps: Much more than antibiotic resistance determinants. *Microorganisms*, *4*(1), 14.
- Bogomolnaya, L. M., Andrews, K. D., Talamantes, M., Maple, A., Ragoza, Y., Vazquez-Torres, A., and Andrews-Polymeris, H. (2013). The ABC-type efflux pump MacAB protects *Salmonella enterica* serovar typhimurium from oxidative stress. *MBio*, *4*(6),

e00630-13.

Bojanić, K., Midwinter, A. C., Marshall, J. C., Biggs, P. J., and Acke, E. (2019). Isolation of emerging *Campylobacter* species in working farm dogs and their frozen home-killed raw meat diets. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *31*(1), 23–32.

Bonifácio, M., Mateus, C., Alves, A. R., Maldonado, E., Duarte, A. P., Domingues, F., Oleastro, M., and Ferreira, S. (2021). Natural transformation as a mechanism of horizontal gene transfer in *Aliarcobacter butzleri*. *Pathogens*, *10*(7), 909.

Brandt, K. K., Frandsen, R. J. N., Holm, P. E., and Nybroe, O. (2010). Development of pollution-induced community tolerance is linked to structural and functional resilience of a soil bacterial community following a five-year field exposure to copper. *Soil Biology and Biochemistry*, *42*(5), 748–757.

Brückner, V., Fiebiger, U., Ignatius, R., Friesen, J., Eisenblätter, M., Höck, M., Alter, T., Bereswill, S., Heimesaat, M. M., and Gölz, G. (2020). Characterization of *Arcobacter* strains isolated from human stool samples: Results from the prospective German prevalence study Arcopath. *Gut Pathogens*, *12*(1), 21.

Bruegge, J. zur, Hanisch, C., Einspanier, R., Alter, T., Gölz, G., and Sharbati, S. (2014). *Arcobacter butzleri* induces a pro-inflammatory response in THP-1 derived macrophages and has limited ability for intracellular survival. *International Journal of Medical Microbiology*, *304*(8), 1209–1217.

Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., and Schulzke, J. D. (2009). *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *Journal of Infectious Diseases*, *200*(5), 756–764.

Buckner, M. M. C., Blair, J. M. A., La Ragione, R. M., Newcombe, J., Dwyer, D. J., Ivens, A., and Piddock, L. J. V. (2016). Beyond antimicrobial resistance: Evidence for a distinct role of the AcrD efflux pump in *Salmonella* biology. *MBio*, *7*(6), e01916-16.

Caille, O., Rossier, C., and Perron, K. (2007). A copper-activated two-component system interacts with zinc and imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, *189*(13), 4561–4568.

Cervenka, L. (2007). Survival and inactivation of *Arcobacter* spp., a current status and future prospect. *Critical Reviews in Microbiology*, *33*(2), 101–108.

Chaban, B., Coleman, I., and Beeby, M. (2018). Evolution of higher torque in *Campylobacter*-Type bacterial flagellar motors. *Scientific Reports*, *8*(1), 97.

- Chaves, M., Vazquez-Valverde, D., Fernández-Jaramillo, H., and Arias-Echandi, M. L. (2021). The ability of *Aliarcobacter butzleri* strains isolated from foods of animal origin in costa rica to form biofilm. *Italian Journal of Food Safety*, 10(2)9020,
- Chen, C. C., Chang, C. J., Lin, T. Y., Lai, M. W., Chao, H. C., and Kong, M. S. (2011). Usefulness of fecal lactoferrin in predicting and monitoring the clinical severity of infectious diarrhea. *World Journal of Gastroenterology*, 17(37), 4218–4224.
- Chieffi, D., Fanelli, F., and 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.
- Choudhuri, B. S., Bhakta, S., Barik, R., Basu, J., Kundu, M., and Chakrabarti, P. (2002). Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drrA* and *drrB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemical Journal*, 367(1), 279–285.
- Ciocchini, A. E., Roset, M. S., Iñó De Iannino, N., and Ugalde, R. A. (2004). Membrane topology analysis of cyclic glucan synthase, a virulence determinant of *Brucella abortus*. *Journal of Bacteriology*, 186(21), 7205–7213.
- Collado, L., and Figueras, M. J. (2011). Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(1), 174–192.
- Collado, L., Guarro, J., and Figueras, M. J. (2009). Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1102–1106.
- Collado, L., Gutiérrez, M., González, M., and Fernández, H. (2013). Assessment of the prevalence and diversity of emergent *campylobacteria* in human stool samples using a combination of traditional and molecular methods. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(4), 434–436.
- Collado, L., Inza, I., Guarro, J., and Figueras, M. J. (2008). Presence of *Arcobacter* spp. in environmental waters correlates with high levels of fecal pollution. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1635–1640.
- Collado, L., Jara, R., Vásquez, N., and Telsaint, C. (2014). Antimicrobial resistance and virulence genes of *Arcobacter* isolates recovered from edible bivalve molluscs. *Food Control*, 46, 508–512.
- Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, J. M., and Figueras, M. J. (2010). Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. *Water*

Research, 44(12), 3696–3702.

De Siena, B., Campolattano, N., D'Abrosca, G., Russo, L., Cantillon, D., Marasco, R., Muscariello, L., Waddell, S. J., and Sacco, M. (2020). Characterization of the Mycobacterial MSMEG-3762/63 Efflux Pump in *Mycobacterium smegmatis* Drug Efflux. *Frontiers in Microbiology*, 11, 575828.

De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, Stephen L. W., Doudiah, L., and Houf, K. (2011). *Arcobacter trophiarum* spp. Nov., isolated from fattening pigs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 356–61.

Dekker, D., Eibach, D., Boahen, K. G., Akenten, C. W., Pfeifer, Y., Zautner, A. E., Mertens, E., Krumkamp, R., Jaeger, A., Flieger, A., Owusu-Dabo, E., and May, J. (2019). Fluoroquinolone-Resistant *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp., and *Arcobacter butzleri* from Local and Imported Poultry Meat in Kumasi, Ghana. *Foodborne Pathogens and Disease*, 16(5), 352–358.

Di Francesco, A., Delogu, M., Giacometti, F., Stancampiano, L., Grilli, E., Guarniero, I., and Serraino, A. (2014). First detection of *Arcobacter* sp. Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*). *Veterinaria Italiana*, 50(4), 313–315.

Doudiah, L., De Zutter, L., Baré, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., and Houf, K. (2012). Occurrence of putative virulence genes in *Arcobacter* Species isolated. *Journal of Clinical Microbiology*, 50, 735–41.

Dulyayangkul, P., Heesom, K. J., and Avison, M. B. (2020). Novel Mechanisms of Efflux-Mediated Levofloxacin Resistance and Reduced Amikacin Susceptibility in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(1), e01284-20.

Erickson, D. L., Endersby, R., Kirkham, A., Stuber, K., Vollman, D. D., Rabin, H. R., Mitchell, I., and Storey, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing systems may control virulence factor expression in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Infection and Immunity*, 70(4), 1783–1790.

Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., and Poole, K. (1998). Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 180(20), 5443–5447.

Fanelli, F., Chieffi, D., Di Pinto, A., Mottola, A., Baruzzi, F., and Fusco, V. (2020). Phenotype and genomic background of *Arcobacter butzleri* strains and taxogenomic assessment of the species. *Food Microbiology*, 89, 1034-16.

Fanelli, F., Di Pinto, A., Mottola, A., Mule, G., Chieffi, D., Baruzzi, F., Tantillo, G., and Fusco, V. (2019). Genomic characterization of *Arcobacter butzleri* isolated from shellfish: Novel insight into antibiotic resistance and virulence determinants. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 670.

Feng, Z., Liu, D., Wang, L., Wang, Y., Zang, Z., Liu, Z., Song, B., Gu, L., Fan, Z., Yang, S., Chen, J., and Cui, Y. (2020). A Putative Efflux Transporter of the ABC Family, YbhFSR, in *Escherichia coli* Functions in Tetracycline Efflux and Na⁺(Li⁺)/H⁺ Transport. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 556.

Fera, M. T., La Camera, E., Carbone, M., Malara, D., and Pennisi, M. G. (2009). Pet cats as carriers of *Arcobacter* spp. in southern Italy. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(5), 1661–1666.

Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., La Camera, E., Lentini, V., Favalaro, A., Bonanno, D., and Carbone, M. (2008). Induction and resuscitation of viable nonculturable *Arcobacter butzleri* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(10), 3266–3268.

Fera, Maria Teresa, Russo, G. T., Di Benedetto, A., La Camera, E., Orlando, A., Giandalia, A., Ruffa, V. F., Lanza, G., Lentini, V., Perdichizzi, G., and Cucinotta, D. (2010). High prevalence of *Arcobacter* carriage in older subjects with type 2 diabetes. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, *2010*, 489784.

Fernandez, H., Villanueva, M. P., Mansilla, I., Gonzalez, M., and Latif, F. (2015). *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Brazilian Journal of Microbiology*, *147*, 145–47.

Fernández, H., Vera, F., and Villanueva, M. P. (2007). *Arcobacter* and *Campylobacter* species in birds and mammals from Southern Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*, *39*(2), 163–165.

