

5
2ij



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores "Cuautitlán"

**EVALUACION in vitro DE FAGOCITOSIS,
EFECTO BACTERICIDA Y CITOTOXICIDAD
DE Pasteurella haemolytica Y Pasteurella
multocida EN MACROFAGOS ALVEOLARES
DE BOVINOS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A:

DELIA AYALA AYALA

**ASESORES: PhD. FRANCISCO J. TRIGO TAVERA
MVZ. JOSE FCO. MORALES ALVAREZ**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México

1987





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

LISTA DE CONTENIDO:

	PAG
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	2
OBJETIVO.....	6
MATERIAL Y METODOS.....	7
- ANIMALES.....	7
- OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES.....	7
- VIABILIDAD Y CONTEO DE CELULAS.....	7
- CULTIVO DE CELULAS.....	8
- SUSPENSIONES BACTERIANAS.....	8
- EVALUACION DE FAGOCITOSIS.....	9
- EVALUACION DE EFECTO BACTERICIDA.....	9
- OBTENCION DE CITOTOXINA DE <u>P. haemolytica</u> Y <u>P. multocida</u>	10
- SUSPENSION DE MACROFAGOS ALVEOLARES.....	10
- SUSPENSION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE BOVINO.....	10
- EVALUACION DE CITOTOXICIDAD DE <u>P. haemolytica</u> Y <u>P. multocida</u>	11
RESULTADOS.....	16
DISCUSION.....	25
LITERATURA CITADA.....	28

LISTA DE CUADROS:

	PAG
DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA RECOLECCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE BOVINO,.....	13
DIAGRAMA DE FLUJO PARA FAGOCITOSIS Y EFECTO BACTERICIDA DE <u>P. haemolytica</u> Y <u>P. multocida</u> ,.....	14
DIAGRAMA DE FLUJO PARA CITOTOXICIDAD,.....	15
CUADRO 1. LAVADOS BRONQUIOALVEOLARES EN BOVINOS PARA LA OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES,.....	18
CUADRO 2. VALORES PROMEDIO DE DENSIDAD OPTICA (CONCENTRACION BACTERIANA) EN LA EVALUACION DE FAGOCITOSIS DE <u>P. haemolytica</u> ,.....	19
CUADRO 3. VALORES PROMEDIO DE DENSIDAD OPTICA (CONCENTRACION BACTERIANA) EN LA EVALUACION DE FAGOCITOSIS DE <u>P. multocida</u> ,.....	20
CUADRO 4. VALORES PROMEDIO DE DENSIDAD OPTICA (CONCENTRACION BACTERIANA) EN LA EVALUACION DE EFECTO BACTERICIDA DE <u>P. haemolytica</u> ,.....	21
CUADRO 5. VALORES PROMEDIO DE DENSIDAD OPTICA (CONCENTRACION BACTERIANA) EN LA EVALUACION DE EFECTO BACTERICIDA DE <u>P. multocida</u> ,.....	22
CUADRO 6. EVALUACION DE CITOTOXICIDAD DE <u>P. haemolytica</u> Y <u>P. multocida</u> SOBRE MACROFAGOS ALVEOLARES Y LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE BOVINO,.....	23

LISTA DE FIGURAS:

	PAG
FIGURA 1. EVALUACION ESPECTROFOTOMETRICA DE FAGOCITOSIS DE <u>P. haemolytica</u> POR MACROFAGOS ALVEOLARES.....	19
FIGURA 2. EVALUACION ESPECTROFOTOMETRICA DE FAGOCITOSIS DE <u>P. multocida</u> POR MACROFAGOS ALVEOLARES.....	20
FIGURA 3. EVALUACION ESPECTROFOTOMETRICA DE EFECTO BACTERICIDA DE <u>P. haemoly-</u> <u>tica</u> POR MACROFAGOS ALVEOLARES.....	21
FIGURA 4. EVALUACION ESPECTROFOTOMETRICA DE EFECTO BACTERICIDA DE <u>P. multocida</u> POR MACROFAGOS ALVEOLARES.....	22
FIGURA 5. LAVADO BRONQUIOALVEOLAR PARA LA RECOLECCION DE MACROFAGOS ALVFOIARES DE BOVINO.....	24

TITULO:

EVALUACION IN VITRO DE FAGOCITOSIS, EFECTO BACTERICIDA Y
CITOTOXICIDAD DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA Y PASTEURELLA
MULTOCIDA EN MACROFAGOS ALVEOLARES DE BOVINOS.

RESUMEN:

Se llevó a cabo la evaluación, por espectrofotometría, de fagocitosis y efecto bactericida de Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida, por macrófagos alveolares (MA) obtenidos mediante lavados bronquioalveolares en bovinos vivos. Se evaluó además la actividad citotóxica de estos agentes sobre MA mediante un ensayo simple visual en microplaca, utilizando comparativamente leucocitos de sangre periférica de bovino. Para evaluar la fagocitosis se consideraron las siguientes variables: P. haemolytica y P. multocida (por separado) en contacto con MA; P. haemolytica y P. multocida en suspensión, como control positivo de crecimiento bacteriano; y medio RPMI-1640 sólo, como control negativo de crecimiento bacteriano. Para la capacidad bactericida, se incubaron las bacterias con MA adheridos al plástico por espacio de 30 minutos y 3 horas; las muestras incubadas durante 30 minutos se tomaron como datos basales de fagocitosis y las de 3 horas, para evaluar la capacidad bactericida de los MA sobre las bacterias fagocitadas. La lectura de las muestras de cada evaluación se realizó en un espectrofotómetro a 380 nm. Los resultados obtenidos de fagocitosis mostraron que la proliferación bacteriana fue mayor al encontrarse las bacterias solas, que en contacto con MA; se observó que la capacidad bactericida del macrófago fue eficiente, ya que el número de bacterias fue mayor en la primera evaluación que en la segunda. Se comprobó que el efecto citotóxico de P. haemolytica fue más severo para los leucocitos de sangre periférica que para los MA. Así mismo no hubo evidencia de citotoxicidad de P. multocida para las células evaluadas. Con el desarrollo de esta técnica para la obtención de MA, empleando el método espectrofotométrico, es posible desarrollar innumerables posibilidades, ya que se puede considerar un método sencillo en el cual se pueden evaluar otras variables, como lo es el uso de bacterias opsonizadas o medir el comportamiento del MA frente a agentes involucrados en problemas neumónicos.

INTRODUCCION

La función del aparato respiratorio es la de captar el aire del medio ambiente para aprovechar el oxígeno contenido en éste y expulsar el bióxido de carbono liberado a nivel de la unión alveolo-capilar, sitio en donde se efectúa el intercambio gaseoso (11).

Las vías respiratorias se encuentran divididas arbitrariamente por la unión bronquioalveolar, en vías aéreas altas y bajas, debido a las diferencias anatómicas y fisiológicas que se encuentran antes y después de ésta zona. Las vías aéreas altas comprenden a los cornetes nasales, senos paranasales, faringe, laringe, tráquea, bronquios y bronquiolos de primero, segundo y tercer orden; en tanto que las vías aéreas bajas están formadas por los bronquiolos respiratorios y los alveolos (12).

El epitelio del aparato respiratorio se encuentra en contacto estrecho con el aire inhalado, el cual puede tener en suspensión elementos físicos, químicos o biológicos, los cuales pueden llegar a lesionar al tejido. Sin embargo, el aparato respiratorio cuenta con mecanismos de defensa los cuales actúan de manera específica o inespecífica y que en la mayoría de las ocasiones resultan eficaces para evitar algún daño. Cuando estos mecanismos son rebasados se presenta la enfermedad respiratoria (11, 28).

