

## Veterinaria México

Volumen 34  
Volume

Número 3  
Number

Julio-Septiembre 2003  
July-September

*Artículo:*

Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis*  
en macrófagos de bovinos naturalmente  
resistentes y susceptibles a patógenos  
intracelulares

Derechos reservados, Copyright © 2003:  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Otras secciones de  
este sitio:

- 👉 Índice de este número
- 👉 Más revistas
- 👉 Búsqueda

*Others sections in  
this web site:*

- 👉 *Contents of this number*
- 👉 *More journals*
- 👉 *Search*



Medigraphic.com

# Sobrevivencia de *Mycobacterium bovis* en macrófagos de bovinos naturalmente resistentes y susceptibles a patógenos intracelulares

## Survival of *Mycobacterium bovis* in macrophages from cattle naturally resistant and susceptible to intracellular pathogens

José A. Gutiérrez-Pabello\*  
L. Garry Adams\*\*

---

### Abstract

Peripheral blood monocyte-derived macrophages from genetically resistant and susceptible cattle to intracellular parasites were evaluated for their ability to control the intracellular growth of virulent *M. bovis*. Bactericidal assays using a 10:1 multiplicity of infection were performed to study bacterial phagocytosis and bacterial multiplication at 0 and 24 h post-inoculation. The rate of bacterial phagocytosis was  $1.4 \pm 0.17$  and  $2.1 \pm 0.54$  bacteria/macrophage, whereas bacterial multiplication was 165% and 263.7% in macrophages from resistant and susceptible cattle respectively. These results confirm that macrophages from resistant and susceptible cattle differ significantly ( $P < 0.01$ ) in controlling intracellular multiplication of virulent *M. bovis*.

**Key words:** NATURAL RESISTANCE, *MYCOBACTERIUM BOVIS*, BOVINE MACROPHAGES.

### Resumen

El control del crecimiento intracelular de *M. bovis* virulento fue evaluado en macrófagos derivados de monocitos provenientes de ganado genéticamente resistente y susceptible a parásitos intracelulares. Se estudió el índice de fagocitosis, así como la multiplicación bacteriana a las 0 y 24 horas, respectivamente, utilizando un ensayo microbiciida con una multiplicidad de infección de 10:1. La proporción de fagocitosis bacteriana fue de  $1.4 \pm 0.17$  y  $2.1 \pm 0.54$  bacterias-macrófago, mientras que la multiplicación bacteriana fue de 165% y 263.7% en macrófagos de ganado resistente y susceptible, respectivamente. Estos resultados confirman que los macrófagos de animales resistentes y susceptibles difieren significativamente ( $P < 0.01$ ) en el control intracelular de la multiplicación de *M. bovis* virulento.

**Palabras clave:** RESISTENCIA NATURAL, *MYCOBACTERIUM BOVIS*, MACRÓFAGOS BOVINOS.

---

Recibido el 26 de agosto de 2002 y aceptado el 29 de enero de 2003.

\* Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

\*\* Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas, 77843, USA.  
Dirección para correspondencia: Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 14510, México, D. F. Tel.: (55)5622-5896. Fax: (55)5622-5971. E-mail: jagp@servidor.unam.mx

Natural disease resistance refers to the inherent capacity of an animal to resist disease when exposed to pathogens, without prior exposure or immunization.<sup>1</sup> Under these conditions, insusceptibility to infection occurs even if there is contact between potential host and infecting agent, because the pathogen fails to develop and reproduce due to some structural or physiological incompatibility with the host.<sup>2,3</sup> The mechanisms by which an animal might resist disease include immune and non-immune mechanisms. Among the latter, macrophages are considered one of the most important elements participating in this process. There is substantial evidence from studies on bovine macrophages that host genetic background associated with resistance to intracellular pathogens is very important in the outcome of the host-pathogen interaction. For instance, Harmon *et al.*<sup>4</sup> showed that mammary gland macrophages from resistant (R) cows produced higher oxidative burst activity and had greater bacteriostatic activity against *Brucella abortus* than did macrophages from susceptible (S) cows. Moreover, mononuclear phagocytes from a greater proportion of naturally R cattle controlled intracellular replication of *B. abortus* better than cells from S cattle.<sup>5</sup>