Fernández, Heriberto, Krause, S., and Villanueva, M. P. (2004). *Arcobacter butzleri* an emerging enteropathogen: Communication of two cases with chronic diarrhea. *Brazilian Journal of Microbiology*, *35*(3), 216–218.

Fernández, L., and Hancock, R. E. W. (2012). Adaptive and mutational resistance: Role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *25*(4), 661–681.

Ferreira, S., Oleastro, M., and Domingues, F. C. (2017a). Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* sp. in a dairy plant. *Journal of Applied*

Microbiology, 123(4), 1019–1026.

Ferreira, Susana, Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., and Oleastro, M. (2013). Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1), 82–88.

Ferreira, Susana, Júlio, C., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., and Oleastro, M. (2014a). Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78(3), 220–225.

Ferreira, Susana, Luís, Â., Oleastro, M., Pereira, L., and Domingues, F. C. (2019a). A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 16, 130–139.

Ferreira, Susana, Oleastro, M., and Domingues, F. (2017b). *Arcobacter* spp. in food chain—from culture to omics. *Foodborne Pathogens and Antibiotic Resistance*, 73–117.

Ferreira, Susana, Oleastro, M., and Domingues, F. (2019b). Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain. *Current Opinion in Food Science*, 26, 9–17.

Ferreira, Susana, Queiroz, J. A., Oleastro, M., and Domingues, F. C. (2014b). Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*, 76, 19–25.

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

Ferreira, Susana, Silva, A. L., Tomás, J., Mateus, C., Domingues, F., and Oleastro, M. (2021). Characterization of AreABC, an RND-type efflux system involved in antimicrobial resistance of *Aliarcobacter butzleri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(9), e00729-21.

Fong, T. T., Mansfield, L. S., Wilson, D. L., Schwab, D. J., Molloy, S. L., and 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.

Garcia, Í. R., de Oliveira Garcia, F. A., Pereira, P. S., Coutinho, H. D. M., Siyatpanah, A., Norouzi, R., Wilairatana, P., de Lourdes Pereira, M., Nissapatorn, V., Tintino, S. R., and Rodrigues, F. F. G. (2022). Microbial resistance: The role of efflux pump superfamilies and their respective substrates. *Life Sciences*, 295, 120391.

Garvey, M. I., and Piddock, L. J. V. (2008). The efflux pump inhibitor reserpine selects multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* strains that overexpress the ABC transporters PatA and PatB. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(5), 1677–1685.

Giacometti, F., Serraino, A., Marchetti, G., Bonerba, E., Florio, D., Bonfante, E., Zanoni, R. G., and Rosmini, R. (2013). Isolation of *Arcobacter butzleri* in environmental and food samples collected in industrial and artisanal dairy plants. *Italian Journal of Food Safety*, 2(3), 121–123.

Giacometti, F., Lucchi, A., Di Francesco, A., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I., Stancampiano, L., Manfreda, G., Merialdi, G., & Serraino, A. (2015). *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* circulation in a dairy farm and sources of milk contamination. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5055–5063.

Gilbert, M. J., Duim, B., Zomer, A. L., and Wagenaar, J. A. (2019). Living in cold blood: *Arcobacter*, *Campylobacter*, and *Helicobacter* in reptiles. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1086.

Gill, K. P. W. (1983). Aerotolerant *Campylobacter* strain isolated from a bovine preputial sheath washing. *Vet. Rec.* 112, 459.

Gölz, G., Karadas, G., Alutis, M. E., Fischer, A., Köhl, A. A., Breithaupt, A., Göbel, U. B., Alter, T., Bereswill, S., and Heimesaat, M. M. (2015). *Arcobacter butzleri* induce colonic, extra-intestinal and systemic inflammatory responses in gnotobiotic IL-10 deficient mice in a strain-dependent manner. *PLoS ONE*, 10(9), e0139402.

González, A., Bayas Morejón, I. F., and Ferrús, M. A. (2017). Isolation, molecular identification and quinolone-susceptibility testing of *Arcobacter* spp. isolated from fresh vegetables in Spain. *Food Microbiology*, 65, 279–283.

González, A., and Ferrús, M. A. (2011). Study of *Arcobacter* spp. contamination in fresh lettuces detected by different cultural and molecular methods. *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), 311–314.

Guerrant, R. L., Steiner, T. S., Lima, A. A. M., and Bobak, D. A. (1999). How intestinal bacteria cause disease. *Journal of Infectious Diseases*, 179, 331–337.

Guilfoile, P. G., and Hutchinson, C. R. (1991). A bacterial analog of the *mdr* gene of mammalian tumor cells is present in *Streptomyces peucetius*, the producer of daunorubicin and doxorubicin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America, 88(19), 8553–8557.

Haiko, J., and Westerlund-Wikström, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology*, 2(4), 1242–1267.

Hamir, A. N., Sonn, R. J., Franklin, S., and Wesley, I. V. (2004). *Campylobacter jejuni* and *Arcobacter* species associated with intussusception in a raccoon (*Procyon lotor*). *Veterinary Record*, 155(11), 338–340.

Hansen, L. H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A. H., and Sørensen, S. J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(9), 3332–3337.

Hassan, K. A., Jackson, S. M., Penesyan, A., Patching, S. G., Tetu, S. G., Eijkelkamp, B. A., Brown, M. H., Henderson, P. J. F., and Paulsen, I. T. (2013). Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(50), 20254–20259.

Hassan, K. A., Liu, Q., Henderson, P. J. F., and Paulsen, I. T. (2015). Homologs of the *Acinetobacter baumannii* AceI transporter represent a new family of bacterial multidrug efflux systems. *MBio*, 6(1), 1–5.

Hayashi, S., Mitsuko, A., Kimoto, M., Furukawa, S., and Nakazawa, T. (2000). The DsbA-DsbB disulfide bond formation system of *Burkholderia cepacia* is involved in the production of protease and alkaline phosphatase, motility, metal resistance, and multi-drug resistance. *Microbiology and Immunology*, 44(1), 41–50.

Hilton, C. L., Mackey, B. M., Hargreaves, A. J., and Forsythe, S. J. (2001). The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 91(5), 929–932.

Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Kamihira, S., Hancock, R. E. W., and Speert, D. P. (2002). Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Experimental Medicine*, 196(1), 109–118.

Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., and Gaastra, W. (2006). *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*, 115(1–3), 1–13.

Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Hendriks, H. G. C. J. M., Tooten, P. C. J., Ultee, T., and Gaastra, W. (2007). Interaction of *Arcobacter* spp. with human and porcine intestinal

epithelial cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 50(1), 51–58.

Ho, T. K. H., Lipman, L. J. A., Van Der Graaf-Van Bloois, L., Van Bergen, M., and Gaastra, W. (2006). Potential routes of acquisition of *Arcobacter* species by piglets. *Veterinary Microbiology*, 114(1–2), 123–133.

Hollenstein, K., Dawson, R. J., and Locher, K. P. (2007). Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 17(4), 412–418.

Houf, K., On, Stephen L. W., Coenye, T., Mast, J., Hoof, Jan Van, and Vandamme, P. (2005) *Arcobacter cibarius* spp. Nov., isolated from Broiler Carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 713–17.

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

Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De Smet, S., and Vandamme, P. (2009). *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2599–2604.

ICMSF. (Eds.). (2018). Microorganisms in food 7 - Microbiological testing in food safety management. *Internacional Commission on Microbiological Specifications for Foods*, Springer Science & Business Media.

Isidro, J., Ferreira, S., Pinto, M., Domingues, F., Oleastro, M., Gomes, J. P., and 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.

Jernaes, M. W., and Steen, H. B. (1994). Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: Influx and efflux of ethidium bromide. *Cytometry*, 17(4), 302–309.

Johnson, L. G., and Murano, E. A. (2002). Lack of a cytolethal distending toxin among *Arcobacter* isolates from various sources. *Journal of Food Protection*, 65(11), 1789–1795.

Jones, P. M., O'Mara, M. L., and George, A. M. (2009). ABC transporters: a riddle wrapped in a mystery inside an enigma. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(10), 520–531.

Josenhans, C., and Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605–614.

Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Kubo, M., Yamamoto, K., Arai, S., Izumi, T.,

- Kobayashi, Y., Katsube, Y., and Mikami, T. (2003). Distribution of *Arcobacter* species among livestock in Japan. *Veterinary Microbiology*, *93*(2), 153–158.
- Kabeya, H., Maruyama, S., Morita, Y., Ohsuga, T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., Abe, M., Katsube, Y., and Mikami, T. (2004). Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International Journal of Food Microbiology*, *90*(3), 303–308.
- Kanipes, M. I., Papp-Szabo, E., Guerry, P., and Monteiro, M. A. (2006). Mutation of *waaC*, encoding heptosyltransferase I in *Campylobacter jejuni* 81-176, affects the structure of both lipooligosaccharide and capsular carbohydrate. *Journal of Bacteriology*, *188*(9), 3273–3279.
- Karadas, G., Bücker, R., Sharbati, S., Schulzke, J. D., Alter, T., and 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., Messelhäuser, U., Glocker, E., Alter, T., and Gözl, G. (2013). Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(2), 583–590.
- Keo, T., Collins, J., Kunwar, P., Blaser, M. J., and Iovine, N. M. (2011). *Campylobacter* capsule and lipooligosaccharide confer resistance to serum and cationic antimicrobials. *Virulence*, *2*(1), 30–40.
- Kiehlbauch, J. A., Brenner, D. J., Nicholson, M. A., Baker, C. N., Patton, C. M., Steigerwalt, A. G., and Wachsmuth, I. K. (1991) *Campylobacter butzleri* spp. Nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *Journal of Clinical Microbiology*, *29*, 376–85.
- Kim, S. W., Choi, C. H., Moon, D. C., Jin, J. S., Lee, J. H., Shin, J. H., Kim, J. M., Lee, Y. C., Seol, S. Y., Cho, D. T., and Lee, J. C. (2009). Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiology Letters*, *301*(2), 224–231.
- Kjeldgaard, J., Jørgensen, K., and Ingmer, H. (2009). Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Food Microbiology*, *131*(2–3), 256–259.
- Kopilović, B., Ucakar, V., Koren, N., Krek, M., and Kraigher, A. (2008). Waterborne outbreak of acute gastroenteritis in a costal area in Slovenia in June and July 2008. *Euro Surveillance*, *13*(34), 7–9.

- Kornelsen, V., and Kumar, A. (2021). Update on multidrug resistance efflux pumps in *Acinetobacter* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7), e00514-21.
- Krzyżek, P., Grande, R., Migdał, P., Paluch, E., and Gościński, G. (2020). Biofilm formation as a complex result of virulence and adaptive responses of *Helicobacter pylori*. *Pathogens*, 9(12), 1062.
- Kumar, A., and Schweizer, H. P. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1486–1513.
- Kumar, S., Ingle, H., Prasad, D. V. R., and Kumar, H. (2013). Recognition of bacterial infection by innate immune sensors. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(3), 229–246.
- Kunisawa, J., and Kiyono, H. (2013). Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discovery Today*, 18(1–2), 87–92.
- Kvist, M., Hancock, V., and Klemm, P. (2008). Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7376–7382.
- Laishram, M., Rathlavath, S., Lekshmi, M., Kumar, S., and Nayak, B. B. (2016). Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. from fresh seafood and the aquatic environment. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 87–89.
- Lappi, V., Archer, J. R., Cebelinski, E., Leano, F., Besser, J. M., Klos, R. F., Medus, C., Smith, K. E., Fitzgerald, C., and 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.
- Lau, S. K. P., Woo, P. C. Y., Teng, J. L. L., Leung, K. W., and Yuen, K. Y. (2002). Identification by 16S ribosomal RNA gene sequencing of *Arcobacter butzleri* bacteraemia in a patient with acute gangrenous appendicitis. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*, 55(3), 182–185.
- Leoni, F., Chierichetti, S., Santarelli, S., Talevi, G., Masini, L., Bartolini, C., Rocchegiani, E., Naceur Haouet, M., and Ottaviani, D. (2017). Occurrence of *Arcobacter* spp. and correlation with the bacterial indicator of faecal contamination *Escherichia coli* in bivalve molluscs from the Central Adriatic, Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 245, 6–12.
- Levicán, A., Alkeskas, A., Günter, C., Forsythe, S. J., and Figueras, M. J. (2013). Adherence to and invasion of human intestinal cells by *Arcobacter* species and their virulence genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4951–4957.

- Levican, A., Collado, L., Yustes, C., Aguilar, C., and Figueras, M. J. (2014). Higher water temperature and incubation under aerobic and microaerobic conditions increase the recovery and diversity of *Arcobacter* spp. from shellfish. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), 385–391.
- Lin, Y. T., Huang, Y. W., Chen, S. J., Chang, C. W., and Yang, T. C. (2015). The SmeYZ efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* contributes to drug resistance, virulence-related characteristics, and virulence in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(7), 4067–4073.
- Lin, Y. T., Huang, Y. W., Liou, R. S., Chang, Y. C., and Yang, T. C. (2014). MacABCsm, an ABC-type tripartite efflux pump of *Stenotrophomonas maltophilia* involved in drug resistance, oxidative and envelope stress tolerances and biofilm formation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(12), 3221–3226.
- Linton, K. J., and Higgins, C. F. (2007). Structure and function of ABC transporters: The ATP switch provides flexible control. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 453(5), 555–567.
- Logan, E. F., Neill, S. D. and Mackie, D. P. (1982). Mastitis in dairy cows associated with an aerotolerant *Campylobacter*. *Vet. Rec.* 110, 229–230.
- López, M., Prado, M., and Díaz, M. (2007). Secondary wastewater treatment as a redistribution mechanism of resistance genes in bacteria: analysis and risk assessment. *Salud-Publica.Es*, 250, 238–250.
- Lu, L., and Walker, W. A. (2001). Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *American Journal of Clinical Nutrition*, 73(6), 1124–1130.
- Lubelski, J., De Jong, A., Van Merkerk, R., Agustindari, H., Kuipers, O. P., Kok, J., and Driessen, A. J. M. (2006). LmrCD is a major multidrug resistance transporter in *Lactococcus lactis*. *Molecular Microbiology*, 61(3), 771–781.
- Lubelski, J., Konings, W. N., and Driessen, A. J. M. (2007). Distribution and Physiology of ABC-Type Transporters Contributing to Multidrug Resistance in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71(3), 463–476.
- Ma, J., Liu, J., Zhang, Y., Wang, D., Liu, R., Liu, G., Yao, H., and Pan, Z. (2019). Bacitracin resistance and enhanced virulence of *Streptococcus suis* via a novel efflux pump. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–11.
- Massari, P., Ram, S., Macleod, H., and Wetzler, L. M. (2003). The role of porins in

- neisserial pathogenesis and immunity. *Trends in Microbiology*, 11(2), 87–93.
- Mata, M. T., Baquero, F., and Pérez-Díaz, J. C. (2000). A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiology Letters*, 187(2), 185–188.
- Mateus, C. L. (2019). Caracterização funcional de um sistema de bombas de efluxo na virulência e resistência de *Arcobacter butzleri*. Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior.
- Mateus, C., Martins, R., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F., Pereira, L., and 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., and Ferreira, S. (2021b). RND efflux systems contribute to resistance and virulence of *Aliarcobacter butzleri*. *Antibiotics*, 10(7), 823.
- Matsumura, K., Furukawa, S., Ogihara, H., and Morinaga, Y. (2011). Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. In *Biocontrol Science*, 16(2), 69–72.
- McDermott, P. F., Zhao, S., Wagner, D. D., Simjee, S., Walker, R. D., and White, D. G. (2002). The food safety perspective of antibiotic resistance. *Animal Biotechnology*, 13(1), 71–84.
- Medina, G., Neves, P., Flores-Martin, S., Manosalva, C., Andaur, M., Otth, C., Lincopan, N., and Fernández, H. (2019). Transcriptional analysis of flagellar and putative virulence genes of *Arcobacter butzleri* as an endocytobiont of *Acanthamoeba castellanii*. *Archives of Microbiology*, 201(8), 1075–1083.
- Middleton, B., Rodgers, H. C., Cámara, M., Knox, A. J., Williams, P., and Hardman, A. (2002). Direct detection of N-acylhomoserine lactones in cystic fibrosis sputum. *FEMS Microbiology Letters*, 207(1), 1–7.
- Miller, W. G., Parker, C. T., Rubenfield, M., Mendz, G. L., Wösten, M. M. S. M., Ussery, D. W., Stolz, J. F., Binnewies, T. T., Hallin, P. F., Wang, G., Malek, J. A., Rogosin, A., Stanker, L. H., and Mandrell, R. E. (2007). The complete genome sequence and analysis of the epsilonproteobacterium *Arcobacter butzleri*. *PLoS ONE*, 2(12), e1358.
- Mottola, A., Bonerba, E., Figueras, M. J., Pérez-Cataluña, A., Marchetti, P., Serraino, A., Bozzo, G., Terio, V., Tantillo, G., and Di Pinto, A. (2016). Occurrence of potentially pathogenic arcobacters in shellfish. *Food Microbiology*, 57, 23–27.

