

Técnicas de estudio de fagocitosis in vivo y su aplicación en la investigación de la actividad inmunomoduladora de antibióticos

Procedures to study the in vivo phagocytosis and application for the investigation of immunomodulatory activity of antibiotics

ALKOUWATLI K¹, LEIVA M², RUIZ-BRAVO A², JIMÉNEZ-VALERA M^{2*}

¹ Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Damascus, Syria.

²Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain.

*Author for correspondence. E-mail: mjvalera@ugr.es

RESUMEN

La depuración de partículas de la sangre es una medida de la capacidad funcional del sistema fagocítico mononuclear, responsable de la eliminación sistémica de microorganismo patógenos, inmunocomplejos y células apoptóticas. Esta capacidad puede ser alterada por agentes modificadores de la respuesta biológica, entre los que figuran numerosos agentes antimicrobianos. En este trabajo se comparó la efectividad de la medida de la capacidad de depuración de ratones BALB/c inoculados con distintos microorganismos (una levadura, dos bacterias Gram-positivas, extra- e intracelular, y dos bacterias Gram-negativas, asimismo extra- e intracelular). La levadura *Candida albicans* fue seleccionada, por su apropiada cinética de depuración y su resistencia natural a agentes antibacterianos, para estudiar la modificación de la fagocitosis in vivo por el antibiótico macrólido azitromicina. El tratamiento con azitromicina durante 10 y 20 días disminuyó la capacidad de depuración del sistema fagocítico-mononuclear. PALABRAS CLAVE: Fagocitosis. Depuración. Modelo murino. Microorganismos extracelulares. Microorganismos intracelulares. Azitromicina. Tratamiento de larga duración.

ABSTRACT

*The blood stream clearance of particles is a measure of the functional capacity of the mononuclear phagocytic system, which is responsible for the systemic elimination of pathogenic microorganisms, immunocomplexes and apoptotic cells. This capacity may be altered by biological response modifiers, in which numerous antimicrobial agents are present. In this work, the effectiveness of the measurement of clearance capacity was compared in BALB/c mice that were inoculated with different microorganisms (a yeast, two extra and intracellular gram-positive bacteria, and two extra and intracellular gram-negative bacteria). As a means to studying the in vivo modification of phagocytosis by the macrolid antibiotic, azithromycin, the yeast *Candida albicans* was chosen for its appropriate clearance kinetics and its natural resistance to antibacterial agents. Treatment with azithromycin for 10 and 20 days reduced clearance capacity of the mononuclear phagocytic system.*

KEYWORDS: Phagocytosis. Clearance. Mouse model. Extracellular microorganisms. Intracellular microorganisms. Azithromycin. Long-term therapy.

1. INTRODUCCIÓN

La fagocitosis es un mecanismo crucial en la inmunidad innata¹. Las células fagocíticas

1. INTRODUCTION

Phagocytosis is a crucial mechanism in innate immunity¹. Phagocytic cells are chemotacti-

son atraídas quimiotácticamente hacia los focos inflamatorios inducidos por la presencia de agentes patógenos en los tejidos. Alternativamente, el sistema fagocítico mononuclear consiste en un número de fagocitos fijos en ciertos órganos, como bazo e hígado, que retiran las partículas extrañas presentes en la sangre². Esta actividad de depuración de la sangre es un parámetro importante de la capacidad de defensa del organismo frente a microorganismos, inmunocomplejos y células muertas por apoptosis. Por tanto, una deficiencia en la capacidad de depuración tiene como consecuencia un mayor riesgo de infecciones y de trastornos inmunopatológicos^{3,4}. Se han propuesto diversas técnicas para el estudio experimental de la depuración de la sangre por fagocitos. Algunas se basan en la retención de partículas inertes, como carbón coloidal, por los fagocitos tisulares. Otras utilizan microorganismos vivos, que se inoculan por vía intravenosa para cuantificar la tasa de depuración del torrente circulatorio en función del tiempo. Los llamados agentes modificadores de la respuesta biológica o BRMs (de «Biological Response Modifiers») se definen por los efectos moduladores que ejercen en el sistema inmune⁵. Uno de los mecanismos más comunes de acción de los BRMs es a través de sus efectos sobre las células fagocíticas. Los BRMs pueden modificar la capacidad de fagocitosis, la eficiencia de los mecanismos microbicidas intracelulares y la secreción de citocinas por fagocitos. Esto tiene consecuencias directas sobre la resistencia a la infección, e indirectas por la acción inmunorreguladora de las citocinas que modulan tanto la respuesta de anticuerpos como la inmunidad celular⁵. Actualmente es bien conocido que numerosos agentes antimicrobianos poseen actividad BRM⁶. Muchos de ellos ejercen efectos sobre fagocitos⁷. Los antibióticos macrólidos poseen interesantes propiedades inmunomoduladoras, posiblemente relacionadas con su acumulación intracelular a concentraciones varias veces superiores a las extracelulares, especialmente en fagocitos⁸. El tratamiento con macrólidos es beneficioso para enfermos con patología de inflamación pulmonar crónica, como fibrosis quística, panbronquiolitis difusa, bronquiectasia y asma^{9,10}. Las propiedades anti-inflamatorias de los

cally attracted towards inflammatory sources induced by the presence of pathogenic agents in tissues. Alternatively, the mononuclear phagocytic system consists of a number of fixed phagocytes in certain organs, such as the spleen and liver, which remove foreign particles from blood². This blood clearance activity represents an important parameter in the defence capacity of the organism against microorganisms, immunocomplexes and cell death due to apoptosis. Accordingly, a deficiency in clearance capacity may bring about a greater risk of susceptibility to infection and immunopathological disorders^{3,4}. Several techniques in the experimental study of blood clearance by phagocytes have been proposed. Some of these have been based on the retention of inert particles, such as colloidal carbon, by tissue phagocytes. Others use live microorganisms, which are inoculated intravenously, in order to quantify blood stream clearance rates in terms of time. The so called «modifying agents» of biological response, («Biological Response Modifiers»)(BRMs) are defined by the modulating effects on the immune system⁵. One of the most common action mechanisms of BRMs is the effects that these have on phagocyte cells. BRMs can modify phagocyte capacity, the effectiveness of intracellular microbicidal mechanisms and the secretion of mechanisms cytokines by phagocytes. These have direct effects on infection resistance, and indirect effects due to the immunoregulatory effect of the cytokines, which modulate both antibody response and cellular immunity⁵. It is currently well known that numerous antimicrobial agents present BRM activity⁶. Many of these affect the phagocytes⁷. The macrolide antibiotics possess interesting immunomodulating properties, which are possibly related to an intracellular accumulation at concentrations that are several times higher than extracellular concentrations, especially in phagocytes⁸. Treatment with macrolides is beneficial for patients with chronic pulmonary inflammation, such as cystic fibrosis, diffuse panbronchiolitis, bronchiectasis and asthma^{9,10}. The anti-inflammatory properties of macrolides are attributed to the interference with the production of proinflammatory cytokin production by phagocytes^{8,10}. The objective of the present work is to comparatively