In addition, Campbell *et al.*<sup>6</sup> demonstrated differences in the binding mechanisms of *B. abortus* to mononuclear phagocytes from cows previously grouped as genetically R or S to challenge infection with *B. abortus*. Bacterial entry into macrophages from R was inhibited by peptide RGDS, outer membrane-peptidoglycan complex from *B. abortus* strain RB51, anti-LFA-1 monoclonal antibody, anti-C3 antiserum, fibronectin, purified O-antigen from *B. abortus* lipopolysaccharide, mannan and heat-aggregated IgG, whereas entry into macrophages from S was inhibited only by outer membrane-peptidoglycan complex, anti-LFA-1 monoclonal antibody, O-antigen and heat-aggregated IgG.

These data demonstrate differences in *B. abortus* binding mechanisms to cells from R and S cattle. In most experiments, inhibition of entry into R cells was two to four times greater than into S cells, with no significant difference in phagocytosis when R controls were compared with S controls. Furthermore, Qureshi *et al.*<sup>7</sup> demonstrated that macrophages from R cattle were significantly superior ( $P < 0.05$ ) in controlling intracellular growth of *B. abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, but not of *S. typhimurium*, than macrophages from S animals.

The objective of this study was to compare phagocytosis and intracellular growth of a virulent *M. bovis* strain in monocyte-derived macrophages from R and S cattle.

El término resistencia natural a las enfermedades se refiere a la capacidad heredable de un animal de evitar la presentación del proceso de enfermedad cuando ha sido expuesto al agente causal que la provoca, sin haber tenido previa exposición o haber sido inmunizado.<sup>1</sup> Bajo estas condiciones se presenta una insusceptibilidad al proceso de enfermedad, aun si existe contacto entre el huésped y el agente infeccioso debido a que el agente patógeno no puede desarrollarse debido a una incompatibilidad de tipo estructural o fisiológica con el huésped.<sup>2,3</sup> Los mecanismos que un animal puede utilizar para resistir la enfermedad se dividen en mecanismos inmunes y no inmunes. Dentro de estos últimos, los macrófagos son considerados como uno de los elementos más importantes en este proceso. Diferentes estudios utilizando macrófagos de origen bovino han demostrado que la condición genética del ganado asociada a la resistencia natural a patógenos intracelulares es muy importante en el resultado final de la interacción microorganismo-huésped. Por ejemplo, Harmon *et al.*<sup>4</sup> evidenciaron que los macrófagos de la glándula mamaria de vacas resistentes (R) presentaron mayor actividad oxidativa y bactericida en contra de *Brucella abortus* que los macrófagos de vacas susceptibles (S). Además de que los fagocitos mononucleares de la mayoría de un grupo de ganado naturalmente R mostró mejor control de la replicación intracelular de *Brucella abortus* que las células del ganado S.<sup>5</sup>

Adicionalmente, Campbell *et al.*<sup>6</sup> encontraron diferencias en los mecanismos de adhesión de *B. abortus* a fagocitos mononucleares de vacas previamente clasificadas como genéticamente R o S mediante un desafío experimental con *B. abortus*. La fagocitosis bacteriana en macrófagos R fue inhibida por el péptido RGDS, el complejo peptidoglicano-membrana externa de *B. abortus* cepa RB51, anticuerpos monoclonales anti LFA-1, antisuero anti C3, fibronectina, antígeno O purificado del lipopolisacárido de *B. abortus*, mananas e IgG agregadas por calor, mientras que la fagocitosis del mismo microorganismo en macrófagos S fue inhibida solamente por el complejo peptidoglicano-membrana externa, anticuerpos monoclonales anti LFA-1, antígeno O y IgG agregadas por calor.

Estos resultados demostraron que existen diferencias en los mecanismos de adhesión de *B. abortus* a macrófagos de ganado R y S. En la mayoría de estos experimentos, la inhibición en la entrada del microorganismo fue de dos a cuatro veces mayor en macrófagos R que en células S, sin mostrar una diferencia significativa al analizar la fagocitosis de los testigos R y S. Adicionalmente, Qureshi *et al.*<sup>7</sup> demostraron que los macrófagos de ganado R fueron significativamente superiores ( $P < 0.05$ ) en el control del crecimiento intracelular de *B. abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin*, pero no de *S. typhimurium*, que los macrófagos de animales S.

