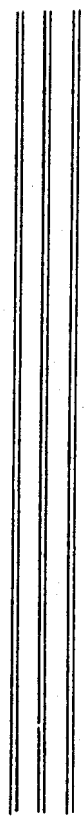


241237



**REMOCION TRAQUEAL DE STAPHYLOCOCCUS
AUREUS Y PASTEURELLA HAEMOLYTICA EN
RATON.**

Tesis presentada ante la
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
de la
Universidad Nacional Autónoma de México
para la obtención del título de
MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA
por
LUZ MARIA RODRIGUEZ LOPEZ



1984

Asesor

M.V.Z. MSc. PhD. Alfonso López Mayagoitia



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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

Página

I	RESUMEN.....	1
II	INTRODUCCION.....	2
	1. Mecanismos de defensa.....	3
	2. Deposición y remoción de bacterias.....	7
III	MATERIAL Y METODOS	
	1. Animales.....	9
	2. Preparación del inóculo.....	9
	3. Inoculación.....	11
	4. Sacrificio y obtención de muestras.....	11
	5. Diseño experimental.....	16
IV	RESULTADOS.....	18
V	DISCUSION.....	32
VI	LITERATURA CITADA.....	36

I RESUMEN

RODRIGUEZ LOPEZ LUZ MARIA: Remoción traqueal de Staphylococcus aureus y Pasteurella haemolytica en ratón.

Asesor: Alfonso López Mayagoitia

Se determinaron las curvas de remoción traqueal de Staphylococcus aureus y Pasteurella haemolytica administradas por vía de aerosol. 144 ratones separados en dos réplicas se inocularon con S. aureus y el mismo número en dos réplicas con P. haemolytica y finalmente un grupo testigo de 72 animales fué inoculado con solución amortiguadora de fosfatos con pH de 7.2. Los ratones fueron sacrificados 0,2,4,8,12,24 y 48 horas después de la inoculación por aerosol y a partir de las traqueas y pulmones se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC). Los resultados indicaron que las traqueas tuvieron una menor deposición de bacterias a las cero horas comparadas con los pulmones. Se encontró una diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$) en el número de bacterias a través de las diferentes horas postinoculación. No hubo efecto significativo ($p > 0.05$) entre bacterias y réplicas. El número de bacterias por órgano tuvo una correlación negativa con respecto al tiempo. El análisis estadístico mostró un efecto significativo en las diferencias de UFC cuando se utilizó la transformación logarítmica. Finalmente las curvas de remoción para P. haemolytica tuvieron un patrón de remoción más rápido pero más errático que para S. aureus.

II INTRODUCCION

Las enfermedades respiratorias, principalmente las infecciosas son una de las causas importantes de morbilidad y mortalidad en los animales domésticos (5,28). Se ha estudiado la patogénesis de las enfermedades respiratorias como un esfuerzo para entender los mecanismos básicos de la interacción bacteria-pulmón, permitiéndose el desarrollo de métodos inmunoprophilácticos en infecciones respiratorias. La mayor parte del conocimiento actual sobre patogenia de neumonías bacterianas en animales domésticos se ha extrapolado de resultados obtenidos con animales de laboratorio (36).

Una de las técnicas más utilizadas en el estudio de la respuesta del pulmón a la inhalación de bacterias es la técnica de remoción bacteriana, que ha permitido estudiar el destino de numerosos géneros bacterianos en el pulmón de diversas especies animales (22,23). Existen investigaciones realizadas con el objeto de estudiar la respuesta de la tráquea y bronquios a la deposición de partículas inhaladas; la mayoría de estas se han enfocado al depósito y eliminación de partículas no viables; habiéndosele dado poca importancia a la interacción bacteria-mucosa traqueobronquial. El objetivo de esta investigación es determinar las curvas de remoción bacteriana en la traquea de ratones expuestos a aerosoles de Staphylococcus aureus y Pasteurella haemolytica.

II.1 Mecanismos de defensa

El aparato respiratorio está constantemente expuesto a partículas que se encuentran suspendidas en el aire, muchas son potencialmente patógenas para el pulmón. El volumen de aire que inhala diariamente una persona es equivalente al volumen de una alberca de tamaño mediano (8000 litros) (12,34, 37), por otro lado se sabe que una muestra de aire aparentemente limpio contiene suspendidas hasta 105 partículas por centímetro cúbico (tres millones de partículas por pie cúbico). Una muestra de aire contaminado llega a contener hasta 3531 partículas por centímetro cúbico (100 millones de partículas por pie cúbico) (34). La deposición de bacterias en pulmones de becerros en una hora puede ser hasta de 5000 UFC (19).

Se sabe que la superficie del pulmón que está en contacto con el aire inspirado es equivalente a la superficie de una cancha de tenis por lo que la membrana respiratoria está críticamente expuesta a entrar en contacto con partículas potencialmente patógenas (41). Otra fuente demostrable de partículas, especialmente bacterias que constantemente llegan al pulmón son los organismos que forman parte de la flora normal del aparato respiratorio, en estudios en becerros se demostró que el aire traqueal contiene los mismos tipos de organismos existentes en la flora bacteriana del aparato respiratorio superior (13).

Las regiones de la mucosa respiratoria donde se depositan las partículas inhaladas han sido estudiadas en detalle en animales de laboratorio y en menor grado en animales domésti-

cos y el hombre (12,27,31,36,41). Las partículas suspendidas en el aire inhalado con un tamaño mayor a 10 μm son prácticamente detenidas en la cavidad nasal. Partículas menores de 10 μm pero mayores de tres son depositadas en la mucosa traqueobronquial, partículas de aproximadamente 2 μm o menos de diámetro penetran hasta el alveolo pulmonar(36,12). Existen otros factores que gobiernan también el lugar del tracto respiratorio donde se depositan las partículas inhaladas. La fuerza centrífuga que se genera cuando el aire inhalado cambia súbitamente de dirección en los cornetes (35) y en la bifurcación traqueobronquial forma turbulencias de aire lo que da como resultado que las partículas suspendidas se impacten contra la mucosa respiratoria. Otro mecanismo importante que gobierna la disposición de partículas es la fuerza gravitacional, que ocasiona el depósito en el alveolo de las partículas mayores (12). Aquellas partículas de 1 μm o menos que llegan al alveolo y que por su masa pequeña no son afectadas por las fuerzas gravitacionales, se depositan en la membrana a través del llamado movimiento Browniano, en éstas, el choque con las moléculas del aire les imprime velocidad llegando hasta las paredes alveolares (12).

La principal vía de contagio por patógenos del aparato respiratorio es la aerógena, en otras palabras, los agentes capaces de establecer infecciones son generalmente en forma de aerosol inhalados y depositados en la membrana respiratoria (36).

Los aerosoles son suspensiones de partículas coloidales que permanecen estables en aire por períodos de tiempo relativamente largos (27). Son creados por condensación, disper-

sión o atomización de un material líquido en partículas (36). El término "núcleo de gotita" se aplica a gotas parcialmente evaporadas que permanecen suspendidas en el aire (36,2,9).