macrólidos se atribuyen a interferencia con la producción de citokinas pro-inflamatorias por fagocitos^{8,10}. El objetivo del presente trabajo es determinar comparativamente la cinética de depuración de distintos microorganismos, extra- e intracelulares, y aplicar esta metodología al estudio de la influencia de la administración durante periodos prolongados del macrólido azitromicina sobre la actividad fagocítica in vivo.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones BALB/c, hembras, de 5 a 6 semanas de edad y de alrededor de 20 g de peso corporal, procedentes de la Unidad de Animales de Experimentación, perteneciente al Centro de Instrumentación de la Universidad de Granada. Los animales se mantuvieron, libres de patógenos, con acceso *ad libitum* a agua y pienso estándar estériles.

Microorganismos

Se usaron cepas de la colección de cultivos del Departamento de Microbiología, pertenecientes a las especies *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* y *Candida albicans*. Las cepas se cultivaron en Agar tripticosa soja (TSA; Difco) inclinado en tubos. Tras 24 de incubación a 37°C, se prepararon suspensiones en tampón fosfato salino isotónico, a pH 7.2 (PBS), estéril. La concentración microbiana se ajustó por turbidez a aproximadamente 10⁷ microorganismos por ml.

Ensayo de depuración

Los animales fueron sometidos a una ligera anestesia etérea, para proceder con comodidad a la inoculación de la suspensión microbiana, por vía intravenosa. Cada ratón recibió una única inyección de 100 μ l en el plexo venoso retroorbital del ojo izquierdo, registrando el tiempo en un cronómetro. Transcurridos

determine kinetic clearance of different extra and intracellular microorganisms, and to apply this methodology to the study of the influence of the macrolides azithromycin over prolonged periods of time on in vivo phagocyte activity.

2. MATERIAL AND METHODS

Animals

Female BALB/c mice of 5 to 6 weeks of age and about 20g in body weight were used. These were obtained from the Animal Experimentation Unit of the University Instrumentation Centre of Granada. The animals were maintained free of pathogens, with *ad libitum* access to water and sterile Standard chow.

Microorganisms

Strains of the species *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans* were obtained from the microbiology department's culture collection. These were subsequently cultivated in tryptic soy agar (TSA;Difco) in tubes in slanted position. After 24 hrs of incubation at 37°C, sterile isotonic phosphate buffered saline suspensions (PBS) at pH 7.2 were prepared. Microbial concentration was adjusted to approximately 10⁷ microorganisms per ml by turbidimetry.

Clearance testing

The animals were given light ether anaesthesia, in order to carry out intravenous microbial suspension inoculation more easily. Each mouse was given a single injection of 100 μ l in the retro orbital venous plexus of the left eye and time was measured with a stop watch. At 1, 5 & 10 min from inoculation, ether anaesthesia was repeated, in order to carry out blood extractions of a volume of approximately 150 μ l, using a sterile Pasteur pipette. So as to avoid coagulation, the blood obtained was transferred to tubes containing 10 μ l of heparin. From each blood sample two se-

1, 5 y 10 min de la inoculación, se repitió la anestesia etérea para realizar extracciones de volúmenes de sangre de alrededor de 150 μ l, mediante pipeta pasteur estéril. La sangre se llevó a tubos con 10 μ l de heparina, con el objeto de evitar la coagulación. De cada muestra de sangre se realizaron dos diluciones seriadas (10^{-1} y 10^{-2}) en PBS estéril, y 100 μ l de la muestra original y de cada dilución se depositaron en la superficie de placas de TSA y se extendieron por ella mediante una espátula de vidrio. Las placas se incubaron 24 h a 37°C, tras lo cual se procedió al recuento de colonias. Se dieron como válidos los recuentos comprendidos entre 30 y 300 colonias por placa. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias (CFU) por ml de sangre.

Tratamiento con azitromicina

El macrólido azitromicina se obtuvo comercialmente (Zitromax^R 500 mg de Pfizer), en forma de polvo destinado a la preparación de disoluciones para perfusión. Cada animal recibió una dosis de 7.1 mg por Kg y día (extrapolada de las dosificaciones usadas en terapia humana), por vía intraperitoneal. Se examinó el efecto de tratamientos de 10 y 20 días de duración. En cada caso, el último día del tratamiento, los animales fueron sacrificados, junto con un lote similar tratado durante el mismo tiempo con el mismo volumen del vehículo acuoso.

Análisis estadístico de los resultados

La significación estadística de las diferencias entre animales tratados y controles no tratados se determinó mediante la prueba de la *t* de Student. Los lotes experimentales constaron de 4 animales. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

3. RESULTADOS

La primera parte de este estudio se centró en la comparación de diversos microorganismos de prueba para el ensayo de fagocitosis

realizadas diluciones (10^{-1} & 10^{-2}) in sterile PBS were carried out 100 μ l of original sample each dilution and each were then deposited over the surface of the TSA dishes and spread using a glass spatula. The dishes were incubated for 24 hrs at 37°C, after which a count of the number of colonies was carried out. Counts of between 30 and 300 colonies per dish were considered as valid. The results were expressed in terms of colony forming units (CFU) per ml of blood.

Azithromycin treatment

The macrolide antibiotic, azithromycin, was obtained commercially (Zitromax^R 500 mg, Pfizer), in powdered form for use in the preparation of perfusion solution. Each animal received a dose of 7.1mg per kg per day (extrapolated from doses used in human therapy), through intraperitoneal injection. The effect of the treatment after 10 and 20 days was examined. In each case, the animals were sacrificed on the last day of treatment together with a similar batch that were treated for the same period of time with the same volume of aqueous vehicle.

