



PREVALÊNCIA DE GENES DO SISTEMA DE SECREÇÃO DO TIPO III E CITOTOXICIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ORIUNDOS DE UTI, COINFECTADOS OU NÃO COM SARS-COV-2

PAMELLA CONSTANTINO TELES LONGUINHO; YASMIN DA CUNHA SEQUEIRA;
KAREN ROSALINO EMMERICK; ALESSANDRA MATTOS SALIBA

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista frequentemente encontrado em hospitais capaz de causar tanto infecções crônicas quanto agudas. O perfil patogênico de *P. aeruginosa* está associado à expressão de diversos fatores de virulência, destacando-se o sistema de secreção do tipo 3 (SST3) e suas proteínas efetoras: ExoS, ExoU, ExoY e ExoT. ExoU e ExoS são indicadores de virulência elevada, com o perfil exoS+/exoU- estando associado a infecções crônicas e exoS-/exoU+ a infecções agudas. A infecção das vias aéreas inferiores por *P. aeruginosa* é uma causa significativa de morbidade e mortalidade, exacerbada pela ação do SST3, particularmente em pacientes com doenças respiratórias crônicas e coinfectados por vírus como o SARS-CoV-2. Este trabalho visou detectar genes do SST3 e avaliar o potencial citotóxico de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de pacientes de UTI, com e sem co-infecção por SARS-CoV-2. Foram analisados 84 isolados através de extração de DNA e PCR com alvo nas proteínas efetoras do SST3. A viabilidade de células epiteliais respiratórias da linhagem A549 infectadas com os diferentes isolados foi usada para medir a citotoxicidade. ExoT foi o fator de virulência mais prevalente, presente em 97,61% dos isolados sem SARS-CoV-2 e em 92,85% dos coinfectados. ExoY foi o segundo mais comum, presente em 80,95% e 71,42% dos isolados, respectivamente. ExoS foi mais prevalente (50%) nos coinfectados com SARS-CoV-2, enquanto exoU foi detectado em 40,47% dos isolados. Nos não coinfectados, exoS e exoU estavam presentes em igual proporção (50% cada). Quanto à citotoxicidade, isolados de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2 apresentaram menor diversidade genética e menor citotoxicidade em comparação aos sem co-infecção. Apenas os isolados 24, 25 e 26, que eram exoU+, mostraram alta citotoxicidade. Os dados indicam que a co-infecção com SARS-CoV-2 reduz a diversidade genotípica e a citotoxicidade dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Doenças respiratórias; virulência; oportunista; PCR; viabilidade celular.

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador de glicose (BGN-NF) e aeróbio facultativo. É uma bactéria ubíqua e cosmopolita, habitando uma variedade de nichos como plantas, animais, solo e água (Fuentefria *et al.*, 2011; Aditi *et al.*, 2017). Como agente causador de infecções, *P. aeruginosa* se comporta como um patógeno oportunista, uma vez que normalmente não apresenta ameaça a indivíduos imunocompetentes, mas é capaz de causar infecções agudas e crônicas em indivíduos com comprometimento de seus mecanismos de defesa, principalmente da imunidade inata (Jurado-Martín *et al.*, 2021). Devido a sua notável habilidade de se adaptar a variações do ambiente, à resistência a diversas classes de antibióticos e à baixa exigência nutricional, *P. aeruginosa* é amplamente

encontrada no ambiente hospitalar, sendo um dos principais patógenos associados a Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), responsável por infecções agudas em diversos órgãos e tecidos, como a corrente sanguínea e o trato respiratório, destacando-se a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (Constantino-Teles *et al.*, 2022; Sathe *et al.*, 2023; Anvisa, 2021). A adaptação de *P. aeruginosa* às variações do meio e sua habilidade de sobreviver apesar dos desafios impostos pelos diferentes ambientes que a cercam são um reflexo da plasticidade do genoma desta bactéria, que inclui um amplo arsenal de genes que codificam fatores de virulência e conferem resistência a várias classes de antibióticos (Espinoza-Camacho *et al.*, 2021; Mielko *et al.*, 2019).