Dentro de los mecanismos de defensa de tipo inespecífico se encuentra el reflejo tusígeno, que permite mantener las vías aéreas libres de materias extrañas. Otro mecanismo importante son las secreciones a lo largo de las vías aéreas, que humidifican y filtran el aire inspirado al englobar partículas y bacterias. Las secreciones son arrastradas hasta la laringe y faringe por el movimiento ciliar ascendente del epitelio, una vez ahí se expulsan o degluten (11). Por otra parte, los macrófagos son considerados el principal mecanismo específico de defensa a nivel alveolar, cuya función es la fagocitosis de bacterias, glóbulos rojos, partículas, tejido necrótico, etc. (13).

Las enfermedades respiratorias son consideradas de importancia en bovinos, así como en otras especies domésticas, debido a las pérdi-

das económicas que se producen por el elevado índice de mortalidad, retraso en el crecimiento, así como las implicaciones de estas sobre la producción de leche y carne en México (18, 40).

Entre los microorganismos más comúnmente implicados en alteraciones del aparato respiratorio del ganado bovino se encuentran, Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida (2, 4, 7, 18, 22, 23, 31, 32, 33).

Pasteurella haemolytica es una bacteria Gram negativa, encapsulada, que puede poseer determinantes de superficie antifagocíticos. Mediante pruebas de hemaglutinación indirecta, se ha demostrado la existencia de 12 serotipos en base a la presencia de antígenos capsulares (17, 32).

Biberstein et al (1960) clasificaron estos serotipos en dos biotipos de acuerdo a sus características bioquímicas y morfológicas. El biotipo A, fermenta la arabinosa e incluye los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 11 y 12; en tanto el biotipo T, fermenta la trehalosa y comprende los serotipos 3, 4 y 10 (17). Recientemente han sido reconocidos otros tres serotipos, el A₁₃, A₁₄ y T₁₅ pero son considerados de poca importancia debido a su baja patogenicidad (35). En México y Estados Unidos los serotipos más importantes y que más frecuentemente se han aislado de pulmones neumónicos de bovinos son los serotipos 1 y 2 (1, 32).

Se ha demostrado que P. haemolytica produce en fase logarítmica de crecimiento una sustancia altamente antigénica, la cual es común para todos los serotipos (18). Esta sustancia contiene un componente protéico esencial y ejerce un efecto citotóxico específico para leucocitos, como los macrófagos de bovinos y ovinos (16, 18, 22, 31, 32, 33, 36).

La citotoxina de P. haemolytica es termolábil, tiene un peso molecular de 150,000-300,000 daltons, que equivale de 12-25% de su peso seco, resiste condiciones extremas de pH y su efecto es inactivado con tripsina debido al componente protéico esencial (4, 18, 34, 40). Se han encontrado anticuerpos neutralizantes de esta citotoxina, en suero de animales jóvenes y adultos, en secreciones nasales, en lavados pulmonares de bovinos y en suero de animales inmunizados experimentalmente (4, 16, 30).

Pasteurella haemolytica es considerada parte de la flora normal

de la nasofaringe (3, 4, 7, 23, 32). Se desconoce el mecanismo por medio del cual esta bacteria se multiplica en nasofaringe y coloniza las vías respiratorias inferiores en donde puede causar daño. Los factores predisponentes son importantes para el desarrollo de la enfermedad, entre estos factores se encuentran el transporte prolongado, hacinamiento, manejo excesivo, variaciones atmosféricas y la presencia de agentes primarios como el virus de la Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Parainfluenza Tipo-3 (7, 22, 23). Asimismo, la citotoxina de P. haemolytica puede jugar un papel importante ya que ejerce su efecto sobre el macrófago alveolar (MA) que es considerada la célula fagocítica primaria del pulmón a nivel alveolar (7, 22, 23, 31, 33).

Pasteurella multocida es un cocobacilo Gram negativo, inmóvil, oxidasa negativo. En agar sangre forma colonias pequeñas no hemolíticas de color gris, se le ha detectado la presencia de antígenos capsulares; generalmente es aislado en forma de variantes lisas o mucoides y variantes rugosas (13).

Se han establecido dos tipos de clasificaciones para esta bacteria. Una de tipo inmunológico determinada por pruebas de aglutinación, en donde se designan cinco tipos el I, II, III, IV y V, pero esta clasificación ya no se usa debido a que históricamente se le considera obsoleta; y la clasificación serológica donde se establecen cuatro tipos equivalentes a los de la primera clasificación. Estos tipos son el A, B, D y E (8). Los tipos en ambas clasificaciones se asocian con problemas neumónicos en los bovinos, donde el tipo A es el más frecuentemente aislado en México, pudiendo llegar a estar presente también el tipo D (20).

Como agente productor de la neumonía de los terneros, afecta más severamente a aquellos animales de 2-4 meses de edad, provocando una reacción de tipo fibrinopurulento que puede estar acompañada de una poliartritis del mismo tipo (8).

Una vez que P. haemolytica y P. multocida se establecen a nivel alveolar, inmediatamente se pone en marcha el principal mecanismo de defensa celular a este nivel, los MA, los cuales se acumulan alrededor de estos microorganismos invasores, iniciándose así el proceso de fagocitosis. Este proceso se inicia con el quimiotactismo, que es el movimiento direccional de las células mediado por la presencia de factores libera-

dos por neutrófilos, productos bacterianos, etc.. La segunda etapa es la adherencia y comprende la unión entre la partícula extraña y la membrana de la célula fagocítica, lo cual es facilitado por la presencia de opsoninas séricas como IgG y complemento, así como receptores específicos en la superficie del macrófago. Una vez que la partícula se une a la membrana, se inicia la fase de ingestión en donde la partícula es englobada por una invaginación de la membrana plasmática que finalmente forma el fagosoma. Por último se liberan las enzimas proteolíticas de los lisosomas, fase conocida como digestión (13, 37).

Se ha observado in vitro, que la fagocitosis de bacterias es más efectiva cuando la relación bacteria/macrófago es 10:1 y cuando el tiempo de incubación es mayor (38). Además, esta se facilita por la presencia de receptores para la fracción cristizable de IgG y para el complemento sobre la membrana del macrófago (39). Se han desarrollado diversas técnicas para evaluar la fagocitosis y efecto bactericida de los MA sobre diversos agentes, pero principalmente sobre P. haemolytica y P. multocida; en ellas se ha utilizado diverso tipo de material, así como el empleo de otra especie distinta a la del bovino. Dentro de las técnicas utilizadas se pueden mencionar, la evaluación por turbidez o transparencia del medio con ensayos de microtitulación; mediante el conteo de unidades formadoras de colonias; la utilización de elementos marcadores como el ^{51}Cr , ^{125}I entre otras. Se han utilizado otro tipo de células como macrófagos peritoneales en ratón, macrófagos obtenidos de ratones timectomizados, etc. (5, 7, 9, 23, 38, 39).

En la mayoría de los trabajos realizados ha sido necesario el sacrificio de los animales (36, 41) o el empleo de un agente anestésico para la obtención de los MA (10, 14, 25, 42).

En México son escasas las investigaciones realizadas para evaluar la actividad de los MA sobre P. haemolytica y P. multocida en animales vivos, por lo que se considera importante realizar este estudio.

OBJETIVO:

Evaluar por espectrofotometría la fagocitosis, efecto bactericida y citotoxicidad in vitro de Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida en macrófagos alveolares obtenidos mediante lavado bronquioalveolar de bovinos vivos.

MATERIAL Y METODOS:

ANIMALES: Se utilizaron 4 bovinos Holstein clínicamente sanos de 1 a 2 años de edad, mantenidos en corrales techados con pisos de concreto, con una dieta de mantenimiento y agua ad libitum.

OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES: Esta técnica es una modificación a la descrita por Trigo (1984). Para facilitar el lavado se administró hidrocioruro de xilazina* como tranquilizante a una dosis de 0.6-0.8 mg/Kg de peso por vía intramuscular y xilocaína en aerosol al 10% ** por vía intranasal como anestésico local. Para realizar el lavado bronquialveolar se introdujo a la tráquea por vía nasal una sonda de proli propileno de 0.6 cm de diámetro por un metro de largo con punta roma, en el extremo libre o externo de la sonda se conectó una jeringa desechable de 20 ml y se introdujeron lentamente alícuotas de una solución salina amortiguada suplementada con 1% de glucosa (29), hasta completar un volumen aproximado de 140-200 ml. Entre cada introducción de las alícuotas, se recuperaba la solución de lavado mediante succión ligera del émbolo; la suspensión conteniendo las células pulmonares se depositó en tubos de centrifuga de polivinil de 50 ml, los cuales se colocaron en baño de agua fría, aproximadamente a 4 C.

VIABILIDAD Y CONTEO DE CELULAS: El número total de células por mililitro se determinó por conteo directo en cámaras cuentaglobulos de Neubauer (6). Para determinar la viabilidad de las células se utilizó la técnica de exclusión de azul tripano en solución al 0.2% (24).

* (Rompun, Lab. Bayer de México, S.A. de C.V.)

** (Lab. Astra Chemicals, S.A.)

CULTIVO DE CELULAS: Los tubos de polivinil conteniendo las células pulmonares se colocaron en una centrífuga con unidad refrigerante y fueron lavadas por centrifugación, 3 veces a 200 G durante 10 minutos con medio 199* adicionado con 100 UI de penicilina/ml y 100 µg de estreptomicina/ml, ajustando finalmente la concentración a 3×10^5 células por mililitro en medio REMI-1640** adicionado con antibióticos y 10% de suero fetal de ternera (SFT).

Se utilizaron microplacas para cultivo de células de 24 pozos, donde se colocaron en forma estéril 2 ml de la suspensión celular y se incubaron toda la noche a 37 C, en una atmósfera con 2% de CO₂ para facilitar la adherencia de las células a la superficie de plástico de las placas. Al finalizar este período, se eliminaron las células no adherentes mediante el lavado de los pozos, 3 veces con solución salina amortiguada (SSA) estéril y se procedió a realizar la evaluación de fagocitosis y efecto bactericida por MA.

SUSPENSIONES BACTERIANAS: Se utilizaron cepas aisladas en México de P. haemolytica, biotipo A, serotipo 1 (1) y P. multocida biotipo A, las cuales se sembraron en agar sangre y se incubaron en una estufa bacteriológica a 37 C manteniéndose en refrigeración hasta su uso.

Las bacterias se cultivaron 12 horas antes de su uso en caldo de infusión cerebro-corazón (BHI)*** a 37 C en una atmósfera con 2% de CO₂. Transcurrido el período de incubación se realizó un conteo de las bacterias, con dilución previa en pipeta de Thoma para glóbulos rojos, en cámara cuentaglóbulos utilizando para la lectura microscopio en contraste de fases. Posteriormente se centrifugaron a 200 G durante 10 minutos para resuspender finalmente en medio REMI-1640 sin antibióticos

* (In vitro México, S.A. de C.V.)

** (Lab. NUNC, Dinamarca)

*** (Bioxon de México, S.A.)

y con 10% de SFT a una concentración aproximada de 1.5×10^5 bacterias por mililitro.

EVALUACION DE FAGOCITOSIS: Una vez realizado el lavado de los pozos, se agregó a 3 pozos con MA 2 ml de la suspensión de P. haemolytica, para obtener aproximadamente una concentración de 5 bacterias por macrófago; a 3 pozos sin MA se les agregó una suspensión de P. haemolytica y finalmente a otros 3 RPMI-1640 sólo. Este procedimiento se llevó a cabo de igual forma para P. multocida, quedando de esta manera las siguientes variables: P. haemolytica y P. multocida por separado, en suspensión con macrófagos; P. haemolytica y P. multocida solas como control positivo de crecimiento bacteriano; y medio RPMI-1640 sólo, como control negativo de crecimiento bacteriano. Las muestras se incubaron a 37 C con 2% de CO₂ por periodos de 1, 3, 5 y 7 horas, al término de cada periodo se tomaron por duplicado en forma estéril alícuotas de 0.1 µl de cada pozo y fueron diluidas 1:10 en caldo nutritivo y se incubaron 5 horas a 37 C. Al concluir cada periodo de 5 horas, las muestras fueron leídas en un espectrofotómetro a 380 nm, tomando como fundamento que a mayor concentración de bacterias mayor sería la lectura en absorbancia en el espectrofotómetro.

EVALUACION DE EFECTO BACTERICIDA: Una vez realizado el lavado de los pozos, se agregó la suspensión de P. haemolytica a 6 pozos con MA adheridos. Se incubaron durante 30 minutos a 37 C en una atmósfera con 2% de CO₂ para facilitar la fagocitosis de bacterias; después de este periodo, se lavaron los pozos con SSA estéril y se provocó lisis celular en 3 pozos agregando agua destilada estéril para la liberación de las bacterias fagocitadas. El resto de los pozos se resuspendió con medio RPMI 1640 adicionado con antibióticos y SFT; se incubaron durante 3 horas más en las mismas condiciones de atmósfera y temperatura. Al concluir este periodo, se realizó el lavado de los pozos con SSA estéril y los MA fueron lisados con agua destilada estéril; inmediatamente después de cada lisis (a los 30 minutos y 3 horas) se tomaron, por duplicado, alícuotas del sobrenadante de cada pozo y se realizaron diluciones logaríft

micas de cada muestra en caldo nutritivo y se incubaron por un período de 24 horas, al término del cual se leyeron las muestras en un espectro fotómetro a 380 nm.

Las muestras evaluadas a los 30 minutos fueron tomadas como parámetro comparativo de fagocitosis bacteriana y las de 3 horas, como capacidad bactericida de los MA. Este mismo procedimiento se llevó a cabo para P. multocida.

OBTENCION DE CITOTOXINA DE P. HAEMOLYTICA Y P. MULTOCIDA: Se cultivaron en agar sangre P. haemolytica y P. multocida (por separado) 18 horas a 37 C, al término del período de incubación se agregó a cada caja de petri un tubo de 10 ml de BHI estéril y se agitaron suavemente; se tomó una alícuota de 1 ml de cada caja y se diluyeron en 15 ml de BHI. Los tubos se incubaron durante 4.5 horas a 37 C en movimiento constante (fase logarítmica de crecimiento); posteriormente se centrifugaron a 3000 G 20 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete de bacterias de cada tubo se resuspendió en 15 ml de medio RPMI-1640 con 7% de SFT sin antibióticos. Nuevamente se incubaron a 37 C por un período de una hora en movimiento constante (alta producción de citotoxina) los tubos fueron centrifugados a 3000 G durante 20 minutos y los sobrenadantes de cada tubo se esterilizaron por filtración en membranas de 0.22 μ (16).

SUSPENSION DE MACROFAGOS ALVEOLARES: Se realizaron lavados bronquio-alveolares hasta obtener un volumen mínimo de 150 ml de la solución de lavado, esta solución se recolectó en tubos de plástico de 200 ml, se centrifugaron a 500 G por 10 minutos en una centrífuga refrigerada. Se realizó el conteo directo de células en cámaras cuantaglobulos de Neubauer para posteriormente ajustar la concentración de células a 1×10^6 /ml en medio RPMI-1640 con SFT sin antibióticos.

