

_ Isolamento de *Helicobacter pullorum* de carne de frango: características de um patogénio emergente de origem alimentar

Vítor Borges¹, Andrea Santos², Cristina Belo Correia³, Margarida Saraiva³, Luís Vieira⁴, Daniel A. Sampaio⁴, João Paulo Gomes¹, Mónica Oleastro²

monica.oleastro@insa.min-saude.pt

(1) Núcleo de Bioinformática; (2) Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(3) Unidade de Referência. Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA.

(4) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, INSA.

_ Introdução

A carne e os produtos à base de carne são importantes fontes de infeções intestinais nos humanos. Entre os agentes patogénicos intestinais mais comuns destacam-se as bactérias *Salmonella enterica*, *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* enterohemorrágica ou produtora de verotoxinas (EHEC ou VTEC). No entanto, as infeções entéricas podem também ser causadas por algumas espécies do género *Helicobacter* spp., nomeadamente a bactéria de Gram negativo *Helicobacter pullorum*. Esta tem sido detetada quer em aves domésticas, quer em amostras humanas (1,2). Em particular, destacam-se o seu isolamento de carcaças de aves domésticas (possivelmente devido à contaminação durante os processos de abate) e a sua associação com casos de gastroenterite (1) ou de doença inflamatória crónica do intestino ou do fígado no Homem (3).

Neste sentido, a bactéria *H. pullorum* tem sido apontada como um agente patogénico emergente causador de doenças transmitidas por alimentos (2,4-6). No entanto, a falta de métodos para a deteção de *H. pullorum* e as dificuldades associadas à sua cultura têm provavelmente resultado no subdiagnóstico das infeções associadas. Por outro lado, até hoje, apenas foi sequenciado o genoma de uma estirpe de *H. pullorum* (7), pelo que o conhecimento das características genéticas potencialmente mediadoras de adaptação ou virulência deste agente patogénico emergente é ainda limitado.

_ Objetivo

Este estudo apresenta a primeira descrição do isolamento de *H. pullorum* em amostras de carne de frango crua, revelando o importante papel da metodologia de Sequenciação Total do Genoma para a correta identificação e caracterização das estirpes isoladas.

_ Materiais e métodos

Amostras alimentares, isolamento, identificação e teste de suscetibilidade a antimicrobianos

No âmbito do Plano de Inspeção dos Géneros Alimentícios (PIGA) da Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, foram colhidas amostras de carne de 15 diferentes produtores. As amostras foram sujeitas a: i) pré-enriquecimento seguindo as orientações preconizadas na ISO 10272-1:2006; ii) incubação a 37±1°C durante 4 a 6h, seguida de 44±4h a 41.5±1°C em condições microaerófilas com hidrogénio (AnoxomatTM, MART Microbiology BV, Brachten, Holanda); iii) filtração com membrana de celulose (0.65µm); e iv) cultura em agar Columbia, enriquecido com sangue de ovelha a 5% (bioMérieux, Marcy l'Étoile, França). Posteriormente, através de subcultura em placas de gelose de sangue, selecionaram-se colónias de bacilos com forma espiralada, de Gram negativo e oxidase positivos. Colónias não características de *Campylobacter* spp. foram identificadas como *H. pullorum* através de PCR e sequenciação de Sanger do gene que codifica o 16S rRNA, usando oligonucleótidos universais (8,9). Procedeu-se ao teste de suscetibilidade a antimicrobianos, determinando a concentração mínima inibitória (CMI) de três antibióticos (ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina) através do método E-test.

Sequenciação Total do Genoma e análises de genómica comparativa

Após extração, o DNA das estirpes de *H. pullorum* isoladas no presente estudo foi sujeito à técnica de Sequenciação Total do Genoma no equipamento MiSeq (Illumina) disponível no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA). O genoma das estirpes foi obtido através da montagem bioinformática das sequências geradas (usando o software Velvet), tendo-se usado profundidades de cobertura entre

135x e 195x. Por forma a obter uma visão detalhada da diversidade genética entre estirpes de *H. pullorum*, realizaram-se múltiplas análises bioinformáticas de comparação genómica usando as sequências obtidas, bem como a sequência do único genoma de *H. pullorum* (estirpe MIT 98-5489) disponível até à data (7).

