

CAPACIDADE INFECTANTE DAS BACTÉRIAS PATOGÊNICAS NA LINHA CELULAR DO SAF-1 E SUA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Said BEN HAMED^{1,5}, Francisco A. GUARDIOLA², Patricia MORCILLO³, Pilar GONZÁLEZ-PÁRRAGA³, María José TAVARES RANZANI-PAIVA⁴, M. Ángeles ESTEBAN³

¹Bolsista FAPESP de Pós-Doutorado (Processo no. 2016/19816-9).

²Pesquisador Científico Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), Universidade de Porto, Portugal.

³Pesquisador Científico, Departamento de Biología Celular e Histología, Facultad de Biología Universidad de Murcia, Espanha

⁴Pesquisador Científico - Instituto de Pesca, SAA/APTA

⁵Endereço: Instituto de Pesca, Centro de Aquicultura, Av. Francisco Matarazzo, 455 - Água Branca, São Paulo - SP, 05001-100, Brasil. Email: benhamed_med@yahoo.fr

Palavras-chave: Infecção, *In vitro*, Patogenicidade, linhagem celular, Antibióticos

INTRODUÇÃO

Dada a crescente demanda mundial de peixe, há uma necessidade crescente de pesquisa para identificar soluções para problemas de saúde de peixes, sem qualquer uso excessivo de antibióticos. Neste contexto, foi testado, *in vitro*, a patogenicidade de dez bactérias patogênicas na linhagem celular de dourada *Sparus aurata* Fibroblast-1 (SAF-1). Também foi testada a sensibilidade dos isolados para vários antibióticos com diferentes modos de ação.

MATERIAL E MÉTODOS

Células SAF-1 foram cultivadas em meio Leibowitz L-15 (Gibco) suplementado com L-glutamina 2 mM (Gibco), 10% de soro fetal bovino (FBS; Gibco), 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina (Gibco) e 100 UI penicilina mL⁻¹ (Gibco). Semearam-se as células em frascos de cultura de plástico (T-25 Nunc não ventilado) em 7 mL de meio de cultura e incubaram-se a 25 °C, durante 3 dias. As células foram subcultivadas usando o método de tripsinização padrão (2,25% tripsina / 0,53 mM EDTA; Invitrogen) plaqueado a densidade de 10⁵ células / poço em placas de cultura de tecidos de 24 poços contendo o mesmo meio de cultura. As placas foram incubadas a 20°C e, após 48 horas, 5 mL de culturas bacterianas (10⁷-10⁸ UFC mL⁻¹) foram adicionados a cada poço. A viabilidade celular foi avaliada usando exclusão de azul tripano e contador de células (TC20 Bio-Rad) (BÉJAR *et al.*, 1997).

Para sensibilidade bacteriana aos antibióticos, foram utilizados 10 µL de diferentes concentrações de antibióticos (10, 50, 100 µg mL⁻¹) seguindo os métodos de difusão em disco EUCAST e CLSI (MATUSCHEK *et al.*, 2014); uma vez obtida resistência aos antibióticos, foram testadas concentrações mais elevadas (1.000 e 10.000 µg mL⁻¹).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 9 horas de incubação, observaram-se diminuições significativas da viabilidade das células SAF-1 para as células expostas a *Halomonas venusta*, *Pseudoalteromonas* sp, *Pseudomonas* sp, *Serratia marcescens*, *Tenacibaculum mesophyllum* e *Vibrio kanaloae*. Após 20 horas, a porcentagem de viabilidade das células foi em torno de 1% após exposição a *Dietzia maris*, *V. harveyi*, *H. venusta* e *Pseudoalteromonas* sp. Esta baixa viabilidade das células SAF-1 confirma sua patogenicidade. No experimento de infecção *in vitro*, os efeitos citotóxicos puderam ser observados dentro de 3-6 h após a inoculação das bactérias patogênicas, mas os resultados foram registrados após 24 h para evitar o descarte de alguns efeitos positivos tardios (BEJAR *et al.*, 1997).

Todas as bactérias estudadas apresentaram resistência à sulfonamida e 60% delas foram resistentes à sulfonamida e a penicilina G. *V. harveyi* e *Pseudoalteromonas* sp, foram resistentes à sulfonamida, penicilina G e sulfadimetoxina. *V. harveyi* e *V. kanaloae*. *Aeromonas bivalvium*, *Pseudoalteromonas* sp, foram sensíveis a 1000 µg mL⁻¹ de eritromicina A, sulfonamida, canamicina, estreptomicina e sulfadimetoxina. A concentração de 100 µg mL⁻¹ de polimixina B inibe todas as bactérias testadas, exceto *D. maris*. Estes resultados mostram que a sensibilidade das bactérias depende do antibiótico utilizado e do seu modo de ação e sugere que algumas bactérias podem ter capacidade significativa para resistir a vários antibióticos. Neste contexto, BLASCO *et al.* (2008) observaram que alguns isolados de *Aeromonas* sp. tem o total de 41 padrões multirresistentes diferentes.

CONCLUSÃO

Este estudo mostra que a capacidade de infecção depende das espécies bacterianas e que essas bactérias patogênicas encontradas com frequência em aquaculturas podem resistir a mais de um antibiótico. Realizado *in vitro*, este estudo será interessante para a escolha de antibiótico adequado em caso de infecção *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- BÉJAR, J.; BORREGO, J.J.; ALVAREZ, M.C. 1997 A continuous cell line from the cultured marine fish gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 150(1-2): 143–153. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(96\)01469-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(96)01469-X).
- BLASCO, M.D.; ESTEVE, C.; ALCAIDE, E. 2008 Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *Journal of Applied Microbiology*, 105(2): 469–475. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03765.x>.
- MATUSCHEK, E.; BROWN, D.F.J.; KAHLMETER, G. 2014 Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(4): O255–O266. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12373>.