- Moussatova, A., Kandt, C., O'Mara, M. L., and Tieleman, D. P. (2008). ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1778(9), 1757–1771.
- Müller, E., Abdel-Glil, M. Y., Hotzel, H., Hänel, I., and Tomaso, H. (2020a). *Aliarcobacter butzleri* from water poultry: Insights into antimicrobial resistance, virulence and heavy metal resistance. *Genes*, 11(9), 1104.
- Müller, E., Hotzel, H., Linde, J., Hänel, I., and Tomaso, H. (2020b). Antimicrobial Resistance and *in silico* Virulence Profiling of *Aliarcobacter butzleri* Strains From German Water Poultry. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1549.
- Musmanno, R. A., Russi, M., Lior, H., and Figura, N. (1997). *In vitro* virulence factors of *Arcobacter butzleri* strains isolated from superficial water samples. *New Microbiologica*, 20(1), 63–68.
- Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C., and Ellis, W. A. (1985). Taxonomic position of *Campylobacter cryaeovophila* spp. Nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35, 342–56.
- Neubauer, H., Pantel, I., Lindgren, P. E., and Götz, F. (1999). Characterization of the molybdate transport system ModABC of *Staphylococcus carnosus*. *Archives of Microbiology*, 172(2), 109–115.
- Neuberger, A., Du, D., and Luisi, B. F. (2018). Structure and mechanism of bacterial tripartite efflux pumps. *Research in Microbiology*, 169(7–8), 401–413.
- Neyrolles, O., and Guilhot, C. (2011). Recent advances in deciphering the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipids to pathogenesis. *Tuberculosis*, 91(3), 187–195.
- Nieva-Echevarria, B., Martinez-Malaxetxebarria, I., Girbau, C., Alonso, R., and Fernández-Astorga, A. (2013). Prevalence and genetic diversity of *Arcobacter* in food products in the north of Spain. *Journal of Food Protection*, 76(8), 1447–1450.
- Nunes, A. R. (2020). Caracterização de sistemas de bombas de efluxo de *Aliarcobacter butzleri*. Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior.
- On, S. L.W., Stacey, A., and Smyth, J. (1995). Isolation of *Arcobacter butzleri* from a neonate with bacteraemia. *Journal of Infection*, 31(3), 225–227.
- On, Stephen L. W., Miller, W. G., Biggs, P. J., Cornelius, A. J., and Vandamme, P. (2021). *Aliarcobacter*, *Halarcobacter*, *Malaciobacter*, *Pseudarcobacter* and *Poseidonibacter* are later synonyms of *Arcobacter*: transfer of *Poseidonibacter parvus*, *Poseidonibacter*

antarcticus, ‘*Halarcobacter arenosus*’, and ‘*Aliarcobacter vitoriensis*’ to *Arcobacter* as *Arcobacter parvus* comb. nov., *Arcobacter antarcticus* comb. nov., *Arcobacter arenosus* comb. nov. and *Arcobacter vitoriensis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(11), 005133.

On, Stephen L.W., Jensen, T. K., Bille-Hansen, V., Jorsal, S. E., and Vandamme, P. (2002). Prevalence and diversity of *Arcobacter* spp. isolated from the internal organs of spontaneous porcine abortions in Denmark. *Veterinary Microbiology*, 85(2), 159–167.

Orelle, C., Durmort, C., Mathieu, K., Duchêne, B., Aros, S., Fenaille, F., André, F., Junot, C., Vernet, T., and Jault, J. M. (2018). A multidrug ABC transporter with a taste for GTP. *Scientific Reports*, 8(1), 2309.

Orelle, C., Mathieu, K., and Jault, J. M. (2019). Multidrug ABC transporters in bacteria. *Research in Microbiology*, 170(8), 381–391.

Oren, A., and Garrity, G. M. (2020). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(5), 2960–2966.

Oren, A., and Garrity, G. M. (2021). Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 71(10).

Otth, L., Solís, G., Wilson, M., and Fernández, H. (2005). Susceptibility of *Arcobacter butzleri* to heavy metals. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36(3), 286–288.

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

Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., and Figueras, M. J. (2018). Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: Getting order from the Chaos. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2077.

Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., and Figueras, M. J. (2019). Corrigendum (2): Revisiting the Taxonomy of the Genus *Arcobacter*: Getting Order From the Chaos. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3123.

Pérez-Varela, M., Corral, J., Aranda, J., and Barbé, J. (2019). Roles of efflux pumps from different superfamilies in the surface-associated motility and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(3), e02190-18.

- Petchiappan, A., and Chatterji, D. (2017). Antibiotic resistance: Current perspectives. *ACS Omega*, 2(10), 7400–7409.
- Peterson, E., and 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.
- Pizarro-Cerdá, J., and Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715–727.
- Prouzet-Mauléon, V., Labadi, L., Bouges, N., Ménard, A., and Mégraud, F. (2006). *Arcobacter butzleri*: Underestimated enteropathogen. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 307–309.
- Puvanendran, D., Cece, Q., and Picard, M. (2018). Reconstitution of the activity of RND efflux pumps: a “bottom-up” approach. *Research in Microbiology*, 169(7–8), 442–449.
- Radlinski, L., and Conlon, B. P. (2018). Antibiotic efficacy in the complex infection environment. *Current Opinion in Microbiology*, 42, 19–24.
- Rathlavath, S., Kohli, V., Singh, A. S., Lekshmi, M., Tripathi, G., Kumar, S., and Nayak, Bhusan B. (2017). Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* isolated from seafood and its environment. *International Journal of Food Microbiology*, 263, 32–37.
- Rech, S., Deppenmeier, U., and Gunsalus, R. P. (1995). Regulation of the molybdate transport operon, modABCD, of *Escherichia coli* in response to molybdate availability. *Journal of Bacteriology*, 177(4), 1023–1029.
- Rice, E. W., Rodgers, M. R., Wesley, I. V., Johnson, C. H., and Tanner, S. A. (1999). Isolation of *Arcobacter butzleri* from ground water. *Letters in Applied Microbiology*, 28(1), 31–35.
- Robertson, G. T., Doyle, T. B., and Lynch, A. S. (2005). Use of an efflux-deficient *Streptococcus pneumoniae* strain panel to identify ABC-class multidrug transporters involved in intrinsic resistance to antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(11), 4781–4783.
- Rodrigues, L., Wagner, D., Viveiros, M., Sampaio, D., Couto, I., Vavra, M., Kern, W. V., and Amaral, L. (2008). Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1076–1082.

Rudkin, J. K., McLoughlin, R. M., Preston, A., and Massey, R. C. (2017). Bacterial toxins: Offensive, defensive, or something else altogether? *PLoS Pathogens*, *13*(9), e1006452.

Salas-Massó, N., Andree, K. B., Furones, M. D., and Figueras, M. J. (2016). Enhanced recovery of *Arcobacter* spp. using NaCl in culture media and re-assessment of the traits of *Arcobacter marinus* and *Arcobacter halophilus* isolated from marine water and shellfish. *Science of the Total Environment*, *566–567*, 1355–1361.

Samie, A., Obi, C. L., Barrett, L. J., Powell, S. M., and Guerrant, R. L. (2007). Prevalence of *Campylobacter* species, *Helicobacter pylori* and *Arcobacter* species in stool samples from the Venda region, Limpopo, South Africa: Studies using molecular diagnostic methods. *Journal of Infection*, *54*(6), 558–566.

Schroeder-Tucker, L., Wesley, I. V., Kiehlbauch, J. A., Larson, D. J., Thomas, L. A., and Erickson, G. A. (1996). Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *8*(2), 186–195.

Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M., Aliyu, A. B., and Jafri, N. (2013). Prevalence, Distribution and Antibiotic Resistance of Emergent *Arcobacter* spp. from Clinically Healthy Cattle and Goats. *Transboundary and Emerging Diseases*, *60*(1), 9–16.

Shange, N., Gouws, P., Hoffman, L. (2020). The prevalence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in ostriches from Oudtshoorn, South Africa. *Journal of Food Protection*, *83*(4), 722-728.

Sharma, A., Gupta, Vivek K., and Pathania, R. (2019). Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: from bench to bedside. *Indian Journal of Medical Research*, *149*, 129–45.

Shepherd, F. R., and McLaren, J. E. (2020). T cell immunity to bacterial pathogens: Mechanisms of immune control and bacterial evasion. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(17), 6144.

Shirshikova, T. V., Sierra-Bakhshi, C. G., Kamaletdinova, L. K., Matrosova, L. E., Khabipova, N. N., Evtugyn, V. G., Khilyas, I. V., Danilova, I. V., Mardanova, A. M., Sharipova, M. R., and Bogomolnaya, L. M. (2021). The ABC-Type Efflux Pump MacAB Is Involved in Protection of *Serratia marcescens* against Aminoglycoside Antibiotics, Polymyxins, and Oxidative Stress. *MSphere*, *6*(2), e00033-21.

Šilha, D., Pejchalová, M., and Šilhová, L. (2017). Susceptibility to 18 drugs and multidrug

resistance of *Arcobacter* isolates from different sources within the Czech Republic. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, 74–77.

Silva, A. L. (2017). A contribuição de bombas de efluxo para a resistência em *Arcobacter butzleri*. Tese de Mestrado, Universidade da Beira Interior.

Smith, R. S., Fedyk, E. R., Springer, T. A., Mukaida, N., Iglewski, B. H., and Phipps, R. P. (2001). IL-8 Production in Human Lung Fibroblasts and Epithelial Cells Activated by the *Pseudomonas* Autoinducer N-3-Oxododecanoyl Homoserine Lactone Is Transcriptionally Regulated by NF- κ B and Activator Protein. *The Journal of Immunology*, 167(1), 366–374.

Sousa, V., Luís, Â., Oleastro, M., Domingues, F., and Ferreira, S. (2019). Polyphenols as resistance modulators in *Arcobacter butzleri*. *Folia Microbiologica*, 64(4), 547–554.

Sun, J., Deng, Z., and Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453(2), 254–267.

Tabatabaei, M., Shirzad Aski, H., shayegh, H., and Khoshbakht, R. (2014). Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. *Microbial Pathogenesis*, 66, 1–4.

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.

Thanassi, D. G., Cheng, L. W., and Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(8), 2512–2518.

