

PAPEL DE LOS LINFOCITOS T CD4⁺ Y CD8⁺ EN LA PROTECCIÓN INDUCIDA POR DIFERENTES VACUNAS CONTRA *CHLAMYDOPHILA ABORTUS*

Role of T CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the protection conferred by different vaccines against *chlamydomphila abortus* infection

Nieves Ortega, María Rosa Caro, Jesús Salinas*

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

Autor de referencia: Jesús Salinas, Tel.: 34 968 364729. Fax: 34 968 364147. E-mail: jsalinas@um.es

RESUMEN

Chlamydomphila abortus es el agente etiológico del aborto enzoótico ovino (AEO). Para el control de esta infección, existen en el mercado dos tipos de vacunas: inactivadas y atenuadas. Estudios previos han demostrado que una vacuna efectiva frente *C. abortus* debe estimular una respuesta inmune específica de tipo Th1, caracterizada por la producción temprana de IFN- γ y la activación de los linfocitos T CD8⁺. El objetivo de este trabajo fue estudiar, sobre un modelo muy utilizado para el estudio de la infección clamidial como es el murino, el papel desempeñado por los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en el desarrollo de una respuesta inmune protectora contra la infección por *C. abortus* en animales previamente vacunados. Para ello, se ha utilizado una vacuna atenuada comercial (1B) y dos vacunas inactivadas experimentales adyuvadas con hidróxido de aluminio (HA) o QS-21 (QS), en ratones que fueron posteriormente deplecionados de linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺ unos días antes del desafío. Para la depleción de los linfocitos T se utilizaron los anticuerpos monoclonales (AcMo) producidos por los hibridomas GK 1.5 (anti-CD4) y 2.43 (anti-CD8). Los resultados de morbilidad y mortalidad mostraron que la depleción de los linfocitos T CD4⁺ indujo menores pérdidas de peso en los animales vacunados con HA y 1B en el día 4 p.i., y no afectó a la supervivencia de los animales infectados. Cuando los animales fueron deplecionados de los linfocitos T CD8⁺, la vacunación impidió la muerte de los animales infectados, ya que en el grupo control no vacunado el 75% de los animales deplecionados habían muerto en el día 8 p.i. Los resultados de colonización hepática mostraron que la depleción de cualquiera de las dos poblaciones de linfocitos T provocó un aumento de la carga clamidial en el hígado que estuvo asociada a un retraso en la resolución de la infección. Se concluye por tanto, que en la respuesta inmune inducida por la vacunación, independientemente de la vacuna empleada, la ausencia de una de las dos poblaciones de linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺ no parece ser esencial *per se* para el establecimiento de la respuesta inmune protectora durante la infección.

Palabras clave: *Chlamydomphila abortus*, linfocitos T, vacunas, respuesta inmune de memoria.

ABSTRACT

Chlamydophila abortus is the etiological agent of ovine enzootic abortion (OEA). For the control of this disease there are two types of commercially available vaccines: inactivated vaccines and attenuated vaccines. Previous studies have demonstrated that an effective vaccine against *C. abortus* must induce a Th1 immune response involving an early IFN- γ production and CD8⁺ T cells activation. The aim of the present work was to clarify, using a mouse model, the role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in the establishment of a protective immune response against *C. abortus* infection in mice previously vaccinated. Mice were vaccinated with a commercially available vaccine (1B) and two experimental inactivated vaccines. The inactivated vaccines were adjuvated with aluminium hydroxide (HA) or QS-21 (QS) respectively. After vaccination and few days before the challenge, mice were depleted of CD4⁺ and CD8⁺ T cells using monoclonal antibodies produced by GK 1.5 (anti-CD4) and 2.43 (anti-CD8) hybridoma cells. In depleted CD4⁺ T cells mice, morbidity and mortality results showed lower weight lost in HA and 1B vaccinated mice at day 4 p.i. while none of infected mice died. In depleted CD8⁺ T cells mice, no mortality was observed in vaccinated mice while 75% of control non vaccinated mice succumbed to *C. abortus* infection at day 8 p.i. The bacterium isolation results showed an increase in clamidial burden in liver in both depletion experiments associated with a slower infection resolution. Thus, in vaccinated mice the absence of any of the two lymphocyte T cells subpopulation (CD4⁺ or CD8⁺) is not essential *per se* in the establishment of a protective immune response during the infection.

Key words: *Chlamydophila abortus*, T lymphocytes, vaccines, memory immune response.