El hombre ha manipulado el uso de los aerosoles para la investigación biomédica y principalmente para el estudio de la patogénesis de las infecciones respiratorias. Se puede exponer a animales a la inhalación de numerosos tipos de partículas incluyendo bacterias (11,21,22,23,25,26). Su exposición permite inocular animales por la vía respiratoria con una concentración conocida de organismos durante un tiempo controlado. La técnica de remoción bacteriana in vivo, permite medir la remoción de bacterias inhaladas en los pulmones de los animales. Se calcula como índice entre las bacterias depositadas a las cero horas post-inoculación por aerosoles y el número de bacterias que permanecen viables en el pulmón después de intervalos conocidos de tiempo. La diferencia de estas dos observaciones constituye el número de bacterias eliminadas del pulmón. Stillman en 1923 expuso ratones a un aerosol de neumococos y observó que el número de estos organismos en el pulmón disminuía con el paso del tiempo. Cralley en 1942 sometió conejos a la inhalación de aerosoles conteniendo Serratia marcescens y encontró que tres horas después de la inoculación el 90% de las bacterias habían sido eliminadas del pulmón. Posteriormente Laurenzi (21) estudió la remoción pulmonar de S. aureus en ratones, sus resultados eran similares a los anteriores. A partir de estas investigaciones se han estudiado detalladamente los patrones

de remoción en diversas especies incluyendo becerros y utilizando una gran variedad de géneros y especies bacterianas (36, 38). Se observó que aunque los patrones de remoción de diferentes bacterias son similares, cada bacteria tiene una curva de eliminación específica: por ejemplo Pseudomonas aeruginosa presenta en las primeras horas post-inoculación un pico de crecimiento bacteriano diferente a S. aureus, P. haemolytica, P. pneumotropica, S. marcescens, E. coli y Proteus mirabilis. Sin embargo a las 12 horas el número de Pseudomonas aeruginosa en el pulmón fué similar al de otras bacterias. La suma de todos los trabajos permitió concluir que en condiciones normales el pulmón de los animales elimina rápida y predeciblemente la mayoría de las bacterias (12,15,21,23).

Una vez determinadas las curvas de remoción se estudió el efecto de numerosos factores sobre la eliminación de bacterias del pulmón, entre los factores más estudiados están los virus, uremia, edema pulmonar, contaminantes del medio ambiente e inmunización entre otros (1,4,8,17,18). Todos estos factores demostraron tener un efecto adverso en la remoción de bacterias inhaladas, por lo que el número de bacterias presentes en el pulmón aumentaba considerablemente en animales con infecciones virales concurrentes, uremia, edema pulmonar y contaminantes del medio ambiente lo que daba como resultado la muerte del animal.

La técnica de remoción bacteriana aunque permite determinar el número de bacterias viables en pulmón, no permite saber si las bacterias fueron destruidas in situ o transportadas fuera del pulmón por el aparato mucociliar. Jakab y

Green en 1972 inocularon ratones con un aerosol de S. aureus etiquetado con fósforo radiactivo (^{32}P) y observaron que el número de bacterias viables en el pulmón disminuía con mayor rapidez que la cuenta radioactiva de pulmón. Estos investigadores concluyeron que la remoción bacteriana se debe a un efecto bactericida local dentro del pulmón y no al transporte físico de las bacterias hacia los bronquios y traquea.

II.2 Deposición y remoción de bacterias en traquea y bronquios

El principal mecanismo de defensa de traquea y bronquios es el llamado aparato mucociliar o carpeta mucociliar. Las partículas inhaladas, depositadas y atrapadas en el moco traqueobronquial son eliminadas a través de un transporte físico unidireccional. Este transporte permite que las partículas sean eliminadas del aparato respiratorio superior. El aparato o carpeta mucociliar está formado por el tejido ciliar y secreción tanto de glándulas como de células caliciformes. El moco está dispuesto en dos capas, la más externa se encuentra en forma de gel y es más viscosa; mientras que la capa interna se encuentra en estado de sol y es por lo tanto más fluida (37).

El moco descansa sobre los cilios, los que producen un constante movimiento metacrónico, haciendo que las partículas depositadas y atrapadas sean desplazadas hacia la faringe para ser deglutidas (7,31,34,37).

La mayoría de las investigaciones que se han realizado para estudiar el depósito y remoción de partículas inhaladas en traquea y bronquios se han llevado a cabo utilizando princi-

palmente dos técnicas generales: una in vitro y otra in vivo.

En la técnica in vitro se ponen cultivos de traquea en medios y condiciones específicas de laboratorio y es conocida como técnica de explantes traqueales, con ella se ha estudiado el desplazamiento de partículas principalmente radioactivas y ha permitido concluir que la carpeta mucociliar es un mecanismo efectivo en la remoción de partículas inhaladas (6,10,19).

La segunda técnica se lleva a cabo in vivo utilizando métodos quirúrgicos. Anestesiado el animal, se inyecta o se abre la traquea depositando partículas de características físicas conocidas y midiendo el desplazamiento de éstas (3,7,20,32,40,39).

Aunque Giordano et al. encontraron una correlación significativa entre técnicas in vivo e in vitro. Otros autores han demostrado que el uso de anestésicos en la técnica in vivo deprime la función ciliar por lo que los resultados pueden ser dudosos (7). La mayoría de estos estudios de remoción traqueo-bronquial se han llevado a cabo utilizando partículas no viables y en muy pocos casos se ha estudiado la interacción aparato mucociliar-bacteria (30).

III MATERIAL Y METODOS

III. 1 Animales

Se utilizaron 360 ratones albinos cepa CFW de 30 g de peso aproximadamente. Los ratones fueron obtenidos del Bioterio de la Granja Veracruz de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Todos los animales se mantuvieron en observación y acondicionamiento durante dos o tres días. Fueron alimentados con alimento comercial sin antibióticos y agua ad libitum. Los 360 ratones se dividieron aleatoriamente en 5 grupos de 72 animales cada uno. Cada grupo se trabajó como réplica independiente. Dos grupos fueron inoculados con aerosol de Staphylococcus aureus (S. aureus), dos con Pasteurella haemolytica (P. haemolytica) y un grupo testigo fue inoculado sólo con aerosol de solución amortiguadora de fosfatos (SAF) con pH de 7.2 (Cuadro 1).

III. 2 Preparación del inóculo

El inóculo bacteriano se preparó con las cepas de S. aureus ATCC 29223 y de P. haemolytica (Biotipo A2) obtenidas del cepario del Departamento de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. A partir de una cepa liofilizada se sembró un cultivo en medio sólido en caja de Petri y se incubó durante 24 horas. Se usó Agar tripticasa soya¹ (ATS) para S. aureus y Gelosa sangre² (GS) para P. haemolytica. Cuatro a cinco colonias aisladas fueron sembradas en 25 ml de Caldo infusión de cerebro y corazón³ (CICC) contenidos en un matraz

1 Merck, D.R.F. Alemania, Div. México

2 ATS con 5% de sangre de bovino citratada

3 Difco Lab., Detroit, Michigan

de 50 ml. El cultivo se incubó durante 12 horas en agitación de 76 ciclos por minuto de temperatura de 37°C¹. De este cultivo se sembraron 20 ml en 200 ml de CICC contenidos en un matraz de 250 ml y se incubaron durante dos horas en las mismas condiciones de temperatura y agitación. Una vez pasadas las dos horas de cultivo el CICC se centrifugó a 17 700 g a una temperatura de 10°C durante 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el sedimento se lavó resuspendiéndolo en 100 ml de SAF. La suspensión de bacterias se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones de temperatura, velocidad y tiempo que el cultivo en CICC. El centrifugado se decantó otra vez y el paquete bacteriano se resuspendió en aproximadamente 6 ml de SAF. La suspensión bacteriana se ajustó por medio de un espectrofotómetro³ a una absorbancia de 1.2 y una longitud de onda (λ) de 620 nm. La concentración de bacterias en el inóculo se determinó mediante diluciones decimales hasta la dilución 10⁻⁷. Con una micropipeta⁴ se sembraron en medio sólido en caja de Petri tres gotas de 20 μ l de cada una de las diluciones. Después de 24 horas de incubación a 37°C se determinaron las unidades formadoras de colonias (UFC). El número de bacterias por mililitro del inóculo se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\frac{\text{No. de colonias} \times \text{factor de dilución}}{0.060 \text{ ml}} = \text{UFC/ml}$$

