

DISTRIBUIÇÃO DE SISTEMAS DE SECREÇÃO DE PROTEÍNAS DO TIPO VI EM ISOLADOS AMBIENTAIS E HOSPITALARES DA BACTÉRIA *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILIA*

Palavras-Chave: Bactérias oportunista, Sistemas de Secreção Tipo VI, Virulência

Autores:

Bárbara Bortolozzo Ribeiro ¹, Daniele Ferreira do Prado ¹, Eliana Guedes Stehling ², Carlos Emílio Levy ³,
Cristina Elisa Alvarez-Martinez ¹

¹ Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biologia - Unicamp;

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo;

³ Departamento de Patologia Clínica, Faculdade de Ciências Médicas - Unicamp.

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, em casos de fibrose cística, além de 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. Inspirado nisso, o objetivo desse projeto é verificar a distribuição de T6SS em isolados ambientais e hospitalares de *S. maltophilia*.

METODOLOGIA:

Foram analisados 34 isolados clínicos (após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - Parecer nº 3.729.208) e 16 isolados ambientais, cultivados em meio Tryptic Soy Agar (TSA) e mantidos a 28 °C (ambientais) e 37 °C (hospitalares) pelo tempo de 16-20h. Após isso, colônias isoladas foram retiradas do meio sólido e alocadas em tubos de vidro previamente esterilizados e contendo 2,5 mL de meio Tryptic Soy Broth (TSB), e colocadas para crescimento em temperaturas adequadas para cada origem (ambiental ou hospitalar), em agitador orbital à 200 rpm por 16h. As amostras foram usadas para realização de PCR após fervura.

PCR multiplex *smeD/ggpS* e da região 23S do RNAr:

As reações de PCR multiplex foram realizadas pelo uso de oligonucleotídeos específicos para a amplificação do gene *smeD* (correspondente à *S. maltophilia*) e ausência de amplificação para o gene *ggpS* (correspondente à *S. rhizophila*), conforme descrito em Pinot *et al.*, 2011.

O PCR para amplificação da região 23S do RNAr objetivou buscar um produto de 278 pb. A região 23S possui maior variabilidade na bactéria, e esse resultado foi utilizado como confirmatório da espécie.

Distribuição de grupamentos gênicos de T6SS:

Com base na conservação encontrada no alinhamento da sequência de aminoácidos e nucleotídeos foi necessário desenhar dois pares de oligos para amplificar os diferentes tipos de *tssC*. O mesmo foi realizado para *tssM*. A presença dos produtos de amplificação (*tssC* clados 3 e 4: 713 pb; *tssC* clado 1: 705 pb; *tssM* clado 3: 1211 pb; *tssM* clado 4: 1022 pb) foi detectada por eletroforese em gel de agarose.

Extração dos produtos de PCR de gel de agarose, purificação e Sequenciamento Sanger:

Para isolar e purificar os fragmentos de DNA obtidos por PCR, as reações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% e a banda correspondente ao produto de amplificação do gene alvo foi recortada do gel e o DNA purificado pelo uso do kit "GeneJET Gel Extraction Kit" (Thermo Scientific). Após purificação, reações de sequenciamento foram realizadas com o kit "BigDyeTerminator v.3.1 CycleSequencing Kit" usando um dos oligonucleotídeos previamente utilizado para amplificação por PCR. As reações foram realizadas na empresa EXXTEND.

Metodologia para Sequenciamento de Genoma para isolados confirmados como positivos para *tssC* e *tssM*:

Isolados confirmados para a presença do gene *tssC* ou *tssM* após PCR e sequenciamento dos produtos, foram selecionados para determinação da sequência genômica completa por NGS (Next-generation sequencing). O DNA genômico foi extraído, quantificado por medida de fluorescência utilizando o Qubit e a integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose 0,8%. As amostras foram enviadas para a empresa MicrobesNG (Birmingham, UK) para o sequenciamento NGS e a montagem dos genomas será realizada usando o programa SPAdes Assembler, em colaboração com o Prof. Dr. Rodrigo Galhardo, do Dept. de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

Ensaio de produção de biofilme:

Seguindo o protocolo descrito em Pompilio *et al.*, 2011, com algumas adaptações, os inóculos das amostras hospitalares selecionados ao acaso foram realizados com o meio de cultura TSB e deixados à temperatura de 37 °C por 16h em agitador orbital a 200 rpm. Após este tempo, foi retirado 1,5 mL de cultura líquida e centrifugada à 8.000 xg por 1 minuto, a fim de retirar o exopolissacarídeo formado. O sobrenadante foi retirado, e o pellet foi ressuscitado com um novo meio TSB e novamente centrifugado a 8000 x g por 1 minuto. Após retirar o sobrenadante, a cultura foi corrigida com um novo TSB para uma densidade ótica de 1,00. Depois, foi diluída em 1:10 e desta, foram retirados 200 µL de cada um e colocados em placa de 96 poços com fundo chato, tratada e estéril, de forma que cada amostra ficasse em quintuplicata. A placa foi tampada e incubada em estufa à 37 °C pelo tempo de 24h. Passado este tempo, o meio de cultura foi retirado de cada poço e foi feita uma lavagem com 200 µL de água destilada por 2x para retirar o excesso de meio. A placa de 96 poços foi levada para estufa de secagem por 1h à 50 °C. Após secagem, foi realizada a etapa de fixação com 200 µL de Cristal Violeta à 0,1% em

20% de etanol, por 30 minutos à temperatura ambiente. O cristal violeta foi retirado e cada poço foi lavado com água destilada até saírem os excessos. Para que o biofilme se desprendesse das paredes do poço, cada um foi

lavado com 200 µL de ácido acético glacial a 33% e a leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro de microplacas Epoch (BioTek) à uma densidade ótica de 492 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados obtidos em experimentos de PCR multiplex *smeD/ggpS* e PCR da região 23S do RNAr para confirmação dos isolados ambientais e hospitalares de *S. maltophilia* confirmaram a identificação da espécie para a grande maioria dos isolados, exceto para 3 isolados ambientais (S492, S494 e S487) e 1 isolado hospitalar (SM11 (V)), que não foram identificadas como *S. maltophilia*. Nestes casos também não houve amplificação do gene *ggpS*, específico de *S. rhizophila*. Estes isolados foram descartados da análise de componentes do T6SS. A Figura 1 demonstra resultados representativos dos experimentos de PCR.

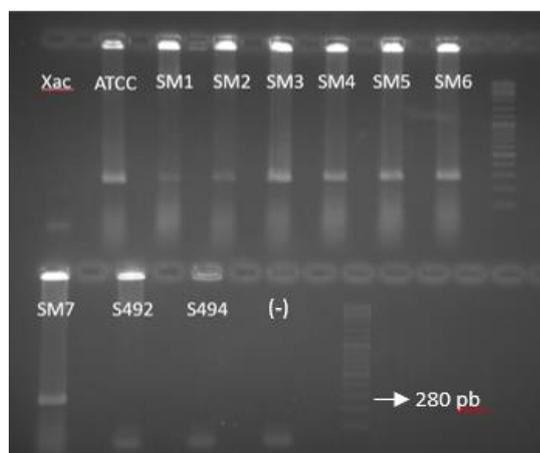


Figura 1: PCR para amplificação do gene do RNAr 23S usando 9 linhagens + controle positivo (ATCC 13637) + controle negativo (DNA genômico *Xanthomonas citri*) + branco (-). 7 confirmações (bandas em 278 pb) e 2 amostras não confirmadas (S492 e S494), com ausência de bandas em 280pb. Marcador de peso molecular: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific)

Para verificar a presença de grupamentos gênicos de T6SS, foi realizado PCR utilizando os pares de oligonucleotídeos degenerados desenhados para *tssC* e *tssM*, que codificam componentes essenciais do T6SS. Optou-se por desenhar primers degenerados a partir de alinhamento com homólogos encontrados na família Xanthomonadales e nos genomas de *Stenotrophomonas sp.*, seguindo o protocolo descrito em Lang e Orgogozo, 2012. Assim, foram desenhados pares de primers degenerados para *tssC* e para *tssM*, devido à maior conservação apresentada quando foram realizadas as análises de alinhamentos de sequência. Análises filogenéticas de T6SS de proteobactérias, demonstraram que estes se subdividem em 5 clados e os homólogos encontrados em Xanthomonadales se distribuem em 3 dos 5 clados principais (clados 1, 3 e 4), conforme descrito em Bayer-Santos *et al.*, 2019. O par de oligonucleotídeos utilizado para a amplificação de *tssC* apresenta complementariedade com representantes dos clados 3 e 4. Os resultados obtidos com as amostras clínicas demonstraram que de 33 isolados testados, 3 foram positivos para o gene *tssC* (CCM, SM10 e SM3), conforme a figura 2, abaixo.

