

**FAGOCITOSIS IN-VITRO POR LEUCOCITOS AISLADOS DE SANGRE
PERIFERICA DE BOVINOS, UTILIZANDO BACTERIAS
MARCADAS CON ¹²⁵I**

MARCELO PÉREZ DOMÍNGUEZ ¹

Diferencias tanto cuantitativas como cualitativas en la población de células fagocíticas en la circulación sanguínea, han sido reconocidas desde hace muchos años como factores asociados a la presentación de infecciones (Bodey *et al.*, 1966). Recientemente se ha informado de un incremento en la susceptibilidad a infecciones en individuos que poseen un número adecuado de células con morfología aparentemente normal. Tal es el caso, por ejemplo, de una disminución en la capacidad fagocítica de leucocitos en síndromes genéticos (Quie *et al.*, 1967; Lehner y Cline, 1969; Gupta, La Force y Mills, 1976), en deficiencias inmunológicas (Wegner y Giles, 1973), en enfermedades metabólicas (Bybee y Rogers, 1964; Litchfield y Wells, 1976), en complicaciones postoperatorias (Alexander, Hegg y Altameirer, 1968), en quemaduras extensas (McEven *et al.*, 1976), en deficiencias nutricionales (Schopfer y Douglas, 1976) y en algunas condiciones fisiológicas normales, tales como el embarazo (Mitchell *et al.*, 1966).

Sin embargo, no se han podido realizar estudios más precisos y extensos sobre el funcionamiento fagocitario, especialmente en animales. El impedimento primordial es la de procedimientos exactos que cuantifiquen el poder fagocítico. Existe un diverso número de procedimientos que se han desarrollado, los cuales van del simple y laborioso, pero efectivo, que estima la dis-

minución del número de bacterias viables en medios de cultivo (Stuart, Habeshaw y Davidson, 1973) y el procedimiento microscópico que permite cuantificar las partículas asociadas con fagocitosis (Guidry, Paape y Pearson, 1974). Existen otros métodos más sofisticados que utilizan materiales marcados con isótopos radioactivos (Swanson, King y Zeligs, 1975; Hallgreen y Stolenheim, 1976; Al-Ibrahim *et al.*, 1976; Midtvet y Bardsen, 1976; Peterson *et al.*, 1976; Pérez y Schultz, 1977), la medición de productos metabólicos derivados de la actividad fagocítica (Sbarra y Karnovsky, 1974; Rottini *et al.*, 1975; Agbaba, 1976) y otros que cuantifican la luminiscencia química producida por los fagocitos en respuesta a la fagocitosis (Nelson *et al.*, 1976).

En general puede afirmarse que cualquiera de los métodos arriba mencionados es lo suficientemente sensible para detectar diferencias cuando existen grandes variaciones en la actividad fagocítica. Sin embargo, cuando se requieren evaluaciones de mayor exactitud, no existe un método confiable y de menor variación, originando controversias entre autores por el procedimiento usado y las diferencias obtenidas.

El objetivo de este trabajo consiste en describir un método de fagocitosis *in-vitro*, rápido, sencillo y exacto, diseñado para evaluar la capacidad fagocítica de células aisladas de sangre periférica de bovinos.

Aislamiento de leucocitos sanguíneos. Se obtienen de 30 a 40 ml de sangre de la yugular en un frasco conteniendo 0.4 ml de solución de heparina al 1%. La sangre debe procesarse lo más rápidamente posible.

Recibido para su publicación el 26 de mayo de 1980.

¹ Departamento de Nutrición Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, Apdo. Postal 41-652, México 10, D.F.

