



## Distribuição de sistemas de secreção de proteínas do tipo IV e VI em isolados ambientais e hospitalares da bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*

**Autores:** Bárbara Bortolozzo Ribeiro<sup>1</sup>, Daniele Ferreira do Prado<sup>1</sup>, Eliana Guedes Stehling<sup>2</sup>, Carlos Emílio Levy<sup>3</sup>, Cristina Elisa Alvarez-Martinez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biologia - Unicamp; <sup>2</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo; <sup>3</sup> Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp.

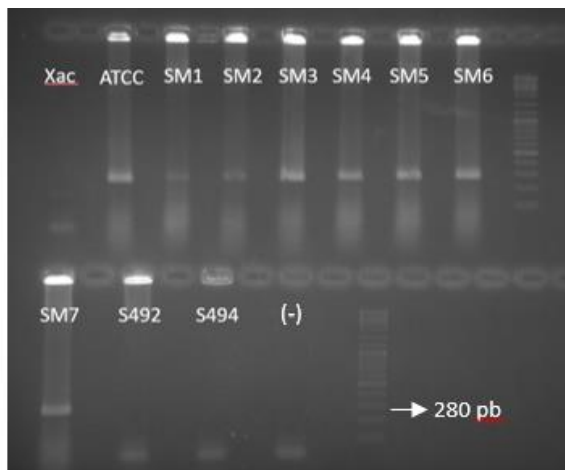
**PALAVRAS-CHAVE:** *Stenotrophomonas* – Sistemas de Secreção – Bactéria

**Apoio Financeiro:** CNPq/PIBIC; PRP-UNICAMP/FAEPEX; Fapesp 2018/01852-4

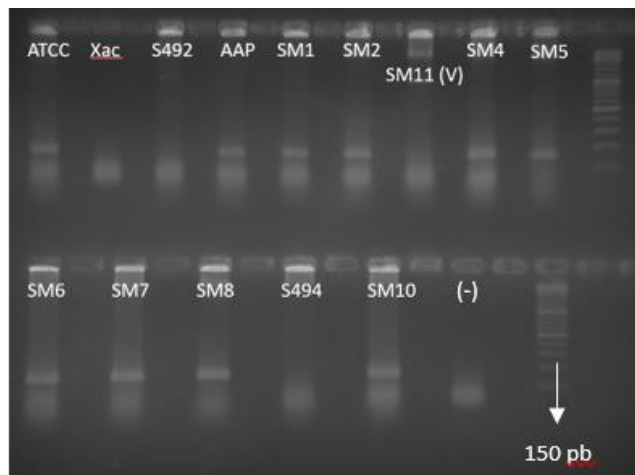
### Resumo:

*Stenotrophomonas sp.* são espécies Gram-negativas da classe gama de proteobactérias e são parte da família *Xanthomonadaceae*, que inclui também importantes fitopatógenos, como *Xanthomonas sp.* e *Xylella sp.* A espécie *Stenotrophomonas maltophilia* é um patógeno oportunista emergente causador de graves infecções, especialmente em pacientes imunocomprometidos e/ou apresentando fibrose cística, câncer e antibioticoterapia de longo prazo. A bactéria é ubíqua no ambiente, sendo encontrada na água, no solo e em associação a plantas, onde exerce efeitos benéficos no crescimento vegetal. Além disto, é encontrada como parte da microbiota de amebas ambientais de solo e água, o que pode representar um importante reservatório de linhagens potencialmente patogênicas. Sistemas de secreção bacterianos são maquinarias macromoleculares de transporte de proteínas para o meio extracelular ou para células-alvo, que exercem papel muito importante para virulência e adaptação ao ambiente em bactérias. Estudos recentes demonstram que em *Xanthomonas citri* pv. *citri*, os sistemas de secreção do tipo IV e VI (T4SS e T6SS) atuam na competição entre bactérias e na resistência a predação por amebas ambientais, respectivamente. Da mesma forma, o T4SS de *S. maltophilia* é responsável por matar bactérias com quem compete, porém, o T6SS não foi descrito nesta espécie. Desta forma, o objetivo do presente trabalho é identificar a presença de T6SS em isolados clínicos e ambientais de *S. maltophilia*. O T6SS (do inglês “type VI secretion system”) apresenta similaridade estrutural com bacteriófagos, e seus componentes formam um nanotúbulo com extremidade em formato de agulha para fazer a translocação de proteínas efetoras diretamente para o interior de células vizinhas, em mecanismo de ejeção similar a um bacteriófago “invertido” (Cianfanelli *et al.*, 2016). T6SS atuam na competição interespecífica em diversas bactérias, através da secreção de toxinas com ação de nucleases, fosfolipases, glicosilases e amidases, que promovem a lise de células procarióticas. Além disto, T6SS podem atuar em alvos eucarióticos, promovendo a virulência e/ou a resistência a predação por amebas ambientais (Cianfanelli *et al.*, 2016).

