

ENSAYO DE VACUNAS INACTIVADAS EXPERIMENTALES CONTRA EL ABORTO ENZOÓTICO OVINO UTILIZANDO RATONES RESISTENTES A LA INFECCIÓN POR *CHLAMYDOPHILA ABORTUS*

Clinical trial of several experimental inactivated vaccines against enzootic ovine abortion in resistant mice infected with *Chlamydophila abortus*

N. Ortega¹, A.J. Buendía², J. Salinas^{1,*}

Departamento de Sanidad Animal,¹ y
Departamento de Histología y Anatomía Patológica,²
Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia,
Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

* Correspondencia a: J. Salinas.

Teléfono: 34 968 364729. Fax: 34 968 364147. E-mail: jsalinas@um.es

RESUMEN

El aborto enzoótico ovino (AEO), cuyo agente etiológico es *Chlamydophila abortus*, es la principal causa de aborto en los pequeños rumiantes en España. Para su control existen en el mercado dos tipos de vacunas: inactivadas y atenuada. Las vacunas inactivadas sólo son capaces de proteger de manera limitada ya que, aunque pueden evitar la aparición de abortos en el rebaño, no impiden la excreción del microorganismo durante el parto. La vacuna atenuada es una vacuna viva y, aunque ofrece mejores resultados que las inactivadas, su uso entraña un riesgo tanto para los animales vacunados como para el veterinario o ganadero. En este estudio se evalúa y compara el nivel de protección que confieren cinco vacunas inactivadas diseñadas experimentales, asociadas con diferentes adyuvantes como son el Hidróxido de Aluminio, las saponinas QS-21 y GPI 0100, y los Montanide ISA 773 e ISA 35, utilizando la línea de ratones C57BL/6Ha (H-2^b), con conocida resistencia a la infección por *C. abortus* y que se emplean como un excelente modelo para los estudios de respuesta inmune contra este patógeno. Para ello se observaron las lesiones que provocaron en el lugar de inoculación, el porcentaje de pérdida de peso que experimentaban los animales desde su infección al sacrificio, la carga bacteriana presente en el hígado y la presencia de IFN-g e IgG totales en suero. Todos los parámetros analizados demuestran que son el adyuvante oleoso Montanide ISA 773 y el derivado purificado de la saponina QS-21, los que mejores resultados mostraron en cuanto al nivel de protección inducido por la vacuna asociada a los mismos.

Palabras clave: *Chlamydomphila abortus*, aborto enzoótico ovino, vacunas inactivadas, adyuvantes, protección

SUMMARY

Ovine enzootic abortion (OEA), which is caused by *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci*, serotype 1) is the main cause of abortion in small ruminants. There are two types of commercially available vaccines for the control of this disease: inactivated vaccines and attenuated vaccine. Inactivated vaccines are avoid abortions in the flock, but some shedding of the microorganism is still detectable during labour. The attenuated vaccine is a live vaccine, so its use implies some danger for the veterinary and stockbreeder, and also may be reactivated in the vaccinated animals. For the present study we used a mouse model C57BL/6Ha (H-2^b), experimentally showed to be resistant to the infection with *C. abortus*. We have designed five experimental inactivated vaccines against OEA associating the inactivated bacteria to different adjuvants like Alum Hydroxyl, QS-21, GPI-0100, Montanide ISA773 and Montanide ISA35. The protection conferred by these vaccines has been analysed. In order to determine which was the most effective, we have evaluated several parameters: inoculation site lesions, percentages of weight loss, bacterial recovery from liver, and IFN-g and IgG production in sera at 4 days post-infection. The best protection was shown using the QS-21 and Montanide 773 experimental vaccines.

Key Words: *Chlamydomphila abortus*, ovine enzootic abortion, inactivated vaccines, adjuvants, protection.

INTRODUCCIÓN

El aborto enzoótico ovino (AEO), cuyo agente etiológico es *Chlamydomphila abortus* (anteriormente *Chlamydia psittaci*, serotipo 1), es en la actualidad la principal causa de aborto en los pequeños rumiantes en nuestro país (Uriarte Fraile y Gil Berduque, 1999), acarreando importantes pérdidas económicas en el sector ganadero ovino y caprino. Esta enfermedad está presente donde quiera que se exploten estas especies y donde su comercio tenga cierta entidad. *C. abortus* es una bacteria parásita intracelular obligada de numerosas células eucariotas, teniendo especial tropismo por las células de la placenta. Las hembras susceptibles se infectan al estar en contacto con las membranas fetales y descargas vaginales de las hembras que abortan, permaneciendo como portadoras latentes de la infección hasta la siguiente gestación en la que pueden aparecer abortos en los últimos estadios de la gestación, nacidos débiles que mueren a los pocos días, retenciones placentarias e infertilidad (Rodolakis et al., 1998).