O transporte de fatores de virulência para o meio extracelular ou para dentro de células procarióticas ou eucarióticas depende de sistemas de secreção de proteínas, que são aparatos moleculares utilizados pela bactéria para secretar toxinas e enzimas hidrolíticas que contribuem para a colonização e a manutenção do processo infeccioso no hospedeiro (Bleves *et al.*, 2010; Jurado-Martín *et al.*, 2021). *P. aeruginosa* é capaz de expressar cinco dos seis tipos de sistema de secreção descritos em bactérias Gram-negativas, dentre os quais o SST3 é um dos mais importantes por estar associado à patogênese de infecções crônicas e agudas e se relacionar diretamente com o aumento da taxa de mortalidade (Hauser, 2009; Deng *et al.*, 2017). Através desse sistema de secreção, *P. aeruginosa* é capaz de sintetizar e secretar quatro exotoxinas, que são entregues direto no citoplasma da célula eucariótica: ExoS, ExoT, ExoU e/ou ExoY (Horna & Ruiz, 2021). Uma vez injetados na célula eucariótica, esses fatores de virulência podem matar as células infectadas ou interferir em vias de sinalização celular de diversos processos, incluindo a inflamação e a resposta antiviral, subvertendo a resposta aos microrganismos (Deng *et al.*, 2017; Foulkes *et al.*, 2019). Diversos estudos sugerem que isolados com genótipo exoS+/exoU- estão relacionados a infecções crônicas, enquanto aqueles com genótipo exoS-/exoU+ são altamente citotóxicos e estão relacionados a processos infecciosos agudos (Diaz & Hauser, 2010; Juan *et al.*, 2017).

Doenças que necessitam de internação deixam os pacientes mais suscetíveis a infecções nosocomiais por patógenos oportunistas, principalmente entre aqueles que necessitam de tratamento intensivo e respiração mecânica, como é o caso de casos graves da COVID-19 causada pelo vírus SARS-CoV-2. O ambiente torna-se, assim, favorável à infecção por *P. aeruginosa*. Tendo em vista a relevância de *P. aeruginosa* no contexto das infecções e coinfeções respiratórias, e a capacidade dos fatores de virulência do SST3 de interferir na patogênese da doença, o presente estudo se propôs a investigar a prevalência de genes do SST3 e a citotoxicidade de isolados clínicos oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2. Como a pandemia de COVID-19 é um evento recente, este estudo revela-se útil para ajudar a entender o comportamento de *P. aeruginosa* durante a coinfeção com SARS-CoV-2.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 84 isolados clínicos coletados entre 2020 e 2022, oriundos de secreções respiratórias ou sangue de pacientes internados na UTI do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE). Desses, 42 isolados eram de pacientes coinfectados com *P. aeruginosa* e SARS-CoV-2, e os outros 42 eram de pacientes infectados apenas com *P. aeruginosa*. Três cepas laboratoriais de *P. aeruginosa* foram usadas como controle de genes de virulência: PA103 (controle positivo para ExoU), PAK (controle positivo para ExoS) e a sua mutante isogênica deletada do gene ExoS, PAK Δ exoS. Células epiteliais alveolares de carcinoma humano da linhagem A549 foram cultivadas em garrafas de 75 cm² com meio F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, glutamina, gentamicina e anfotericina B. As culturas foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂. Aproximadamente 48 horas antes da infecção bacteriana, as células foram lavadas com PBS, dissociadas com solução de tripsina-EDTA e padronizadas com azul de trypan para contagem de células viáveis. As suspensões celulares foram distribuídas em

placas de 96 poços, com uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células/mL, e incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

Para a pesquisa de genes de virulência no genoma de *P. aeruginosa*, uma colônia de cada isolado clínico foi cultivada em 9 mL de LB caldo por 18 horas a 37°C com agitação. Após incubação, a cultura foi centrifugada, o sedimento ressuspensionado em PBS e utilizado para preparar suspensões bacterianas contendo $2,0 \times 10^9$ células por mL. A concentração foi ajustada por espectrofotometria. As suspensões foram centrifugadas novamente, e o sedimento submetido à extração de DNA genômico usando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). A integridade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, e a concentração e pureza determinadas por espectrofotometria. O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a realização das PCR. Para a PCR, 50 ng de DNA genômico foram amplificados usando a enzima GoTaq DNA polimerase, dNTPs, e oligonucleotídeos iniciadores para os genes alvo. As condições de ciclagem para ExoU, ExoY, e ExoT incluíram desnaturação a 95°C, anelamento a 55°C e extensão a 72°C. Para ExoS, a única modificação feita na ciclagem foi em relação à temperatura de anelamento, que foi de 52°C. Os amplicons foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1% com marcador de peso molecular.