Resultados e discussão

O presente estudo constitui a primeira descrição do isolamento de *H. pullorum* em amostras de carne de frango crua. Foram isoladas estirpes de *H. pullorum* de quatro das 17 amostras analisadas. Três estirpes foram obtidas de carcaças de frango refrigeradas, e a quarta estirpe foi isolada de uma preparação de carne crua de frango temperada (tabela 1). Estes resultados sugerem que a bactéria *H. pullorum* poderá ser transmitida por alimentos, e apresenta risco de transmissão zoonótica, tal como sucede com *Campylobacter* spp., atualmente o principal agente bacteriano enteropatogénico para o Homem a nível mundial. Por outro lado, demonstrou-se a eficácia da aplicação de um método de filtração com membrana para o isolamento de *H. pullorum* a partir de amostras de carne. Este dado é relevante uma vez que se considera que as dificuldades de cultura deste microrganismo fastidioso e o uso inapropriado de meios e condições de cultura têm levado à subdetecção, e consequente subvalorização de *H. pullorum* como um agente patogénico.

As estirpes isoladas foram sujeitas a testes de suscetibilidade aos antibióticos comumente usados para tratar infeções causadas por *Campylobacter* e *Helicobacter*. Todas as estirpes mostraram

ser resistentes à ciprofloxacina, uma estirpe foi também resistente à eritromicina, e outra à tetraciclina (tabela 1). Foi possível associar os fenótipos de resistência à ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina a mutações genéticas nos genes *gyrA*, *23S rRNA* e *16S rRNA*, respetivamente, tal como previamente descrito (7,10). Excecionalmente, a mutação no gene *gyrA* que confere resistência à ciprofloxacina não foi detetada numa estirpe resistente a este antibiótico. A pesquisa de mutações em outros alvos genéticos, como o gene *gyrB*, foi inconclusiva, pelo que é expectável que a base molecular de resistência envolva outros mecanismos (ex. bombas de efluxo), tal como demonstrado para *Campylobacter* spp. (11). De um modo geral, embora não estejam descritos estudos de suscetibilidade a antimicrobianos incluindo um número alargado de isolados de *H. pullorum*, o presente estudo, bem como os de outros autores (10,12) apontam para a importância da avaliação do perfil de resistência do agente patogénico emergente *H. pullorum*.

Este estudo permitiu ainda libertar e analisar quatro novos genomas de estirpes de *H. pullorum* (até à data estava apenas disponível o genoma de uma estirpe - MIT 98-5489 (7)). O tamanho do genomas das estirpes isoladas variou entre 1.7 e 2.1 Mb (tabela 1), revelando elevada similaridade (>98%) nas regiões genómicas comuns, mas sendo pautado por regiões genómicas muito polimórficas. Destacam-se um gene que codifica para uma proteína da membrana externa (PME), potencialmente com importantes propriedades antigénicas (13), e um gene que codifica uma potencial citotoxina

Tabela 1: Origem, tamanho do genoma e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos das quatro estirpes de *H. pullorum* isoladas de amostras de carne de frango crua.

Estirpe	Origem	Tamanho do genoma (Mb)	Suscetibilidade a antimicrobianos (Concentração Mínima Inibitória em mg/L; R - resistente)		
			Ciprofloxacina	Eritromicina	Tetraciclina
229313/12	Carcaça de frango refrigerada	1.69	>32 (R)	0.25	0.25
229334/12	Preparação de carne crua de frango temperada	2.13	>32 (R)	0.125	0.5
229336/12	Carcaça de frango refrigerada	1.81	>32 (R)	>256 (R)	0.38
229254/12	Carcaça de frango refrigerada	1.81	>32 (R)	0.25	>256 (R)

com padrões estruturais semelhantes ao da citotoxina vacuolizante do agente patogénico gástrico *H. pylori*. Quer a PME, pelo seu potencial envolvimento em variação antigénica, quer esta potencial citotoxina, poderão contribuir para a virulência e capacidade de adaptação de *H. pullorum*, pelo que constituem alvos de estudo promissores.

Entre as regiões genómicas não partilhadas por todas as estirpes inclui-se um *cluster* de genes que codificam o sistema de secreção do tipo VI (SST6). Este sistema é utilizado pelas bactérias de Gram negativo para “injeção” de proteínas nas células eucariotas alvo com vista à sua manipulação (14), constituindo um reconhecido mecanismo de virulência. Por exemplo, em *C. jejuni* tem-se associado a infeção com estirpes que possuem o SST6 com uma apresentação gastrointestinal mais severa (15, 16).