El control de esta enfermedad no sólo es importante desde el punto de vista de la sanidad animal, sino también para prevenir su contagio al hombre, ya que se ha demostrado el carácter zoonótico de dicha infección (Buxton et al., 1986). La medida de control más aconsejada en esta enfermedad es la vacunación. Las vacunas inactivadas, comercializadas actualmente en varios países europeos, incluida España, confieren una protección limitada (Caro et al., 2001) y no impiden la eliminación del microorganismo durante el parto. No obstante, estas vacunas pueden ser capaces de promover una cierta protección residual, protección que puede ser adecuada en rebaños de pequeños rumiantes vacunados, siempre y cuando la carga clamidial presente en el rebaño sea baja. Sin embargo, cuando la carga bacteriana en el rebaño es alta, la protección inducida es demasiado débil para evitar la aparición de signos clínicos, apareciendo los abortos. Esto explica el porqué proporcionan las vacunas inactivadas un resultado tan irregular, existiendo brotes de aborto enzoótico

en rebaños vacunados (Aitken et al., 1990). La vacunación con una cepa atenuada de *C. abortus* (Rodolakis y Souriau, 1983; Chalmers et al., 1997) mejora el nivel de protección, pero, puesto que se trata de una vacuna viva, el daño potencial que entraña el uso de esta vacuna hace que sea una solución menos atractiva. Además, la reciente identificación de nuevas cepas con estructura antigénica distinta a la cepa vacunal (Vretou et al., 2001), ha hecho que esta vacuna pueda ser menos efectiva. La búsqueda de una nueva vacuna atenuada resultaría un trabajo arduo y difícil, ya que de nuevo debería conseguirse una cepa mutante hipovirulenta que protegiera frente a todas las cepas identificadas de *C. abortus*, y aun cuando se hubiera obtenido, sería muy probable que siguieran apareciendo nuevas cepas con determinantes antigénicos distintos. Sin embargo, sería mucho más sencillo añadir cepas de nueva descripción y antigénicamente diferentes a una vacuna polivalente ya existente y eficaz, inactivada y adyuvada, cuyo proceso de elaboración es relativamente más sencillo, sin tener que recurrir al costoso proceso de selección de mutantes. Igualmente el empleo de vacunas subcelulares no ha dado, hasta el momento, los resultados esperados (Entrican et al., 2001), ni tampoco los ensayos realizados con vacunas ADN (Hechard et al., 2002; 2003). Por ello, las nuevas estrategias vacunales van dirigidas hacia el empleo de nuevos adyuvantes asociados a vacunas inactivadas, que potencien el desarrollo de una respuesta inmune adecuada para evitar la infección y posterior excreción de *C. abortus* (Caro et al., 2003).

El modelo murino es una herramienta sencilla y económica para el estudio de la infección por *C. abortus*. En animales no gestantes, la infección experimental de los ratones provoca un síndrome febril y una multiplicación de *C. abortus* en órganos internos como bazo e hígado. La infección es controlada rápidamente tras una o dos semanas, según la línea de ratón utilizada (Del Río et al., 2000). Por las similitudes encontradas entre los pequeños rumiantes y el

modelo de infección experimental, los resultados obtenidos con el modelo murino pueden extrapolarse a lo que ocurre en el hospedador definitivo; por ello ha sido ampliamente utilizado en estudios sobre patogénesis (Sánchez et al., 1996; Buendía et al., 1998), respuesta inmune (Buendía et al., 1999b; 2002; Montes de Oca et al., 2000; Del Río et al., 2000; 2001) y en estudios de nuevas vacunas experimentales subcelulares (De Sa et al., 1995). También este modelo ha sido utilizado para analizar el grado de protección que confieren las vacunas disponibles comercialmente (Caro et al., 2001) o las nuevas vacunas inactivadas experimentales (Caro et al., 2003).

En anteriores trabajos sobre vacunas inactivadas contra el aborto enzoótico (Caro et al., 2001; 2003) en los que se estudiaron adyuvantes, se utilizó como modelo experimental la línea de ratones CBA/JHa (H-2^k), que se caracteriza por su marcada sensibilidad frente a la infección con *C. abortus* (Del Río et al., 2000). En este estudio, en cambio, hemos utilizamos una línea de ratones (C57BL/6Ha (H-2^b)), considerada como una de las más resistentes frente a *C. abortus* (Del Río et al., 2000). Esta línea de ratones tiene la ventaja de disponer de ratones transgénicamente modificados, deficientes por ejemplo en IL-12 (Del Río et al., 2001), o que carecen genéticamente de linfocitos B que sean funcionales (Buendía et al., 2002), lo que permite comparar animales transgénicos con la cepa salvaje (C57BL/6). Esto nos abre las puertas a futuros estudios en los que no sólo se compararán distintas vacunas inactivadas experimentales, sino que nos permitirá determinar el papel que desempeñan las distintas poblaciones celulares y las citoquinas que éstas producen, al comparar distintos tipos de adyuvantes.

Por ello, en el presente estudio hemos utilizado cinco adyuvantes: el Hidróxido de Aluminio, que es un adyuvante de naturaleza mineral, y además es el más frecuentemente utilizado en las vacunas inactivadas frente al AEO; el QS-21 y el GPI 0100, de reciente aparición, ambos son

derivados sintéticos de la saponina, y los Montanide ISA773 e ISA 35 de naturaleza oleosa, todo ello con objeto de evaluar el nivel de protección inducido en ratones C57BL/6.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembras de la línea C57BL/6Ha (H-2^b) (Harlan, Backthorn, UK). A la llegada de los animales al laboratorio, se encontraban libres de patógenos, según los controles rutinarios realizados por la empresa proveedora. Una vez en nuestro laboratorio se mantuvieron aislados y a una temperatura de 23°C, hasta su sacrificio.