Suspensões padronizadas de *P. aeruginosa* foram preparadas ressuspensionando o sedimento bacteriano em meio de cultura F12 com 10% de soro fetal bovino (SFB) e glutamina (250 µg/mL), sem antibióticos. As concentrações das suspensões bacterianas foram ajustadas por espectrofotometria. Células epiteliais alveolares da linhagem A549 foram infectadas com diferentes isolados clínicos de *P. aeruginosa* utilizando uma multiplicidade de infecção de 10 ou tratadas com meio de cultura como controle por 1 hora. Posteriormente, foram expostas à gentamicina a 300 µg/mL por mais 1 ou 23 horas. Alíquotas de 10 µL de cada poço foram semeadas em meio LB-ágar para avaliar a viabilidade das cepas bacterianas pós-tratamento. Isolados clínicos que mostraram resistência à gentamicina foram excluídos dos experimentos de citotoxicidade. A viabilidade celular foi avaliada usando o método de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium (MTT), usando três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada com "two-way ANOVA" comparando dois grupos: 1) células A549 infectadas com diferentes isolados por 1 hora sem tratamento adicional; e 2) células A549 infectadas com diferentes isolados por 1 hora e tratadas com gentamicina por 23 horas. A significância estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

ExoT foi o fator de virulência mais prevalente nos isolados clínicos, sendo encontrado em 97,61% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes internados em UTI e não infectados com SARS-CoV-2, e em 92,85% dos isolados de *P. aeruginosa* coinfectados com SARS-CoV-2. ExoY foi o segundo fator de virulência do SST3 mais prevalente, totalizando 34 (80,95%) e 30 (71,42%) nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes sem e com coinfeção com SARS-CoV-2, respectivamente. O resultado das toxinas ExoS e ExoU foi divergente quando comparados os 2 grupos de pacientes: nos isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2, ExoS foi mais prevalente, estando presente em 21 (50% das cepas), enquanto ExoU foi detectada em 17 cepas (40,47%). Já nos isolados obtidos de pacientes sem coinfeção, observamos proporções iguais (50% cada) de presença de ExoS e ExoU (Tabela 1).

Tabela 1 – Genes do SST3 nos 84 isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos de UTI, coinfectados ou não com SARS-CoV-2

Genes do Sistema de Secreção do Tipo III				
	ExoU (%)	ExoS (%)	ExoY (%)	ExoT (%)
<i>P. aeruginosa</i> + Covid-19	17 (40,47)	21 (50)	30 (71,42)	39 (92,85)
<i>P. aeruginosa</i>	21 (50)	21 (50)	34 (80,95)	41 (97,61)
Total	38	42	64	80

Quanto à viabilidade, 42 isolados clínicos provenientes de pacientes coinfectados com *P. aeruginosa* e SARS-CoV-2, 10 (23,8%) foram resistentes à gentamicina. Dos 42 isolados clínicos de *P. aeruginosa* oriundos de pacientes não infectados com SARS-CoV-2, tivemos mais isolados resistentes, totalizando 19 (45,2%). Os 33 isolados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes coinfectados com SARS-CoV-2 e os 28 isolados de pacientes sem coinfecção suscetíveis à gentamicina prosseguiram à avaliação de citotoxicidade.