1 Forma Scientific, M. Ohio

2 Beckman Inst. Inc., Fullerton CA.

3 Bausch & Lomb

4 Brinkmann Instruments, Inc., Westbury, N.Y.

III.3 Inoculación

Tanto *S. aureus* como *P. haemolytica* se inocularon por aerosol durante 10 minutos. Se utilizó una cámara de plexiglass (29) sellada donde se introdujeron por separado los 72 ratones de cada una de las réplicas. Esta cámara contaba con tres nebulizadores¹ donde se repartieron y depositaron los 6 ml del inóculo bacteriano. El aerosol se generaba mediante el paso de aire a los nebulizadores a partir de una compresora² a una presión de 0.703 kilogramo por centímetro cuadrado. La circulación y distribución del aerosol se aseguraba por la acción de una bomba de vacío con un filtro para evitar la salida de bacterias al exterior de la cámara (figura 1). Inmediatamente después de la inoculación de los ratones se transportaron al laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM) (cuadro 2).

III.4 Sacrificio y obtención de muestras

Los animales se anestesiaron con una dosis de barbitúricos³ (7.877 mg/g de peso), se pesaron en una balanza digital⁴ y se colocaron en posición de decúbito supino, con los miembros en extensión fijados a una plancha de parafina. La piel de la región torácica y abdominal se desinfectó con un algodón conteniendo cloruro de benzalconio⁵. Con tijeras se abría la cavidad abdominal, se localizaba la arteria renal izquierda y se seccionaba causando una muerte por exanguinación. La cavidad abdominal se cerraba con pinzas, dejando una gasa dentro para evitar

1 DeVilbiss Co. Somerset, P.A., D.V. de México

2 Fabricantes de Equipos para Laboratorio e Industrias S.A., Jal., México

3 Anestésal, Lab. Norden de México, México

4 Ohaus Scale Corp., Florham Park, N.J.

5 Equipos Médico Quirúrgicos S.A., México

la salida de sangre. Para extraer la tráquea se abría la caja torácica mediante dos incisiones paracostales hasta exponer los pulmones. La tráquea se pinzaba y se separaba del esófago con un bisturí. Se hacía un corte inmediatamente por debajo de la laringe y otro a nivel de la bifurcación traqueal, depositándose la tráquea en una caja de Petri estéril. Para la determinación del número de bacterias, se maceraron las tráqueas en grupos de tres en tubos maceradores¹ conteniendo 2 ml de SAF utilizando un rotor eléctrico². A partir del macerado (dilución 10°) se realizaron diluciones decimales hasta 10⁻³. Cada una de las diluciones se sembraron depositando 10 gotas de 20 µl en medio sólido en caja de Petri y después de secadas las gotas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Mediante el número de colonias contables en las diferentes diluciones se calculó el número de bacterias en tráquea usando la siguiente fórmula:

$$\text{No. de bacterias por tráquea} = \frac{\text{No. de colonias} \times 2 \text{ ml} \times \text{factor de dilución}}{0.2} \div 3$$

Donde:

- No. de bacterias por tráquea = Número de S. aureus y P. haemolytica depositadas en tráquea en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación
- No. de colonias = Número de UFC presentes en las 10 gotas, a una dilución contable
- 2 = Número de mililitros de solución amortiguadora de fosfatos adicionados al tubo donde se maceraron las tráqueas
- factor de dilución = Factor de dilución al que se realizó la cuenta de UFC
- 0.2 = Volumen de mililitros sembrados en la caja de Petri (10 gotas de 0.020 ml)
- 3 = Número de tráqueas contenidas en cada tubo macerador

1 Pyrex, Corning Glass Works, C.N.Y.
2 Caframo, Ontario, Canadá

Una vez sacada la tráquea los pulmones se extraían y depositaban en una caja de Petri estéril; utilizando un bisturí se separaban los pulmones de los bronquios principales y se depositaban dentro de un macerador en grupos de 3 pulmones. Se agregaban 10 ml de SAF y se maceraban y sembraban de manera idéntica a la descrita para las tráqueas. El número de bacterias por pulmón se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{No. de bacterias por pulmón} = \frac{\text{No. de colonias} \times 10 \text{ ml} \times \text{factor de dilución}}{0.2} \div 3$$

Donde:

No. de bacterias por pulmón = Número de *S. aureus* y *P. haemolytica* depositadas en pulmón en los diferentes intervalos de tiempo postinoculación.

No. de colonias = Número de UFC presentes en las 10 gotas, a una dilución contable.

10 = Número de mililitros de solución amortiguadora de fosfatos adicionados al tubo donde se maceraron los pulmones.

factor de dilución = Factor de dilución al que se realizó la cuenta de UFC.

0.2 = Volumen de mililitros sembrados en la caja de Petri (10 gotas de 0.020 ml)