Microorganismo

Los animales se infectaron con la cepa AB7 de *C. abortus*, aislada a partir de un aborto ovino (Salinas et al., 1995). La bacteria, para su propagación, se cultivó en saco vitelino de embrión de pollo, se tituló en función del número de unidades formadoras de inclusión (UFI) sobre células McCoy, como describen Buendía et al. (1999a), se alicuotó y se congeló a -80°C, hasta el momento de su utilización. Cada ratón fue infectado mediante una inoculación intraperitoneal con una dosis de 10⁶ UFI de *C. abortus* en un volumen de 0,2 ml de tampón fosfato salino (PBS) 0,1 M, pH 7,2.

Producción de antígeno vacunal

La producción del antígeno destinado a la elaboración de las vacunas se realizó mediante el cultivo de la bacteria sobre la línea celular McCoy, como describieron Salinas et al. (1994), con algunas modificaciones. Esta técnica consiste en diluir el inóculo con *C. abortus* a una concentración de 10⁷ UFI/ml en un tampón de PBS, con 100 µg/ml de dietilaminoetil dextrano

(DEAE-D) (Fluka Biochemika, Busch, Suiza), que se añade a un cultivo de células McCoy y se incuba durante 2 horas a 37°C, posteriormente se centrifuga a 840 x g durante 30 min. Terminada la centrifugación, se lava suavemente con PBS y se añade ciclohexamida (Sigma, Madrid, España) a una concentración final de 2 µg/ml en Medio Mínimo Esencial de Eagle (Gibco, Paisley, Escocia) suplementado con 10% de suero fetal bovino, 200 mM de L-glutamina, 2,5 µg de fungizona y 10 µg de estreptomycin (todos los reactivos de Sigma). El cultivo se mantiene en una estufa a 37°C y 5% de CO₂ hasta el momento de la purificación. A los 6-7 días post-infección, se tripsinizaron las células y se mezclaron con un volumen igual de PBS, esta mezcla se sonicó, se centrifugó a 170 x g a 20°C durante 10 minutos, el sobrenadante se depositó sobre 8 ml de Urografin (Schering, Madrid, España) al 35% en tampón Tris-0,15 M KCl, pH 7,5, y se centrifugó durante 1 hora a 50.000 x g a 4 °C. El sedimento se diluyó con tampón Tris y se volvió a centrifugar a 50.000 x g durante 1 hora y a 4° C. El sedimento se resuspendió en PBS y se sonicó, para disgregar las bacterias. La concentración proteica se valoró usando el Kit del Ácido Bicinchoninico (BCA) (Sigma). Posteriormente se procedió a su inactivación mediante el método de la etilenimina binaria (BEI), tal y como se describe en Caro et al. (2003). La suspensión bacteriana se incubó con un 1,5% de BEI durante 24-48 horas a 37°C y con agitación constante. El BEI residual se neutralizó mediante adición de tiosulfato sódico a una concentración final de 0,15%.

Adyuvantes y elaboración de las vacunas

En este estudio se utilizaron adyuvantes de depósito de naturaleza oleosa, como el Montanide ISA773 y el Montanide ISA35 (cedidos por Seppic, Inc., Paris, Francia), un adyuvante de depósito de naturaleza mineral como Hidróxido de Aluminio (Rehydragel, Reheis, Dublin, Irlanda) y dos adyuvantes de

rivados de la saponina como son el QS-21, cedido por Antigenics Inc. (Framingham, USA) y el GPI-0100, cedido por Galenica Pharmaceuticals Inc. (Birmingham, USA). Todas las vacunas se prepararon bajo condiciones asépticas. La proporción a la que se utilizaron los adyuvantes con respecto a la suspensión antigénica fue distinta en cada uno de ellos. Así, en el caso del Montanide ISA35 y del Hidróxido de Aluminio esta proporción fue de 1:3, mientras que para los derivados de la saponina (QS-21 y GPI-0100) fue de 1:1. En este último caso, ambos adyuvantes fueron preparados en solución acuosa con una concentración de 75 mg/ml. Finalmente, la proporción del Montanide 773 con relación a la suspensión antigénica fue de 7:3. En todos los casos se procedió incorporando el adyuvante gota a gota, mientras el antígeno estaba en agitación, homogenizándose durante 10 minutos. La emulsión se mantuvo toda la noche a 4°C en agitación continua; posteriormente, la vacuna así preparada se conservó a 4°C, hasta su inoculación. También se preparó una vacuna con el antígeno diluido en PBS, para utilizarla como testigo. Todas las vacunas se utilizaron a una dosis de 200 µl/ratón, conteniendo 20 mg del antígeno por dosis.

Diseño experimental

Los ratones fueron distribuidos en ocho grupos, con un mínimo de 5 ratones por grupo. De estos ocho grupos, cinco se inmunizaron con las vacunas experimentales: Antígeno+Hidróxido de Aluminio (ALUM), Antígeno+QS-21 (QS-21), Antígeno+GPI-0100 (GPI), Antígeno+Montanide ISA773 (Mo773), Antígeno+Montanide ISA35 (Mo35); otro fue un grupo testigo inmunizado con el antígeno pero sin adyuvante (CH), un grupo testigo (TEST) no infectado ni vacunado y, por último, un grupo control de infección (CONT), en el que los ratones fueron inmunizados con PBS.

Los animales fueron vacunados subcutáneamente dos veces, con un intervalo de 12 días.

Un mes después de la última vacunación se infectaron intraperitonealmente con 10⁶ UFI de la cepa AB7 de *C. abortus*. El sacrificio se realizó anestesiando a los animales con CO₂, a los 4 días p.i., y se extrajo sangre mediante punción intracardiaca. Tras dejarla coagular, el suero fue recogido y conservado a -20°C, y posteriormente se analizó para la detección de anticuerpos y de IFN-γ en el estudio de la respuesta inmune. Durante la necropsia se extrajo a cada animal un lóbulo hepático, en condiciones estériles, que se pesó y se conservó a -80°C para realizar posteriormente el aislamiento y recuento de *C. abortus*.

