



CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS AMBIENTAIS E HOSPITALARES DA *STENOTROPHOMONAS MALTOPHILA*

Palavras-Chave: Sistemas de Secreção, *Stenotrophomonas maltophilia*, patógeno oportunista

NATALLI JENNIFER TANCREDO DE OLIVEIRA (autora), IB, UNICAMP

BÁRBARA BORTOLOZZO RIBEIRO (coautora), FCF, UNICAMP
Dr.^a NATÁLIA CAROLINA DREBES DÖRR (co-orientadora), IB, UNICAMP

Prof.^a Dr.^a CRISTINA ELISA ALVAREZ MARTINEZ (orientadora), IB, UNICAMP

INTRODUÇÃO

Stenotrophomonas maltophilia é uma bactéria Gram-negativa da Família Xanthomonadaceae e que se encontra presente nas rizosferas de plantas sendo comumente encontrada em associação às raízes de plantas da família Poaceae (Adegoke *et al*, 2017; Berg *et al*, 2005). Além disso, a *S. maltophilia* é um patógeno oportunista emergente em humanos, sendo conhecida por estar associada a casos de infecções do trato respiratório e bacteremia em pacientes hospitalizados.

Os principais fatores de virulência descritos para essa espécie incluem a formação de biofilme, o mecanismo de quorum sensing (QS), a estrutura de pilus e a secreção de proteínas extracelulares, em especial as DNases, RNases, proteases, lipases e fosfatases (Di Bonaventura *et al*, 2004; Adegoke *et al*, 2017).

Além dos fatores de virulência apresentados acima, algumas cepas de *Stenotrophomonas spp.* apresentam sistemas de secreção de proteínas, sendo esse também um importante mecanismo de virulência e de adaptação ao ambiente nessas cepas. Os sistemas de secreção bacterianos são um conjunto de proteínas que formam um complexo protéico e atuam no transporte de toxinas e proteínas efectoras através da membrana bacteriana e diretamente para outras células ou para o exterior celular. Nove classes de sistemas de secreção foram descritas em bactérias, denominados sistemas de secreção do tipo I a IX (T1SS a T9SS), que se diferenciam em estrutura, função e mecanismo de secreção de proteínas. A linhagem clínica mais estudada de *S. maltophilia*, K279a, possui um T2SS que é importante para virulência (Karab *et al*, 2013) e um T4SS com função antibacteriana, secretando toxinas que matam células vizinhas de forma dependente de contato (Bayer-Santos *et al*, 2019).

O sistema de secreção tipo VI (T6SS) atua na competição interespecífica em diversas bactérias, além de poder também atuar em alvos eucarióticos, promovendo virulência ou resistência à predação por protistas ambientais. O T6SS é composto por 13 proteínas estruturais, sendo elas produtos dos genes: *tssM*, *tssL*, *tssJ*, *tssF*, *tssE*, *tssG*, *tssK*, *tssB*, *tssC*, *tssA*, *hcp*, *clpV* e *vgrG*. Análises filogenéticas de

componentes estruturais que codificam os 13 genes conservados do T6SS de proteobactérias, demonstraram que o T6SS se subdivide em 5 clados diversos (Boyer *et al.*, 2009). A análise filogenética de T6SS encontrados em genomas de Xanthomonadales demonstrou a presença de representantes nos clados 1, 3 e 4 (Bayer-Santos *et al.*, 2019).

A linhagem K279a de *S. maltophilia* não possui um T6SS, porém, em acesso ao banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information; (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)) é possível identificar três isolados da espécie (*AA1*, *SJTL3* e *ISMMS3*) que codificam T6SS ainda não caracterizados, sendo dois isolados de origem ambiental e um hospitalar.