SUSPENSION DE LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA DE BOVINO: Se recolectó un volumen aproximado de 40 ml de sangre heparinizada de bovinos clif

nicamente sanos por punción en la vena yugular con equipo vacutainer* . Los eritrocitos fueron destruidos por lisis hipotónica con agua destilada durante 15 segundos, la lisis fue detenida agregando un volumen similar, al de agua destilada, de SSA concentrada 2x; la suspensión fue centrifugada a 500 G durante 10 minutos, el sobrenadante se decantó y se repitió nuevamente la lisis hipotónica para obtener la población leucocitaria, se lavó una vez más por centrifugación con SSA. Se realizó el conteo directo de células y el paquete se resuspendió a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 sin antibióticos con 10% de SFT (16).

EVALUACION DE CITOTOXICIDAD DE P. HAEMOLYTICA Y P. MULTOCIDA: Se realizaron diluciones dobles del sobrenadante obtenido de P. haemolytica en medio RPMI-1640 sin antibióticos con SFT en placas de microtitulación de 96 pozos con fondo plano, en seguida se agregaron 50 μ l de SFT diluido 1:10, como suero control negativo a anticuerpos anticitotóxina, y se incubaron las placas durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, por separado, se adicionaron 100 μ l de las suspensiones de MA y leucocitos de sangre periférica a los pozos y se incubaron una hora a 37 C en una atmósfera con 2% de CO₂. Finalizado el período de incubación, las placas se centrifugaron a 200 G por 10 minutos, el sobrenadante se decantó por inversión rápida de la placa y se agregaron 100 μ l de formalina buferada al 10% a cada pozo y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó a cada pozo 150 μ l de cristal violeta al 1% durante 5 minutos, finalmente se lavaron las placas con agua de la llave; este mismo procedimiento se llevó a cabo para la evaluación de citotoxicidad de P. multocida. Un fondo azul en los pozos indicaba la presencia de células teñidas y por lo tanto la ausencia de citotoxicidad, por el contrario un fondo claro era indicio de citotoxicidad debido a la ausencia de células (16).

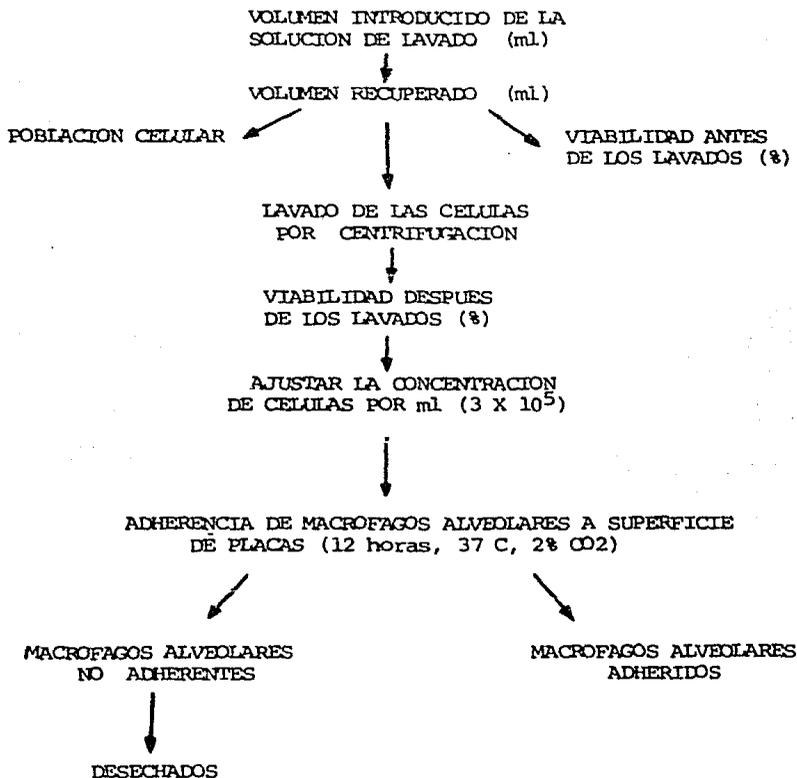
* (Lab. Becton-Dickinson México, S.A. de C.V.)

ANALISIS ESTADISTICO: Se realizaron 3 repeticiones para las evaluaciones de fagocitosis, efecto bactericida y citotoxicidad de P. haemolytica y P. multocida.

Para fagocitosis, se tomaron en cuenta como tratamientos las variables de suspensión bacteriana sola, como control positivo; suspensión bacteriana en contacto con macrófagos; y RPMI-1640 sólo como control negativo. Para efecto bactericida, el parámetro de fagocitosis de 30 minutos y el de 3 horas, de capacidad bactericida. En tanto para citotoxicidad los parámetros de comparación eran las bacterias entre sí y las diferentes células blanco.

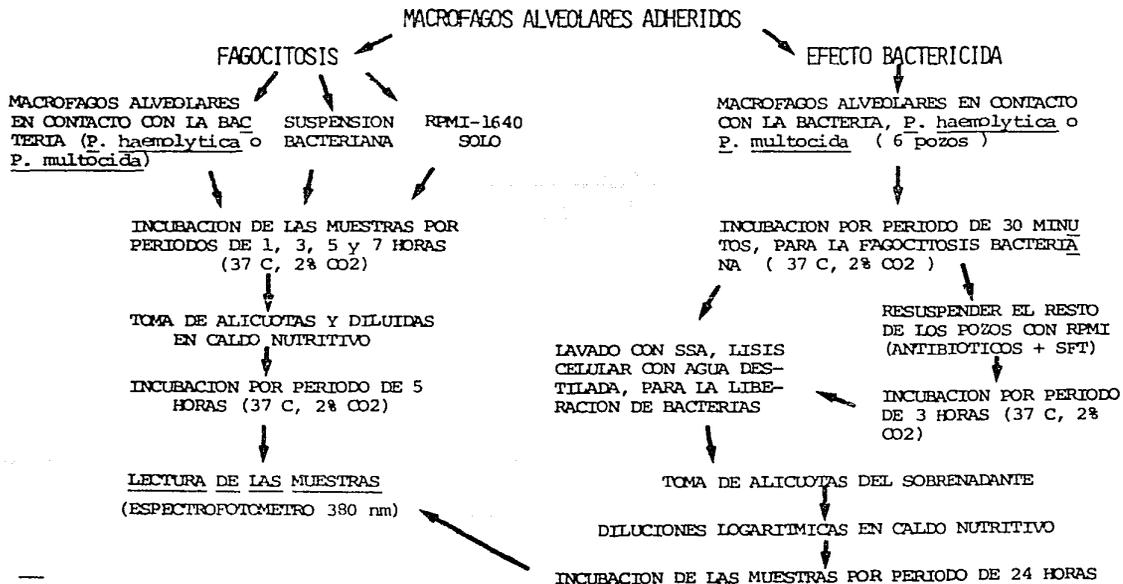
La comparación de medias para fagocitosis se realizó por análisis de varianza. Para efecto bactericida y citotoxicidad, en las diferentes células blanco, se utilizó la prueba de T de Student. Un valor de $p < 0.05$ se consideró como significativo.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA RECOLECCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES DE BOVINO*



* Modificado de Morales (1985)