Aislamiento de *C. abortus*

Se valoró la carga bacteriana presente en el hígado, mediante el recuento de UFI/g de muestra, sobre una monocapa de células Mc Coy, utilizando un microscopio de fluorescencia, según el método de Buendía et al. (1999a). El límite de detección se situó en 2,6 log UFI por muestra.

Detección de IFN-γ en suero

La detección de IFN-γ se realizó mediante un ELISA tipo sándwich. El anticuerpo de captura que se utilizó fue el R4-6A2, y el anticuerpo de detección biotinado fue el XMG1, ambos proceden de PharMingen (San Diego, USA). La biotina se detectó con estreptavidina conjugada con peroxidasa (PharMingen), y posteriormente un sustrato soluble, 2,2'-acino-bis(3-etilbentiazolina-6-ácido sulfónico) (ABTS) (Sigma). La densidad óptica se midió en un lector de placas Asys Hitech (DigiScan), a 405 nm.

Valoración de anticuerpos

Para valorar la producción de anticuerpos en suero se utilizó una técnica ELISA indirecta, empleando como antígeno bacterias semipurificadas obtenidas a partir de la cepa AB7 de *C.*

abortus, multiplicada en saco vitelino de huevos embrionados, una anti-inmunoglobulina de ratón unida a la peroxidasa como conjugado y ABTS como sustrato, tal y como se describe en Buendía et al. (2001).

Estudio estadístico

Con los datos obtenidos se calcularon las medias aritméticas de los valores correspondientes a los animales de cada grupo \pm desviación típica. Para comparar las mediciones entre grupos de ratones se aplicó un test *t* de Student a los datos obtenidos, considerando como diferencias significativas todos aquéllos con un valor de $P < 0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro estudio se evaluó el aspecto externo de los animales vacunados y una serie de parámetros para determinar el nivel de protección y la respuesta inmune que eran capaces de conferir las vacunas experimentales.

Reacciones cutáneas adversas

Los lugares de inmunización se palparon al menos una vez a la semana para detectar signos de dolor y examinar la reacción cutánea en el lugar de inmunización que presentaron algunos ratones. Tras el sacrificio se procedió a la necropsia de todos los ratones y se realizó un análisis macroscópico de los lugares de inmunización, no detectándose cambios clínicos ni lesiones macroscópicas en los ratones en los que se probaron los adyuvantes derivados de la saponina (QS-21 y GPI-0100), tampoco en el grupo inmunizado con el antígeno más el Montanide ISA35, ni en el grupo testigo inmunizado sólo con el antígeno. Sin embargo, en aquellos grupos en los que se utilizó como adyuvante el Hidróxido de Aluminio o el Montanide ISA773, los ratones presentaron unos nódulos de unos 5-8 mm de diámetro, que aparecieron 1 ó 2 sema-

nas post-vacunación, tanto en el primer como en el segundo lugar de inoculación. Tras su palpación, no se demostró que dichos nódulos causarían dolor a los animales que los presentaron. Tras la necropsia de dichos animales, pudimos apreciar en los ratones en los que se inyectó el Hidróxido de Aluminio la presencia de formaciones de color amarillo-blanquecino, adheridas al tejido conjuntivo subcutáneo, que al corte no exudaban líquido ni perdían su morfología. En el caso de los ratones vacunados con el Montanide ISA773, estos nódulos aparecieron adheridos de igual manera al tejido conjuntivo subcutáneo, pero en lugar de ser prominentes, como los que presentaron los ratones inmunizados con la vacuna que contenía el Hidróxido de Aluminio, eran alargados y con forma de gota, y a su corte exudaban un líquido blanquecino. Lesiones similares han sido descritas en ratones CBA/J inmunizados con estos mismos adyuvantes presentes, tanto en vacunas comerciales (Caro et al., 2001) como en vacunas experimentales (Caro et al., 2003).

Estas lesiones subcutáneas no constituyen un problema para la salud del animal vacunado, aunque no hay que olvidar que suele ser un inconveniente importante inherente a las vacunas inactivadas cuando se asocian a adyuvantes de depósito. Aunque en este trabajo estamos valorando vacunas experimentales, se considera un factor positivo, con vista a una vacuna que pudiera ser comercializada, aquélla que evite la aparición de reacciones cutáneas adversas. Esto se debe a que los ganaderos, y por extensión las casas farmacéuticas que comercializan una vacuna, van a preferir una vacuna que no ocasione ningún tipo de lesión en el lugar de inoculación, en lugar de aquélla que, aun cuando proteja de manera adecuada, provoque lesiones macroscópicas que muestren la canal menos atractiva para el consumidor.