3 = Número de pulmones contenidos en cada tubo macerador

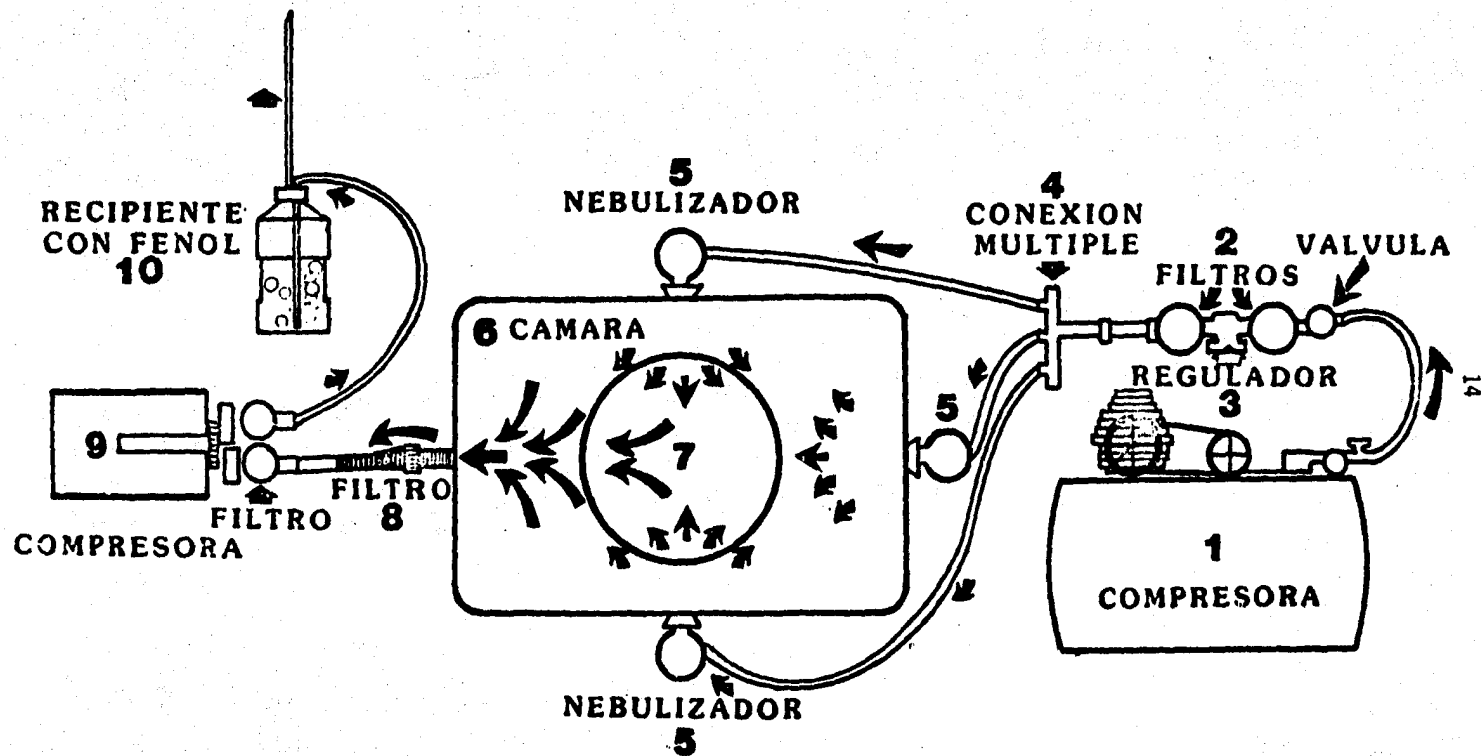


Figura 1. Aparato de inoculación por aerosol *(Diagrama de flujo de aire)

*Aparato diseñado por J Martínez Burnes (29)

CUADRO 1. NUMERO DE REPLICAS Y DE RATONES UTILIZADOS EN LOS DIFERENTES INTERVALOS POSTINOCULACION

Tratamiento	Rep*	No. de ratones y tiempo de sacrificio (horas)							
		0	2	4	8	12	24	48	72
<u>S. aureus</u>	1	9	9	9	9	9	9	9	9
<u>S. aureus</u>	2	9	9	9	9	9	9	9	9
								total = 144	
<u>P. haemolytica</u>	1	9	9	9	9	9	9	9	9
<u>P. haemolytica</u>	2	9	9	9	9	9	9	9	9
								total = 144	
Control	1	9	9	9	9	9	9	9	9
								total = 72	
								gran total = 360	

* Rep = réplica

CUADRO 2. CONCENTRACION DEL INOCULO, VOLUMEN INOCULADO Y TIEMPOS DE INOCULACION EN LOS RATONES EXPUESTOS A AEROSOLES DE S. aureus O P. haemolytica

Tratamiento	Réplica	Concentración del inóculo	Mililitros inoculados	Tiempo de inoculación
<u>S. aureus</u>	1	1.45×10^9	6	10 min
<u>S. aureus</u>	2	5.00×10^8	6	10 min
<u>P. haemolytica</u>	1	3.83×10^9	6	10 min
<u>P. haemolytica</u>	2	3.50×10^9	6	10 min
SAF	control	0	6	10 min

III.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

Para este estudio se utilizaron 360 ratones formándose 120 unidades experimentales. Cada unidad constaba de 3 tráqueas y los valores obtenidos se compararon estadísticamente con los obtenidos de los pulmones que formaron parte de una investigación colateral pero independiente de esta tesis. De acuerdo al tratamiento se formaron tres grupos (P. haemolytica, S. aureus y testigo). Los grupos inoculados con bacterias contaron con dos réplicas experimentales cada uno, mientras que el grupo testigo sólo tuvo una réplica (cuadro 1)

Las siguientes hipótesis nulas fueron probadas:

Efecto principal:	Hipótesis nulas:
Bacteria	<u>P. haemolytica</u> = <u>S. aureus</u>
Organo	Tráquea = Pulmón
Tiempo	Hora 0 = 2 = 4 = 8 = 12 = 24 = 48
Réplica	Réplica 1 = Réplica 2

La variable número de bacterias por tráquea y pulmón se analizaron bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ijkl} = \dots + B_i + R_j + H_k + O_l + BR_{ij} + BH_{ik} + BO_{il} + E_{ijkl}$$

Donde:

μ = media general

B = efecto de la i-ésima bacteria

R = efecto de la j-ésima réplica

H = efecto de la h-ésima hora

O = efecto del l-ésimo órgano

BR = interacción entre la i-ésima bacteria y la j-ésima réplica

BH = interacción entre la i-ésima bacteria y la k-ésima hora

- BO = interacción entre la i-ésima bacteria y la k-ésima hora
E = error aleatorio NI (0, σ^2e).

El análisis estadístico¹ se realizó utilizando la transformación logarítmica base 10 (\log_{10}) de la variable número de bacterias.

IV RESULTADOS

El número de S. aureus depositados en la traquea inmediatamente después de la inoculación por aerosol fué considerablemente menor al número de bacterias depositadas en el pulmón (cuadro 3). En el caso de P. haemolytica también hubo una menor deposición de bacterias a las cero horas en la traquea comparada con el pulmón, sin embargo esta diferencia fué menor que en el caso de S. aureus (cuadro 4). No se observaron diferencias significativas $p > 0.05$ entre el número de UFC de S. aureus y P. haemolytica en las traqueas a través de las diferentes horas o entre las diferentes réplicas, sin embargo hubo una diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$) en el número de UFC entre la hora cero y las demás horas postinoculación. La transformación logarítmica del número de UFC mostró diferencias entre la hora cero, 2 y 4 y 24, 12 y 48 (cuadro 5).

En los ratones expuestos al aerosol con P. haemolytica se observó una diferencia significativa ($p < 0.0001$) en el número de UFC presentes en la traquea comparada con el pulmón (cuadro 4). No hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) entre las réplicas cuando se analizó el número de UFC, pero sí ($p > 0.04$) cuando se utilizó la transformación logarítmica (cuadro 5).

En los animales expuestos al aerosol con S. aureus también existió una diferencia significativa ($p < 0.0002$) en el número de UFC presentes en la traquea comparada con el pulmón (cuadro 5). No hubo efecto de réplica utilizando los valores de UFC pero sí hubo ($p < 0.0001$) cuando se usó la transformación logarítmica de las UFC.

La retención de bacterias tomada como índice no mostró diferencias significativas entre réplicas o entre bacterias sin embargo

la transformación logarítmica si mostró diferencias significativas ($p < 0.009$) entre S. aureus y P. haemolytica. Se encontró una diferencia altamente significativa ($p < 0.0001$) entre los valores de retención bacteriana en los diferentes tiempos postinoculación (cuadros 7,8,9,10 y figuras 2,3).

Los efectos de la interacción réplica-órgano, réplica-hora y órgano-hora para el número de UFC e índices de retención (INRET) se muestran en el cuadro 12. Así mismo las correlaciones entre hora y UFC y entre hora y retención para cada bacteria están resumidos en el cuadro 11.