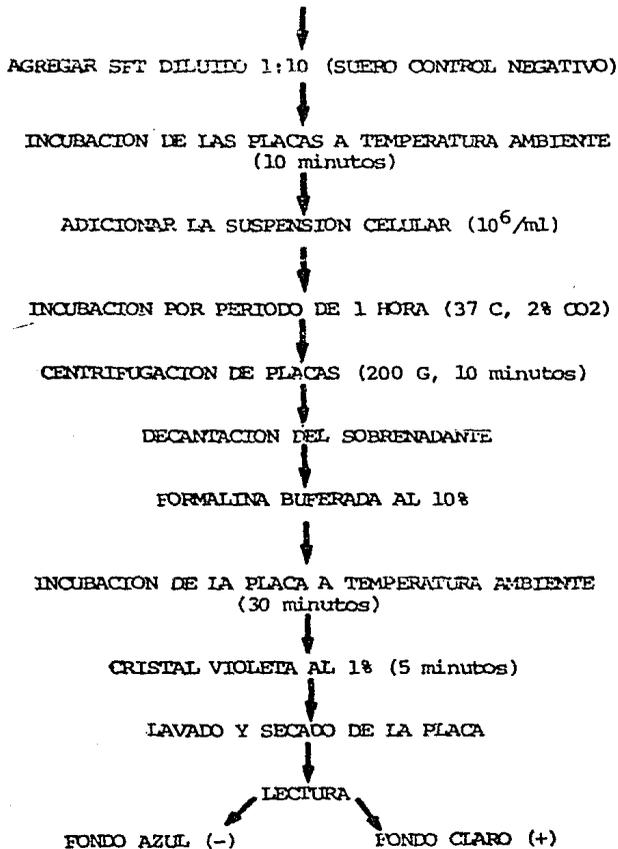
DIAGRAMA DE FLUJO PARA FAGOCITOSIS Y EFECTO BACTERICIDA*



* Modificado de Trigo (1984)

DIAGRAMA DE FLUJO PARA CITOTOXICIDAD*

DILUCIONES DOBLES DE LOS SOBRENADANTES DE *P. haemolytica* o *P. multocida*, CON RPMI-1640 (SIN ANTIBIOTICOS CON SFT) EN PLACAS DE MICROTITULACION



* Modificado de Gentry (1985)

RESULTADOS:

Durante el tiempo en que los animales fueron utilizados para la realización de los lavados bronquioalveolares no hubo evidencia clínica de alteraciones de tipo respiratorio.

Se realizaron un total de 17 lavados bronquioalveolares para llevar a cabo la evaluación de fagocitosis, efecto bactericida y citotoxicidad. Se recolectó un promedio del $81.57 \pm 7.32\%$ de la solución de lavado introducida, con $20.95 \pm 11.13 \times 10^4$ células por mililitro con una viabilidad del $80.29 \pm 9.18\%$, la cual disminuyó después de los lavados celulares a $76.29 \pm 9.18\%$ (Cuadro 1).

Al graficar los resultados de fagocitosis, se observó un comportamiento similar en todas las evaluaciones realizadas tanto para P. haemolytica como para P. multocida, donde la curva de crecimiento bacteriano fue mayor al encontrarse las bacterias solas que en contacto con MA (Cuadros 2 y 3; Figuras 1 y 2). Al realizar el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas entre las 3 variables evaluadas ($p < 0.05$). Cabe hacer mención que el crecimiento bacteriano, evaluado por espectrofotometría, mostró fases similares a la del crecimiento logarítmico y estacionario (ver controles positivos de crecimiento bacteriano).

Se considera que el efecto bactericida fue eficiente para P. haemolytica y P. multocida, ya que los datos registrados a las 3 horas de incubación de bacterias con MA fueron menores que los de 30 minutos, de lo que se puede interpretar, que el número de bacterias viables fue menor después del período de incubación con macrófagos, en comparación con el número de bacterias fagocitadas a los 30 minutos; encontrándose diferencias estadísticamente significativas para estas variables ($p < 0.05$) (Cuadros 4 y 5; Figuras 3 y 4).

En los resultados de citotoxicidad (Cuadro 6), se observa en primera instancia que P. multocida no tuvo efecto citotóxico para ninguna de las "células blanco" evaluadas. En tanto que P. haemolytica

si produjo un efecto citotóxico sobre MA y leucocitos de sangre periférica, siendo más evidente la citotoxicidad para los leucocitos (título 1:16) que para los macrófagos (título 1:4).

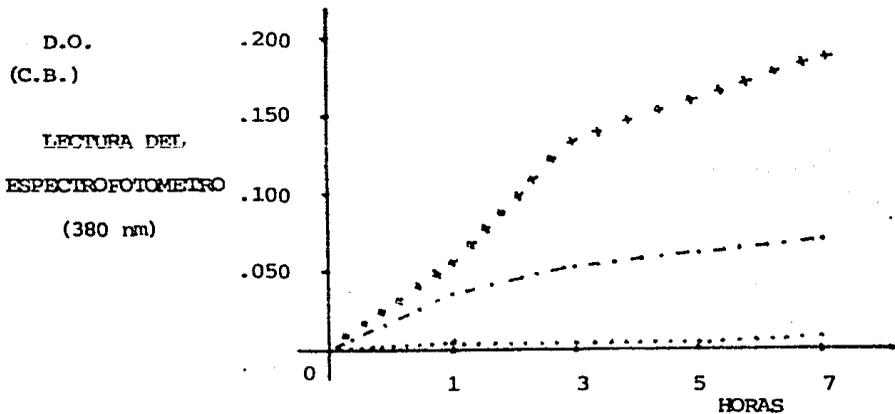
CUADRO 1
LAVADOS BRONQUIALVEOLARES EN BOVINOS PARA LA OBTENCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES

NO. DE LAVADO	VOLUMEN INTRODUCIDO (ml)	VOLUMEN RECUPERADO (%)	VIABILIDAD ANTES DE LOS LAVADOS CELULARES (%)	VIABILIDAD DESPUES DE LOS LAVADOS CELULARES (%)	NO. DE CELULAS POR ml X 10 ⁴
1	120	87.5	84	80	6.2
2	200	90	81	77	9.5
3	150	83.3	80	76	12.2
4	200	81.5	84	80	51.2
5	160	88.1	81	77	36.2
6	200	90.5	51	47	17.7
7	160	93.7	87	83	45
8	140	80	70	66	18
9	160	84.3	82	78	32
10	140	81.4	76	72	13.2
11	160	67.5	96	92	18
12	160	78.1	78	74	7.7
13	140	75	80	76	15
14	125	80	84	80	23.2
15	140	82.1	75	71	21.7
16	160	71.2	82	78	11.5
17	160	72.5	94	90	18
\bar{X}	157.3	81.5	80.2	76.2	20.9
DS	± 38.9	± 7.3	± 9.1	± 9.1	± 11.1

CUADRO 2
VALORES PROMEDIO DE DENSIDAD OPTICA (CONCENTRACION BACTERIANA) EN
LA EVALUACION DE FAGOCITOSIS DE P. HAEMOLYTICA

HORAS	REMI-1640	<u>P. haemolytica</u> + MA	<u>P. haemolytica</u> SOLA
1	0.003	0.035	0.055
3	0.003	0.053	0.133
5	0.003	0.061	0.160
7	0.007	0.070	0.187

FIGURA 1
EVALUACION ESPECTROFOTOMETRICA DE FAGOCITOSIS DE P. HAEMOLYTICA



- REMI-1640 (CONTROL (-) DE CRECIMIENTO BACTERIANO)
- - - - - MA + P. haemolytica
- + + + + + P. haemolytica (CONTROL (+) DE CRECIMIENTO BACTERIANO)