Para confirmar a identidade das bandas obtidas, o PCR foi realizado novamente usando apenas as amostras positivas CCM, SM3 e SM10 e as bandas correspondentes aos amplicons foram recuperadas de gel de agarose e as sequências

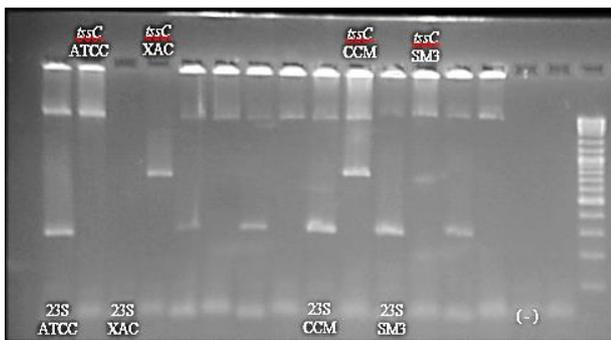


Figura 2: Foto do gel de agarose com os resultados de reações de PCR com o par de oligos desenhados para amplificação do gene *tssC* (banda em 713 pb). De forma concomitante, foram realizadas reações para amplificação do gene de RNAr 23S (banda em 278 pb) como controle positivo da qualidade das amostras. A amostra ATCC 13637 foi usada como controle de amplificação de 23S e a amostra da linhagem *X. citri* (indicada por XAC) foi usada como controle negativo em 23S e positivo para *tssC*. Duas 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. Marcador de peso molecular: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific). SM10 reproduziu resultado semelhante.

determinadas pelo método de Sanger. As sequências de melhor qualidade obtidas pelo sequenciamento com os oligonucleotídeos que anelam na extremidade 5' (Forward) e 3' (Reverse) do gene foram analisadas usando a ferramenta BLAST (para cada amplicon foi selecionada a região com 100% de qualidade na sequência para análise por BLAST).

Ao utilizar a opção "non-redundant" no banco de dados do BLAST para o produto obtido da amostra SM10 forward, SM3 reverse e CCM observou-se, alinhamento de 100% de identidade com o gene *tssC* do T6SS de *S. maltophilia*. Excluindo *Stenotrophomonas sp.* da análise BLAST e utilizando a opção banco de dados de "Reference proteins" ao invés de "non-redundant", a sequência obtida com o primer reverse de CCM mostrou no primeiro score maior semelhança no alinhamento com componente estrutural de T6SS de *Xanthomonas axonopodis*. Para a sequência de *tssC* de SM3 com o primer reverse, o primeiro homólogo com maior score foi *Xanthomonas maliensis*; e SM10 forward demonstrou identificação com componente estrutural de T6SS de *Xanthomonas oryzae*.

Para o gene *tssM* observou-se menor grau de conservação na sequência de aminoácidos entre representantes dos clados 3 e 4 e optou-se por desenhar dois pares oligonucleotídeos para amplificação independente de genes do clado 3 e

4. Assim, foram realizados ensaios de PCR com o par de oligonucleotídeos que contempla *tssM* do clado 4 com 15 dos 33 isolados hospitalares, escolhidos de forma aleatória. Conforme pode ser visto na análise das reações em gel de agarose, 3 dos 15 isolados testados demonstraram amplificação: CCM, SM3 e SM10, os mesmos positivos para *tssC*.

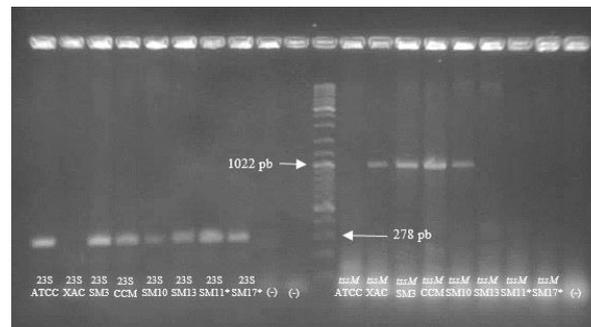


Figura 3: Foto do gel de agarose com os resultados do PCR para amplificação do gene de RNAr 23S (banda em 278 pb, controle positivo da qualidade das amostras) e com o oligo desenhado para *tssM* (banda em 1022 pb), utilizando como controle de amplificação de 23S a amostra da linhagem ATCC 13637 e a amostra da linhagem *X. citri* (indicada por XAC) como controle negativo em 23S e positivo para *tssC*. 3 linhagens clínicas positivas para *tssM* e 23S (CCM, SM10 e SM3), 3 linhagens negativas para *tssM* (SM13, SM11* e SM17*) e 3 poços sem DNA (-) para controle da reação. Marcador de peso molecular: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific)

Foi realizado o PCR com os isolados ambientais, buscando amplificação em 713 pb, referentes ao produto gerado pelos oligonucleotídeos desenhados para *tssC*. Dos 16 isolados, obteve-se resultado positivo em 6 deles (S370, S377, S496, S489, S495 e S359). A figura 4 mostra o gel que identifica S377 e S496 como positivas. As outras amostras exibiram resultado semelhante.