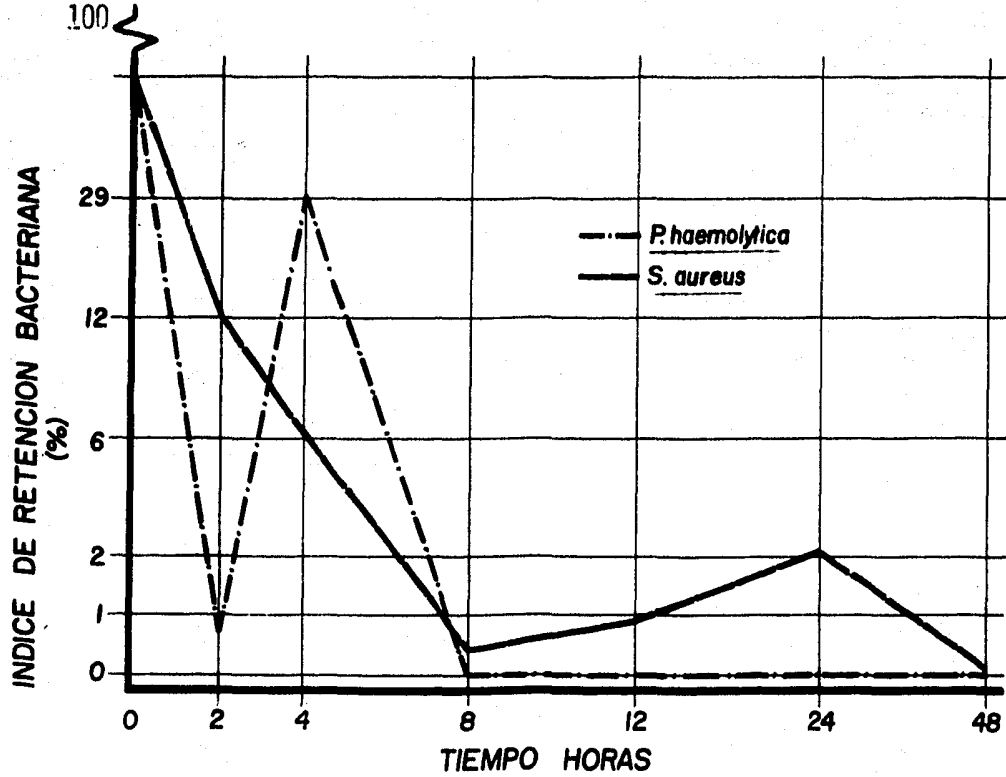


Fig.2. Índice de retención bacteriana de la tráquea (INRET) en ratones inoculados con aerosoles de *P. haemolytica* o de *S. aureus*

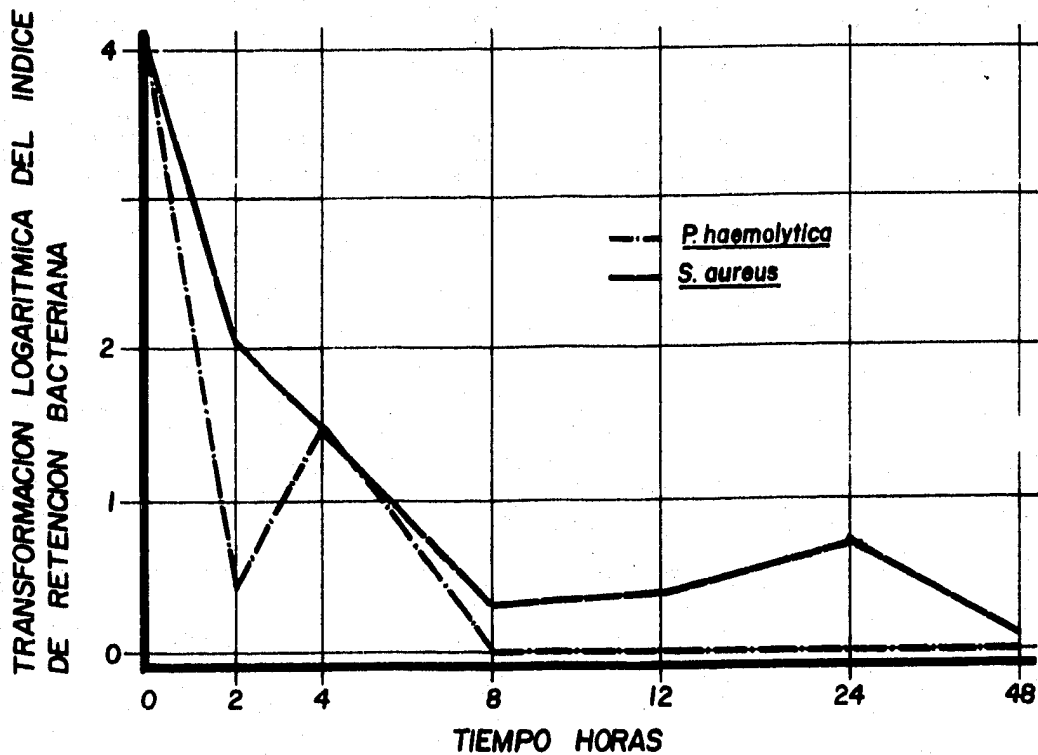


Fig. 3 Transformación logarítmica del índice de retención bacteriana de la tráquea (INRETLOG) en ratones inoculados con aerosoles de *P. haemolytica* y *S. aureus*.

CUADRO 3 . UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN TRAQUEAS Y PULMONES EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO.

Réplica	Hora	U F C (\bar{X} ± D.E.)	
		Tráquea	Pulmón
1	00	$1.753 \times 10^4 \pm 1.964 \times 10^4$	$1.340 \times 10^6 \pm 1.047 \times 10^6$
	02	$3.933 \times 10^3 \pm 4.061 \times 10^3$	$4.956 \times 10^5 \pm 1.721 \times 10^5$
	04	$2.000 \times 10^3 \pm 2.291 \times 10^3$	$1.820 \times 10^5 \pm 1.326 \times 10^5$
	08	0.000 0.000	$5.416 \times 10^4 \pm 1.977 \times 10^4$
	12	$6.333 \times 10^1 \pm 1.096 \times 10^2$	$1.466 \times 10^4 \pm 7.059 \times 10^3$
	24	$2.000 \times 10^1 \pm 1.000 \times 10^1$	$1.500 \times 10^3 \pm 7.566 \times 10^2$
	48	$1.000 \times 10^1 \pm 1.732 \times 10^1$	$2.833 \times 10^2 \pm 1.527 \times 10^2$
2	00	$1.004 \times 10^5 \pm 6.581 \times 10^3$	$7.283 \times 10^5 \pm 3.666 \times 10^5$
	02	$3.400 \times 10^3 \pm 1.385 \times 10^3$	$3.416 \times 10^5 \pm 2.199 \times 10^5$
	04	$2.323 \times 10^3 \pm 1.612 \times 10^3$	$1.325 \times 10^5 \pm 4.023 \times 10^4$
	08	$9.600 \times 10^2 \pm 3.260 \times 10^2$	$2.533 \times 10^4 \pm 3.685 \times 10^3$
	12	$1.456 \times 10^3 \pm 2.300 \times 10^3$	$7.783 \times 10^3 \pm 3.295 \times 10^3$
	24	$4.603 \times 10^3 \pm 4.009 \times 10^3$	$3.116 \times 10^4 \pm 2.171 \times 10^4$
	48	$1.623 \times 10^2 \pm 1.859 \times 10^2$	$1.633 \times 10^4 \pm 1.899 \times 10^4$

CUADRO 4 . UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA EN TRAQUEAS Y PULMONES EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO.