El objetivo del presente trabajo fue comparar el porcentaje de fagocitosis y de crecimiento intracelular

The *M. bovis* "El Paso" strain, isolated from the tuberculous lesions of a tuberculin skin test-positive cow from a 600 head El Paso, Texas dairy herd which had a 50% rate of infection was used in this study. The inoculum was prepared in Middlebrook 7H9 broth\* supplemented with 0.05% of Tween 80 and OADC enrichment.\*\* Bacteria were grown at 37°C during eight days in aerobic conditions to a logarithmic phase and harvested. The bacterial suspension was passed twice through a 26 gauge needle and sonicated for 30 sec in order to minimize clumping of organisms. Aliquots of 1 ml were stored at -80°C. The bacterial suspension was titrated by plating serial dilutions on 7H11 medium.\*\*\* Citrated peripheral venous blood was obtained from healthy adult cattle, confirmed as R or S based on *in vivo* infections of *B. abortus* strain 2308, processed by isopycnic centrifugation using a Percoll gradient† and cultured as previously described.<sup>7,8</sup> The selected donors were *M. bovis*-naïve and their mononuclear cells have been extensively characterized.<sup>4,5,7</sup> Macrophages were harvested from teflon flasks by chilling the flasks on melting ice for 30-45 min. The bactericidal assay was performed as described by Qureshi *et al.*,<sup>7</sup> with some modifications. Macrophage monolayers in tissue culture Terasaki HLA plates‡ were infected with *M. bovis* at a multiplicity of infection (MOI) of 10:1, centrifuged at 200g for 10 min and incubated at 37°C for 4h. Cultures were maintained in a humidified atmosphere consisting of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. After the time allowed for phagocytosis, the cells were washed 5 times with 5µl of fresh RPMI 1640 with L-glutamine, amino acids, sodium pyruvate, sodium bicarbonate (CRPMI),<sup>o</sup> and 15% of heat inactivated fetal calf serum (FCS)<sup>oo</sup> to remove the extracellular bacteria, and incubated again at 37°C. This was considered time 0h. The cells were harvested at 0h and 24h post-infection for analysis. Bacterial phagocytosis was calculated by plating serial dilutions of the live intracellular bacteria released from the macrophages after treatment with 0.5% Tween 20,<sup>ooo</sup> the total number of colony forming units was divided by the total number of macrophages to obtain an average bacterial concentration per macrophage. Bacterial growth was calculated as the ratio of the total number of intracellular bacteria at the end of the assay to the total number of bacteria at the start of the assay expressed as percent. Results are the average of three independent experiments each one with three replicates.

Statistical analysis was performed using Student's *t* test. A P value of 0.01 or less was considered statistically significant.

Macrophages from R and S cattle differed in the rate of bacterial phagocytosis, however the differ-

de de una cepa virulenta de *M. bovis* en macrófagos derivados de monocitos provenientes de ganado R y S.

Para este estudio se utilizó la cepa "El Paso" de *M. bovis*, la cual fue aislada de las lesiones tuberculosas de una vaca rectora a la tuberculina proveniente de un hato compuesto por 600 bovinos localizado en El Paso, Texas, y que presentaba una prevalencia a la tuberculosis de 50%. El inóculo se preparó en medio líquido Middlebrook 7H9\* suplementado con 0.05% de Tween 80 y enriquecimiento OADC.\*\* Las bacterias se crecieron a 37°C durante ocho días en condiciones aeróbicas hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento e inmediatamente fueron cosechadas. La suspensión bacteriana se paso dos veces a través de una aguja del número 26 y se sonicó durante 30 seg para minimizar el efecto de agregación bacteriana. Se prepararon alicuotas de 1 ml y se almacenaron a -80°C. El inóculo se tituló mediante plaqueo de diluciones en medio 7H11.\*\*\* Se obtuvo sangre periférica de donadores adultos en buen estado de salud, que habían sido clasificados previamente como R y S mediante la infección *in vivo* de la cepa 2308 de *B. abortus*, la sangre se procesó a través de una centrifugación isopícnica utilizando un gradiente de Percoll,† y se cultivó de acuerdo con la técnica previamente descrita.<sup>7,8</sup> Los donadores seleccionados estaban libres de cualquier infección por *M. bovis* y sus células monocíticas han sido caracterizadas en forma extensiva.<sup>4,5,7</sup> Los matraces de teflón conteniendo los macrófagos se colocaron en una cama de hielo durante 30-45 min para ser cosechados. Los ensayos microbicidas se realizaron de acuerdo con la técnica descrita por Qureshi *et al.*<sup>7</sup> con algunas modificaciones. Se infectaron monocapas de macrófagos contenidas en placas estilo Terasaki HLA‡ con una multiplicidad de infección (MOI) de 10:1, las placas se centrifugaron a 200 g durante 10 min y se incubaron posteriormente a 37°C por un periodo de 4 h. Los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera humedecida con 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>. Después del tiempo destinado a la fagocitosis, las células se lavaron cinco veces con 5 µl de medio fresco RPMI 1640 con L-glutamina, amino ácidos, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio (CRPMI),<sup>o</sup> y 15% de suero fetal bovino inactivado (SFB),<sup>oo</sup> para remover las bacterias extracelulares y se incubaron nuevamente a 37°C. A este tiempo se le consideró 0 h. Las células se cosecharon a las 0 h y 24 h posinfección para su análisis. La fagocitosis bacteriana se calculó mediante plaqueo de diluciones decuples seriadas de las bacterias vivas alojadas intracelularmente, las cuales fueron liberadas mediante un tratamiento con 0.5% Tween 20<sup>ooo</sup> el