Se transfieren 20 ml de sangre a un tubo de centrifuga de 50 ml, se centrifuga a $1,500 \times g$ durante cinco minutos y el plasma se desecha por medio de una pipeta Pasteur. El paquete celular se suspende en 20 ml de una solución de NaCl al 0.1% enfriada a 4C y se agita levemente durante un minuto. La isotonicidad se restaura inmediatamente agregando 5 ml de una solución de NaCl al 3.7%. La suspensión celular se centrifuga nuevamente a $500 \times g$ durante un minuto y se elimina el sobrenadante. Las células leucocíticas se suspenden en 20 ml de Medio Esencial Mínimo (MEM), se agita en un Vortex y se centrifugan a $500 \times g$ por un minuto. Las células se suspenden en 3 ml de MEM, se agitan en un Vortex y cuidadosamente se depositan sobre 3 ml de una solución al 5% de dextrán en MEM, contenidos en un tubo de vidrio de 13×100 mm. El contenido se centrifuga a $60 \times g$ durante 15 minutos, se elimina el sobrenadante y las células se suspenden en 2 ml de MEM. El número de células que se obtiene por medio de este procedimiento es alrededor de 10×10^6 /ml y la población está constituida por leucocitos polimorfonucleares y monocitos en una proporción mayor del 90%. Para realizar la prueba de fagocitosis, se ajusta la suspensión celular con MEM, de tal manera, que la cantidad total de células deseada esté contenida entre 80 y 100 microlitros.

Radiomarcaje de las bacterias. La bacteria que se pretende radiomarcarse se desarrolla en caldo soya triptosa durante 24 hs. El cultivo es transferido a un tubo, centrifugándolo a $4,500 \times g$ durante 15 minutos a 4C. El sobrenadante se desecha y las bacterias se suspenden en solución salina fisiológica a 4C. Se repite este procedimiento y el número de bacterias se ajusta a alrededor de 1×10^9 unidades formadoras de colonias/ml (UFC/ml).

El marcaje de las bacterias se realiza por medio de una modificación al método Fracker y Speck (1978), desarrollado para células animales. El procedimiento es como sigue: una alícuota de 200 ml de una solución de cloruro de metileno conteniendo 100 μg de 1, 3, 4, 6-tetracloro-3a, 6a-dife-

nilglicoluril (TDG) se coloca en un tubo de vidrio desechable de 13×100 mm. El cloruro de metileno se evapora haciendo girar el tubo en un baño María a 37C de tal manera que se forma en el fondo del tubo una capa de TDG (pueden prepararse varios tubos, envolverlos con papel aluminio para protegerlos de la luz y almacenarlos en el congelador hasta que se necesiten). A otro tubo de vidrio se agregan 100 μl de la suspensión bacteriana (alrededor de 1×10^8 UFC) y 15 μci de ^{125}I (en solución amortiguadora de fosfato .05 M, pH 7.2); el volumen final de esta mezcla se ajusta a 200 μl con la solución amortiguadora mencionada. Los dos tubos se colocan en hielo picado y en cuanto estén a 0-4C de temperatura la reacción se inicia transfiriendo la suspensión bacteriana al tubo que contiene el TDG; el tubo se coloca en el hielo durante 20 minutos, agitándolo frecuentemente. La reacción termina mediante la adición de 300 μl de la solución amortiguadora fosfatada y transfiriendo la mezcla (0.5 ml) a un tubo de plástico desechable de 11×75 mm. La suspensión se centrifuga a $4,500 \times g$ durante 15 minutos. Las bacterias se lavan con 2 ml de solución salina fisiológica fría y se centrifugan durante dos veces más. Las bacterias se suspenden en una solución fría de KI al 1% y se incuban a 0-4C durante 20 minutos. Las células se centrifugan nuevamente a $4,500 \times g$ durante 15 minutos, y se lavan con solución salina fisiológica hasta que el nivel de radioactividad en el sobrenadante sea mínimo. La suspensión bacteriana se ajusta con solución salina fisiológica de tal manera que 10 μl contengan las cuentas por minuto (cpm) deseadas. Valores típicos de Actividad Específica obtenidos mediante esta técnica son: 0.006 cpm/UFC para *Streptococcus agalactiae* y 0.007 cpm/UFC para *E. coli*. Las bacterias radioactivas deben mantenerse todo el tiempo a 0-4C y deben usarse en el transcurso de dos días máximo.