As cepas clínicas foram divididas em 3 grupos, de acordo com a sua atividade citotóxica em células epiteliais alveolares humanas: alta citotoxicidade, média citotoxicidade e baixa citotoxicidade. A alta citotoxicidade foi considerada quando a viabilidade de células A549 infectadas foi menor ou igual do que 25% após 23 horas de tratamento com gentamicina. A citotoxicidade foi considerada média nos isolados em que a viabilidade foi igual ou maior do que 25% e menor do que 75%, e considerada baixa nos isolados em que a viabilidade celular foi igual ou maior que 75%. Entre as cepas não coinfectadas, as de alta citotoxicidade foram as clínicas 24, 25 e 26. Os perfis genotípicos das cepas clínicas 24, 25 e 26 foram, respectivamente, *exoU*+/*exoS*-/*exoY*+/*exoT*+, *exoU*+/*exoS*-/*exoY*-/*exoT*+, *exoU*+/*exoS*-/*exoY*+/*exoT*+. A maioria dos isolados clínicos teve citotoxicidade moderada para células, enquanto os isolados clínicos 11 e 14 se mostraram pouco citotóxicos (Figura 1). O genótipo das cepas menos citotóxicas foi *exoU*-/*exoS*-/*exoY*-/*exoT*- e *exoU*-/*exoS*+/*exoY*+/*exoT*+, respectivamente. Entre os isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes simultaneamente infectado com SARS-CoV-2, não foi observado nenhuma cepa com alta citotoxicidade *in vitro*. A maioria das cepas clínicas mostrou citotoxicidade média, com exceção das clínicas 17, 18 e 24, que apresentaram baixa citotoxicidade (Figura 2). Os genótipos dessas cepas foram *exoU*-/*exoS*-/*exoY*-/*exoT*-, *exoU*+/*exoU*+/*exoS*-/*exoY*-/*exoT*+ e *exoU*+/*exoS*-/*exoY*+/*exoT*+, respectivamente.

Figura 1 - Viabilidade de células epiteliais respiratórias após 1 ou 24 horas de infecção com isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes não infectados com SARS- CoV-2.