Réplica	Hora	U F C ($\bar{X} \pm D.E.$)			
		Tráquea		Pulmón	
1	00	$1.446 \times 10^5 \pm 1.183 \times 10^5$		$4.716 \times 10^5 \pm 3.015 \times 10^5$	
	02	$1.300 \times 10^2 \pm 1.014 \times 10^2$		$1.628 \times 10^5 \pm 1.387 \times 10^5$	
	04	$1.700 \times 10^3 \pm 2.857 \times 10^3$		$4.316 \times 10^4 \pm 1.909 \times 10^4$	
	08	0.000	0.000	$4.166 \times 10^3 \pm 5.923 \times 10^3$	
	12	0.000	0.000	$7.290 \times 10^2 \pm 4.160 \times 10^2$	
	24	0.000	0.000	0.000	0.000
	48	0.000	0.000	0.000	0.000
2	00	$1.216 \times 10^4 \pm 3.547 \times 10^3$		$2.966 \times 10^5 \pm 2.081 \times 10^4$	
	02	$1.666 \times 10^2 \pm 1.761 \times 10^2$		$1.783 \times 10^5 \pm 7.637 \times 10^3$	
	04	$7.110 \times 10^3 \pm 1.177 \times 10^4$		$1.333 \times 10^5 \pm 2.886 \times 10^4$	
	08	0.000	0.000	0.000	0.000
	12	0.000	0.000	0.000	0.000
	24	0.000	0.000	0.000	0.000
	48	0.000	0.000	0.000	0.000

CUADRO 5 . UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS LOGARITMICAS (UFCLOG) PRESENTES EN TRAQUEAS Y PULMONES DE LOS RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Réplica	Hora	UFCLOG ($\bar{X} \pm D.E.$)	
		Tráquea	Pulmón
1	00	9.2969 \pm 1.2152	13.9220 \pm 0.7180
	02	7.9173 \pm 1.0216	13.0680 \pm 0.3816
	04	5.2419 \pm 4.5727	11.9503 \pm 0.6710
	08	0.0 0.0	10.8467 \pm 0.4162
	12	1.7507 \pm 3.0324	9.5025 \pm 0.5432
	24	2.9588 \pm 0.5233	7.1988 \pm 0.6304
	48	1.1446 \pm 1.9826	5.5514 \pm 0.5475
2	00	11.5155 \pm 0.0644	13.4216 \pm 0.4664
	02	8.0815 \pm 0.3774	12.6161 \pm 0.5932
	04	7.4420 \pm 1.1157	11.7592 \pm 0.3352
	08	6.8285 \pm 0.3462	10.1331 \pm 0.1414
	12	5.6169 \pm 2.6409	8.9008 \pm 0.4190
	24	7.8573 \pm 1.6134	10.1715 \pm 0.7407
	48	4.6591 \pm 1.1084	9.0460 \pm 1.5536

CUADRO 6 . UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS LOGARITMICAS (UFCLOG) PRESENTES EN TRAQUEAS Y PULMONES DE LOS RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA.

Réplica	Hora	UFCLOG ($\bar{X} \pm D.E.$)	
		Tráquea	Pulmón
1	00	11.1751 \pm 1.8947	12.9353 \pm 0.6088
	02	4.6359 \pm 0.8879	11.5509 \pm 1.3573
	04	5.4472 \pm 2.6662	10.6076 \pm 0.4419
	08	0.0 0.0	7.4770 \pm 1.6210
	12	0.0 0.0	6.4259 \pm 0.7805
	24	0.0 0.0	0.0 0.0
	48	0.0 0.0	0.0 0.0
2	00	9.3785 \pm 0.2887	12.5988 \pm 0.0692
	02	4.7632 \pm 1.0013	12.0908 \pm 0.0431
	04	6.5901 \pm 3.2562	11.7832 \pm 0.2340
	08	0.0 0.0	0.0 0.0
	12	0.0 0.0	0.0 0.0
	24	0.0 0.0	0.0 0.0
	48	0.0 0.0	0.0 0.0

CUADRO 7 . INDICES DE RETENCION BACTERIANA (INRET) EN TRAQUEAS Y PULMONES EN LOS ANIMALES INOCULADOS CON STAPHYLOCOCCUS AUREUS EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO.

Réplica	Hora	Tráquea	Pulmón
		%	%
1	00	100.0000	100.0000
	02	22.4334	36.9900
	04	11.4068	13.5821
	08	0.0000	4.0422
	12	0.3612	1.0945
	24	0.1140	0.1119
	48	0.0570	0.0211
	2	00	100.0000
02		3.3864	46.9108
04		2.3140	18.1922
08		0.9561	3.4782
12		1.4508	1.0686
24		4.5849	4.2791
48		0.1616	2.2425

CUADRO 8 . INDICES DE RETENCION BACTERIANA (INRET) EN TRAQUEAS Y PULMONES EN LOS ANIMALES INOCULADOS CON PASTEURELLA HAEMOLYTICA EN LOS DIFERENTES INTERVALOS DE TIEMPO.

Réplica	Hora	Tráquea	Pulmón
		%	%
1	00	100.0000	100.0000
	02	0.0898	34.5230
	04	1.1751	9.1519
	08	0.0000	0.8833
	12	0.0000	0.1545
	24	0.0000	0.0000
	48	0.0000	0.0000
2	00	100.0000	100.0000
	02	1.3698	60.1124
	04	58.4383	44.9438
	08	0.0000	0.0000
	12	0.0000	0.0000
	24	0.0000	0.0000
	48	0.0000	0.0000

CUADRO 9 . INDICES DE RETENCION LOGARITMICA (INRETLOG) PRESENTES EN TRAQUEAS Y PULMONES DE LOS RATONES INOCULADOS CON AEROSOLES DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS.

Réplica	Hora	INRETLOG ($\bar{X} \pm D.E.$)	
		Tráquea	Pulmón
1	00	4.1538 \pm 1.1945	4.433 \pm 0.711
	02	2.8303 \pm 0.9652	3.5943 \pm 0.3701
	04	1.8468 \pm 1.6796	2.5404 \pm 0.6240
	08	0.0 0.0	1.5853 \pm 0.3219
	12	0.2447 \pm 0.4238	0.7171 \pm 0.2607
	24	0.1071 \pm 0.0512	0.1052 \pm 0.0513
	48	0.0526 \pm 0.0911	0.0208 \pm 0.0111
2	00	4.6137 \pm 0.0637	4.5397 \pm 0.4619
	02	1.4481 \pm 0.2946	3.7491 \pm 0.5808
	04	1.0901 \pm 0.6125	2.9232 \pm 0.3154
	08	0.6618 \pm 0.1658	1.4951 \pm 0.1104
	12	0.6206 \pm 0.8777	0.7113 \pm 0.2142
	24	1.4560 \pm 0.9901	1.5549 \pm 0.5742
	48	0.1418 \pm 0.1533	0.9558 \pm 0.8133

CUADRO 10. INDICES DE RETENCION LOGARITMICA (INRETLOG) PRESENTES EN TRAQUEAS Y PULMONES DE LOS RATONES INOCULADOS CON AEROSOLE DE PASTEURELLA HAEMOLYTICA.