Porcentaje de pérdida de peso

La pérdida de peso que experimentaron los ratones de los distintos grupos desde el día que

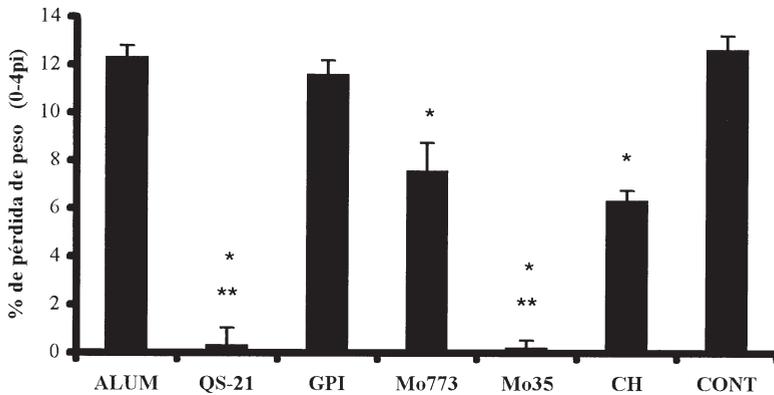


Figura 1: Pérdida de peso entre el día 0 y el día 4 p.i. de los diferentes grupos inmunizados e infectados, expresada en porcentaje. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección (CONT). ** Diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto al grupo vacunado sin adyuvante (CH).

fueron infectados (día 0) hasta el día en que se sacrificaron (día 4 p.i.) se expresó en porcentaje (Figura 1). Este parámetro sirve para medir la morbilidad de los ratones, detectándose que el grupo que mayores pérdidas de peso experimentó fue el grupo control (CONT), lo cual resulta lógico pues este grupo no había sido previamente inmunizado. Llama la atención la alta morbilidad de los ratones de los grupos ALUM y GPI, que sufrieron pérdidas de peso similares al grupo CONT, y significativamente mayores al grupo testigo CH, que se inmunizó con el antígeno pero sin ningún adyuvante. Este resultado pone de manifiesto que algunos adyuvantes no sólo no van a evitar o reducir la morbilidad causada tras la infección por *C. abortus*, sino que la aumentan en comparación con una vacuna sólo formulada con antígeno pero sin adyuvante, aportando un efecto más bien negativo que positivo sobre el efecto de la vacunación. El grupo de ratones Mo773 mostró una importante pérdida de peso, si bien ésta fue significativamente menor que la producida en el grupo CONT. Por último, cabe destacar los grupos QS-21 y Mo35, donde los ratones no sufrieron apenas pérdida de peso, tal y como

sucedió con el grupo testigo no vacunado ni infectado (TEST). Aparentemente estas dos vacunas experimentales lograron conseguir una morbilidad nula, y además mostraron diferencias significativas con respecto al grupo CH, demostrando que estos adyuvantes son capaces de potenciar la respuesta inmune, superando los resultados de morbilidad que ofrece una vacuna formulada con el antígeno pero sin ningún adyuvante.

Aislamiento de *C. abortus* en hígado

Para determinar la carga bacteriana en hígado de los ratones de los distintos grupos se realizó un aislamiento sobre células McCoy. Se observó que la carga bacteriana detectada el día 4 p.i. era significativamente menor en los ratones vacunados con las vacunas experimentales, en comparación con el grupo control no vacunado (Figura 2). Además, en los grupos QS-21 y Mo773 dicha carga fue significativamente menor al grupo testigo CH (inmunizado con el antígeno pero sin adyuvante), lo que de nuevo pone de manifiesto el papel de estos adyuvantes como potenciadores de la respuesta inmune. Los

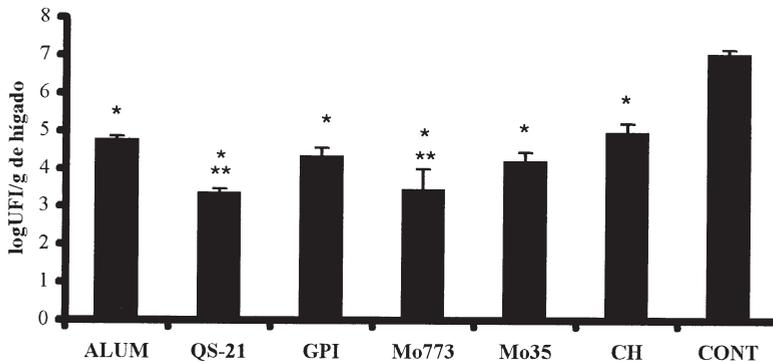


Figura 2: Aislamiento de *C. abortus* en hígado de los diferentes grupos inmunizados e infectados, expresado como el log de las unidades formadoras de inclusión (UFI) por gramo de hígado. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección (CONT). ** Diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto al grupo vacunado sin adyuvante (CH).

ensayos de vacunación realizados con ratones CBA/J muestran resultados semejantes, siendo también las vacunas QS-21 y Mo773 las que mejores índices de protección proporcionaron (Caro et al., 2003).

Presencia de IFN- γ en suero

Con este parámetro se pretende medir la respuesta inflamatoria asociada a la infección con *C. abortus*, y para ello se realizó un ELISA tipo sandwich. Los resultados, expresados en pg/ml, mostraron que la mayor presencia de INF-g en suero se detectó en el grupo CONT (Figura 3); valores muy semejantes aunque inferiores se detectaron en el grupo ALUM, lo que se traduce en que es en estos dos grupos donde se ha producido una mayor respuesta inflamatoria tras la infección, hecho que explicaría el porqué precisamente en estos dos grupos se da la mayor morbilidad (medida como el % de pérdida de peso). Todo esto concuerda con el hecho de que en estos dos grupos se den las mayores tasas de aislamiento bacteriano en hígado, es decir, a mayor colonización bacteriana, mayor respuesta inflamatoria, y mayor morbilidad. El resto de