Statistical analysis of the results

The statistical significance of the results obtained from the differences between treated and untreated control animals was determined using the Student *t* test. Experimental batches consisted of 4 animals. The values of $P < 0.05$ were considered as significant.

3. RESULTS

The first part of this study was focussed on the comparison of varying test microorganisms for the in vivo phagocytosis tests, in which clearance of previously intravenously administered particles was measured in terms of time. This comparison was carried out using a yeast, *Candida albicans*, and four bacteria species. Two of these were Gram-negative, one an extracellular type (*Escherichia coli*) and the other intracellular (*Salmonella enterica*

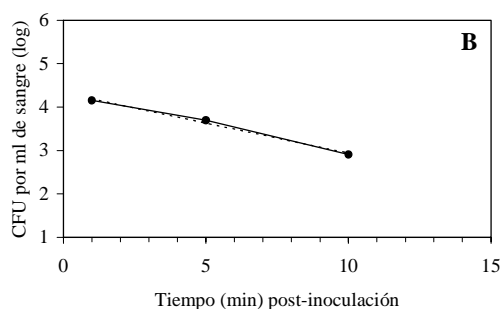
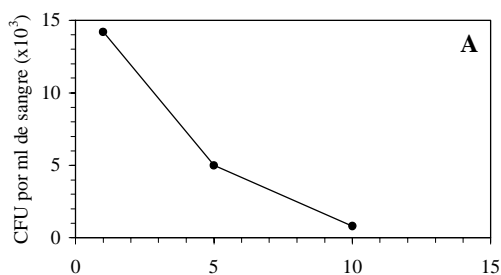
in vivo, en el que se mide la depuración, en función del tiempo, de partículas previamente administradas por vía intravenosa. En esta comparación se incluyeron una levadura, *Candida albicans*, y cuatro bacterias, dos Gram-negativas, de las cuales una extracelular (*Escherichia coli*) y otra intracelular (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium), y dos Gram-positivas, una extracelular (*Micrococcus luteus*) y otra intracelular (*Listeria monocytogenes*).

La Figura 1 muestra los resultados de los ensayos realizados con *C. albicans*. Las tasas de depuración (referidas al recuento inicial de CFU, realizado al minuto de la inoculación) fueron del 65% a los 5 minutos y del 94% a los 10 minutos (Figura 1A). Al representar los valores de CFU en escala logarítmica (Figura 1B), se obtuvo una buena rectificación de la gráfica de depuración, con un valor $R^2 = 0.9918$, y la siguiente ecuación:

$$Y = -0.139 X + 4.330$$

FIGURA 1. Cinética de depuración de *C. albicans*.

FIGURE 1. Kinetic clearance of *C. albicans*.

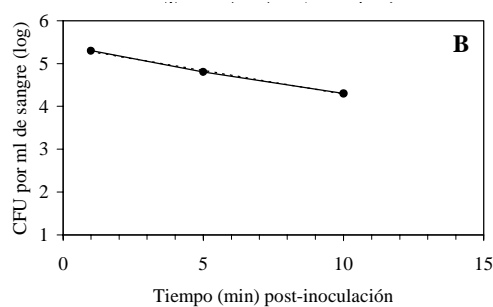
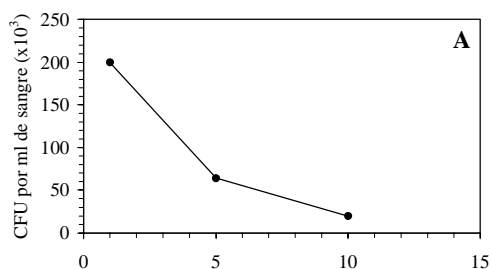


Los resultados de depuración de *E. coli* se presentan en la Figura 2. Las tasas de depuración fueron del 68% a los 5 minutos y del 90% a los 10 minutos (Figura 2A). En escala semilogarítmica, se obtuvo un valor $R^2 = 0.9966$ y la siguiente ecuación:

$$Y = -0.110 X + 5.393$$

FIGURA 2. Cinética de depuración de *E. coli*

FIGURE 2. Kinetic clearance of *E. coli*



serovar Typhimurium). Similarly, an extracellular and intracellular Gram-positive bacteria were used, these being *Micrococcus luteus* and *Listeria monocytogenes* respectively.

Figure 1 shows the results of the tests carried out with *C. albicans*. Clearance rates (with initial CFU counts carried out at one minute after inoculation taken as reference) were found to be 65% at 5 minutes and 94% at 10 minutes (Figure 1A). By representing CFU values on a logarithmic scale (Figure 1B), a good rectification of the clearance graph was obtained, with a $R^2 = 0.9918$, value, and the following equation:

$$Y = -0.139 X + 4.330$$

The results for *E. coli* clearance are represented in Figure 2. Clearance rates from 68% at 5 minutes and 90% at 10 minutes were obtained (Figure 2A). On a semilogarithmic scale, a $R^2 = 0.9966$ value was obtained with the following equation:

$$Y = -0.110 X + 5.393$$

La Figura 3 muestra los resultados obtenidos con *M. luteus*. Se encontraron unas tasas de depuración 98% (5 minutos) y 99% (10 minutos) (Figura 3A). Al pasar a la escala semilogarítmica, la rectificación no fue buena, debido al gran descenso en el número de CFUs registrado ya a los 5 minutos, con $R^2 = 0.7845$ y la siguiente ecuación:

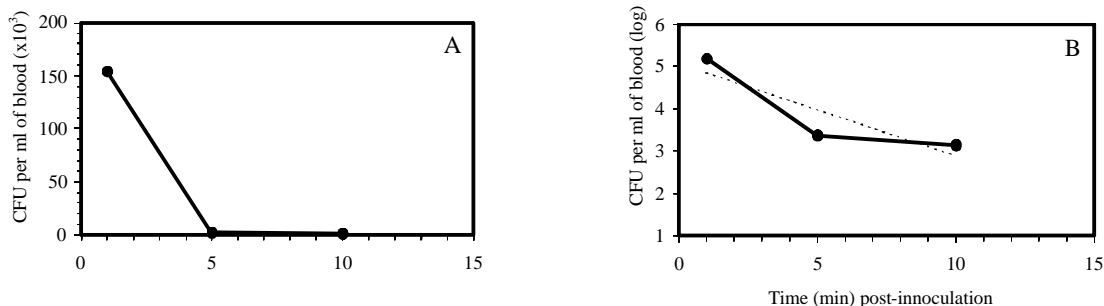
$$Y = -0.219 X + 5.075$$

Figure 3 shows the results obtained from *M. luteus*, where clearance rates of 98% at 5 minutes and 99% at 10 minutes were obtained. (Figure 3A). After converting to the semilogarithmic scale, rectification values were not found to be good, due to a sharp decrease in the number of recorded CFUs at 5 minutes, with $R^2 = 0.7845$ and the following equation:

$$Y = -0.219 X + 5.075$$

FIGURA 3. Cinética de depuración de *M. luteus*

FIGURE 3. Kinetic clearance of *M. luteus*



La Figura 4 corresponde a *S. enterica* serovar Typhimurium. Las tasas de depuración fueron 47% (5 minutos) y 58% (10 minutos). En escala semilogarítmica, se obtuvo $R^2 = 0.8989$. La ecuación fue:

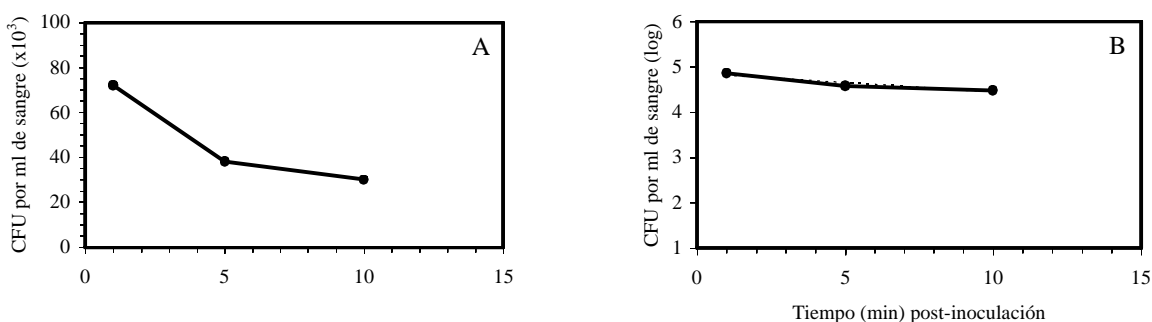
$$Y = -0.041 X + 4.859$$

Figure 4 corresponds to *S. enterica* serovar Typhimurium. Clearance rates of 47% at 5 minutes and 58% at 10 minutes were obtained. $R^2 = 0.8989$ was obtained on the semilogarithmic scale, giving the equation:

$$Y = -0.041 X + 4.859$$

FIGURA 4. Cinética de depuración de *S. enterica* serovar Typhimurium.

FIGURE 4. kinetic clearance of *S. enterica* serovar Typhimurium.



En la Figura 5 se presentan los datos obtenidos con *L. monocytogenes*. Se registraron tasas de depuración de 67% (5 minutos) y 92% (10 minutos). La escala semilogarítmica generó una recta ($R^2 = 1.0000$), con la siguiente ecuación:

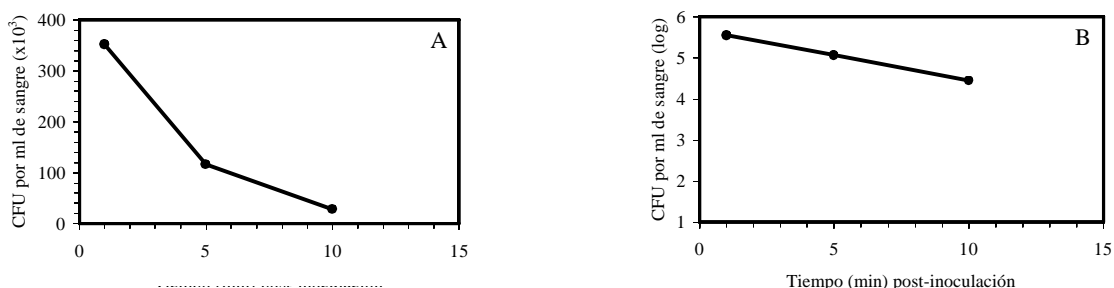
$$Y = -0.122 X + 5.671$$

Figure 5 shows the data obtained for *L. monocytogenes*. Clearance rates of 67% at 5 minutes and 92% at 10 minutes were recorded. The semilogarithmic scale gave a straight of ($R^2 = 1.0000$), with the following equation:

$$Y = -0.122 X + 5.671$$

FIGURA 5. Cinética de depuración de *L. monocytogenes*

FIGURE 5. Kinetic clearance of *L. monocytogenes*

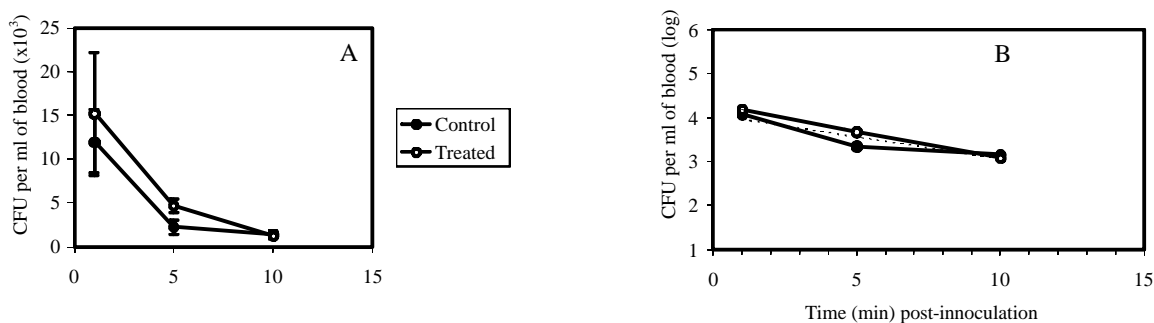


El estudio comparativo de los diferentes microorganismos de prueba presenta unas tasas de depuración, a 5 y 10 minutos, de rangos similares para *C. albicans*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. *M. luteus* fue muy sensible a la fagocitosis in vivo, siendo eliminado ya en un 98% a los 5 minutos de la inoculación: por este motivo, la regresión en la gráfica semilogarítmica no fue aceptable. Por el contrario, *S. enterica* serovar Typhimurium demostró una notable resistencia a la depuración, ya que la tasa a 10 minutos fue inferior incluso a las tasas a 5 minutos de los otros microorganismos.

