

# Avaliação da virulência de duas estirpes de *Tenacibaculum maritimum* por métodos *in vitro*

## INTRODUÇÃO

*Tenacibaculum maritimum* é o agente etiológico de uma doença ulcerativa conhecida como Flexibacteriose [1]. É um organismo de crescimento lento e cuja cultura levanta problemas [2]. Sendo este agente patogénico a causa de importantes prejuízos na produção comercial em aquacultura do linguado (*Solea senegalensis*), é importante desenvolver esforços no sentido de melhorar o conhecimento dos mecanismos de interação patogénio/hospedeiro, pois todo o conhecimento acrescido poderá ajudar na aplicação de imunostimulantes e no desenvolvimento de vacinas, podendo no futuro conduzir a melhores práticas de prevenção e manejo, e contribuir para a eliminação dos problemas levantados por esta infecção na aquacultura do linguado.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Tenacibaculum maritimum* ACC6.1 e ACC13.1

$1 \times 10^3$ ;  $1 \times 10^4$ ;  $1 \times 10^5$  cfu/ml

Viva ou morta por UV dependendo do ensaio

### Explosão Respiratória

Redução do ferrocitocromo C pelo anião  $O_2^-$

30min – 18°C

### Produção de Óxido Nítrico

Reacção de Griess – quantificação de nitritos do sobrenadante dos leucócitos

72h – 18°C

*Solea senegalensis* (aprox. 350g)



Gradiente de Percoll 34:51% para separação do anel de leucócitos do rim anterior



Monocamada de células no fundo plano do poço nas placas de 96 poços.

## RESULTADOS

**Tabela 1**

Produção do anião  $O_2^-$  (nmoles) extracelular por leucócitos do rim anterior de *S. senegalensis* estimulados com diferentes concentrações de 2 estirpes (ACC6.1 e ACC13.1) de *T. maritimum*.

Estirpes	Bactéria (cfu/ml)		
	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
ACC 6.1	$0,58 \pm 0,18$	$1,02 \pm 0,12$	$6,56 \pm 0,29$
ACC 13.1	$0,63 \pm 0,16$	$0,97 \pm 0,16$	$3,19 \pm 0,21$

Todos os valores foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (ANOVA duas vias;  $P > 0,001$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS 15.0 para WINDOWS.

**Tabela 2**

Produção de óxido nítrico ( $\mu M$ ) de leucócitos do rim anterior de *S. senegalensis* estimulados com diferentes concentrações de 2 estirpes (ACC6.1 e ACC13.1) de *T. maritimum*.

Estirpes	Bactéria (cfu/ml)		
	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$
ACC 6.1	$1,63 \pm 0,34$	$2,20 \pm 0,45$	$7,53 \pm 1,81$
ACC 13.1	$1,47 \pm 0,26$	$1,82 \pm 0,42$	$2,98 \pm 0,39$

Todos os valores foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (Teste Kruskal-Wallis;  $P > 0,001$ ). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS 15.0 para WINDOWS.

## DISCUSSÃO

Os dados obtidos no presente estudo mostram pela primeira vez as respostas celulares do linguado perante um desafio com *T. maritimum*. A explosão respiratória e a produção de óxido nítrico são mecanismos críticos na limitação do crescimento de agentes patogénicos [3]. Assim, para a concentração mais alta verificou-se que a estirpe ACC6.1 induz uma resposta superior à da estirpe ACC13.1, o que poderá ser indicativo de que a estirpe ACC6.1 apresenta um grau de virulência superior. Em estudos anteriores no nosso laboratório, Costas *et al.* (comunicação pessoal) verificaram que células do rim anterior do linguado infectadas com *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* apresentavam uma maior produção de anião  $O_2^-$  quando desafiadas com a estirpe mais virulenta. O facto de não existirem diferenças significativas entre estirpes quando utilizadas concentrações de bactéria inferiores a  $1 \times 10^5$  cfu/ml, pode ser indicativo de que os ensaios não são suficientemente sensíveis para detectar eventuais diferenças.

## CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no nosso estudo podemos sugerir que a estirpe ACC6.1 poderá ser mais virulenta do que a ACC13.1. No entanto, estudos de desafio com estas estirpes e com a utilização de ferramentas moleculares, poderão ajudar a clarificar esta hipótese, assim como dar mais indícios na interação patogénio/hospedeiro.

### 1 CIMAR/CIIMAR

Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental



### 2 ICBAS-UP

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade Porto



Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

### 3 CIMAR/CCMAR

Centro de Ciências do Mar do Algarve, Universidade Algarve



### 4 Faculdade de Ciências

Universidade Porto



### 5 A. Coelho & Castro, Lda.



### Agradecimentos

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do projecto OPTISOLE. Com um montante de investimento superior a 100,000 €, este projecto tem como objectivo introduzir melhorias ao nível da organização e gestão da empresa e estimular a sua presença no mercado Internacional. Foi co-financiado pelo Quadro de Referência Estratégico Nacional - QREN, no âmbito do Programa Operacional Regional do Norte - ON2, no montante de 343.751,84 € provenientes do Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional - FEDER.



### Bibliografia

- Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Lemos, M.L., Magañiños, B., 2005. Iron uptake mechanisms in the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. Applied and Environmental Microbiology, 71(11), 6947-6953.
- Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Magañiños, B., Romalde, J.L., Toranzo, A.E., 2006a. Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. Environmental Microbiology, 8(5), 921-928.
- Neumann, N.F., Stafford, J.L., Barreda, D., Ainsworth, A.J., Belosevic, M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. Developmental & Comparative Immunology, 25, 807-825.