los grupos vacunados mostraron una producción de IFN-g significativamente menor al grupo control, siendo el grupo en que se estudió el adyuvante Montanide ISA35 en el que dicha producción era menor, existiendo diferencias significativas entre este grupo y el grupo testigo CH. Todo ello coincide además con el hecho de que en este grupo apenas existió variación de peso desde el día en que fueron infectados los animales hasta su sacrificio, lo que de nuevo pone de manifiesto que una menor producción de IFN-g se asocia a una menor morbilidad. Aunque el IFN-g desempeñe un papel fundamental en la resolución de la infección por *C. abortus* (Buendía et al., 1999b), una baja producción del mismo es suficiente para esta función protectora, tal y como ocurre en ratones deficientes de IL-12, cuya producción de IFN-g es residual, pero capaz de controlar la infección por *C. abortus* (Del Río et al., 2001). La producción exacerbada de IFN-g, por el contrario, tiene efectos muy negativos sobre el hospedador, efectos que se acentúan en el caso de animales gestantes, ya que se ha demostrado el efecto abortigénico de esta citoquina en modelos experimentales con otros patógenos intracelulares (Krishnan et al., 1996). En conclusión, es nece-

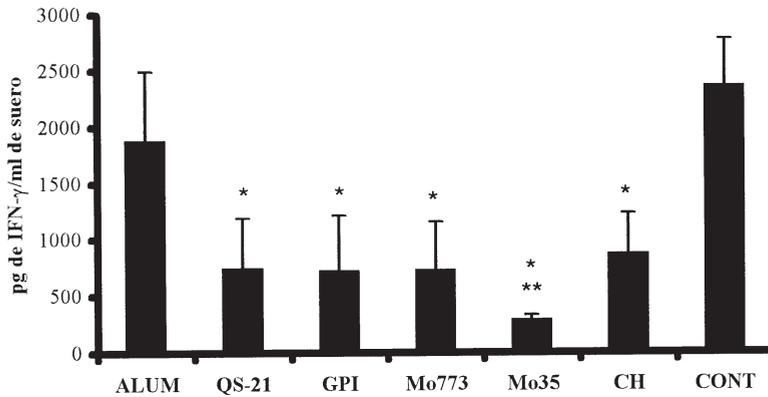


Figura 3: Presencia de IFN- γ en suero (pg/ml) de los diferentes grupos inmunizados e infectados, medido mediante una técnica ELISA tipo sandwich. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección (CONT). ** Diferencias significativas ($P < 0,05$) respecto al grupo vacunado sin adyuvante (CH).

sario que una vacuna induzca producción de IFN-g, pero dicha producción ha de ser la mínima capaz de controlar la infección, ya que cualquier producción excesiva provocaría efectos negativos sobre la salud del animal vacunado y posteriormente infectado.

Determinación de IgG totales en suero

Para determinar la producción de anticuerpos debida al efecto de la vacunación, se recogieron los sueros de los ratones el día 4 p.i. y con ellos se realizó un ELISA indirecto. A la vista de los resultados (Figura 4) se comprobó, en primer lugar, que los ratones del grupo control apenas tenían IgG específicas de *C. abortus*, lo que es lógico teniendo en cuenta el poco tiempo transcurrido entre el momento de la infección y del sacrificio (4 días). Esto nos induce a pensar que los niveles de anticuerpos encontrados en los animales inmunizados son debidos a la propia vacuna y no a la infección directamente. En todos los grupos inmunizados con las vacunas formuladas con un adyuvante, se detectaron niveles de IgG totales, a una dilución de los sueros 1/100, significativamente mayores al detectado en el grupo CONT. Sin embargo, no se

encontró dicha diferencia significativa en el grupo inmunizado sólo con el antígeno (CH), lo que demuestra que los adyuvantes están favoreciendo, al menos en parte, el desarrollo de una respuesta humoral basada en la producción de anticuerpos.

Aun así, el nivel de anticuerpos detectado en todos los grupos no fue excesivamente elevado, especialmente si lo comparamos con los obtenidos en los ensayos con ratones CBA/J (Caro et al., 2003). Este hecho está estrechamente relacionado con la línea de ratón utilizada: Del Río et al. (2000) pusieron de manifiesto que no existe una correlación directa entre título más alto de anticuerpos y mayor resistencia a la infección. Así, en la línea CBA/J la producción de anticuerpos era más elevada que en la línea de ratones C57BL/6 que, sin embargo, son más resistentes a la infección por *C. abortus*. Por otro lado, sabemos que, si bien la respuesta que se busca es una respuesta celular citotóxica, ya que *C. abortus* es una bacteria parásita intracelular, esta respuesta nunca se da de forma pura y siempre vendrá acompañada de una respuesta humoral más o menos intensa, y que a su vez puede favorecer una respuesta inmune más o menos eficaz, por lo que parece intere-

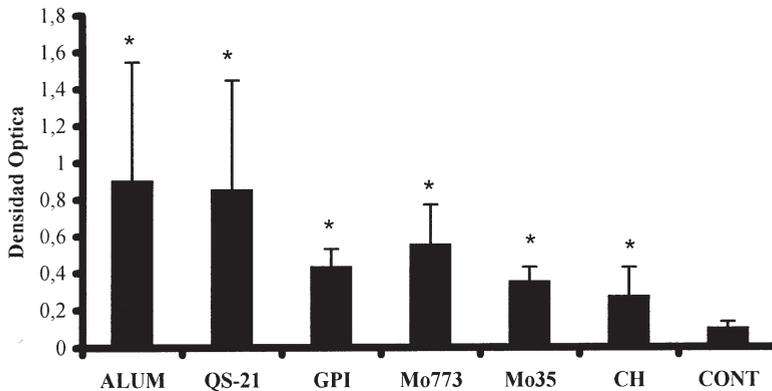


Figura 4: Título de anticuerpos (IgG total) presentes en suero de los diferentes grupos inmunizados e infectados, medido mediante un ELISA utilizando como antígeno cuerpos elementales de *C. abortus* multiplicada en saco vitelino de huevos embrionados.