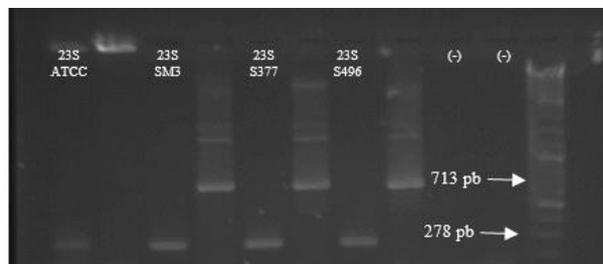


Figura 4: Foto do gel de agarose com os resultados do PCR para amplificação do gene de RNAr23S (banda em 278 pb, controle positivo da qualidade das amostras) e com o oligo desenhado para *tssC* (banda em 713 pb), utilizando como controle de amplificação positivo de 23S e negativo de *tssC* a amostra da linhagem ATCC 13637 e a amostra da linhagem SM3 como controle positivo para *tssC*. 2 linhagens ambientais positivas para *tssC* e 23S (S377 e S496) e 2 poços sem DNA (-) para controle da reação. Marcador de peso molecular: GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Fisher Scientific)

Os isolados clínicos positivos para *tssC* e *tssM* (SM10, SM3 e CCM), tiveram o DNA genômico extraído pelo Kit Wizard Genomic DNA Purification (Ref: A1120 - Promega), para realização do sequenciamento do genoma completo por Next Generation Sequencing (NGS) e enviados para a empresa MicrobesNG (Birmingham, UK).

Resultado complementar - Ensaio de produção de biofilme:

Foram realizados ensaios de biofilme como parte da caracterização fenotípica dos isolados clínicos, escolhendo aleatoriamente 11 deles. Na tabela 1 estão descritos os resultados obtidos no ensaio de biofilme mostrando a média de 3 ensaios realizados em quintuplicatas, os isolados hospitalares utilizados para o ensaio foram escolhidos aleatoriamente, junto com um controle positivo da espécie (ATCC13637). Com isso, pode-se observar 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. Os ensaios com os demais isolados foram interrompidos devido a paralisação de atividades presenciais no período de Março de 2020 a Janeiro de 2021, decorrente da pandemia Covid-19.

| Nome | Média (erro padrão) |
|------------|---------------------|
| ATCC 13637 | 2,7 (0,1) |
| SM17* | 0,8 (0,1) |
| SM20 | 1,7 (0,2) |
| SM12 | 1,3 (0,01) |
| SM16 | 0,9 (0,04) |
| LGLF | 1,0 (0,03) |
| SM13 | 0,4 (0,07) |
| SM19 | 1,1 (0,1) |
| SM1 | 1,2 (0,05) |
| SM2 | 0,6 (0,04) |
| SM3 | 0,7 (0,05) |

Tabela 1: Médias e erro padrão de 11 ensaios de biofilme que foram realizados em quintuplicatas; * é uma notação para diferenciar isolados com o mesmo nome

CONCLUSÕES:

O gene *tssC* foi identificado em 6 dos 14 isolados ambientais testados (equivalente à 42,86%), o que pode indicar mais frequente distribuição de T6SS em isolados ambientais, uma vez que a bactéria é ubíqua no ambiente, tendo contato com diversos microrganismos, não ficando

restrita à microbiotas específicas, como é o caso dos isolados hospitalares, que de 33, apenas 3 positivaram para *tssC* (equivalente à 9,1%). Devido à pandemia de COVID-19, que paralisou boa parte das atividades, não foi possível finalizar as análises da distribuição do gene *tssM* nos isolados clínicos e ambientais, e gene *tssC* do clado 1, o que segue em andamento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Faepex - PRP/UNICAMP e ao PIBIC/CNPq, que possibilitaram que a pesquisa fosse executada, além do Instituto de Biologia da Unicamp, que forneceu a infraestrutura necessária para tal.

BIBLIOGRAFIA

1. 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
2. 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
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. Bayer-Santos E, Cenens W, Matsuyama BY, et al. The opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia* utilizes a type IV secretion system for interbacterial killing. *PLoS Pathog.* 2019;15(9): e1007651. Published 2019 Sep 12. doi:10.1371/journal.ppat.1007651