The comparative study of the different test microorganisms presented clearance rates at 5 and 10 minutes within similar ranges for *C. albicans*, *E. coli* and *L. monocytogenes*. *M. luteus* was found to be sensitive to in vivo phagocytosis, eliminated to the degree of 98% at 5 minutes after inoculation: consequently, regression on the semilogarithmic graph was not acceptable. Conversely, *S. enterica* serovar Typhimurium showed noteworthy resistance to clearance, given that the rates obtained at 10 minutes were even lower than those obtained at 5 minutes from other microorganisms.

FIGURA 6. Efecto del tratamiento con Azitromicina durante 10 días en la cinética de depuración de *C. albicans*

FIGURE 6 Effect of Azithromycin treatment for 10 days on kinetic clearance of *C. albicans*.



Entre los tres microorganismos con un comportamiento aceptable, la levadura *C. albicans* fue seleccionada para la segunda parte del trabajo, ya que su condición de célula eucariota le hace resistente a la mayoría de los agentes antibacterianos a ensayar como BRMs. Se realizaron, pues, ensayos de depuración de *C. albicans* en ratones tratados con

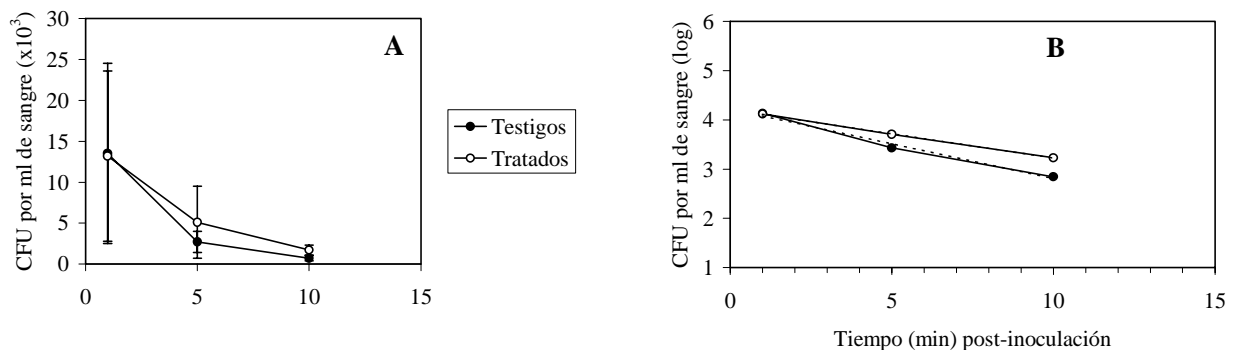
Of the three microorganisms that present acceptable behaviour, the yeast *C. albicans* was chosen for the second part of the study, given that as a eukaryotic cell, it is resistant to most antibacterial agents to be tested as BRMs. Clearance test with *C. albicans* were therefore carried out in mice treated with azithromycin for 10 and 20 days. The results

azitromicina durante 10 y 20 días. Los resultados de las determinaciones tras 10 días se presentan en la Figura 6. El tratamiento con el antimicrobiano no afectó a las rectas de regresión: los valores promedio de R^2 fueron 0.907 ± 0.1092 , para los animales testigos, y 0.997 ± 0.0017 para los tratados (diferencias no significativas). Sin embargo, la tasa de depuración en los primeros 5 minutos fue significativamente mayor en los animales testigos (81%) que en los tratados (65%) ($P < 0.05$). Por tanto, el tratamiento con azitromicina durante 10 días retardó la cinética de depuración de *C. albicans*, aunque a los 10 minutos las diferencias perdieron la significación.

obtained after 10 days are presented in Figure 6. Antimicrobial treatment did not affect the straight lines of regression: the average values for R^2 were 0.907 ± 0.1092 , for control and 0.997 ± 0.0017 for treated animals (no significant difference). However, clearance rates within the first 5 minutes were significantly higher in control (81%) than in treated animals (65%) ($P < 0.05$). Therefore, azithromycin treatment over a period of 10 days delayed kinetic clearance of *C. albicans*, even though at 10 minutes, significant differences were not apparent.

FIGURA 7. Efecto del tratamiento con Azitromicina durante 20 días en la cinética de depuración de *C. albicans*.

FIGURE 7. Effect of Azithromycin treatment for 20 days on kinetic clearance of *C. albicans*



A los 20 días de tratamiento con azitromicina, tampoco se registraron diferencias significativas entre las rectas de regresión, con valores de R^2 de 0.987 ± 0.0141 para los animales testigos y 0.999 ± 0.0346 para los tratados (Figura 7). En cuanto a las tasas de depuración, también aquí, a los 5 minutos, fue mayor el promedio de los animales testigos (80%) que el de los tratados (61%), si bien la dispersión de los datos impidió llegar a diferencias significativas.

After 20 days of azithromycin treatment, no significant differences among the straight lines of regression were observed. R^2 values of 0.987 ± 0.0141 for control animals and 0.999 ± 0.0346 for treated animals were obtained (Figure 7). Similarly, with regard to clearance rates, at 5 minutes the highest averages were obtained for control animals (80%) in comparison with treated animals (61%). However, the dispersion of data did not produce significant differences.

4. DISCUSIÓN

La depuración de carbón coloidal se ha utilizado desde hace años como una medida de la capacidad funcional del sistema fagocítico-mononuclear^{11,12}, y sigue recurriéndose a ella en la actualidad^{13,14}. Algunos trabajos han mostrado una correlación entre este paráme-

4. DISCUSSION

The clearance of colloidal carbon has been used for many years as a measure of the functional capacity of the phagocytic-mononuclear system^{11,12}, and is still being used today^{13,14}. Some studies have shown a correlation between this parameter and the resistance to ex-

tro y la resistencia a infecciones experimentales por bacterias y levaduras¹⁵. Sin embargo, el uso de microorganismos vivos constituye una aproximación más representativa de la capacidad defensiva real del organismo.