* Diferencias significativas ($P < 0,05$) con respecto al grupo control de infección (CONT).

sante determinar cuál de los adyuvantes utilizados es capaz de potenciar más este tipo de respuesta inmune humoral.

En cuanto a la respuesta inmune de tipo celular, se sabe que la subpoblación linfocitaria más importante para el control y la eliminación de la infección por *C. abortus* es la subpoblación de linfocitos CD8 citotóxicos (Buzoni-Gatel et al., 1992). De hecho, la relativa resistencia a la infección por parte de los ratones C57BL/6 con relación a los ratones CBA/J es debida, al menos en parte, a las células CD8⁺ (Del Río et al., 2000). Sin embargo, dado que los ratones fueron inmunizados con vacunas inactivadas, es decir, los antígenos clamidiales son de naturaleza exógena, los ratones no pueden desarrollar una respuesta adecuada en linfocitos T CD8⁺, dada la imposibilidad de multiplicación de la bacteria. Por este motivo, es importante asociar los antígenos vacunales con adyuvantes que potencien la respuesta citotóxica, tales como el QS-21 (Mikloska et al., 2000).

En nuestras experiencias esperábamos una fuerte respuesta en anticuerpos que, unida al incremento en el número de células NK en ratones inmunizados (como se observó en otras ocasiones en nuestro laboratorio mediante estudios

con citometría de flujo -Buendía et al., 1999b-) complementada por la producción de IFN- γ y la acción directa neutralizante de los anticuerpos asociados al sistema del complemento, podría proporcionar un mecanismo alternativo. A pesar de que la producción de anticuerpos que se ha detectado en los distintos grupos no es excesivamente intensa, lo cierto es que, aquellas vacunas que protegen más, según muestran los datos de aislamiento y de pérdida de peso (las adyuvadas con el QS-21 y el Montanide ISA773), mostraron diferencias evidentes en cuanto a la producción de anticuerpos, con respecto a aquéllas que protegen menos, o al menos lo hacen de una manera menos eficaz, excepto en el grupo ALUM, en el que no se observó la correlación entre la presencia de una mayor concentración de anticuerpos con un mayor nivel de protección, lo que también fue puesto de manifiesto cuando estas vacunas fueron ensayadas sobre ratones CBA/J (Caro et al., 2003).

En conclusión, pese a la existencia de diferencias en cuanto a la susceptibilidad y respuesta inmune inducida entre los ratones más sensibles (CBA/J) y los más resistentes (C57BL/6) durante la infección por *C. abortus*, estos últimos pueden ser empleados en ensayos para la

valoración de vacunas inactivadas experimentales contra el AEO, con la gran ventaja de que pueden ser utilizados para un mejor conocimiento de los mecanismos inmunitarios efectores puestos en marcha tras la vacunación.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por fondos FEDER (1FD97-1242-CO2-01). Los autores agradecen a la Dra. M. R. Caro (Departamento de Sanidad Animal, Univ. Murcia) por la revisión y las sugerencias realizadas sobre el manuscrito. Igualmente, agradecemos a SEPPIC Inc., (Paris, Francia), a la Dra. C.R. Kensil (Antigenics Inc., Framingham, USA) y al Dr. G. Marciani (Galenica Pharmaceuticals Inc., Birmingham, USA) por la cesión de los Montanides, el QS-21 y el GPI-0100, respectivamente. Nieves Ortega fue beneficiaria de una beca Predoctoral de la Universidad de Murcia.

BIBLIOGRAFIA

- Aitken, I.D., Clarkson M.J., Linklater K. 1990. Enzootic abortion in ewes. *Vet. Rec.* 126: 136-138.
- Buendia A.J., Cuello F., Del Rio L., Gallego M.C., Caro M.R., Salinas J. 2001. Field evaluation of a new commercially available ELISA based on a recombinant antigen for diagnosing *Chlamydophila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection. *Vet. Microbiol.* 78:229-239.
- Buendia A.J., Del Rio L., Ortega N., Sanchez J., Gallego M.C., Caro M.R., Navarro J.A., Cuello F., Salinas J. 2002. B-cell-deficient mice show an exacerbated inflammatory response in a model of *Chlamydophila abortus* infection. *Infect. Immun.* 70: 6911-6918.
- Buendía A.J., Montes de Oca R., Navarro J.A., Sánchez J., Cuello F., Salinas J. 1999-a. Role of polymorphonuclear neutrophils in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect. Immun.* 67: 2110-2116.
- Buendía A.J., Sánchez J., Del Río L., Garcés B., Gallego M.C., Caro M.R., Bernabé A., Salinas J. 1999-b. Differences in the immune response against ruminant chlamydial strains in a murine model. *Vet. Res.* 30: 495-507.
- Buendía A.J., Sánchez J., Martínez M.C., Cámara P., Navarro J.A., Rodolakis A., Salinas J. 1998. Kinetics of infection and effects on placental cell population in murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect. Immun.* 66: 2128-2134.
- Buxton D. 1986. *Chlamydia psittaci* of ovine origin: an especial risk to pregnant women. En: *Chlamydial diseases of ruminants*. Ed. Aitken I. D., Commission of the European Communities, Luxembourg. 121pp.
- Buzoni-Gatel D., Guilloteau L., Bernard F., Charde T., Rocca A. 1992. Protection against *Chlamydia psittaci* in mice conferred by Lyt-2+ cells. *Immunology.* 77: 284-288.
- Caro M.R., Ortega N., Buendía A.J., Gallego M.C., Del Río L., Cuello F., Salinas J. 2001. Protection conferred by commercially available vaccines against *Chlamydophila abortus* in a mouse model. *Vet. Rec.* 149: 492-493.
- Caro M.R., Ortega N., Buendía A.J., Gallego M.C., Del Río L., Cuello F., Salinas J. 2003. Relationship between the immune response and protection conferred by new designed inactivated vaccines against the enzootic abortion of ewes in a mouse model. *Vaccine* 21: 3125-3135.
- Chalmers W.S., Simpson J., Lee S.J., Baxendale W. 1997. Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Vet. Rec.* 141: 63-67.
- De Sa C., Souriau A., Bernard F., Salinas J., and Rodolakis A. 1995. An oligomer of the major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* is recognized by monoclonal antibodies which protect mice from abortion. *Infect. Immun.* 63: 4912-4916.

