

MAZATLAN, SIN. JULIO 11 AL 14 DE 1984

INTERACCION VIRUS-BACTERIA EN LAS NEUMONIAS DEL CERDO.

CONACYT: PCAFBNA-020316

TITULO	IV. Patrón de remoción <u>Pasteurella multocida</u> D/necrotóxica y efecto del sobrenadante de un cultivo de ésta sobre la remoción pulmonar.
AUTOR (es)	*Badiola S., J.I. y Pujols R.J.; ** Ponce H., C. y Camacho M., J.
INSTITUCION	*Generalitat de Catalunya (España), **FES-Cuautitlán, UNAM.
AREA	Sanidad

INTRODUCCION

En la actualidad se discute cual pudiera ser el papel de ciertos componentes segregados o liberados por P. multocida, en la patogenia de los cuadros respiratorios en los que está involucrada (Pedersen, 1982).

Ciertos resultados obtenidos en nuestros estudios, nos obligaron a introducirnos en este tema e investigar cual era el papel que los sobrenadantes de cultivos bacterianos tienen sobre la eliminación de las Pasteurellas depositadas en pulmón.

OBJETIVOS

Determinar la curva patrón de eliminación pulmonar para P. multocida en ratones normales, y estudiar el efecto del líquido sobrenadante, obtenido tras el cultivo de P. multocida D/necrotóxica, sobre la remoción pulmonar.

MATERIAL Y METODOS

- Ratones:** Se emplearon 38 ratones Balb/c procedentes del bioterio del Centro Médico Nacional. Veinte de ellos, distribuidos al azar en cinco grupos de 4, se utilizaron para la realización de la curva patrón de remoción. Para el estudio del sobrenadante se crearon tres grupos aleatorios de 6 ratones.
- Bacterias:** Para todos los experimentos se utilizó la P. multocida VC-Cap, una tipo D/necrotóxica de mediana patogenicidad para ratón.
- Cultivo bacteriano:** Se inocularon matraces nefelométricos, que contenían 50 ml de BHI, con 6-7 colonias de Pasteurella crecida en agar sangre. Estos se incubaron a 37°C, en agitación (120 rpm), hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. El sobrenadante empleado se obtuvo tras centrifugación del cultivo a 3500 g durante 45 minutos en centrífuga refrigerada. Este se filtró, antes de su uso, con filtro Millipore de 0.22 μ m (SCPF = Sobrenadante de cultivo de Pasteurella filtrada). El botón bacteriano se lavó dos veces PBS (pH 7.2) y la concentración final de bacterias se ajustó a 10^8 UFC/ml con PBS.
- Aerosolizaciones:** En todos los casos se utilizó un aparato cedido por el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria de la U.N.A.M.
 - Para la curva de remoción se aerosolizaron al mismo tiempo los veinte ratones con 10 ml de la suspensión bacteriana ajustada (SBA): sacrificándose los cuatro ratones de cada grupo a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas después del aerosol.
 - Para ver el efecto del líquido sobrenadante, se aerosolizaron seis ratones con 10 ml de SCPF, otros seis con PBS (Control 1) y seis con BHI (Control 2). Doce horas después, los 18 ratones se aerosolizaron con 10 ml de SBA.

Tres ratones de cada grupo se sacrificaron inmediatamente después de este aerosol (T0h) y los otros tres, seis horas después (T6h).

Nota: Todas las aerosolizaciones fueron de 15 minutos.

e) Sacrificio de ratones y cuentas bacterianas: A cada ratón se le inoculó 0.15ml (7.87 mgr/gr de peso) de Pentobarbital intraperitonealmente antes de pesarlo. Una vez anestesiado se desinfectó la piel sumergiéndolo en cloruro de benzalco-nio (1:1000), con la precaución de que no aspirase desinfectante. En una mesa de disección se abrió primero la cavidad abdominal para sangrar al animal por sección de la vena renal izquierda. Posteriormente se sacaba el paquete toráxi-co, vigilando de no seccionar esófago, y se eliminaban corazón, grandes vasos, tráquea y la porción extrapulmonar de bronquios. Los pulmones así procesados se pesaban y homogeneizaban en un mortero Tembroeck que contenía 5 ml de PBS (pH 7.2). Los homogenados se diluyeron en base 10, hasta la dilución 10^{-3} , y de cada tubo se sembraron tres gotas, de 20 μ l, en placas de agar sangre. Después de 24 horas de incubación, a 37°C, se contó el número de V.F.C. por go-ta.

Aplicando la fórmula:

$$\left(\frac{\sum_{i=1}^b \sqrt{V_n \cdot FD}}{b} \right)^2 \cdot \left(\frac{5}{0.02} \right)$$

b = gotas con colonias contables
 n = número de colonias/gota
 FD = factor de dilución
 5 = ml en el Tembroeck
 0.02 = ml por gota

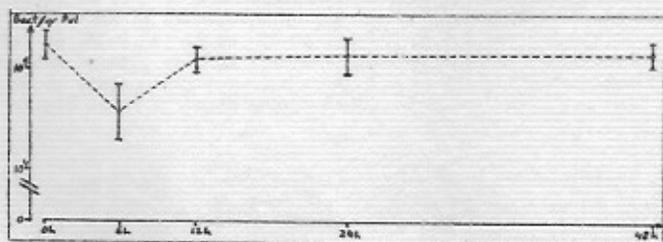
Se calculó el número de bacterias por pulmón, que dividido por el peso del pulmón (en gramos) y por el del ratón se diluyeron en base 10, hasta la dilución 10^{-3} , y de cada tubo se sembraron tres gotas, de 20 μ l, en placas de agar sangre. Después de 24 horas de incubación, a 37°C, se contó el número de V.F.C. por go-ta.

RESULTADOS

La gráfica 1 muestra la curva de remoción patrón. En ella puede verse un marcado enlentecimiento después de las primeras seis horas.

El cuadro 1 y la gráfica 2, presentan los resultados de la aerosolización con SCPP.

Gráfica 1

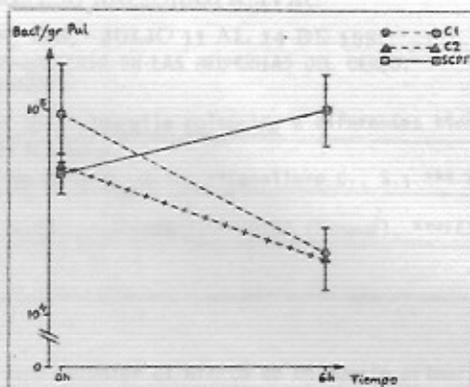


Cuadro 1

	C1	C2	SCPF
0h	9.8×10^4	7.2×10^4	7.1×10^4
6h	2.8×10^4	2.8×10^4	1.0×10^5

Bacteria/gr. de pulmón

Gráfica 2



DISCUSION Y COMENTARIOS

La remoción de la *P. multocida* utilizada en pulmones normales, sigue un patrón diferente al publicado para otras bacterias, tanto grampositivas como gramnegativas (Martínez, 1984). Especialmente después de las primeras seis horas. Cabe decir que esto no sería suficiente para explicar las neumonías por *Pasteurella*, pues vimos (datos no publicados), que seis días después de aerosolizar con *Pasteurella multocida*, no se recuperó ésta del pulmón.

En la actualidad se ha descubierto una línea de trabajo para individualizar el efecto de la necrotoxina y estudiar cuáles son los sistemas de defensa pulmonar afectados.