Prueba de fagocitosis. La actividad fagocitaria se cuantifica midiendo la incorporación de radioactividad por los leucocitos. La mezcla fagocitaria tiene un volumen total de 350 μl y está constituida por

8.5×10^5 leucocitos, 20 μ l de suspensión bacteriana, 150 μ l de plasma y el volumen total se completa con buffer de fosfato. Se incuba a 36C en un baño María con agitador, durante tres horas. El proceso de fagocitosis se interrumpe añadiendo 2 ml de solución salina fisiológica fría. La suspensión se centrifuga a $200 \times g$ durante 10 minutos y el sobrenadante se elimina. Una solución de lisozima precalentada (.05% en ácido fórmico .05M) se adiciona y se incuba a 36C durante cinco minutos. Se añaden 2 ml de solución salina fisiológica fría, se agita en un Vortex y se centrifuga a $200 \times g$ durante cinco minutos. Se repite este proceso tres veces y al final la actividad radioactiva del precipitado se cuantifica en un contador de radiaciones gama. Cada muestra debe realizarse por triplicado. Tubos control que contienen todo, excepto leucocitos, deben procesarse de una manera similar; estos tubos se utilizan para estimar el fondo radioactivo, el cual debe substraherse del valor obtenido en los tubos problema para estimar la verdadera radioactividad asociada con los leucocitos.

Esta técnica permite evaluar de una manera precisa el poder fagocítico de células obtenidas de un número grande de animales. Esto representa una ventaja sobre otros métodos que en ocasiones están limitados por la capacidad de poder examinar células de diferentes animales, al mismo tiempo. Similarmente, la ventaja de poder marcar con ^{125}I a las bacterias con este procedimiento, que puede considerarse inocuo para las mismas, permite utilizarlas para otros estudios.

Summary

It has been observed, that an increase in the susceptibility to infectious diseases is related to an impairment of the phago-

cytic ability of leukocytes. For this reason, a number of techniques, that vary in sensitivity and complexity, have been developed for measuring phagocytosis. It can be said, that when there are big differences in phagocytosis almost any procedure can be used. However, there is not a procedure, sensitive enough to detect minor differences, that could be used for analysing many samples at one time.

The objective of this paper is to describe a procedure for measuring phagocytosis in vitro by bovine blood leukocytes using ^{125}I labeled bacteria.

The leukocytes are isolated from blood by hypotonic shock and suspended in minimum essential medium. The population of cells is constituted mainly by PMN leukocytes and the final suspension is adjusted in such a way that 80-100 microliters deliver the desired number of cells.

The bacteria is labeled with 125-iodine through a oxidation reaction by 1, 2, 3, 4, 6-Tetracloro-3a, 6a, difenilglicoluril in test tubes. Typical specific activity values for *Streptococcus agalactiae* and *Escherichia coli* are 0.006 CPM/CFU and 0.007 CPM/CFU, respectively. The final suspension is in cold saline solution.

The phagocytic mixture contains 8.5×10^5 leukocytes, 20 μ l of bacterial suspension, 150 μ l of plasma, and enough phosphate buffer to complete a total volumen of 350 μ l. The mixture is incubated during 3 hs at 36C in a water shaker. Outside bacteria is lysed with lysozyme and the leukocytes are washed several times by centrifugation. The radioactivity is measured in a gamma counter and the phagocytic activity is quantified measuring the radioactive uptake by leukocytes.