Réplica	Hora	INRETLOG ($\bar{X} \pm D.E.$)	
		Tráquea	Pulmón
1	00	3.9579 \pm 1.8027	4.4890 \pm 0.6024
	02	0.0846 \pm 0.0638	3.1700 \pm 1.2611
	04	0.5207 \pm 0.8431	2.2651 \pm 0.3959
	08	0.0 0.0	0.4988 \pm 0.6120
	12	0.0 0.0	0.1417 \pm 0.0781
	24	0.0 0.0	0.0 0.0
	48	0.0 0.0	0.0 0.0
2	00	4.5877 \pm 0.2858	4.6135 \pm 0.0685
	02	0.7506 \pm 0.5599	4.1121 \pm 0.0424
	04	2.3810 \pm 2.5154	3.8108 \pm 0.2285
	08	0.0 0.0	0.0 0.0
	12	0.0 0.0	0.0 0.0
	24	0.0 0.0	0.0 0.0
	48	0.0 0.0	0.0 0.0

CUADRO 11. CORRELACION ENTRE HORAS Y UFC, UFCLOG, INRET E INRETLOG

Bacteria	Organo	UFC	UFCLOG	INRET	INRETLOG
<i>P. haemolytica</i>	pulmón	-0.481**	-0.749**	-0.517**	-0.656**
<i>P. haemolytica</i>	tráquea	-0.229**	-0.596**	-0.335**	-0.428**
<i>S. aureus</i>	pulmón	-0.422**	-0.796**	-0.455**	-0.703**
<i>S. aureus</i>	tráquea	-0.303**	-0.460**	-0.342**	-0.537**

** p < 0.01

CUADRO 12. SIGNIFICANCIA DE LAS INTERACCIONES REPLICA-ORGANO, REPLICA-HORA Y ORGANO-HORA EN LAS VARIABLES UFC, UFCLOG, INRET E INRETLOG.

Bacteria	Variable	Interacción(*)		
		Réplica*Organo	Réplica*Hora	Organo*Hora
<u>P. haemolytica</u>	UFC	0.7899	0.0137	0.0001
<u>P. haemolytica</u>	UFCLOG	0.0058	0.0001	0.0001
<u>P. haemolytica</u>	INRET	0.9826	0.2834	0.2657
<u>P. haemolytica</u>	INRETLOG	0.5580	0.0076	0.0001
<u>S. aureus</u>	UFC	0.1849	0.7171	0.0001
<u>S. aureus</u>	UFCLOG	0.0001	0.0094	0.0344
<u>S. aureus</u>	INRET	0.6206	1.0000	0.8433
<u>S. aureus</u>	INRETLOG	0.2705	0.0135	0.0138

V DISCUSION

El número de S. aureus depositado en las tráqueas y los pulmones resultó ser inversamente proporcional al número de bacterias presentes en el inóculo, estos resultados paradójicos son consistentes con los encontrados por Laurenzi et al. en 1964 (21). Estos investigadores encontraron que a mayor concentración de S. aureus en el inóculo menor deposición de esta bacteria ocurría después de la inoculación por aerosol. Observaciones similares han sido descritas también por López en 1981 (24) y por Martínez en 1984 (29), sin embargo estos últimos investigadores lo reportaron con P. haemolytica y esta bacteria no demostró un comportamiento similar en la presente investigación. Es muy probable que estas diferencias en resultados se deban principalmente al número reducido de réplicas que se utilizaron.

A la fecha no se ha esclarecido completamente el por qué existe una correlación negativa entre dosis del inóculo y deposición en los pulmones. Laurenzi et al. en 1964 (21) sugieren que una alta concentración de bacterias en un volumen determinado predispone a la formación de aglomerados bacterianos. Estos aglomerados por su mayor tamaño son retenidos en la cavidad nasal y no alcanzan a penetrar hasta la tráquea y pulmón. Lillie y Thomson en 1972 (23) también sugieren que la tendencia de las bacterias a aglomerarse está dada por las características de su cápsula. Finalmente Martínez en 1984 (29) sugiere que la correlación negativa se debe a que el número de UFC no refleja con precisión el número de bacterias presentes en el pulmón a la hora cero. El número de bacterias depositadas en el pulmón fue considerablemente mayor al depositado en la tráquea, esto es probablemente debido a la mayor

superficie de contacto que presenta el pulmón en comparación con la tráquea (12). Otra posible explicación podría ser el pequeño tamaño de las partículas generadas por el aparato de aerosol que no haya permitido su deposición en tráquea pero sí en bronquios, bronquiolos y alvéolos (35).

No se observaron efectos de réplica significativos a pesar de haberse utilizado dosis iniciales de bacterias ligeramente diferentes, por lo que se sugiere que este modelo experimental de inoculación es bastante confiable. Esta confiabilidad ha sido también reportada para el mismo aparato por Martínez et al. en 1984 (29) y por López et al. en 1982 (26).

Debido a que no existen experimentos similares no es posible comparar con otros estudios los patrones de remoción de S. aureus y P. haemolytica encontrados en la tráquea. Sin embargo es claro que los índices de remoción bacteriana traqueal difieren considerablemente de los observados en los pulmones de los mismos animales o de los descritos en otras investigaciones (16,21,23).

La remoción traqueal de P. haemolytica fue mucho más rápida que la remoción de S. aureus. Es difícil explicar esta diferencia tan marcada presente en la tráquea pero no en el pulmón. Pijoan et al. (33) sugieren la presencia de sustancias bactericidas en el moco traqueal y no se puede descartar la posibilidad de que esta sustancia tenga mucho mayor efecto en S. aureus que en P. haemolytica. Tampoco se puede descartar la posibilidad de que algunas o todas las P. haemolytica presentes en la tráquea se hayan originado del pulmón y transportado posteriormente hacia la tráquea a través del movimiento producido por la carpeta mucociliar. Esta última idea es poco probable ya que investigaciones realizadas con bacterias radioactivas indican que éstas son destruidas in situ en el

pulmón (12).

Finalmente la diferencia entre la remoción traqueal de S. aureus y P. haemolytica pudo deberse simplemente a variaciones específicas presentes entre diferentes bacterias; estas variaciones han sido bien documentadas en la remoción pulmonar por lo que se considera que cada bacteria y en algunas ocasiones diferentes cepas de la misma bacteria tienen sus patrones de remoción característicos (15,23,36).

La transformación logarítmica de las UFC mostró un efecto favorable en el análisis de varianza. Estos resultados son consistentes con los observados por López en 1982 (26) y Martínez en 1984 (29). Este efecto favorable se debe de acuerdo a Holt (14) a una reducción en las variaciones de los valores encontrados dentro de los grupos produciéndose así una distribución con tendencia normal de los valores. Este investigador también sugiere que la transformación logarítmica produce una independencia entre la media y la varianza produciéndose así una aditividad de los efectos. Este efecto favorable de la transformación logarítmica hace mucho más fuertes las correlaciones entre horas postinoculación y número de bacterias en tráquea y pulmón.

Una vez ya establecidos los valores normales de remoción bacteriana traqueal, sería de gran interés en futuras investigaciones estudiar el efecto de infecciones virales concurrentes. Sobre todo comparar si la interacción virus-bacteria se comporta en la tráquea en forma parecida a la descrita por Jakab (16) y Green (12) en el pulmón.

Sería interesante también investigar si la lesión traqueo-bronquial inducida por virus respiratorios predispone a una mayor deposición de bacterias en forma similar a la reportada in vitro en cultivos celulares.

Como conclusiones del presente trabajo podemos mencionar:

- 1.- Las traqueas mostraron menor deposición de bacterias que los pulmones, como consecuencia de su menor area de exposición y del tamaño menor de las partículas inoculadas.
- 2.- No hubo efectos de réplica significativos en el análisis estadístico, lo que apoya la confiabilidad del modelo experimental utilizado.
- 3.- La remoción traqueal de P. haemolytica fué más rápida que la de S. aureus.