Tiku, V. (2022). *Acinetobacter baumannii*: Virulence Strategies and Host Defense Mechanisms. *DNA and Cell Biology*, 41(1), 43–48.

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

Van Driessche, E., and Houf, K. (2008). Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2), 443–451.

- Van Veen, H. W., Venema, K., Bolhuis, H., Oussenko, I., Kok, J., Poolman, B., Driessen, A. J. M., and Konings, W. N. (1996). Multidrug resistance mediated by a bacterial homolog of the human multidrug transporter MDR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(20), 10668–10672.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J. P., Lior, H., and Lauwers, S. (1992a). 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., and Goossens, H. (1992b). 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., Cadranel, S., Douat, N., Zisis, G., Butzler, J. P., and Vandamme, P. (2004). *Arcobacter* species in humans. *Emerging Infectious Diseases*, *10*(10), 1863–1867.
- Venâncio, I., Luís, Â., Domingues, F., Oleastro, M., Pereira, L., and Ferreira, S. (2022). The Prevalence of *Arcobacteraceae* in Aquatic Environments: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*, *11*(2), 244.
- Vicente-Martins, S., Oleastro, M., Domingues, F. C., and Ferreira, S. (2018). *Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: Prevalence, genotyping and antibiotics resistance. *Food Control*, *85*, 107–112.
- Villarruel-López, A., Márquez-González, M., Garay-Martínez, L. E., Zepeda, H., Castillo, A., Mota De La Garza, L., Murano, E. A., and Torres-Vitela, R. (2003). Isolation of *Arcobacter* spp. from retail meats and cytotoxic effects of isolates against Vero cells. *Journal of Food Protection*, *66*(8), 1374–1378.
- Vogel, U., and Frosch, M. (1999). Mechanisms of neisserial serum resistance. *Molecular Microbiology*, *32*(6), 1133–1139.
- Wagner, C., Zimmermann, S., Brenner-Weiss, G., Hug, F., Prior, B., Obst, U., and Hänsch, G. M. (2007). The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC12-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*,

387(2), 481–487.

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., and Hugenholtz, P. (2017). Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Frontiers in Microbiology*, 8, 682.

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., and Hugenholtz, P. (2018). Addendum: Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to Epsilonbacteraeota (phyl. nov.). *Frontiers in Microbiology*, 9, 772.

Wang, Z., Bie, P., Cheng, J., Lu, L., Cui, B., and Wu, Q. (2016). The ABC transporter YejABEF is required for resistance to antimicrobial peptides and the virulence of *Brucella melitensis*. *Scientific Reports*, 6, 31876.

Webb, A. L., Boras, V. F., Kruczkiewicz, P., Selinger, L. B., Taboada, E. N., and Inglis, G. D. (2016). Comparative detection and quantification of *Arcobacter butzleri* in stools from diarrheic and nondiarrheic people in Southwestern Alberta, Canada. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(4), 1082–1088.

Wesley, I. V., and Baetz, A. L. (1999). Natural and experimental infections of *Arcobacter* in poultry. *Poultry Science*, 78(4), 536–545.

Wesley, I. V., Baetz, A. L., and Larson, D. J. (1996). Infection of cesarean-derived colostrum-deprived 1-day-old piglets with *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii*. *Infection and Immunity*, 64(6), 2295–2299.

Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, James T., Xu, R., Topp, E., Arts, Michael T., Chao, J., Adam Z., Lévesque, C. A., Lapen, David R., Villemur, R., Talbot, G., and Khan, Izhar U. H. (2015) *Arcobacter lanthieri* spp. Nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65, 2709–16.

Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, James T., Xu, R., Topp, E., Arts, Michael T., Chao, J., Adam, Z., Lévesque, C. André, Lapen, David R., Villemur R., and Khan, Izhar U. H. (2016) Identification, Characterization and Description of *Arcobacter faecis* spp. Nov., Isolated from a Human Waste Septic Tank. *Systematic and Applied Microbiology*, 39, 93–99.

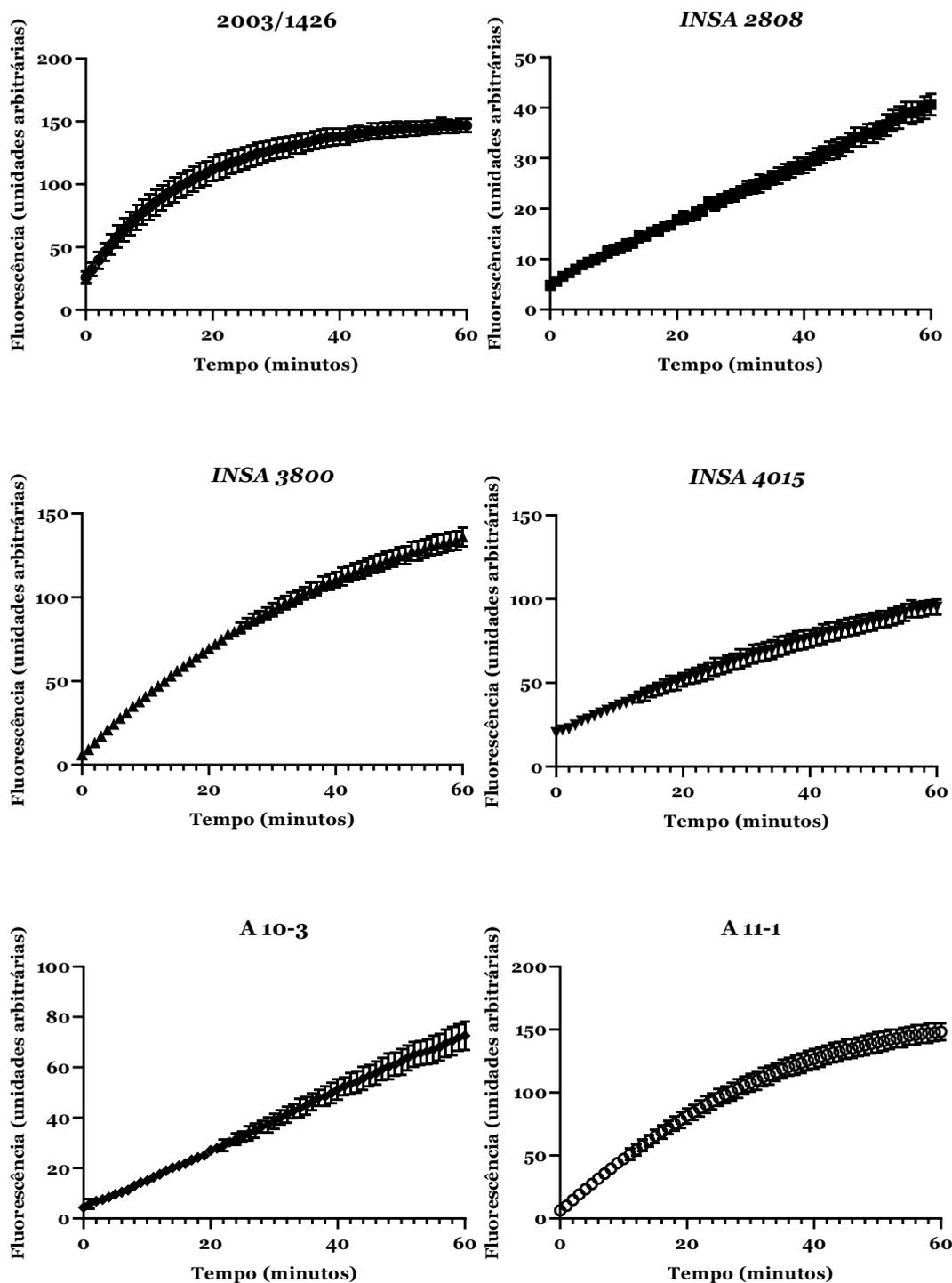
- Wilson, M., Otth, L., Aron, R., and Fernández, H. (2010). Susceptibility of *Arcobacter butzleri* to human blood serum. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 62(1), 232–235.
- Xavier, D. E., Pico, R. C., Girardello, R., Fehlberg, L. C. C., and Gales, A. C. (2010). Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiology*, 10, 217.
- Xavier, J. C., Costa, P. E. S., Hissa, D. C., Melo, V. M. M., Falcão, R. M., Balbino, V. Q., Mendonça, L. A. R., Lima, M. G. S., Coutinho, H. D. M., and Verde, L. C. L. (2019). Evaluation of the microbial diversity and heavy metal resistance genes of a microbial community on contaminated environment. *Applied Geochemistry*, 105, 1–6.
- Yamanaka, Y., Shimada, T., Yamamoto, K., and Ishihama, A. (2016). Transcription factor CecR (YbiH) regulates a set of genes affecting the sensitivity of *Escherichia coli* against cefoperazone and chloramphenicol. *Microbiology (United Kingdom)*, 162(7), 1253–1264.
- Yesilmen, S., Vural, A., Erkan, M. E., and 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.
- Yu, Z., Gunn, L., Wall, P., and Fanning, S. (2017). Antimicrobial resistance and its association with tolerance to heavy metals in agriculture production. *Food Microbiology*, 64, 23–32.
- Zambri, M., Cloutier, M., Adam, Z., Lapen, D. R., Wilkes, G., Sunohara, M., Topp, E., Talbot, G., and Khan, I. U. H. (2019). Novel virulence, antibiotic resistance and toxin gene-specific PCR-based assays for rapid pathogenicity assessment of *Arcobacter faecis* and *Arcobacter lanthieri*. *BMC Microbiology*, 19(1), 11.
- Zhang, C. Z., Chen, P. X., Yang, L., Li, W., Chang, M. X., and Jiang, H. X. (2018). Coordinated Expression of *acrAB-tolC* and Eight Other Functional Efflux Pumps Through Activating *ramA* and *marA* in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbial Drug Resistance*, 24(2), 120–125.
- Zhang, Y., Gu, A. Z., Cen, T., Li, X., He, M., Li, D., and Chen, J. (2018). Sub-inhibitory concentrations of heavy metals facilitate the horizontal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance genes in water environment. *Environmental Pollution*, 237, 74–82.
- Zhao, Y., Cocerva, T., Cox, S., Tardif, S., Su, J. Q., Zhu, Y. G., and Brandt, K. K. (2019).