Em projeto anterior do grupo de pesquisa, realizado durante estágio de Iniciação Científica da aluna Bárbara Bortolozzo Ribeiro da Universidade Estadual de Campinas (PIBIC/PRP-UNICAMP), foram obtidos isolados de *S. maltophilia* de origens diversas, sendo 33 isolados clínicos e 16 isolados ambientais, encontrados em associação a plantas ou ao solo. A presença de grupamentos gênicos de T6SS foi analisada nestas amostras por meio de PCR utilizando pares de oligonucleotídeos degenerados para o gene *tssC* encontrado em T6SSs dos clados 3 e 4. Os resultados obtidos demonstraram a presença do gene em 3 isolados clínicos e 6 isolados ambientais, que estão em fase de sequenciamento genômico para verificação da presença do cluster gênico completo do T6SS e que serão usados em futuros estudos do papel destes T6SS na fisiologia da bactéria (Ribeiro, 2021, p.21.). Como citado anteriormente, análises filogenéticas dos sistemas de T6SS demonstraram que estes se subdividem em 5 clados e os homólogos de Xanthomonadales descritos em bancos de dados se distribuem em 3 dos 5 clados principais (clados 1, 3 e 4). O projeto anterior permitiu avaliar a presença de gene *tssC* com homologia a representantes dos clados 3 ou 4, sem distingui-los, uma vez que não foi possível obter oligonucleotídeos degenerados para *tssC* capazes de amplificar diferencialmente homólogos de cada clado. Além disso, não foi avaliada a presença de genes *tssC* com homologia a representantes do clado 1. Com isso, esse projeto visa dar continuidade ao estudo, ampliando a análise da distribuição do T6SS nos isolados ambientais e hospitalares de *S. maltophilia* para detecção de representantes de *tssC* do clado 1 e usando oligonucleotídeos degenerados capazes de amplificar outro gene do T6SS, diferenciando representantes dos clados 3 e 4. Além disso, considerando a importância do biofilme para a virulência e persistência das infecções ocasionadas por essa espécie, será realizada uma caracterização fenotípica dos isolados, por meio de curvas de crescimento e ensaios de formação de biofilme em superfícies abióticas.

METODOLOGIA

1. Distribuição de grupamentos gênicos de T6SS

Com base na conservação encontrada no alinhamento da sequência de aminoácidos e nucleotídeos foi realizada uma amplificação da região utilizando dois pares de oligos desenhados no projeto anterior (Ribeiro, 2021, p.23.) para amplificar a região do gene *tssC* de clados distintos (clados 1, 3 e 4). Este PCR foi realizado com 13 isolados ambientais (S493, S370, S496, S488, S494, S495, S371, S490, S377, S369, S359, S487, S489, S492, S365 e S491) e foi utilizado como controle positivo o isolado clínico SM3.

2. Curva de Crescimento

Para a caracterização fenotípica dos isolados ambientais, foram realizadas curvas de crescimento e ensaios de biofilme. As curvas foram realizadas em meio TSB em temperaturas de 28°C e de 37°C. As culturas saturadas foram diluídas para DO_{600nm} = 0,1 em meio TSB e o crescimento foi avaliado pela variação na densidade óptica das culturas, medindo-se a DO_{600nm}.

3. Construção de mutante por deleção em T6SS

Para o entendimento funcional do T6SS nos isolados que possuem o cluster genômico completo vem sendo realizada a construção de uma linhagem mutante SM3 $\Delta tssC$. Para isso, será obtida construção no vetor pEX18Tc, contendo as extremidades 5' e 3' de *tssC* fusionadas em fase (deleção da região interna) e contendo 1000 pb das regiões genômicas que flanqueiam o gene. A construção foi obtida por PCR, amplificando-se em uma primeira etapa cada uma das extremidades do gene e regiões flanqueadoras correspondentes separadamente e fusionando-se os dois fragmentos em uma segunda etapa de PCR de sobreposição, usando os fragmentos como molde e os oligonucleotídeos que anelam nas extremidades de cada um deles como iniciadores.