Inicialmente, foi realizado cultivo de 16 isolados ambientais e 32 isolados hospitalares e, posteriormente, análise espécie-específica deles, por meio de PCR multiplex, buscando a amplificação do gene *ggs* e ausência de amplificação para o gene *smeD*. Este perfil de amplificação permite diferenciar *S. maltophilia* de *S. rhizophila* (Figura 1), conforme Pinot *et al.* 2011. Além disso, também foi feito PCR para amplificação da região 23S do RNAr, buscando um produto de 278 pb, outro alvo usado para confirmar a espécie, descrito em Gallo *et al.* 2013 (Figura 2).

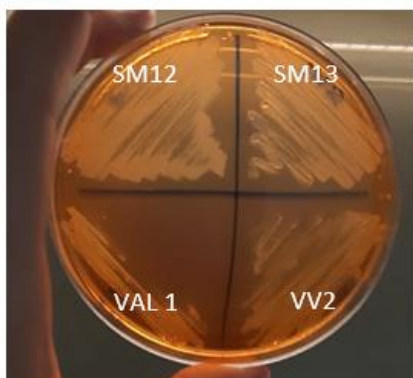


**Figura 1:** PCR do 23S do RNAr com 9 linhagens + controle positivo (ATCC 13637) + controle negativo (DNA genômico *Xanthomonas citri*) + branco (-). 7 confirmações (bandas em 278 pb) e 2 amostras não confirmadas (S492 e S494), com ausência de bandas.

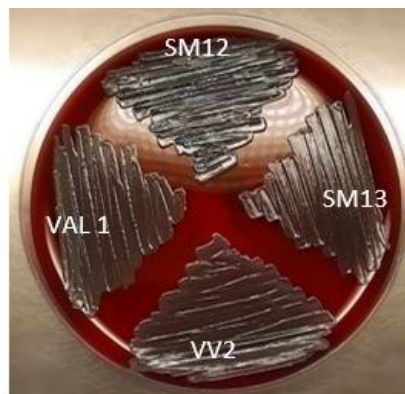


**Figura 2:** PCR multiplex com 12 linhagens + controle positivo (ATCC 13637) + controle negativo (DNA genômico *Xanthomonas citri*) + branco (-). 9 confirmações (bandas em 150 pb) e 3 amostras não confirmadas (SM11(V), S494 e S492), com ausência de bandas.

Também foram realizados testes para a visualização de perfis de crescimento nos meios de cultura diferenciais em Ágar Sangue e Ágar MacConkey (também seletivo) com os isolados hospitalares (Figura 3 e Figura 4), além de ensaios de biofilme, descrito em Pompilio *et al.*, 2011 com 8 deles (Tabela 1).



**Figura 3:** 4 linhagens hospitalares em placa de Ágar MacConkey, 3 com crescimento confirmado e 1 com pouco crescimento (VAL1).



**Figura 4:** 4 linhagens hospitalares em placa de Ágar Sangue com crescimento confirmado.

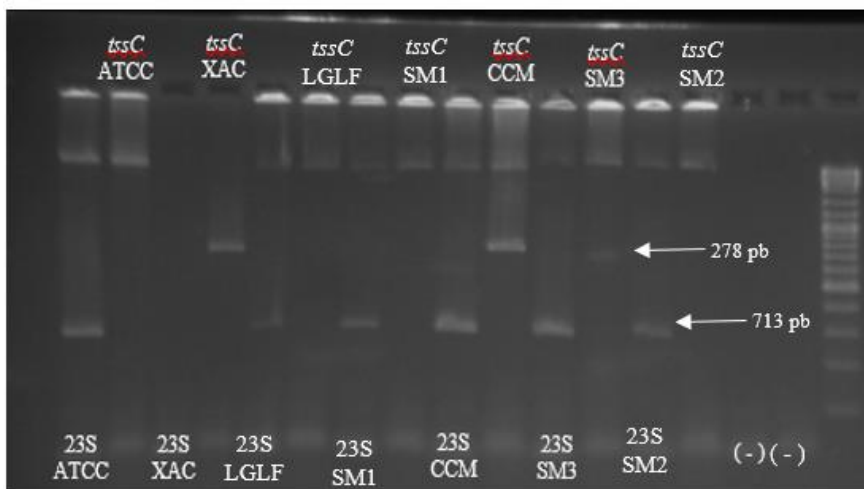
Algumas linhagens apresentaram pouco ou nenhum crescimento no meio, e como foram confirmadas como *S. maltophilia* por PCR, esse acontecimento indica variabilidade genética e pode ser decorrente de sensibilidade a sais biliares. Da mesma forma, linhagens de *S. maltophilia* isoladas de escarro de pacientes com fibrose cística não se mostraram capazes de crescer em meio ágar MacConkey (Anderson *et al.*(2007)) e