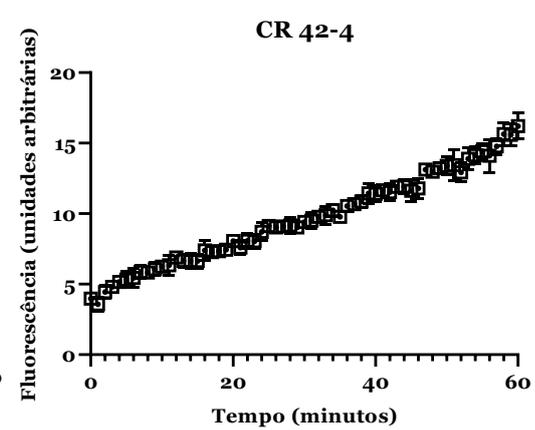
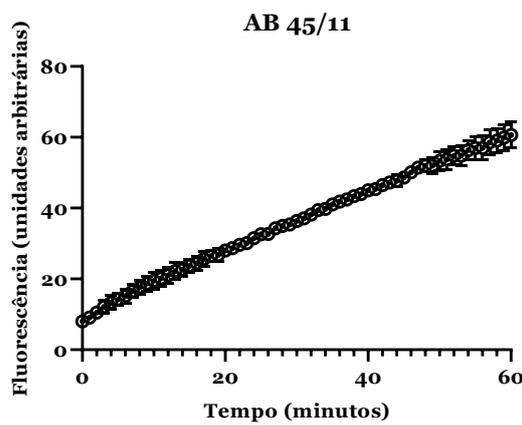
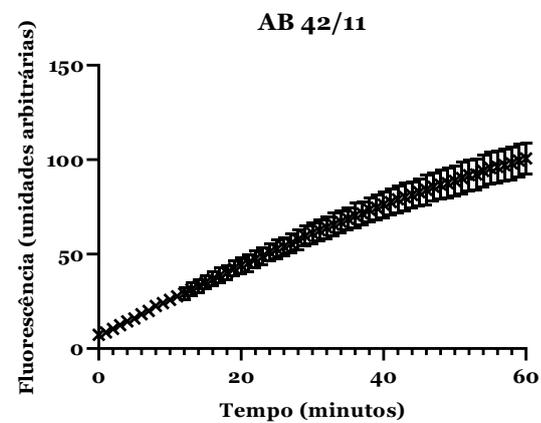
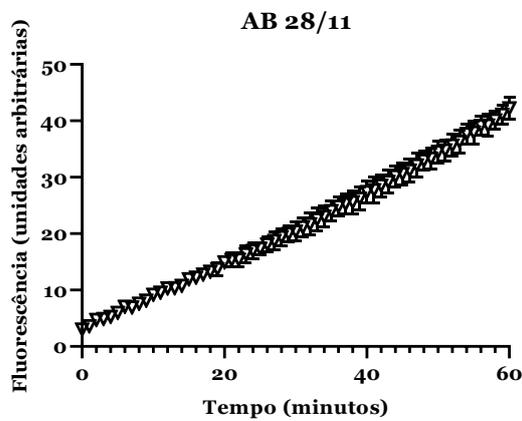
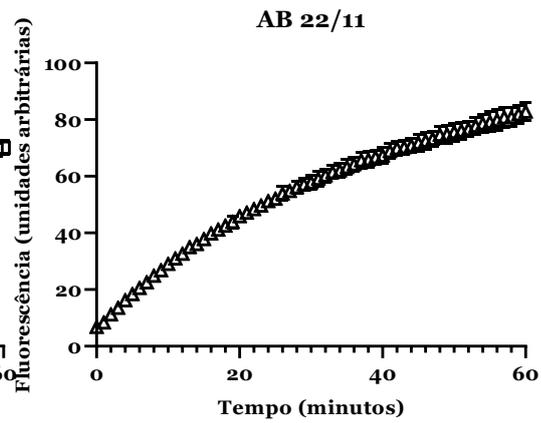
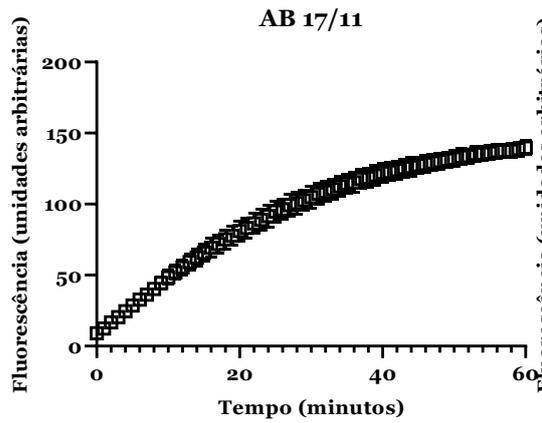
Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Science of the Total Environment*, 656, 512–520.

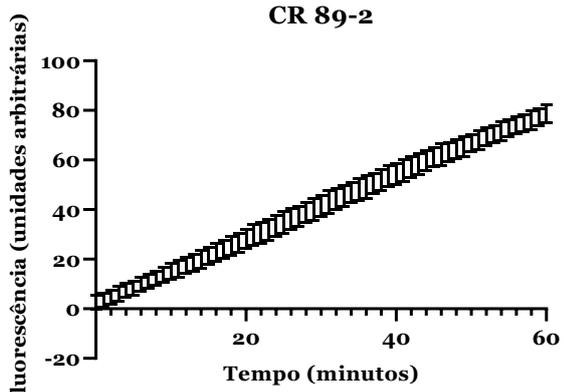
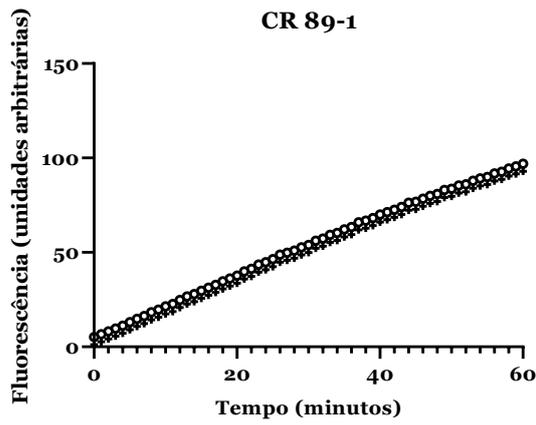
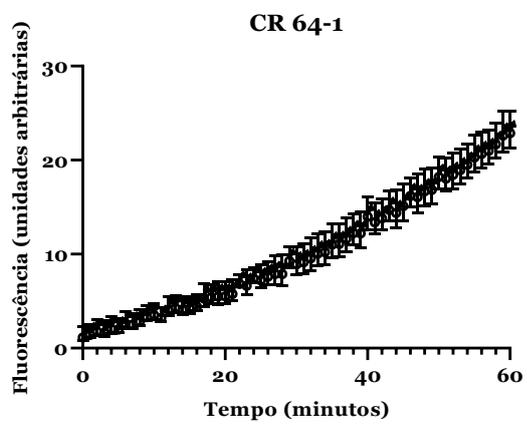
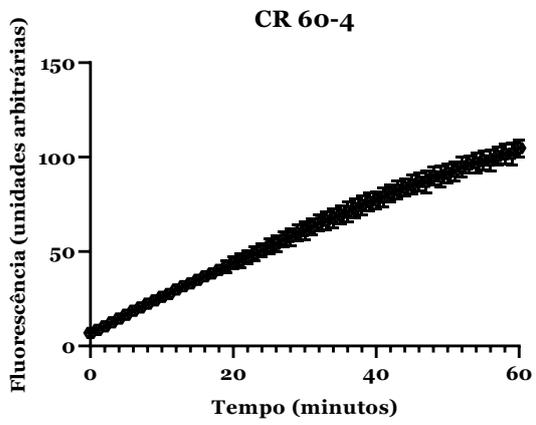
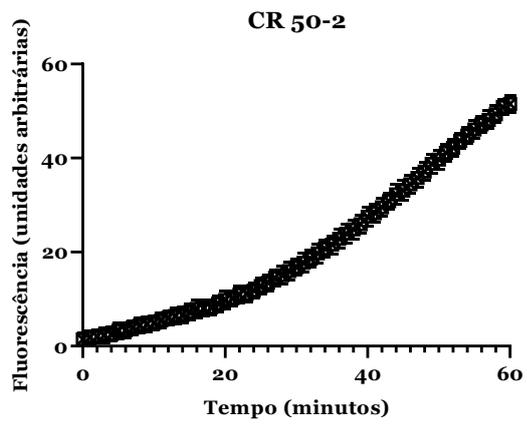
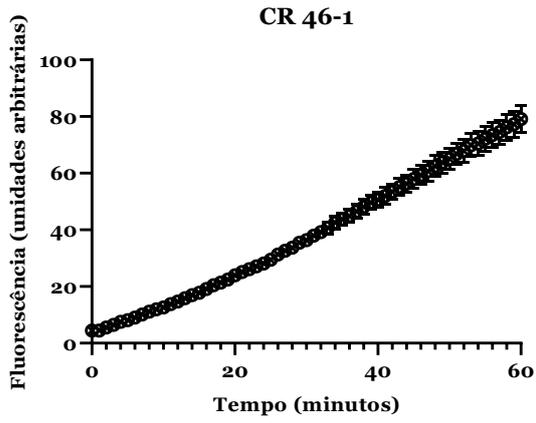
Zilbauer, M., Dorrell, N., Wren, B. W., and Bajaj-Elliott, M. (2008). *Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(2), 123–129.