LITERATURA CITADA

1. Dannenberg, A.M.: Influence of environmental factors on the respiratory tract. J. Reticuloendothel. Soc., 22:273-290 (1977).
2. First, M.W.: Aerosols in nature. Arch. Intern. Med., 131:24-32 (1973).
3. Foster, W.M., Langenback, E. and Bergofsky, E.H.: Measurement of tracheal and bronchial mucus velocities in man: relation to lung clearance. J. Appl. Physiol., 48:965-971 (1980).
4. Gilka, F., Thomson, R.G. and Savan, M.: The effect of edema, hidrocortisone acetate, current viral infection and immunization on the clearance of *Pasteurella haemolytica* from the bovine lung. Can. J. Comp. Med., 38:251-259 (1974).
5. Gillespie, J.H. and Timoney, J.F.: Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. 4a ed. en español. Editorial La Prensa Médica Mexicana, S.A., México, 1983.
6. Giordano, A. and Holsclaw, D.S.: Tracheal resection and mucociliary clearance. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., 85:631- 639 (1976).
7. Giordano, A.Jr., Shih, C.K., Holsclaw, D.S.Jr., Khan, M.A. and Litt, M.: Mucus clearance: in vivo canine tracheal vs. in vitro bull frog palate studies. J. Appl. Physiol., 42:761-766 (1977).
8. Goldstein, E. and Green, G.M.: Inhibition of pulmonary bacterial clearance during acute renal failure. Antimicrob. Ag. Chemother., 22-25 (1965).
9. Goodlow, J.G. and Leonard, F.A.: Viability and infectivity of microorganisms in experimental airborne infection. Bact. Rev., 25: 182-187 (1961).
10. Gore, D.J. and Patrick, G.: The distribution and clearance of inhaled UO₂ particles on the first bifurcation and trachea of rats. Phys. Med. Biol., 23: 730-737 (1978).

11. Green,G.M.: Patterns of bacterial clearance in murine influenza. Antimicrob. Ag. and Chemother., 26-29 (1965).
12. Green,G.M., Jakab,G.J., Low,R.B. and Davis,G.S.: Defense mechanisms on the respiratory membrane. Am. Rev. Respir. Dis., 115:479-514 (1977).
13. Grey,C.L. and Thomson,R.G.: Pasteurella haemolytica in the tracheal air of calves. Can. J. Comp. Med., 35: 121-128 (1971).
14. Holt,J., Lumsden,J.H. and Mullen, K.: On transforming biological data to Gaussian form. Can. J. Comp. Med., 44:43-51 (1980).
15. Jackson,A.E., Southern,P.M., Pierce,A.K., Fallis,B.D. and Sandford,J.P.: Pulmonary clearance of Gram-negative bacilli. J. Lab. Clin. Med., 69: 833-841 (1967).
16. Jakab,G.J.: Mechanisms of virus induced bacterial superinfections of the lung. Clin. Chest. Med., 2:59-66 (1981).
17. Jakab,G.J. and Dick,E.C.: Synergistic effect in viral-bacterial infection: combined infection of the murine respiratory tract with Sendai virus and Pasteurella pneumotropica. Infect. Imm., 8:762-768 (1973).
18. Jakab,G.J. and Green,G.M.: Immune enhancement of pulmonary bactericidal activity in murine virus pneumonia. J. Clin. Invest., 52:2878-2884 (1973).
19. Jones,C.D.R.: Mucociliary clearance from the calf lung. Can. J. Comp. Med., 47:265-269 (1983).
20. King,M., Phillips,D.M., Gross,D., Vartian,V., Chang,H.G. and Zidulka,A.: Enhanced tracheal mucus clearance with high frequency chest wall compression. Am. Rev. Respir. Dis., 128:511-515 (1983).
21. Laurenzi,G.A., Berman,L., First,M. and Kass,E.H.: A quantitative study of the deposition and clearance of bacteria in the murine lung. J. Clin. Inv., 43:759-768 (1964).

22. Laurenzi, G.A., Guarneri, J.J., Endriga, R.B. and Carey, J.P.: Clearance of Bacteria by the lower respiratory tract. Science, 142:1572-1573 (1963).
23. Lillie, L.E. and Thomson, R.G.: The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice. Can. J. Comp. Med., 36:129-137 (1972).
24. López, A.: The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica and the bronchioalveolar cell morphology in calves infected with BVD virus or Mycoplasma bovis. Ph. D. Thesis. Faculty of Graduate Studies. University of Guelph. Ontario, Canada.
25. López, A., Gilka, F., Lillie, L.E., Thomson, R.G., Maxie, M.G. and McMillan, I.: A mouse model for estimation of Pasteurella haemolytica deposition in calf lungs following aerosol exposure. Can. J. Comp. Med., 46:314-316 (1982).
26. López, A., Maxie, M.G., Savan, M., Ruhnke, H.L., Thomson, R.G., Barnum, D.A. and Geissinger, H.D.: The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with Bovine Virus Diarrhea or Mycoplasma bovis. Can. J. Comp. Med., 46:302-306 (1982).
27. Lourenco, R.V.: Inhaled aerosols. Arch. Intern. Med., 131:21-22 (1973).
28. Martin, S.W., Meek, A.H., Davis, D.G., Thomson, R.G., Johnson, J.A., López, A., Stephens, L., Curtis, R.A., Prescott, J.F., Rosendal, S., Savan, M., Zubaidy, A.J. and Bolton, M.R.: Factors associated with mortality in feedlot cattle: The Bruce County Beef Cattle Project. Can. J. Comp. Med., 44:1-10 (1980).
29. Martínez, J.: Eventos inflamatorios en el pulmón y su correlación con la remoción bacteriana en ratones inoculados con Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus. Tesis de Maestría en Ciencias Veterinarias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 1984.
30. Matsuyama, T.: Resistance of Bordetella pertusis phase I to mucociliary clearance by rabbit tracheal mucous membrane. J. Infect. Dis., 136:609-616 (1977).

31. Mims, C.A.: The pathogenesis of infectious disease. Academic Press. New York, 1976.
32. Patrick, G. and Stirling, C.: Measurement of mucociliary clearance from the trachea of conscious and anesthetized rats. J. Appl. Physiol., 42:651-655 (1977).
33. Pijoan, C.: Infecciones mixtas del aparato respiratorio. Ciencia Vet., 2:215-232 (1978).
34. Sodeman, W.A. and Sodeman, T.M.: Pathologic physiology. Mechanisms of disease. 6th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1979.
35. Stuart, B.O.: Deposition of inhaled aerosols. Arch. Intern. Med., 131:60-73 (1973).
36. Thomson, R.G. and Gilka, F.: A brief review of pulmonary clearance of bacterial aerosols emphasizing aspects of particular relevance to veterinary medicine. Can. Vet. J., 15:99-107 (1974).
37. Veit, H.P. and Farrell, R.L.: The anatomy and physiology of the bovine respiratory system relating to pulmonary disease. Cornell Vet., 68:555-581 (1978).
38. Veit, H.P., Farrell, R.L. and Troutt, H.E.: Pulmonary clearance of *Serratia marcescens* in calves. Am. J. Vet. Res., 39:1646-1650 (1978).
39. Wolff, R.K., Mussenburg, B.A. and Silbaugh, S.A.: Effect of 0.3 and 0.9 μm sulfuric acid aerosols on tracheal mucous clearance in beagle dogs. Am. Rev. Respir. Dis., 123:291-294 (1981).
40. Wolff, R.K., Hardy, S.C. and Mussenburg, B.A.: Effect of radiolabeled materials on tracheal mucous clearance in beagle dogs. Am. Rev. Respir. Dis., 126:505-508 (1982).
41. Woolcock, J.B.: Bacterial infection and immunity in domestic animals. Elsevier Scientific Publishing Co., New York, 1979.