verificando o material biológico de origem das bactérias, foi possível fazer a associação dessa afirmação com os resultados obtidos, As linhagens que cresceram em ágar MacConkey não apresentaram capacidade de fermentar lactose, como era esperado para a espécie.

Nome	Média (erro padrão)
ATCC 13637 (isolado ambiental)	2,7 (0,1)
SM17* (isolado hospitalar)	0,8 (0,1)
SM20 (isolado hospitalar)	1,7 (0,2)
SM12 (isolado hospitalar)	1,3 (0,01)
SM16 (isolado hospitalar)	0,9 (0,04)
LGLF (isolado hospitalar)	1,0 (0,03)
SM13 (isolado hospitalar)	0,4 (0,07)
SM19 (isolado hospitalar)	1,1 (0,1)

**Tabela 1:** Médias e erro padrão de 3 ensaios de biofilme que foram realizados em quintuplicatas; \* é uma notação para diferenciar isolados com o mesmo nome

Os resultados obtidos na Tabela 1 demonstram diferenças significativas na capacidade de formação de biofilme entre as linhagens. A linhagem referência ATCC 13637, isolado do ambiente, apresentou maior capacidade de formação de biofilme. Além disto, foram realizados ensaios de PCR para detecção do gene *tssC*, que codifica componente essencial do SSVI. Para isso, optou-se por desenhar primers degenerados, conforme Lang e Orgogozo, 2012, a partir de alinhamento com homólogos encontrados em bancos de dados de genomas bacterianos. Dentre os 30 isolados hospitalares testados foi possível detectar banda correspondente ao produto do gene *tssC* em 3 deles (CCM, SM3 e SM10) (Figura 5) e a presença do gene foi confirmada por sequenciamento do produto obtido.



**Figura 5:** Foto do gel de agarose com os resultados do PCR da região 23S do RNAr (banda em 278 pb, controle positivo da qualidade das amostras) e com o oligo desenhado para *tssC* (banda em 713 pb), utilizando como controle de amplificação de 23S a amostra da linhagem ATCC 13637 e a amostra da linhagem *X. citri* (indicada por XAC) como controle negativo em 23S e positivo para *tssC*. 2 linhagens clínicas positivas para *tssC* e 23S (CCM e SM3), 3 linhagens negativas para *tssC* (LGLF, SM1 e SM2) e 2 poços sem DNA (-) para controle da reação. A linhagem clínica SM10 não está representada, mas gerou o mesmo perfil.

Diante dos resultados obtidos, será daremos continuidade ao estudo, com a caracterização dos isolados ambientais e análise da sequência completa do genoma dos isolados positivos para *tssC*.

## Referências Bibliográficas

1. Cianfanelli, Francesca R., Monlezun, Laura Coulhurst, Sarah J. Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. 2016/01/01. DOI: 10.1016/j.tim.2015.10.005. Trends in Microbiology 5162241. Elsevier.

2. Gallo SW, Ramos PL, Ferreira CA, Oliveira SD. A specific polymerase chain reaction method to identify *Stenotrophomonas maltophilia*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(3):390–391. doi:10.1590/S0074-02762013000300020
3. Lang M., Orgogozo V. (2012) Identification of Homologous Gene Sequences by PCR with Degenerate Primers. In: Orgogozo V., Rockman M. (eds) *Molecular Methods for Evolutionary Genetics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 772. Humana Press
4. Pinot, C., Deredjian, A., Nazaret, S., Brothier, E., Cournoyer, B., Segonds, C. and Favre-Bonté, S. (2011), Identification of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from environmental and clinical samples: a rapid and efficient procedure. *Journal of Applied Microbiology*, 111: 1185-1193. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05120.x
5. Pompilio, A., Pomponio, S., Crocetta, V. *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: Genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiol* **11**, 159 (2011) doi:10.1186/1471-2180-11-159