D.O. DENSIDAD OPTICA
C.B. CONCENTRACION BACTERIANA

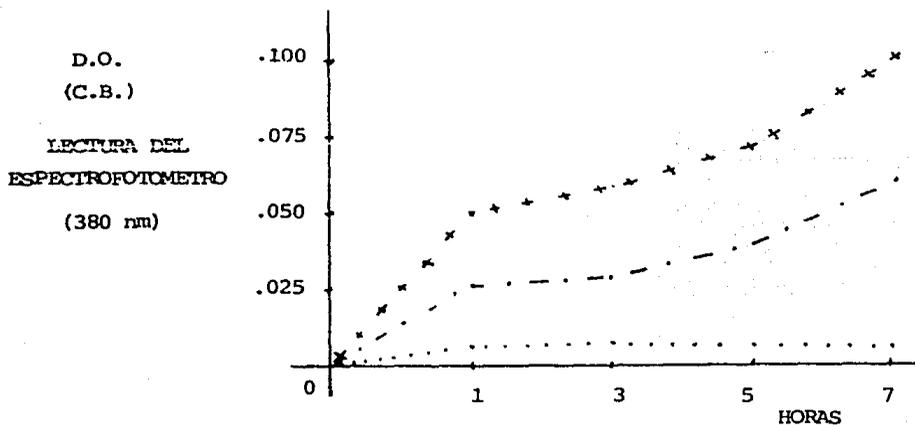
CUADRO 3

VALORES PROMEDIO DE DENSIDAD OPTICA (CONCENTRACIÓN BACTERIANA) EN LA EVALUACION DE FAGOCITOSIS DE P. MULTOCIDA

HORAS	RPMI-1640	<u>P. multocida</u> + MA	<u>P. multocida</u> SOLA
1	0.006	0.026	0.050
3	0.007	0.028	0.059
5	0.006	0.039	0.072
7	0.006	0.059	0.101

FIGURA 2

EVALUACION ESPECTROFOTOMETRICA DE FAGOCITOSIS DE P. MULTOCIDA



..... RPMI-1640 (CONTROL (-) DE CRECIMIENTO BACTERIANO)
- - - - - MA + P. multocida
* * * * * P. multocida (CONTROL (+) DE CRECIMIENTO BACTERIANO)

D.O. DENSIDAD OPTICA
C.B. CONCENTRACION BACTERIANA

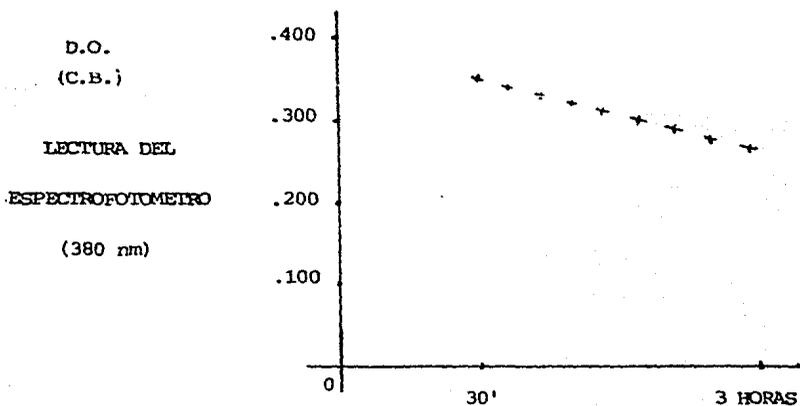
CUADRO 4

VALORES PROMEDIO DE DENSIDAD OPTICA (CONCENTRACION BACTERIANA) EN LA EVALUACION DE EFECTO BACTERICIDA DE *P. HAEMOLYTICA*

	30 MINUTOS	3 HORAS
D.O.	0.344	0.258

FIGURA 3

EVALUACION ESPECTROFOTOMETRICA DE EFECTO BACTERICIDA DE *P. HAEMOLYTICA*



D.O. DENSIDAD OPTICA
C.B. CONCENTRACION BACTERIANA

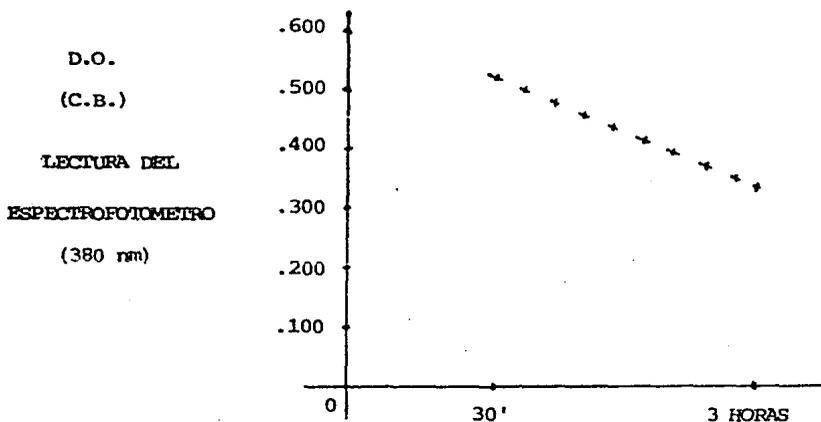
CUADRO 5

VALORES PROMEDIO DE DENSIDAD OPTICA (CONCENTRACION BACTERIANA) EN LA EVALUACION DE EFECTO BACTERICIDA DE P. MULTOCIDA

	30 MINUTOS	3 HORAS
D.O.	0.515	0.338

FIGURA 4

EVALUACION ESPECTROFOTOMETRICA DE EFECTO BACTERICIDA DE P. MULTOCIDA



D.O. DENSIDAD OPTICA

C.B. CONCENTRACION BACTERIANA

CUADRO 6

EVALUACION DE CITOTOXICIDAD DE P. HAEMOLYTICA Y P. MULTOCIDA
SOBRE MACROFAGOS ALVEOLARES Y LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA
DE BOVINO.

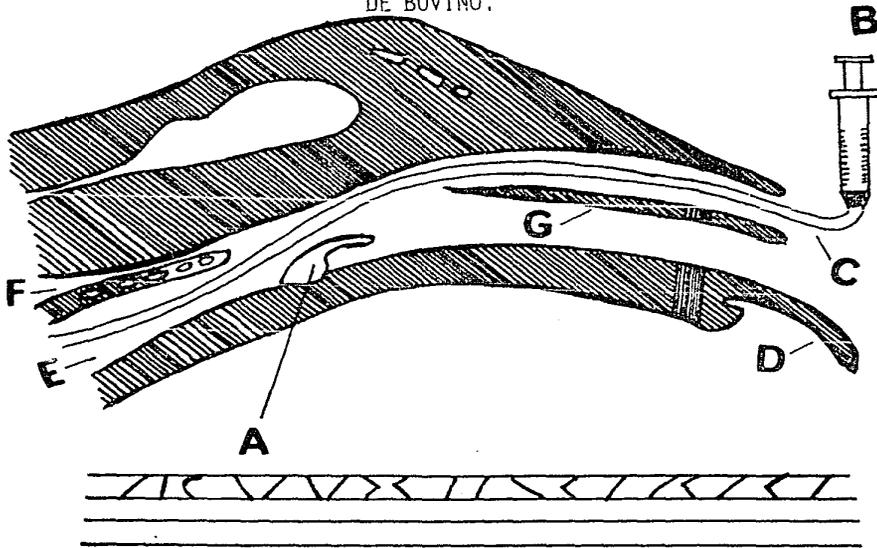
EVALUACION	1	2	3	4
A	-	-	1:16	1:4
B	-	-	1:16	1:4
C	-	-	1:16	1:4

- 1.- SOBRENADANTE DE P. multocida CON MA*
- 2.- SOBRENADANTE DE P. multocida CON LSP**
- 3.- SOBRENADANTE DE P. haemolytica CON LSP
- 4.- SOBRENADANTE DE P. haemolytica CON MA

* MA : MACROFAGOS ALVEOLARES

** LSP: LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFERICA

FIGURA 5
LAVADO BRONQUIOALVEOLAR PARA LA RECOLECCION DE MACROFAGOS ALVEOLARES
DE BOVINO.