Literatura citada

- ACBABA, O., 1976, Effects des histones sur la phagocytose et le metabolisme phagocyttaire, *Revue. can. Biol.*, 35:25.
- ALEXANDER, V.N., M. HECC and W.A. ALTAMEIRER, 1968, Neutrophil function in selected surgical functions, *Ann. Surg.*, 168:447.
- AL-IBRAHIM, M.S., R. CHANDRA, R. KOSHORE, F.T. VALENTINE and H. SHERWOOD, 1976, A micromethod for evaluating the phagocytic activity of human macrophages by ingestion of radio-labelled polystyrene particles, *J. Immunol. methods*, 10:207.
- BODEY, G.P., M. BUCKLEY, Y.S. SATHE and E.J. FREIRECH, 1966, Quantitative relationship between circulating leucocytes and infection in patient with acute leukemia, *Ann. Intern. Med.*, 64:328.
- BYBEE, J.D. and E.R. ROGERS, 1964, The phagocytic activity of PMN's obtained from patients with *Diabetes mellitus*, *J. Lab. clin. Med.*, 64:1.
- FRACKER, P.J. and J.C. SPECK, 1978, Protein and cell membrane iodination with a sparingly soluble chloramide, 1, 3, 4, 6-Tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril, *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 80:849.
- GUIDRY, A.J., M.J. PAAPE and R.E. PEARSON, 1974, *In-Vitro* procedure for measuring phagocytosis of blood neutrophils, *Am. J. Vet. Res.*, 35:705.
- GUPTA, R.C., F.M. LA FORCE and D.M. MILLS, 1976, Polymorphonuclear leukocyte inclusions and impaired bacterial killing in patients with Felty's syndrome, *J. Lab. clin. Med.*, 88:183.
- HALLGREEN, R. and G. STOLENHEIM, 1976, Quantification of phagocytosis by human neutrophils, The use of radiolabelled staphylococcal protein A-IgG Complexes, *Immunol.*, 30:755.
- LEHNER, R.L. and M.J. CLINE, 1969, Leucocyte myeloperoxidase deficiency and disseminated candidiasis, *J. Clin. Invest.*, 48:1478.
- LITCHFIELD, W.J. and W.W. WELLS, 1976, Inhibitory action of D-Galactose on phagocyte metabolism and function, *Inf. Immunity*, 13:728.
- MC EVEN, D.D., G.C. GERBER, P. BLAIR and K. EUREMIUS, 1976, Granulocyte function and *Pseudomonas burn* wound infection, *Inf. Immunity*, 43:399.
- MIDTVET, T. and A. BARSDEN, 1976, Elimination of ingested 32p-labelled *E. coli* from rat polymorphonuclear neutrophils, *Acta path. Microb. scand.*, Sect. C., 84:100.
- MITCHELL, G.W., R.J. MCRIPBEY, R.J. SELVARAJ, A.J. SBARRA, 1966, The role of the phagocyte in host-parasite interactions. IV. The phagocytic activity of leucocytes in pregnancy and its relationship to urinary tract infections, *Ann. J. Obstet. Gynec.*, 96:687.
- NELSON, R.D., E.L. MILLS, R.L. SIMMONS and P.C. QUIE, 1976, Chemiluminescence response of phagocytizing human monocytes, *Inf. Immunity*, 14:129.
- NEWBOULD, F.H.S., 1976, The effect of added serum and glucose and some inherent factors in phagocytosis *in-vitro* by milk leucocytes from several cows, *Can. J. comp. Med.*, 37:189.
- PÉREZ, D.M. and L.H. SCHULTZ, 1977, A procedure for measuring *in-vitro* phagocytosis by peripheral ruminant leukocytes using ³H-thymidine labelled bacteria, 71th, *ADSA, Ann. Mtg.*, *J. Dairy Sci.*, (Suppl.), p. 36.
- PETERSON, P.K., J. VERHOEF, L.D. SABATH and G. QUIE, 1976, Extracellular and bacterial factors influencing staphylococcal phagocytosis and killing by human polymorphonuclear leucocytes, *Inf. Immunity*, 14:496.
- QUIE, D.G., J.G. WHIRE, B. HOLMES and R.H. GOOD, 1967, *In-vitro* bactericidal capacity of human polymorphonuclear leucocytes: Diminished activity in chronic granulomatous disease of childhood, *J. Clin. Invest.*, 46:668.
- ROTTINI, G., P. DRI, M.R. SORANZO and P. PATRIARCA, 1975, Correlation between phagocytic activity and metabolic responses of polymorphonuclear leucocyte toward different strains of *E. coli*, *Inf. Immunity*, 11:417.
- SBARRA, A.J. and M.L. KARNOVSKY, 1974, The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leucocytes, *J. biol. Chem.*, 234:1355.
- SCHOFFER, K. and S.D. DOUGLAS, 1976, Neutrophil function in children with kwashiorkor, *J. Lab. clin. Med.*, 88:450.
- STUART, A.E., J.A. HABESHAW and A.E. DAVIDSON, 1973, Phagocytosis *in-vitro*. In Cellular Immunology, Handbook of Experimental Immunology. Vol. II. Edited by D.M. Weit. 2nd ed., *Blackwell Scientific Publ.*, London, p. 24-1.
- SWANSON, J., G. KING and B. ZELIGS, 1975, Studies on gonococcus infection. VIII. ¹²⁵I iodine labelled gonococcus and studies on their *in-vitro* interaction with Eukaryotic cells, *Inf. Immunity*, 11:453.
- WEGNER, M.E. and G.B. GILES, 1973, NBT dye reduction by peripheral leukocytes from rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus patients, *J. Lab. clin. Med.*, 82:513.