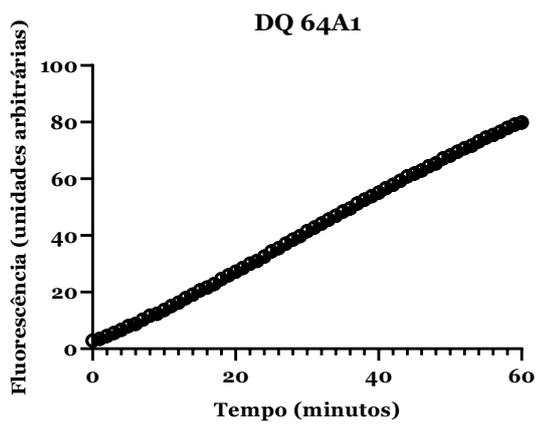
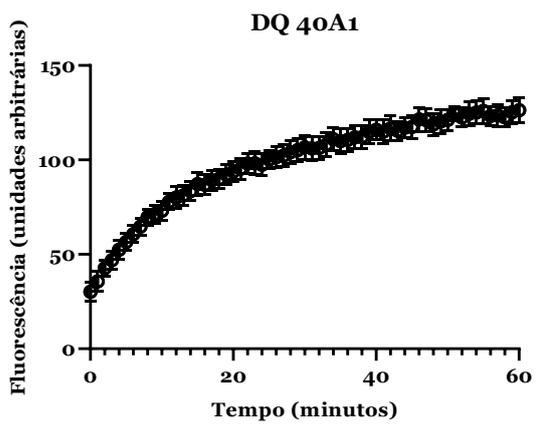
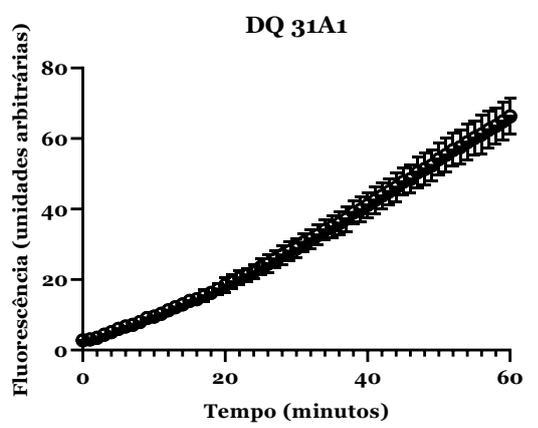
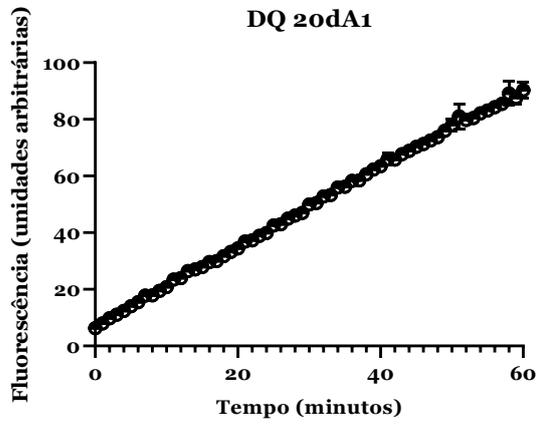
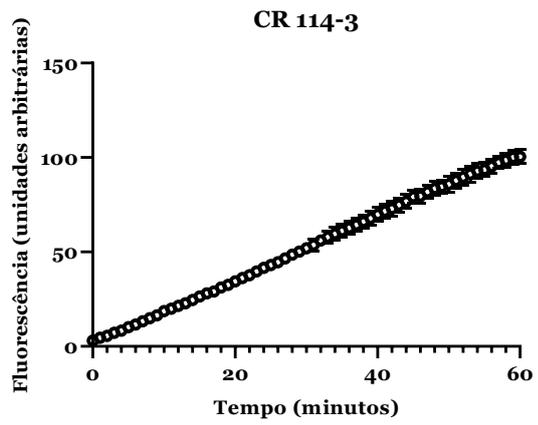
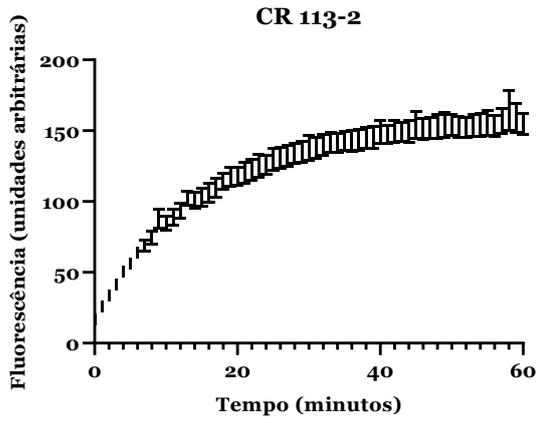
Apêndice I

Cinética de acumulação de brometo de etídio para as 24 estirpes de *A. butzleri* em estudo.









Apêndice II

Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína YbhF pertencente à bomba de efluxo YbhFSR das 24 estirpes *A. butzleri* em estudo.

```

AB_28_11  MQIISASNLEKFTFTDMTMAIKKINFSIFSGKITGVGPDGAGKTTLIRMLTGLLAPTFGELKVLNKNMNTSSDFLQQIGYMPQKFGLYEDLTVYENLKLKYSLDLQNIENSNRIDEELLTPTSLKPKQDRL
2003_1426  .....S.....S.....
INSA_2808  .....S.....
INSA_3800  .....
INSA_4015  .....K.....
A_10-3     .....A.....
A_11-1     .....A.....
AB_17_11  .....
AB_22_11  .....P.....S.....
AB_42_11  -----
AB_45_11  .....I.....
CR_42-4    .....S.....
CR_46-1    .....
CR_50-2    .....S.....
CR_60-4    .....
CR_64-1    .....
CR_89-1    .....
CR_89-2    .....L.....
CR_113-2   .....S.....
CR_114-3   .....S.....
DQ_20dA1   .....D.....S.....
DQ_31A1    .....
DQ_40A1    .....S.....R.....
DQ_64A1    .....S.....

```

```

AB_28_11  AGKLSGGMKQKLGACALIKKPKLLLLDEPGVGVDPISRIELWEIVQKLEDDIAVVMWTSYLDQAQCDEVILLNEGNCLYQSTPQNLKENMKDRVFLISEIFLQKRETLTKILEQDEILDVAVLVSKI
2003_1426  .....K.....G.....F.....
INSA_2808  .....G.....
INSA_3800  .....K.....K.....G.....N.....
INSA_4015  .....N.....G.....N.....
A_10-3     .....K.I.....G.....
A_11-1     .....K.I.....G.....
AB_17_11  .....K.....G.....
AB_22_11  .....K.....G.....
AB_42_11  -----
AB_45_11  .....
CR_42-4    .....K.....CG.....I.....
CR_46-1    .....K.....K.....G.....
CR_50-2    .....K.....G.....
CR_60-4    .....G.....
CR_64-1    .....K.....G.....
CR_89-1    .....G.....K.....G.....
CR_89-2    .....G.....G.....R.....
CR_113-2   .....G.....
CR_114-3   .....G.....
DQ_20dA1   .....K.....GV.....
DQ_31A1    .....K.....G.....
DQ_40A1    .....G.....
DQ_64A1    .....G.....