\* Becton Dickinson, Cockeysville, MD.

\*\* Difco, Detroit, MI.

\*\*\* Difco, Detroit, MI.

† Pharmacia, Uppsala, Sweden.

‡ Nunc, Inc., Naperville, IL

<sup>o</sup> Gibco, Grand Island, NY

<sup>oo</sup> Gibco, Grand Island, NY

<sup>ooo</sup> Sigma Chemical Company, St. Louis, MO

Cuadro 1

PROPORCIÓN DE FAGOCITOSIS Y CRECIMIENTO BACTERIANO EN MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *Mycobacterium bovis* PROCEDENTES DE GANADO RESISTENTE Y SUSCEPTIBLE A PARÁSITOS INTRACELULARES  
 RATE OF PHAGOCYTOSIS AND BACTERIAL GROWTH IN *Mycobacterium bovis*-INFECTED MACROPHAGES FROM RESISTANT AND SUSCEPTIBLE CATTLE

	<i>Resistant</i>	<i>Susceptible</i>
Bacteria/macrophage 0 h	1.42 ± 0.17 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.54 <sup>a</sup>
Bacteria/macrophage 24 h	2.37 ± 0.69 <sup>a</sup>	5.55 ± 0.95 <sup>b</sup>
Bacterial growth	165% <sup>a</sup>	263% <sup>b</sup>

<sup>a-b</sup>Mean ± SEM. Means with no common superscript differ significantly ( $P < 0.01$ )

ence was not statistically significant ( $P > 0.01$ ) (Table 1). Similar results were reported by Campbell *et al.*<sup>6</sup>, who showed differences in the binding mechanisms of *B. abortus* to R and S cells suggesting that binding of *B. abortus* to S cells may be mediated by bacterial cell wall components that R cells fail to recognize. Macrophages from R and S cattle differed significantly ( $P < 0.01$ ) in controlling intracellular growth of virulent *M. bovis*. Macrophages from R cattle were superior to macrophages from S cattle in controlling the *in vitro* intracellular replication. Our results add virulent *M. bovis* to the list of pathogens for which the intracellular growth has been shown to be better controlled by the R cells.

Macrophage bactericidal assays have proved useful in identifying the intracellular parasite resistance phenotype in cattle. Previous studies established 65%, 70% and 100% of bacterial survival as a cut-off point to designate an animal as R or S when using *M. bovis* BCG, *B. abortus* and *S. dublin*, respectively, as the inoculum to screen a population.<sup>7</sup> However, those experiments were performed with an avirulent *M. bovis* strain. Our results also showed that the virulent *M. bovis* strain survived better in both R and S macrophages than *M. bovis* BCG suggesting that the 65% cut-off point established to identify an animal as R or S to intracellular parasites should be modified when using a virulent *M. bovis* strain.