A, EPIGLOTIS; B, JERINGA; C, SONDA ENDOTRAQUEAL; D, LENGUA; E, TRAQUEA;
F, ESOFAGO; G, PALADAR.

DISCUSION:

El volumen recuperado de la solución de lavado fue menor al obtenido por otros autores en diversas especies. Por ejemplo en el cerdo fue del 98%, ratas 94.5% y en el hamster y cuye del 88%. Esto fue debido principalmente a que estos investigadores realizaron los lavados bronquioalveolares en pulmones de animales muertos (21). En animales vivos, se han obtenido porcentajes de volumen recuperado similares a los observados en el presente trabajo. En bovinos se han obtenido porcentajes promedio del 70% (21, 38) y 70% (40) y en ovinos del 60% (25). Se sabe que el volumen residual no recuperado causa alteraciones poco significativas en el tejido pulmonar, las cuales desaparecen en un lapso de 48 horas aproximadamente (19, 27).

El número total de células recuperadas por mililitro también fue menor al descrito para animales muertos (15, 26) y similar al obtenido para animales vivos (38). Sin embargo, se considera que el número de células y la viabilidad fueron suficientes para realizar la evaluación de las células.

El uso del tranquilizante y el anestésico local fue con el fin de facilitar al máximo la realización de los lavados bronquioalveolares, así como para reducir en lo posible el estrés y el manejo excesivo de los animales.

Los datos registrados al evaluar la actividad fagocítica y bactericida del MA ejercida durante la fase de crecimiento estacionario de P. haemolytica y P. multocida fueron semejantes a los descritos por otros autores (7, 22, 23, 40). Esto se pudo comprobar ya que en cada uno de los períodos de incubación se observó que el crecimiento de P. haemolytica y P. multocida fue menor cuando estaban en contacto con los macrófagos que cuando se encontraban solas en el medio de cultivo. No obstante el haber variaciones en la técnica utilizada por estos autores, por ejemplo Markham et al utilizó P. haemolytica marcada con ^{125}I , sus resultados demuestran que los niveles óptimos de fagocitosis y efecto bactericida registrados se obtienen en cultivos bacterianos de

12-18 horas. Esto es debido a que en estos cultivos no se encuentra presente o está en mínimas cantidades el material citotóxico, producto del metabolismo de P. haemolytica, el cual es el responsable de ocasionar un deterioro de la capacidad fagocítica del macrófago además de producirle alteraciones en sus características morfológicas.

Se puede considerar que la fagocitosis fue eficiente al utilizar la relación aproximada bacteria-macrófago de 5:1; esto está de acuerdo a lo descrito por otros autores (22, 38), quienes obtuvieron resultados óptimos en relaciones 10:1 o menores. Otros factores que pueden contribuir a la eficiencia de la fagocitosis son la adición de suero fetal; la opsonización de bacterias y la fase de crecimiento en que se encuentre la bacteria a evaluar (22, 23, 40).

Se considera que el efecto bactericida fue eficiente, ya que estudios de microscopía electrónica han revelado que después de un período de 30 minutos es posible encontrar, dentro de los fagosomas del macrófago, bacterias en diferentes estados de degradación, siendo la condensación del material citoplásmico, la presencia de abundantes restos celulares y fragmentos de pared celular las alteraciones más comúnmente encontradas, llevándose a cabo la completa degradación bacteriana a los 60 minutos de exposición. No obstante, ha sido posible encontrar algunas bacterias sin presentar ningún tipo de alteración después de este período (22).

A pesar de ser una técnica visual simple, fue posible demostrar la mayor citotoxicidad para los leucocitos de sangre periférica que para los MA, lo que se puede traducir en que si bien la citotoxina de P. haemolytica tiene un efecto importante sobre macrófagos, estos a su vez tienen cierto grado de resistencia para la citotoxina; por lo tanto, el desarrollo de la enfermedad respiratoria puede depender de la proliferación bacteriana en el aparato respiratorio o bien de la cantidad de citotoxina producida.

La ausencia de citotoxicidad de P. multocida para leucocitos es de acuerdo a lo reportado para esta bacteria, ya que en la actualidad sólo se conoce que P. multocida produce una toxina de tipo necrotóxico (2, 8). Lo anterior puede relacionarse a la capacidad que tie

ne P. haemolytica, a diferencia de P. multocida, para actuar como agente primario asociado a problemas neumónicos donde la citotoxina al parecer desempeña un papel importante.

En el presente trabajo fue posible evaluar las principales funciones del MA en bovinos mediante el desarrollo de una técnica que no precisa de material o equipo especializado y tiene la ventaja que es posible llevarlo a cabo en el animal vivo sin ocasionarle efectos colaterales al efectuarle el lavado bronquioalveolar para la obtención de las células pulmonares y su caracterización in vitro.

La técnica utilizada para el presente trabajo es relativamente sencilla y rápida no obstante el haber sido aplicada en animales tranquilizados, siendo mínimo el manejo a que fueron sometidos. Se pueden llevar a cabo varios lavados en un mismo animal sin que el volumen residual presente en el pulmón afecte su funcionalidad. El empleo de una sonda endotraqueal con punta roma fue con el objeto de lesionar al mínimo el tejido pulmonar, pudiendo comprobarse posteriormente al no presentar los animales signología clínica de neumonía.

Con el desarrollo de esta técnica para la obtención de MA, es posible llevar a cabo diversos estudios morfofisiológicos de las poblaciones celulares del pulmón en las diferentes etapas de la vida del animal, así mismo es posible utilizar otras variables como lo son, el uso de bacterias opsonizadas, evaluar la interacción virus-bacteria-macrófago o medir su comportamiento frente a agentes involucrados en problemas neumónicos de los animales.

LITERATURA CITADA:

- 1.- Aguilar, F., Jaramillo, L., Trigo, F.J., 1985. Serotipos de Pasteurella haemolytica aislados a partir de pulmones neumónicos de bovinos. Memoria de la Reunión de Investigación Pecuaria en México, 73.
- 2.- Ames, T.R., Markham, R.J.F., Opuda-Asibo, J., Leininger, J.R. and Maheswaran, S.K., 1985. Pulmonary response to intratracheal challenge with Pasteurella haemolytica and Pasteurella multocida. Can. J. Comp. Med., 49: 395-400.
- 3.- Argueta, G.J., 1986. Frecuencia de Pasteurella haemolytica en la cavidad nasal de corderos y ovinos adultos. Tesis de Licenciatura. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.
- 4.- Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Benrick, W.J., Maheswaran, S.K., 1981. Interaction of Pasteurella haemolytica with bovine neutrophils: Identification and partial characterization of a cytotoxin. Am. J. Vet. Res., 42: 1920-1926.
- 5.- Baughn, R.E., Bonventre, P.F., 1975. Phagocytosis and intracellular killing of Staphylococcus aureus by normal mouse peritoneal macrophages. Infect. Immun., 12: 346-352.
- 6.- Benjamin, M.M., 1974. Outline of Veterinary Clinical Pathology. 2nd ed., The Iowa State University Press. Iowa, U.S.A., 43-50.
- 7.- Berggren, K.A., Baluyut, C.S., Simonson, R.R., Benrick, W.J., Maheswaran, S.K., 1981. Cytotoxic effects of Pasteurella haemolytica on bovine neutrophils. Am. J. Vet. Res., 42: 1383-1388.
- 8.- Carter, G.R. and Conner, G.H., 1974. Serologic study of bovine strains of Pasteurella multocida. Am. J. Vet. Res., 35: 111-114.
- 9.- Confer, A.W. and Simons, K.R., 1986. Effects of Pasteurella haemolytica lipopolysaccharide on selected functions of bovine leukocytes. Am. J. Vet. Res., 47: 154-157.
- 10.- Corsvet, R.E., Runnige, J.A., Homer, J.T., 1982. Recovery of pulmonary alveolar macrophages from non-anesthetized calves.