La inmunidad innata se basa en la capacidad de determinadas células y moléculas para reconocer estructuras comunes a amplios grupos de microorganismos, denominadas PAMPs («pathogen-associated molecular patterns»)¹⁶. Se han identificado diversos PAMPs en la superficie microbiana: la mureína bacteriana, el lipopolisacárido (LPS) y las lipoproteínas de bacterias Gram-negativas, los ácidos lipoteicoicos (bacterias Gram-positivas), los lipoarabinomananos de micobacterias, el zimósán de levaduras, los glicoinositolfosfolípidos de *Trypanosoma cruzi*, son diversos ejemplos de PAMPs superficiales¹⁷. La interacción de los PAMPs de la superficie microbiana con sus receptores (PRRs, «pattern recognition receptors») tiene gran importancia en la fagocitosis. Algunos PRRs están ubicados en la superficie de células fagocíticas, e intervienen en la unión de microorganismos como paso previo a la fagocitosis. Otros PRRs residen en moléculas plasmáticas, pertenecientes a sistemas como el complemento, que se activan en presencia de microorganismos, liberando opsoninas que facilitan la fagocitosis. Este tipo de interacciones no se pueden reproducir con partículas inertes. Sin embargo, una limitación inherente al uso de microorganismos es la posible interferencia de anticuerpos con capacidad opsonizante, que podrían estar presentes en algunos animales previamente al ensayo, como consecuencia de contactos subclínicos o de reacciones cruzadas con antígenos ambientales. Esta limitación debe ser considerada cuando se trabaja con microorganismos ubicuos como *E. coli*¹⁸.

No hay antecedentes en la bibliografía sobre la comparación de la depuración in vivo de patógenos extra- e intracelulares. Nuestros datos muestran divergencia entre las dos bacterias intracelulares ensayadas, *L. monocytogenes* y *S. enterica* serovar Typhimurium. La depuración de *L. monocytogenes* fue similar a la de *E. coli*, mientras que *S. enterica* serovar Typhimurium reveló una notable resistencia a la depuración. Ambos patógenos intracelulares se caracterizan por su capacidad para sobre-

peramental infections produced by bacteria and yeast¹⁵. However, the use of live microorganisms constitutes a more representative approach to the determination of an organism's defence capacity.

Innate immunity is based on the capacity of determined cells and molecules to recognise common to wide ranging groups of microorganisms, known as PAMPs («pathogen-associated molecular patterns»)¹⁶. Numerous PAMPs have been identified on the microbial surface: the murine bacteria, the lipopolysaccharides (LPS) and the lipoproteins of Gram-negative bacteria, lipoteichoic acids (Gram-positive bacteria), lipoarabinomannan from mycobacterium, zymosan from yeasts, glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*, are numerous examples of superficial PAMPs¹⁷. The interaction between PAMPs and the microbial surface and their receptors (PRRs, «pattern recognition receptors») is highly important in phagocytosis. Some PRRs are situated on the surface of phagocytic cells, and have a part to play in the binding of microorganisms prior to phagocytosis. Other PRRs reside in the plasmatic molecules, belonging to such systems as the complement, which are activated in the presence of microorganisms, liberating opsonins, which facilitate phagocytosis. These types of interactions cannot be reproduced with inert particles. However, an inherent limitation in the use of microorganisms is the possible interference from antibodies possessing opsonizing capacity, which could be present in some animals before testing, due to sub clinical contact or crossed reactions with environmental antigens. This limitation should be considered when working with ubiquitous microorganisms such as *E. coli*¹⁸.

There are no bibliographical precedents on the comparison between in vivo clearance of extra and intracellular pathogens. Our data shows differences between the two intracellular bacteria tested, *L. monocytogenes* and *S. enterica* serovar Typhimurium. The clearance of *L. monocytogenes* was similar to that of *E. coli*, while *S. enterica* serovar Typhimurium showed a noteworthy resistance to clearance. Both intracellular pathogens are characterised by their survival capacity inside macrophages, except when activated by cyto-

vivir en el interior de macrófagos, excepto cuando estos están activados por acción de citokinas. En principio, esta resistencia no debiera afectar a la cinética de depuración, es decir, a la capacidad de los macrófagos fijos de bazo e hígado para retirar bacterias de la sangre por fagocitosis, aunque las bacterias intracelulares sobrevivirían en ambos órganos, donde podrían proliferar y formar abscesos. Sin embargo, en el caso de *S. enterica* serovar Typhimurium, parece que existe algún factor de virulencia adicional, que permite a la bacteria evitar la fagocitosis. Este factor podría ser la naturaleza de la cadena O del LPS, ya que se ha descrito que una cepa de *S. enterica* serovar Typhimurium con un polisacárido O capaz de activar eficientemente la vía alternativa del complemento, es eficazmente depurada de la sangre, en comparación con otra cepa cuya cadena O no es eficiente en la activación del complemento, siendo esta última más virulenta¹⁹. Podemos concluir que la depuración por fagocitosis in vivo se ve influenciada por factores de virulencia concretos (como la naturaleza del LPS en el caso de bacterias Gram-negativas) en mayor extensión que por la condición de patógenos extra- o intracelulares o la estructura de la pared (definida por la tinción de Gram).

La elección de *C. albicans* para medir el efecto BRM de la azitromicina se basó en los datos de cinética de depuración, así como en su resistencia frente a este agente antibacteriano, in vitro²⁰ e in vivo^{21,22}.

La azitromicina ha sido utilizada en tratamientos de larga duración, en enfermos de fibrosis quística (al menos 3 meses) y panbronquiolitis difusa (al menos 6 meses), con buenos resultados clínicos atribuibles, al menos en parte, a sus efectos antiinflamatorios²³. Sin embargo, no hay suficientes evidencias experimentales que soporten claramente esta hipótesis, dada la escasez de estudios sobre actividad BRM en este tipo de tratamientos.