Conclusão

Os dados apresentados indicam que o agente patogénico emergente *H. pullorum* poderá ser transmitido aos humanos através do contacto/consumo de carne, pelo que se sugere a expansão das estratégias de vigilância dos produtos alimentares. Adicionalmente, através da aplicação da tecnologia de Sequenciação Total do Genoma, foi possível incrementar o nosso conhecimento sobre a variabilidade entre estirpes de *H. pullorum*, tendo-se apontado várias características genéticas potencialmente mediadoras de virulência e adaptação.

Este artigo corresponde a uma versão reduzida em português do artigo: Borges V, Santos A, Correia CB, et al. *Helicobacter pullorum* isolated from fresh chicken meat: antibiotic resistance and genomic traits of an emerging foodborne pathogen. Appl Environ Microbiol. 2015 Dec 1;81(23):8155-63.

Referências bibliográficas:

- (1) Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, et al. Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis. Scand J Infect Dis. 1997;29(3):315-8.
- (2) Ceelen L, Decostere A, Verschraegen G, et al. Prevalence of *Helicobacter pullorum* among patients with gastrointestinal disease and clinically healthy persons. J Clin Microbiol. 2005;43(6):2984-6. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1151964/
- (3) Pellicano R, Ménard A, Rizzetto M, et al. *Helicobacter* species and liver diseases: association or causation? Lancet Infect Dis. 2008;8(4):254-60.
- (4) Atabay HI, Corry JE, On SL. Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum*. J Appl Microbiol. 1998;84(6):1017-24. http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.1998.00435.x/full
- (5) Zanon RG, Rossi M, Giacomucci D, et al. Occurrence and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pullorum* from broiler chickens and commercial laying hens in Italy. Int J Food Microbiol. 2007;116(1):168-73.
- (6) González A, Piqueres P, Moreno Y, et al. A novel real-time PCR assay for the detection of *Helicobacter pullorum*-like organisms in chicken products. Int Microbiol. 2008;11(3):203-8.
- (7) Shen Z, Sheh A, Young SK, et al. Draft genome sequences of six enterohepatic *Helicobacter* species isolated from humans and one from rhesus macaques. Genome Announc. 2014;2(5). pii: e00857-14. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4161742/
- (8) Ferreira S, Júlio C, Queiroz JA, et al. Molecular diagnosis of *Arcobacter* and *Campylobacter* in diarrhoeal samples among Portuguese patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;78(3):220-5. Epub 2013 Nov 27.
- (9) Suzuki MT, Giovannoni SJ. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl Environ Microbiol. 1996;62(2):625-30. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167828/
- (10) Pasquali F, Rossi M, Manfreda G, Zanon R. Complete nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Helicobacter pullorum* and identification of a point mutation leading to ciprofloxacin resistance in poultry isolates. Int J Antimicrob Agents. 2007;30(3):222-8.
- (11) Ge B, McDermott PF, White DG, et al. Role of efflux pumps and topoisomerase mutations in fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(8):3347-54. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1196287/
- (12) Mohamed M, Ibrahim R, Shahata M, et al. *Helicobacter pullorum* among Poultry in Assiut-Egypt: Genetic Characterization, Virulence and MIC. Int J Poult Sci. 2010; 9(6):521-526. http://mail.livedna.net/qredirect.php?doi=ijps.2010.521.526&linkid=pdf
- (13) Zhang Q, Meitzler JC, Huang S, et al. Sequence polymorphism, predicted secondary structures, and surface-exposed conformational epitopes of *Campylobacter* major outer membrane protein. Infect Immun. 2000;68(10):5679-89. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC101523/
- (14) Ho BT, Dong TG, Mekalanos JJ. A view to a kill: the bacterial type VI secretion system. Cell Host Microbe. 2014;15(1):9-21. Epub 2013 Dec 11. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmcid/24332978/
- (15) Bleumink-Pluym NM, van Alphen LB, Bouwman LI, et al. Identification of a functional type VI secretion system in *Campylobacter jejuni* conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity. PLoS Pathog. 2013;9(5):e1003393. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3667781/
- (16) Harrison JW, Dung TT, Siddiqui F, et al. Identification of possible virulence marker from *Campylobacter jejuni* isolates. Emerg Infect Dis. 2014;20(6):1026-9. wwwnc.cdc.gov/eid/article/20/6/13-0635_article