RESULTADOS PRELIMINARES

Resultados obtidos no trabalho anterior haviam demonstrado positividade para o gene *tssC* em 6 isolados ambientais, denominados S370, S377, S496, S489, S495 e S359 (Ribeiro, 2021). Com base nestes resultados, três destes isolados (SM 370, SM 489 e SM 495) tiveram o genoma sequenciado na facility CEFAP (ICB/USP). Os resultados da análise de sequência genômica confirmaram a presença do gene *tssC*, bem como dos demais 12 genes que compõem a estrutura básica do T6SS em apenas um deles: SM 489. Uma vez que o resultado de sequenciamento foi contrastante com a análise por PCR que havia sido feita anteriormente, decidimos realizar novas reações de PCR com os 13 isolados ambientais, para que houvesse uma confirmação da detecção do gene *tssC* do clado 3 e 4, buscando assim um produto de amplificação de 713 pb. No sentido de confirmar a qualidade das amostras de DNA utilizadas, foi realizado simultaneamente um PCR para amplificação do gene RNAr 23S, que serviu de controle positivo. Como forma de confirmar a identidade das bandas da amplificação de *tssC*, também foi utilizada como controle positivo a linhagem clínica SM3, cujo genoma já foi completamente sequenciado por nosso grupo de pesquisa. Os resultados obtidos demonstraram que apenas dois isolados ambientais, SM 377 e SM 489, apresentaram a banda resultante de amplificação de *tssC* (713pb). Durante o período, foram realizadas também análises para a padronização do PCR utilizando o par de primers que foi desenhado para o gene *tssC* do Clado 1, tendo como amostra controle o DNA genômico purificado de *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1), que possui um T6SS deste clado.

O DNA genômico da linhagem foi extraído pelo kit Wizard® Genomic DNA purification (Promega) e, após análise em gel de agarose, foi possível confirmar a integridade e qualidade da purificação. Contudo, os resultados de PCR não permitiram identificar uma banda do tamanho esperado de 714 pb, mesmo realizando variações de temperaturas na etapa de anelamento nas reações de PCR.

Para a caracterização fenotípica dos isolados ambientais, foram realizadas curvas de crescimento em meio TSB em temperaturas de 28°C e de 37°C. Os ensaios a 37°C permitem avaliar a possibilidade de colonização de hospedeiros humanos por bactérias encontradas no ambiente, sendo a temperatura mais alta uma das barreiras para a infecção de humanos (Brooke, 2012; Konkel *et al.*, 2000). As culturas saturadas foram diluídas em meio TSB e o crescimento foi avaliado pela variação na densidade óptica das culturas, medindo-se a DO_{600nm} . Até o momento, os ensaios foram realizados em triplicata biológica para 9 isolados ambientais (SM359, SM365, SM369, SM371, SM377, SM488, SM489, SM 490 e SM491) e dois isolados hospitalares (K279a e ATCC 13637) que funcionaram como controle.

Os resultados demonstraram que as seis linhagens ambientais testadas são capazes de crescer a 37°C, sendo possível perceber uma diferença na velocidade de crescimento entre os isolados nas temperaturas de 28°C e 37°C.

Para a análise funcional do T6SS foi utilizada a linhagem SM3, que possui os 13 genes essenciais do T6SS, demonstrando assim possuir um T6SS completo e possivelmente funcional. Assim, iniciamos a construção de linhagem mutante no gene *tssC*, por meio de um procedimento em duas etapas, ambas conduzidas utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Na primeira etapa, foi realizada a amplificação das extremidades e das regiões flanqueadoras do gene *tssC*, denominadas F1 (extremidade 5' do gene *tssC* e sua região flanqueadora) e F2 (extremidade 3' do gene *tssC* e sua região flanqueadora). Na segunda etapa, foi realizada a fusão dos fragmentos F1 e F2 por meio de PCR overlap, obtendo como produto do PCR o tamanho esperado dos fragmentos fusionados de 2200 pb