- Am. J. Vet. Res., 43: 2253-2254.
- 11.- Cosío, I.V., Celis, A.S., Cosío, M.P., 1974. Aparato Respiratorio. 8ª ed., Interamericana, México, D.F., 31-40, 169-185.
 - 12.- Dellman, H.D. and Brown, E.M., 1976. Textbook of Veterinary Histology. 1st ed., Lea and Febiger. Philadelphia, U.S.A.
 - 13.- Dubelco, D., Ginsberg, E.W., 1979. Tratado de Microbiología. 2ª ed., Salvat, Barcelona (España), 807, 820-822.
 - 14.- Dyer, R.M., Liggitt, H.D., Leid, W.R., 1983. Isolation and partial characterization of equine alveolar macrophages. Am. J. Vet. Res.
 - 15.- Fox, M.L., 1973. The bovine alveolar macrophage. 1. Isolation, in vitro cultivation, ultrastructure and phagocytosis. Can. J. Microbiol., 19: 1207-1210.
 - 16.- Gentry, J.M., Confer, W.A. and Kreps, A.J., 1985. Simple visual assay for determination of Pasteurella haemolytica cytotoxin neutralizing antibody titers in cattle sera. J. Clin. Microbiol., 22: 968-972.
 - 17.- Glynn, H.F. and Wessman, G.E., 1978. Rapid plate agglutination procedure for serotyping Pasteurella haemolytica. J. Clin. Microbiol., 7: 142-145.
 - 18.- Himmel, M.E., Yates, M.D., Lauerman, L.H., 1982. Purification and partial characterization of a macrophage cytotoxin from Pasteurella haemolytica. Am. J. Vet. Res., 43: 764-767.
 - 19.- Huber, G.L., Edmunds, H., Finley, T.N., 1971. Effect of experimental saline lavage on pulmonary mechanics and morphology. Am. Rev. Respir. Dis., 104: 337.
 - 20.- Jaramillo, M.L., Aguilar, R.F., Trigo, T.F., 1986. Distribución de tipos de Pasteurella multocida en neumonías de becerros. Memoria de la Reunión de Investigación Pecuaria en México, 71.
 - 21.- López, A., Yong, S., Sharma, A. and Bailey, D., 1986. Effect of sex, age, number of bronchoalveolar lavages and quantitation methods on the bronchoalveolar cell counts in rats. Can. J. Vet. Res., 50: 101-105.

- 22.- Maheswaran, S.K., Berggren, K.A., Simonson, R.R., Ward, G.E. and Muscoplat, C.C., 1980. Kinetics of interaction and fate of Pasteurella haemolytica in bovine alveolar macrophages. Infect. Immun., 30: 254-262.
- 23.- Markham, R.J.F. and Wilkie, B.N., 1980. Interaction between Pasteurella haemolytica and bovine alveolar macrophages: Cytotoxic effect on macrophages and impaired phagocytosis. Am. J. Vet. Res., 41: 18-22.
- 24.- Mishell, B.B. and Stanley, M.S., 1980. Selected methods in cellular immunology. 1st ed., W.H. Freeman and Co., San Francisco, U.S.A., 219-224.
- 25.- Morales, A.J.F., 1985. Obtención ante mortem de macrófagos alveolares de borregos y su parcial caracterización in vitro. Tesis de Licenciatura. F.E.S. Cuautitlan. Universidad Nacional Autónoma de México, D.F.
- 26.- Moolenbeek, C., 1982. Obtaining alveolar macrophages from small laboratory rodents. Lab. Anim., 16: 56-58.
- 27.- Muggenburg, B.A., Mauderly, J.L., Plckerell, J.A., 1972. Pathophysiologic sequelae of bronchopulmonary lavage in the dog. Am. Rev. Respir. Dis., 166: 219.
- 28.- Pijoan, A.P., Tórtora, P.J.L., 1986. Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. F.E.S. Cuautitlan. Universidad Nacional Autónoma de México. 1ª ed. México, D.F., 3, 4.
- 29.- Rinaldini, L.M., 1959. A improved method for the isolation and quantitative cultivation of embryonic cells. Exp. Cell. Res., 16: 477-505.
- 30.- Sánchez-Mejorada, P.H., Zepeda, M. de O.O., Morales, A.F., et al, 1986. Presencia de anticuerpos anticapsula y anticitotóxica de Pasteurella haemolytica en suero de bovinos. Memoria de la Reunión de Investigación Pecuaria en México, 69.
- 31.- Shewen, E.P. and Wilkie, B.N., 1982. Cytotoxin of Pasteurella haemolytica acting on bovine leukocytes. Infect. Immun., 35: 91-94.

- 32.- Shewen, E.P. and Wilkie, B.N., 1983. Pasteurella haemolytica cytotoxin: Production by recognized serotypes and neutralization by type-specific rabbit antisera. Am. J. Vet. Res., 44: 715-719.
- 33.- Shewen, E.P. and Wilkie, B.N., 1985. Evidence for the Pasteurella haemolytica cytotoxin as a product of actively growing bacteria. Am. J. Vet. Res., 46: 1212-1214.
- 34.- Sutherland, A.D. and Redmond, J., 1986. Cytotoxin from an ovine strain of Pasteurella haemolytica: Characterization studies and partial purification. Vet. Microbiol., 11: 337-347.
- 35.- Sutherland, A.D., Donachie, W., 1986. Cytotoxic effect of serotypes of Pasteurella haemolytica on sheep bronchoalveolar macrophages. Vet. Microbiol., 11: 331.
- 36.- Sutherland, A.D., Gray, E. and Wells, P.W., 1983. Cytotoxic effect of Pasteurella haemolytica on ovine bronchoalveolar macrophages in vitro. Vet. Microbiol., 8: 3-15.
- 37.- Tizard, I.R., 1979. Inmunología Veterinaria. 1^a ed., Interamericana, México, D.F., 10-18.
- 38.- Trigo, T.E., 1984. Bovine pulmonary alveolar macrophages. Ante mortem recovery and in vitro evaluation of bacterial phagocytosis and killing. Tesis de Maestría. Washington State University. College of Veterinary Medicine. U.S.A.
- 39.- Větvička, V., Fornusek, L., Jolub, M., Zídková, J. and Kopeček, J., 1984. Macrophages of athymic nude mice: Fc receptors, C receptors, phagocytic and pinocytic activities. Eur. J. Cell. Biol., 35: 35-40.
- 40.- Walker, R.D., Schultz, T.W., Hopkins, F.M. and Bryant, M.J., 1984. Growth phase-dependent phagocytosis of Pasteurella haemolytica by bovine pulmonary macrophages. Am. J. Vet. Res., 45: 1230-1234.
- 41.- Wei, C., Misra, H.P., 1982. Cytotoxicity of ammonium metavanadate to cultured bovine alveolar macrophages. J. Tox. Environ. Health., 9: 995-1006.

- 42.- Wilkie, B.N., Markham, R.J.F., 1981. Bronchoalveolar washing cells and immunoglobulins of clinically normal calves. Am. J. Vet. Res., 42: 241-243.