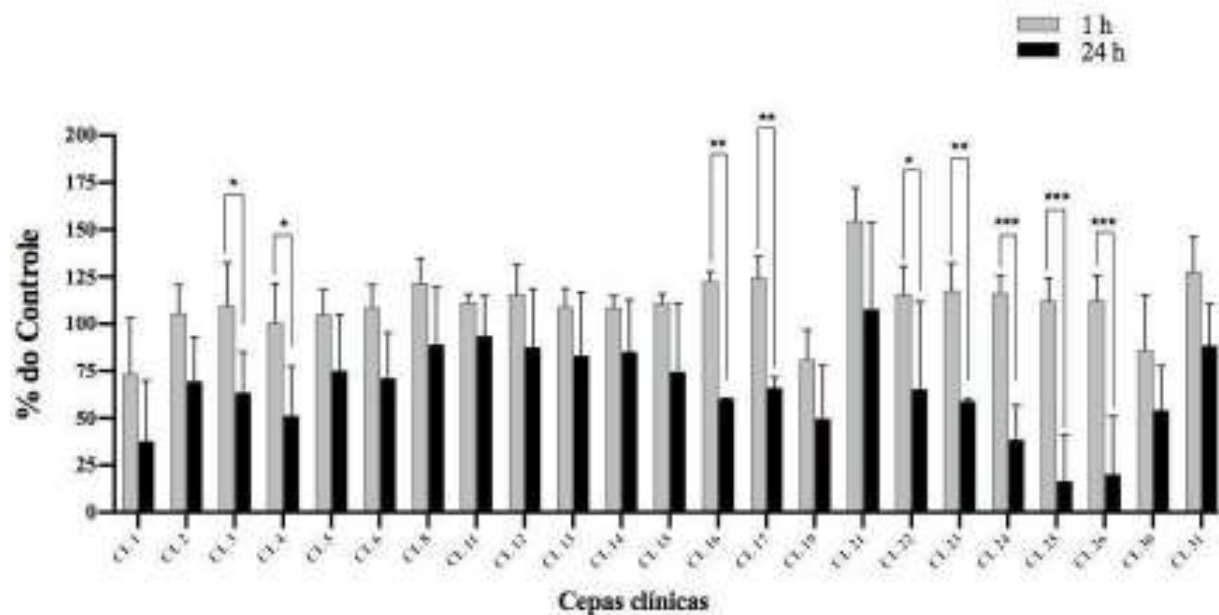
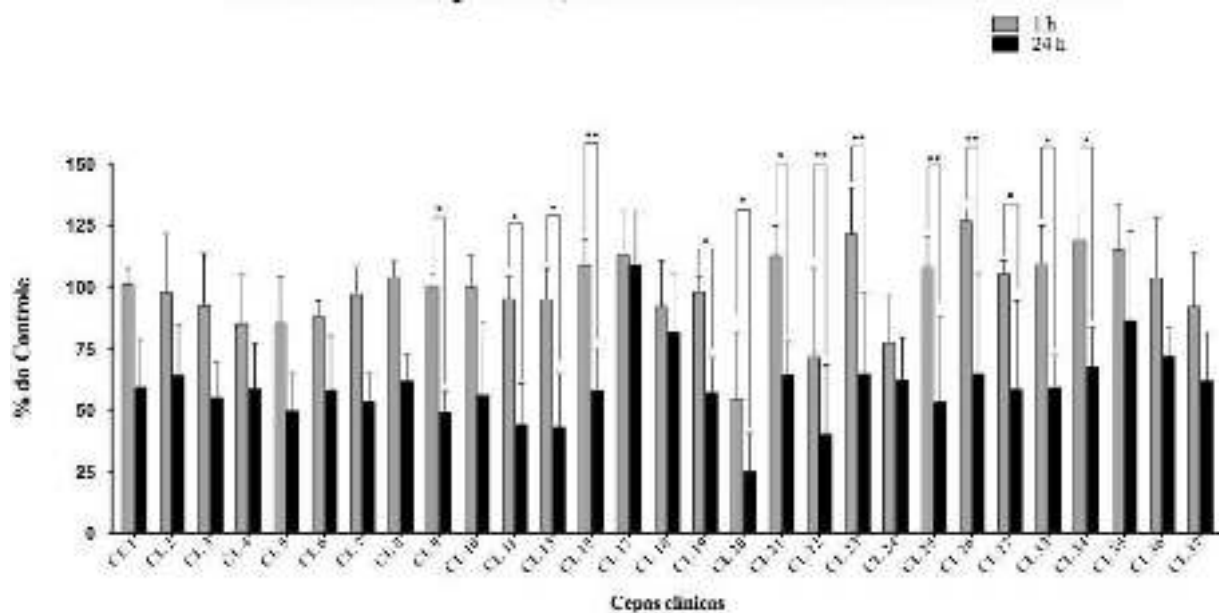


Figura 2: Viabilidade de células epiteliais respiratórias após 1 ou 24 horas de infecção com isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes coinfectados com SARS- CoV-2.



Como descrito na literatura, o gene ExoU costuma ser detectado em cepas mais citotóxicas, resultado também visto neste trabalho. Porém, em cepas menos citotóxicas, ExoU também foi encontrado, mostrando que outros fatores, além da expressão de proteínas do SST3, contribuem com a citotoxicidade dos isolados de *P. aeruginosa*. De um modo geral, as cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes sem COVID-19 se mostraram mais resistentes à gentamicina, mais heterogêneas em relação aos virulotipos e mais citotóxicas, quando comparadas com as cepas isoladas de pacientes com COVID-19. A pandemia de COVID-19 é um evento recente, e por este motivo, existem poucas evidências na literatura sobre a coinfeção respiratória com *P. aeruginosa*. A falta de trabalhos que forneça informações sobre a presença de genes do SST3 durante a coinfeção com SARS-CoV-2 não permitiu uma análise

comparativa aprofundada sobre o comportamento destes genes específicos.

4 CONCLUSÃO

A análise da prevalência de genes que codificam fatores de virulência do SST3 nas amostras de *P. aeruginosa*, mostrou que ExoT e ExoY foram os dois fatores de virulência observados na maioria dos isolados clínicos nos dois grupos de pacientes: com e sem infecção simultânea com SARS-CoV-2.