## Acknowledgements

This project was supported by the Texas Agricultural Experiment Station Project No. 8409. J. A. Gutierrez-Pabello received support from the Universidad Nacional Autonoma de Mexico through the Departamento de Superacion Academica of the Direccion General de Asuntos del Personal Academico.

número total de unidades formadoras de colonias fue dividido por el número total de macrófagos para obtener una concentración bacteriana promedio por macrófago. El crecimiento bacteriano se calculó como una proporción del número total de bacterias intracelulares al final del ensayo con el número total de bacterias al principio del ensayo expresado en porcentaje. Los resultados son un promedio de tres experimentos independientes cada uno con tres réplicas.

El análisis estadístico se realizó utilizando la prueba "t" de Student. Un valor de P de 0.01 o menos fue considerado estadísticamente significativo.

Los macrófagos procedentes de ganado R y S difirieron en la proporción de fagocitosis; sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa ( $P > 0.01$ ) (Cuadro 1). Resultados similares fueron observados por Campbell *et al.*<sup>6</sup> quien mostró diferencias en los mecanismos de adhesión de *B. abortus* a células de ganado R y S sugiriendo que la adhesión de *B. abortus* a células S puede estar mediado por componentes de la pared bacteriana que no son reconocidos por las células R. Los macrófagos de ganado R y S difirieron significativamente ( $P < 0.01$ ) en el control del crecimiento intracelular de *M. bovis* virulento. Los macrófagos R fueron superiores que los macrófagos S en el control *in vitro* de la replicación bacteriana intracelular. Nuestros resultados adicionan *M. bovis* virulento a la lista de patógenos para los cuales se ha demostrado que el crecimiento intracelular es mejor controlado por las células R.

Se ha demostrado que los ensayos microbicidas son útiles en la identificación del fenotipo de resistencia a parásitos intracelulares. Estudios previos establecieron 65%, 70% y 100% de sobrevivencia bacteriana como el punto de corte para designar a un animal como R o S cuando se utiliza *M. bovis* BCG, *B. abortus* y *S. dublin*, respectivamente, como el inóculo para discriminar una población.<sup>7</sup> Sin embargo, aquellos experimentos se realizaron con una cepa de *M. bovis* avirulenta.



## Referencias

1. Hutt FB. Genetic resistance to disease in domestic animals. New York: Comstock Publishing Associates, 1958.
2. Skamene E. Genetic regulation of host resistance to bacterial infection. *Rev. Infect Dis* 1983;4:S823-832.
3. Haller O, Acklin M, Staeheli P. Genetic resistance to influenza virus in wild mice. *Curr Top Microbiol Immunol* 1986;127:331-337.
4. Harmon BG, Adams LG, Templeton JW, Smith R 3rd. Macrophage function in mammary glands of *Brucella abortus*-infected cows and cows that resisted infection after inoculation of *Brucella abortus*. *Am J Vet Res* 1989;50:459-465.
5. Price RE, Templeton JW, Smith R III, Adams LG. Ability of mononuclear phagocytes from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis to control *in vitro* intracellular survival of *Brucella abortus*. *Infect Immun* 1990;58:879-886.
6. Campbell GA, Adams LG, Sowa BA. Mechanisms of binding of *Brucella abortus* to mononuclear phagocytes from cows naturally resistant or susceptible to brucellosis. *Vet Immunol Immunopathol* 1994;41:295-306.
7. Qureshi T, Templeton JW, Adams LG. Intracellular survival of *Brucella abortus*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Salmonella dublin* and *Salmonella typhimurium* in mac-

Nuestros resultados también mostraron que *M. bovis* virulento sobrevivió mejor que *M. bovis* BCG en ambos grupos celulares R y S sugiriendo que el 65% establecido como punto de corte para identificar a un animal como R o S a parásitos intracelulares debería ser modificado cuando se utilice una cepa de *M. bovis* virulenta.

## Agradecimientos

Este proyecto fue financiado por el Texas Agricultural Experiment Station Project No. 8409. J. A. Gutiérrez-Pabello recibió apoyo económico de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Departamento de Superación Académica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.

- rophages from cattle genetically resistant to *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1995;50:55-66.
8. Campbell GA, Adams LG. The long-term culture of bovine monocyte-derived macrophages and their use in the study of intracellular proliferation of *Brucella abortus*. *Vet Immunol Immunopathol* 1992;34:291-305.