```

```

AB_28_11  RIMLKKNTLSKEPIYKLGEDVKIEAIEPIFEDCFVDILNIKTKAHSQLVENMKNIKSSSLKLEAKSLTKKPGMFPVATDNIDFEIGNGEIFGFLGPNAGKSTTFKMLCGLLTPTLGTAKVLGEDLYKS
2003_1426  .....K.....F.....
INSA_2808  .....S.....F.....
INSA_3800  .....F.....
INSA_4015  .....P.....F.....
A_10-3     .....F.....
A_11-1     .....F.....
AB_17_11  .....A.....M.....F.....
AB_22_11  .....N.....F.....
AB_42_11  -----
AB_45_11  .....
CR_42-4    .....I.....T.....F.....
CR_46-1    .....M.....F.....
CR_50-2    .....M.....F.....
CR_60-4    .....
CR_64-1    .....
CR_89-1    .....P.....R.....F.....
CR_89-2    .....
CR_113-2   .....F.....
CR_114-3   .....P.....F.....
DQ_20dA1   .....F.....
DQ_31A1    .....P.....F.....
DQ_40A1    .....I.....F.....
DQ_64A1    .....

```

```

AB_28_11 NSMIKNSIGYMAQKFSLYGMLKIKDNLDFPSGIYGLKNKKREEKIEEMIEIFDFKNYLHLNANSLPLGKQRLSLACSVMHPEKVLFLDEPTSGVDPITRKEFWTHINGMWKKGVSIMWTHFMDEAAYC
2003_1426 .....S
INSA_2808 .....
INSA_3800 .....
INSA_4015 .....
A_10-3 .....Y
A_11-1 .....
AB_17_11 .....
AB_22_11 .....
AB_42_11 .....
AB_45_11 .....
CR_42-4 .....
CR_46-1 .....
CR_50-2 .....
CR_60-4 .....
CR_64-1 .....
CR_89-1 .....
CR_89-2 .....
CR_113-2 .....
CR_114-3 .....
DQ_20dA1 .....
DQ_31A1 .....
DQ_40A1 .....
DQ_64A1 .....

```

```

AB_28_11 DKIMLIYKGNIASGTFDELKALVGNASMQDAFITLVKKYDKEDL*
2003_1426 .....S
INSA_2808 .....
INSA_3800 .....
INSA_4015 .....
A_10-3 .....
A_11-1 .....
AB_17_11 .....
AB_22_11 .....
AB_42_11 .....
AB_45_11 .....
CR_42-4 .....
CR_46-1 .....
CR_50-2 .....
CR_60-4 .....
CR_64-1 .....
CR_89-1 .....
CR_89-2 .....
CR_113-2 .....
CR_114-3 .....
DQ_20dA1 .....
DQ_31A1 .....
DQ_40A1 .....
DQ_64A1 .....

```

Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína YbhS pertencente à bomba de efluxo YbhFSR das 24 estirpes *A. butzleri* em estudo.

```

AB_28_11 MMLKRLKALTYKESLQVFRDPSSILIAFILPLILLFLMGYAVSLDARKIPIAIISKSNSELSOKLISSFISSNPFVDSLKNKDILYEQMOKSKIKAILTLNNDPFGKNSKYDIQIITDGTPEMAGLAQM
2003_1426 .....D.N.....
INSA_2808 .....D.N.....
INSA_3800 .....D.N.....
INSA_4015 .....D.N.....
A_10-3 .....N.....
A_11-1 .....N.....
AB_17_11 .....D.N.....
AB_22_11 .....D.N.....
AB_42_11 .....D.N.....
AB_45_11 .....D.N.....
CR_42-4 .....N.....
CR_46-1 .....N.....
CR_50-2 .....D.N.....R.....
CR_60-4 .....N.....
CR_64-1 .....N.....
CR_89-1 .....R.....
CR_89-2 .....D.N.....R.....
CR_113-2 .....D.N.....
CR_114-3 .....N.....
DQ_20dA1 .....D.N.....R.....
DQ_31A1 .....D.N.....
DQ_40A1 .....D.N.....V.....
DQ_64A1 .....D.N.....G.....

```

```

AB_28_11 YISAVIKLWAKANNIYNKENIILESRYWFPNPLSSRYFLLEPGSIAIIMTLIGTLLTALVIAREWERTMEALMATPATMSEILIGKLIPIYFILGMFMSMLLCFIVAYFWYKIPFPGSFFILILSSIYLFPS
2003_1426 .....S.....E.....
INSA_2808 .....E.....
INSA_3800 .....N.....
INSA_4015 .....E.....
A_10-3 .....N.....
A_11-1 .....N.....
AB_17_11 .....I.....
AB_22_11 .....E.....
AB_42_11 .....N.....
AB_45_11 .....N.....
CR_42-4 .....N.....
CR_46-1 .....N.....
CR_50-2 .....K.....
CR_60-4 .....V.....
CR_64-1 .....V.....
CR_89-1 .....E.....
CR_89-2 .....T.....T.....E.....L.....
CR_113-2 .....T.....E.....
CR_114-3 .....N.....
DQ_20dA1 .....I.....
DQ_31A1 .....G.....
DQ_40A1 .....E.....
DQ_64A1 .....E.....

```

```

AB_28_11 SLSIGLLISTLAKNQFVAAQMSLIVGFLPAFILSGFLFRIQNMFMQLQYITSIIPARYFVESLQTIPLAGNIYEIPDPAFVMILISALLFAFVLTKSKKAL*
2003_1426 .....K.....
INSA_2808 .....E.....K.....
INSA_3800 .....K.....
INSA_4015 .....K.....
A_10-3 .....K.....
A_11-1 .....K.....
AB_17_11 .....K.....
AB_22_11 .....K.....
AB_42_11 .....K.....
AB_45_11 .....K.....
CR_42-4 .....K.....
CR_46-1 .....L.....K.....
CR_50-2 .....K.....
CR_60-4 .....K.....
CR_64-1 .....L.....K.....
CR_89-1 .....K.....
CR_89-2 .....K.....
CR_113-2 .....A.....K.....
CR_114-3 .....K.....V.....
DQ_20dA1 .....K.....
DQ_31A1 .....M.....K.....
DQ_40A1 .....K.....
DQ_64A1 .....K.....

```

Alinhamento da sequência de aminoácidos da proteína YbhR pertencente à bomba de efluxo YbhFSR das 24 estirpes *A. butzleri* em estudo.

```

AB_28_11 MFERLFALIKKEFLAIKNDKSLMWWVLPPIVQVILFSPAATLEVKMINLALLNQDDGYKSKELIKDLGSSSYIKSLNIVKSYEDGKYEIDRQKVIAFIVIPSPDFSKDLEKSSKIQVIFDGRRSNTSQI
2003_1426 .....S.....
INSA_2808 .....I.....S.....
INSA_3800 .....N...K.....S.....
INSA_4015 .....S.....N.....
A_10-3 .....S.....N...K.....
A_11-1 .....S.....N...K.....
AB_17_11 .....S.....
AB_22_11 .....S.....N.....
AB_42_11 .....S.....
AB_45_11 .....S.....
CR_42-4 .....S.....
CR_46-1 .....S.....
CR_50-2 .....S.....S.....
CR_60-4 .....S.....E.....
CR_64-1 .....S.....
CR_89-1 .....S.....S.....
CR_89-2 .....S.....N...K...V.....L.....
CR_113-2 .....S.....
CR_114-3 .....S.....N...K.....
DQ_20dA1 .....S.....
DQ_31A1 .....S.....
DQ_40A1 .....S.....N.....
DQ_64A1 .....S.....N...K.....

```

```

AB_28_11 VEGYLNQIILNHYKKEQLNSKINIISRNFYNPENFWMIVPSLFAISIMVWVAMLLTSLSIAREKELGTPEQILVSPSSIEILLGKLLPALFISVLESTF ILFVAIYFFGVPLNGSIMLLYLSATVFLF
2003_1426 .....
INSA_2808 .....
INSA_3800 .....
INSA_4015 .....
A_10-3 .....
A_11-1 .....
AB_17_11 .....
AB_22_11 .....
AB_42_11 .....S.....
AB_45_11 .....
CR_42-4 .....
CR_46-1 .....
CR_50-2 .....
CR_60-4 .....
CR_64-1 .....
CR_89-1 .....
CR_89-2 .....
CR_113-2 .....
CR_114-3 .....
DQ_20dA1 .....
DQ_31A1 .....D.....
DQ_40A1 .....
DQ_64A1 .....

```

```

AB_28_11 SMSGIGLFISSISNTQQQAILGSPVVMLEPSFLLSGFATPVSNMPQMLQPFDFIPLKYYLELIKGIPLKDISFSIALTYLTPMFLFGVISLFGTVIYFKRKA*
2003_1426 .....
INSA_2808 .....
INSA_3800 .....
INSA_4015 .....L.....
A_10-3 .....
A_11-1 .....
AB_17_11 .....
AB_22_11 .....
AB_42_11 .....
AB_45_11 .....
CR_42-4 .....
CR_46-1 .....
CR_50-2 .....
CR_60-4 .....
CR_64-1 .....
CR_89-1 .....
CR_89-2 .....V.....
CR_113-2 .....
CR_114-3 .....
DQ_20dA1 .....
DQ_31A1 .....
DQ_40A1 .....I.....
DQ_64A1 .....

```

Apêndice III

Apresentação de parte do presente trabalho no *The 2nd International Electronic Conference on Antibiotics—Drugs for Superbugs: Antibiotic Discovery, Modes of Action And Mechanisms of Resistance*, sob a forma de poster.