Quanto à citotoxicidade dos isolados para células de mamíferos, os espécimes clínicos de *P. aeruginosa* com coinfeção pelo SARS-CoV-2 foram menos citotóxicos do que os espécimes clínicos sem coinfeção. Nenhum isolado do grupo com coinfeção apresentou alta citotoxicidade nos testes *in vitro*. No grupo de espécimes clínicos sem coinfeção pelo SARS-CoV-2, as cepas clínicas 24, 25 e 26 apresentaram alta citotoxicidade. Nestas cepas mais citotóxicas, foi observada a presença de ExoU em todas, e nenhuma foi positiva para ExoS, corroborando os dados encontrados na literatura de que cepas de *P. aeruginosa* ExoU+ costumam ser mais citotóxicas e invasivas.

Existem poucas evidências na literatura sobre a correlação entre a infecção por SARS-CoV-2 e a infecção por *P. aeruginosa*, necessitando-se, assim, de estudos mais aprofundados. Os dados revelados neste estudo podem ajudar a entender o comportamento de *P. aeruginosa* em infecções respiratórias durante a coinfeção com o SARS-CoV-2, norteando o caminho dos cientistas para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

ADITI; SHARIFF, M.; CHHABRA, S. K.; RAHMAN, M. Similar virulence properties of infection and colonization associated *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 10, p. 1489-1498, 2017.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Critérios Diagnósticos das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde - 2021 - **NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/ANVISA nº 02/2021**, de fevereiro de 2021.

BLEVES, S.; VIARRE, V.; SALACHA, R.; MICHEL, G. P. F.; FILLOUX, A.; VOULHOX, R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: A wealth of pathogenic weapons. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 8, p. 534-543, 2010.

CONSTANTINO-TELES, P.; JOUAULT, A.; TOUQUI, L.; SALIBA, A. Role of host and bacterial lipids in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 931027, 2022.

DENG, X.; LI, M.; PAN, X.; ZHENG, R.; LIU, C.; CHEN, F.; LIU, X.; CHENG, Z.; JIN, S.; WU, W. Fis regulates type III secretion system by influencing the transcription of *exsA* in *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 669, 2017.

DIAZ, M. H.; HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU is injected into phagocytic cells during acute pneumonia. **Infection and immunity**, v. 78, n. 4, p. 1447-1456, 2010.

ESPINOSA-CAMACHO, L.; DELGADO, G.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; ALCARAZ, L. D.; CASTAÑÓN, J.; MORALES-ESPINOSA, R. Complete genome sequences of four extensively drugresistant *Pseudomonas aeruginosa* strains, isolated from adults with ventilator-associated

pneumonia at a tertiary referral hospital in Mexico City. **Genome Announcements**, v. 5, n. 36, p. 10.1128/genomea.00925-17, 2017.

FOULKES, D. M.; MCLEAN, K.; HANEEF, A. S.; FERNIG, D. G.; WINSTANLEY, C.; BERRY, N.; KAYE, S. B. *Pseudomonas aeruginosa* toxin ExoU as a therapeutic target in the treatment of bacterial infections. **Microorganisms**, v. 7, n. 12, p. 707, 2019.

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A. E.; CORÇÃO, G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: are they genetically related?. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 1, p. 250-255, 2011.

HAUSER, A. R. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 9, p. 654-665, 2009.

HORNA, G.; RUIZ, J. Type 3 secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiological research**, v. 246, p. 126719, 2021.

JUAN, C.; PEÑA, C.; OLIVER, A. Host and pathogen biomarkers for severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S44-S51, 2017.

JURADO-MARTÍN, I.; SAINZ-MEJÍAS, M.; MCCLEAN, S. *Pseudomonas aeruginosa*: An audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 3128, 2021.

MIELKO, K. JABLÓŃSKI, S. J.; MILCZEWSKA, J.; SANDS, D.; LUKASZEWICZ, M.; MLYNARZ, P. Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1-11, 2019.

SATHE, N.; BEECH, P.; CROFT, L.; SUPHIOGLU, C.; KAPAT, A.; ATHAN, E. *Pseudomonas aeruginosa*: Infections and Novel Approaches to Treatment “Knowing the enemy” the threat of *Pseudomonas aeruginosa* and exploring novel approaches to treatment. **Infectious Medicine**, 2023.