Al igual que otros macrólidos, la azitromicina se concentra notablemente en el interior de los fagocitos²⁴, pero no hay concordancia respecto a los posibles efectos de esta acumulación en las funciones fagocíticas. Los distintos parámetros medidos en cada caso pueden ser responsables de estas discrepancias. La medida de quimioluminiscencia en neutró-

kins. In principle, this resistance should not affect clearance kinetics, that is to say, the capacity of fixed macrophages in the spleen and liver to withdraw bacteria from blood through phagocytosis. However, these intracellular bacteria would survive in both organs, where they could proliferate and form abscesses. However, in the case of *S. enterica* serovar Typhimurium, an additional virulence factor seems to exist, which allows the bacteria to avoid phagocytosis. This factor could be attributed to the nature of the LPS O chain, given that a strain of *S. enterica* serovar Typhimurium with an O polysaccharide that is capable of efficiently activating the alternative complement pathway, is efficiently cleared from blood in comparison with a strain whose O chain does not efficiently activate the complement, with the last of these being the most virulent¹⁹. In conclusion, it can be said that clearance through in vivo phagocytosis is influenced to a greater extent by concrete virulence factors (such as the nature of the LPS in the case of Gram-negative bacteria), rather than the extra or intracellular nature of pathogens or the structure of the wall (defined by Gram staining).

The decision to use *C. albicans*, as a means to measuring the effect of BRM of azithromycin, was based on kinetic clearance data, as well as its resistance to this antibacterial agent in both in vitro²⁰ and in vivo^{21,22} conditions.

Azithromycin has been used in long term treatment for patients presenting cystic fibrosis (at least 3 months) and diffuse panbronchiolitis, (at least 6 months), with good clinical results that may be attributable, at least in part, to its antiinflammatory effects²³. However, there is insufficient experimental evidence to clearly support this hypothesis, given the scarcity of studies carried out on the role of BRM activity in this type of treatment.

As in the case of other macrolides, azithromycin is concentrated to a noticeable degree within the interior of phagocytes²⁴. However, there is no agreement as to the possible effects of such an accumulation on phagocytic functions. The differing parameters measured in each case may be responsible for these discrepancies. Chemiluminescence in human neutrophils was not altered by azithromycin treatments in ex vivo^{20,25} and in vitro²⁵ tests.

filos humanos no se alteró por tratamientos con azitromicina en ensayos *ex vivo*^{20,25} e *in vitro*²⁵. En cambio, se ha descrito un efecto supresor del antibiótico *ex vivo* en la incorporación de bacterias fluorescentes medida por citometría de flujo²⁶ y una modulación de los perfiles de citocinas en ensayos *in vitro*, con inhibición de la respuesta de células T «helper» 1 e inducción de la respuesta de T «helper» 2²⁷. Por el contrario, la azitromicina potenció la fagocitosis y la capacidad microbicida de la línea de macrófagos J774.1²⁸, y su administración a enfermos tratados con ciclosporina mejoró la actividad fagocítica dañada por este agente inmunosupresor²⁹. Recientemente, se ha sugerido que el tratamiento con azitromicina podría tener un efecto bifásico, consistente en una inmunoestimulación a corto plazo, seguida de la inhibición de la respuesta inflamatoria⁹. Este efecto antiinflamatorio ha sido confirmado experimentalmente: el tratamiento de ratones con azitromicina durante 4 semanas inhibió significativamente los niveles plasmáticos de citocinas proinflamatorias (factor necrosante de tumores alfa, interleukina 1 beta, interleukina 6) y óxido nítrico³⁰. Dado que la respuesta inflamatoria se asocia con una estimulación de la depuración de bacterias en sangre³¹, el efecto antiinflamatorio de la azitromicina en tratamientos de larga duración estaría en concordancia con la depresión de la depuración manifestada en nuestros resultados.

En conclusión, la cinética de depuración de *C. albicans* inoculada por vía intravenosa es un ensayo apropiado para medir los posibles efectos de agentes antimicrobianos sobre la fagocitosis *in vivo*. Su aplicación al estudio de la actividad BRM del macrólido azitromicina ha mostrado que el tratamiento durante 10 y 20 días con este antibiótico ejerce un efecto inhibitorio sobre la capacidad de depuración del sistema fagocítico-mononuclear.

AGRADECIMIENTOS

K. Alkouwatli manifiesta su agradecimiento al Ministerio de Enseñanza Superior de Siria, por la financiación de su estancia de investigación en la Universidad de Granada. Los autores agradecen su colaboración al Dr. A. Mar-

Conversely, a suppressing effect of the *ex vivo* antibiotic on fluorescent bacteria measured through flow cytometry, and a modulation of the cytokin profiles in *in vitro* tests has been described²⁶. This produced the inhibition of the T «helper» 1 response and the induction of the T «helper» 2 response²⁷. On the other hand, azithromycin promoted phagocytosis and microbicidal capacity of the macrophage line J774.1²⁸, and its administration in patients treated with cyclosporin enhanced phagocytic activity damaged by this immunosuppressing agent²⁹. It has been recently suggested that azithromycin treatment could have a biphasic effect, which would consist of short term immunostimulation, followed by the inhibition of the inflammatory response⁹. This antiinflammatory effect has been confirmed experimentally: Azithromycin treatment in mice over a period of 4 weeks was found to significantly inhibit plasmatic levels of proinflammatory cytokins (tumour necrosis factor alfa, interleukin 1 beta, interleukin 6) and nitric oxide³⁰. Given that inflammatory response is associated with the stimulation of blood bacteria clearance³¹, the antiinflammatory effect of azithromycin in long term treatments would be consistent with the decrease in clearance found in our results.

In conclusion, the kinetic clearance of intravenously inoculated *C. albicans* is an appropriate test for the measurement of the possible effects of antimicrobial agents on *in vivo* phagocytosis. Its application to the study of BRM activity of the macrolid azithromycin has shown that treatment over a period of 10 and 20 days with this antibiotic exerts an inhibitory effect on clearance capacity of the phagocytic mononuclear system.

ACKNOWLEDGEMENTS

K. Alkouwatli would like to thank the Ministry of Higher Education of Syria for the financing of his research at the University of Granada. The authors would like to thank Dr. A. Martínez-Brocal for his collaboration. This research work has been financed by Aid for Year on Year Activity awarded by the Department for Innovation, Science and Business of the Junta de Andalusia to the CVI201 group.

ténez-Brocal. La investigación ha sido financiada por la Ayuda para la Actividad Interanual concedida por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía al Grupo CVI201.

BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Brown GD, Gordon S. Phagocytes and anti-infective immunity. In: Kaufmann SHE, Sher A, Ahmed R, eds. Immunology of infectious diseases. Washington DC: ASM Press. 2002; 79-91.
2. Unanue E. Interactions of pathogens with the innate and adaptive immune system. In: Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R, eds. Cellular microbiology. Washington DC: ASM Press. 2000; 291-311.
3. Kim SJ, Gershov D, Ma X, Brot N, Elkon KB. Opsonization of apoptotic cells and its effect on macrophage and T cell immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 987: 68-78.
4. Rosenzweig SD, Holland SM. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113: 620-626.
5. Roth JA. Enhancement of nonspecific resistance to bacterial infection by biological response modifiers. In: Roth JM, ed. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. Washington DC: ASM Press. 1988; 329-342.
6. Jimenez-Valera M, Moreno E, Ruiz-Bravo A. Immunomodulation by antimicrobial agents. *Recent Res Devel Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 2: 83-94.
7. Labro MT. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or «immuno-fairy tales»? *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 615-650.
8. Labro MT, Abdelghaffar H. Immunomodulation by macrolide antibiotics. *J Chemother.* 2001; 13: 3-8.
9. Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides. An underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55: 10-21.
10. Hatipoglu U, Rubinstein I. Low-dose, long-term macrolide therapy in asthma: an overview. *Clin Mol Allergy* 2004; 2: 1-4.
11. Dicarlo F.J., O'Driscoll RG, Haynes LJ, Sliver NJ, Steinetz BG. Acceleration of intravascular carbon clearance in mice by inhaled endotoxin. *Can J Biochem Physiol.* 1963; 41: 2034-2037.
12. Lightfoot RW Jr, Garfein GR, Christian CL. The effect of steroids on the clearance and fate of bacteria. *J Reticuloendothel Soc.* 1968; 5: 340-352.
13. Jayathirtha MG, Mishra SH. Preliminary immunomodulatory activities of methanol extracts of *Eclipta alba* and *Centella asiatica*. *Phytomedicine.* 2004; 11: 361-365.
14. Shin KH, Lim SS, Lee S, Lee YS, Jung SH, Cho SY. Anti-tumour and immuno-stimulating activities of the fruiting bodies of *Paecilomyces japonica*, a new type of *Cordyceps* spp. *Phytother Res.* 2003; 17: 830-833.
15. Fraser-Smith EB, Waters RV, Matthews TR. Correlation between in vivo anti-*Pseudomonas* and anti-*Candida* activities and clearance of carbon by the reticuloendothelial system for various muramyl dipeptide analogs, using normal and immunosuppressed mice. *Infect Immun.* 1982; 35: 105-110.
16. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20: 197-216.
17. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21: 335-376.
18. Young DA, Dobson P, Karakawa WW. Immunological specificity of natural opsonins and their role in the cross-reactivity between *Staphylococcus aureus* Mardi and *Escherichia coli* 101. *Infect Immun.* 1979; 25: 954-959.
19. Liang-Takasaki CJ, Saxen H, Makela PH, Leive L. Complement activation by polysaccharide of lipopolysaccharide: an important virulence determinant of salmonellae. *Infect Immun.* 1983; 41: 563-569.
20. Tomazic J, Maticic M, Kotnik V, Simcic S, Wraber B, Zakotnik B. Ex vivo effect of azithromycin in human leukocyte bactericidal functions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39: 1906.
21. Matute AJ, Schurink CAM, Krijnen RMC, Florijn A, Rozenberg-Arska M, Hoepelman IM. Double-blind, placebo-controlled study comparing the effect of azithromycin with clarithromycin on oropharyngeal and bowel microflora in volunteers. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2002; 21: 427-431.
22. Samonis G, Maraki S, Anatoliotakis N, Anatoliotaki M, Apostolakou H, Margioris AN, et al. Effects of erythromycin, clarithromycin, roxithromycin and azithromycin on murine gut colonization by *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2002; 40:139-142.
23. Schoni MH. Macrolide antibiotic therapy in patients with cystic fibrosis. *Swiss Med Wkly.* 2003; 133: 297-301.
24. Wildfeuer A, Laufen H, Zimmermann T. Uptake of azithromycin by various cells and its intracellular activity under in vivo conditions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 75-79.
25. Bonnet M, Van de Auwera P. In vitro and in vivo intraleukocytic accumulation of azithromycin (CP-62, 993) and its influence on ex vivo leukocyte chemiluminescence. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36: 1302-1309.
26. Wenisch C, Parschalk B, Zedtwitz-Liebenstein K, Weihs A, El Menyawi I, Graninger W. Effect of single oral dose of azithromycin, clarithromycin, and roxithromycin on polymorphonuclear leukocyte function assessed ex vivo by flow cytometry. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40: 2039-2042.

27. Ortega E, Escobar MA, Gaforio JJ, Algarra I, Alvarez de Cienfuegos G. Modification of phagocytosis and cytokine production in peritoneal and splenic murine cells by erythromycin A, azithromycin and josamycin. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 367-370.
28. Xu G, Fujita J, Negayama K, Yuube K, Hojo S, Yamaji Y et al. Effect of macrolide antibiotics on macrophage functions. *Microbiol Immunol.* 1996; 40: 473-479.
29. Paik JW, Kim CS, Cho KS, Chai JK, Kim CK, Choi SH. Inhibition of cyclosporin A-induced gingival overgrowth by azithromycin through phagocytosis: an in vivo and in vitro study. *J Periodontol.* 2004; 75: 380-387.
30. Terao H, Asano K, Kanai K, Kyo Y, Watanabe S, Hisamitau T, Suzaki H. Suppressive activity of macrolide antibiotics on nitric oxide production by lipopolysaccharide stimulation in mice. *Mediators Inflamm.* 2003; 12: 195-202.
31. Noursadeghi M, Bickerstaff MC, Herbert J, Moyes D, Cohen J, Pepys MB. Production of granulocyte colony-stimulating factor in the nonspecific acute phase response enhances host resistance to bacterial infection. *J Immunol.* 2002; 169: 913-919.