- Del Río L., Buendía A.J., Sánchez J., Gallego M.C., Caro M.R., Ortega N., Seva J., Pallarés F.J., Cuello F., Salinas J. 2001. Endogenous IL-12 is not required for resolution of *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) Infection in mice. *Infect. Immun.* 69: 4808-4815.
- Del Río L., Buendía A.J., Sánchez J., Garcés B., Caro M.R., Gallego M.C., Bernabé A., Cuello F., Salinas J. 2000. *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) clearance is associated with the early recruitment of neutrophils and CD8⁺ T cell in a mouse model. *J. Comp. Path.* 132: 171-181.
- Entrican G., Buxton D., Longbottom D. 2001. Chlamydial infection in sheep: immune control versus fetal pathology. *J. R. Soc. Med.* 94: 273-277.
- Hechard C., Grepinet O., Rodolakis A. 2002. Protection evaluation against *Chlamydomphila abortus* by DNA vaccination with a dnaK-encoding plasmid in pregnant and non-pregnant mice. *Vet. Res.* 33: 313-326.
- Hechard C., Grepinet O., Rodolakis A. 2003. Evaluation of protection against *Chlamydomphila abortus* challenge after DNA immunization with the major outer-membrane protein-encoding gene in pregnant and non-pregnant mice. *J. Med. Microbiol.* 52: 35-40.
- Krishnan L., Guilbert L.J., Wegmann T.G., Belosevic M., Mosmann. T.R. 1996. T helper 1 response against *Leshmania major* in pregnant C57BL/6 mice increases implantation failure and fetal resorptions. Correlation with increased IFN-gamma and TNF- alpha and reduced IL-10 production by placental cells. *J. Immunol.* 156: 653-662.
- Mikloska Z., Rückholdt M., Ghadiminejad I., Dunckley H., Denis M., Cunningham A.L. 2001. Monophosphoryl lipid A and QS-21 increase CD8 T lymphocyte cytotoxicity to herpes simplex virus-2 infected cell protein 4 and 27 through INF-g and IL-12 production. *J. Immunol.* 164: 5167-5176.
- Montes de Oca R., Buendía A.J., Del Río L., Sánchez J., Salinas J., and Navarro J.A. 2000. Polymorphonuclear neutrophils are necessary for the recruitment of CD8⁺ T cells in the liver in a pregnant mouse model of *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* Serotype 1) infection. *Infect. Immun.* 68: 1746-1751.
- Rodolakis A., Salinas J., Papp J. 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res.* 29: 275-288.
- Rodolakis A., Souriau A. 1983. Responses of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* var. ovis obtained by NTG mutagenesis. *Ann. Rech. Vét.* 14: 155-161.
- Salinas J., Sánchez J., Buendía A.J., Souriau A., Rodolakis A., Bernabé A., Cuello F. 1994. The LPS localization might explain the lack of protection of LPS-specific antibodies in abortion-causing *Chlamydia psittaci* infections. *Res. Microbiol.* 145: 611-620.
- Salinas J., Souriau A., Cuello F., Rodolakis A. 1995. Antigenic diversity of ruminant *Chlamydia psittaci* strains demonstrated by the indirect microimmunofluorescence test with monoclonal antibodies. *Vet. Microbiol.* 43: 219-226.
- Sánchez J., Buendía A.J., Salinas J., Bernabé A., Rodolakis A., Stewart I.J. 1996. Murine granulated metrial gland cell are susceptible to *Chlamydia psittaci* infection in vivo. *Infect. Immun.* 64: 3897-3900.
- Uriarte Fraile A., Gil Berduque J.A. 1999. Abortos infecciosos en ganado ovino. Resultados de 984 brotes analizados durante el período 1995-1998. *ITEA.* 20: 381-383.
- Vretou E., Psarrou E., Kaisar M., Vlisidou I., Salti-Montesanto V., Longbottom D. 2001. Identification of protective epitopes by sequencing of the major outer membrane protein gene of variant strain of *Chlamydia psittaci* serotype 1 (*Chlamydomphila abortus*). *Infect. Immun.* 69: 607-612.