Após a fusão dos fragmentos, ocorreu a etapa de clonagem, na qual os fragmentos de interesse foram inseridos ao vetor pEX18Tc. Para verificar o sucesso da clonagem, foi realizado um PCR para confirmar se os fragmentos foram corretamente inseridos no vetor. Além disso, foi realizado o preparo das amostras para envio de sequenciamento, garantindo assim a precisão da sequência de DNA inserida no vetor.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento foram importantes para iniciar a compreensão do papel do TSS6 na virulência e disseminação no ambiente desta importante espécie patogênica, que é a *S. maltophilia*. Os resultados foram promissores, com a identificação do gene *tssC* em dois isolados ambientais SM 377 e SM 489, tendo a presença de T6SS completo sido confirmada por sequenciamento no isolado SM 489 e o sequenciamento de SM 377 se encontra em processo de análise.

Além disso, a análise fenotípica que está sendo realizada é fundamental para entender o comportamento dos isolados em diferentes temperaturas. Os resultados demonstraram que os isolados ambientais não têm redução na taxa de crescimento pelo aumento da temperatura de incubação de 28°C para 37°C, uma temperatura crítica para que ocorra a colonização do corpo humano.

BIBLIOGRAFIA

- 1-Adegoke AA, Stentrom TA, Okoh AI. *Stenotrophomonas maltophilia* as an Emerging Ubiquitous Pathogen: Looking Beyond Contemporary Antibiotic Therapy. *Front Microbiol.* 2017;8:2276.
- 2- Bayer-Santos Ethel, Ceseti Lucas de Moraes, Farah Chuck Shaker, Alvarez-Martinez Cristina Elisa. Distribution, Function and Regulation of Type 6 Secretion Systems of Xanthomonadales *Frontiers in Microbiology* V.10.2019. doi:10.3389/fmicb.2019.01635
- 3-Boyer F, Fichant G, Berthod J, Vandenbrouck Y, Attree I. Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources?. *BMC Genomics.* 2009;10:104. Published 2009 Mar 12. doi:10.1186/1471-2164-10-104
- 4-Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(1):2–41. doi:10.1128/CMR.00019-11
- 5-Di Bonaventura, G., Spedicato, I., D'Antonio, D., Robuffo, I., and Piccolomini, R. (2004). Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim-sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 151–160. doi: 10.1128/AAC.48.1.151-160.2004.
- 6-Sara M. Karab, Richard C. White, Nicholas P. Cianciotto, S. M. Payne. *Stenotrophomonas maltophilia* Encodes a Type II Protein Secretion System That Promotes Detrimental Effects on Lung Epithelial Cells. *Journal Article Infection and Immunity.* 2013.3210-3219(81). doi:10.1128/IAI.00546-13

7-Michael E. Konkel, Kit Tilly, Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes, *Microbes and Infection*, Volume 2, Issue 2, 2000, Pages 157-166, ISSN 1286-4579, [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00272-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00272-0).

8-RIBEIRO, Bárbara Bortolozzo. Distribuição de Sistema de Secreção de Proteínas do tipo VI em Isolados Ambientais e Hospitalares da Bactéria *Stenotrophomonas maltophilia*. Orientadora: Cristina Elisa Alvarez Martinez. 2021. p.59. TCC (graduação) - Curso de Farmácia. Universidade Estadual de Campinas.

9-Berg G, Eberl L, Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol.* 2005 Nov;7(11):1673-85. doi: 10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x. PMID: 16232283.

10-Alavi P, Starcher MR, Thallinger GG, Zachow C, Müller H, Berg G. *Stenotrophomonas* comparative genomics reveals genes and functions that differentiate beneficial and pathogenic bacteria. *BMC Genomics.* 2014 Jun 18;15(1):482. doi: 10.1186/1471-2164-15-482. PMID: 24939220; PMCID: PMC4101175.