INTRODUCCIÓN

Chlamydophila abortus es una bacteria parásita intracelular obligada con especial tropismo por las células de la placenta, siendo la responsable del aborto enzoótico ovino (AEO), enfermedad que causa importantes pérdidas económicas en el sector ganadero ovino y caprino y que es en la actualidad la principal causa de aborto en los pequeños rumiantes en numerosos países europeos (Rodolakis et al., 1998), incluida España (Uriarte Fraile y Gil Berduque, 1999). Esta enfermedad es importante no sólo desde el punto de vista de la Sanidad Animal, sino también por su carácter zoonótico, pudiendo provocar abortos en mujeres embarazadas (Buxton, 1986).

La vacunación de los rebaños contra el AEO es hoy en día la medida de control más aconsejada. Las vacunas inactivadas elaboradas a partir del cultivo de la bacteria en huevos embrionados o sobre cultivos celulares, se vienen usando desde principios de los años 50 (McEwen et al., 1951), pese a que su eficacia es cuestionable ya que en la actualidad se han descrito brotes de abortos en rebaños vacunados (Aitken et al.,

1990; Jones et al., 1995). Además, aunque estas vacunas reducen la incidencia de abortos y la excreción de *C. abortus* (Rodolakis y Souriau, 1979; García de la Fuente et al., 2004), no son capaces de eliminar por completo la excreción postparto, permitiendo el mantenimiento enzoótico de la enfermedad en el rebaño. 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, su uso conlleva una serie de riesgos potenciales dado el aspecto zoonótico de la enfermedad. Además, la constante aparición de nuevas cepas de *C. abortus* con diferente estructura antigénica (Vretou et al., 2001), puede llegar a afectar a la protección que se obtiene con este tipo de vacunas.

Varios estudios han dejado claro que para la eliminación del microorganismo es necesaria una respuesta inmune que se caracteriza por el establecimiento de una potente respuesta Th1, que conlleva la producción de citoquinas proinflamatorias, especialmente de IFN- γ (McCafferty et al., 1994; Rottenberg et al., 2002) y la activación de linfocitos T (Buzoni-Gatel et al., 1987; McCafferty, 1990). La población de

linfocitos T CD4⁺ resulta esencial en la resolución de la infección de otras especies de la familia *Chlamydiaceae* (Morrison et al., 1995; Su y Caldwell., 1995). Sin embargo, en el caso de *C. abortus*, esta población, si bien es importante en la resolución de la infección, lo es en menor grado que la población de linfocitos CD8⁺, que resultan esenciales para la eliminación del microorganismo en una infección primaria (Buzoni-Gatel et al., 1992; Martínez et al., 2006). Por esta razón, una vacuna efectiva en la lucha frente al AEO tiene que ser capaz de estimular en el animal inmunizado respuestas citotóxicas, potenciando la activación de los linfocitos T CD8⁺.

La infección experimental con *C. abortus* utilizando el modelo murino ha proporcionado una herramienta sencilla y económica para su estudio. En animales no gestantes, la infección experimental de los ratones provoca un síndrome febril y una multiplicación clamidial 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 éste modelo de infección, la infección experimental en ratón ha sido ampliamente utilizada en estudios sobre patogénesis y respuesta inmune (Sánchez et al., 1996; Rodolakis et al., 1998; Buendía et al., 1998; 1999a; 1999b; 2002; 2004; Del Río et al., 2000; 2001; Montes de Oca et al., 2000). Además, estos modelos se han establecido para analizar el grado de protección que confieren las vacunas disponibles comercialmente (Caro et al., 2001) o en ensayos de vacunas inactivadas experimentales (Caro et al., 2003), ya que los resultados obtenidos se pueden extrapolar a lo que ocurre en el hospedador definitivo (Rodolakis et al., 1998; García de la Fuente et al., 2004).

Por todo lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se pretende analizar el papel que desempeñan ante la infección por *C. abortus* los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ en ratones

previamente vacunados con dos vacunas inactivadas, elaboradas de manera idéntica aunque con diferente adyuvante (QS-21 ó hidróxido de aluminio) y una vacuna atenuada (1B), empleando modelos de depleción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se utilizaron ratones hembras de la línea C57BL/6J (Harlan, Backthorn, UK). A la llegada de los ratones al laboratorio éstos 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 21°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). Para su propagación, la bacteria fue cultivada 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 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 (PBS) 0,1M, pH 7,2.

Vacunas utilizadas

Se utilizaron dos vacunas inactivadas elaboradas en nuestro laboratorio y una vacuna viva atenuada, que se presenta en el mercado como un producto liofilizado que contiene la cepa 1B de *C. abortus* (1B, Ovilis Enzovax®, Intervet, Salamanca). Para las vacunas inactivadas se utilizaron como adyuvantes, el hidróxido de aluminio (HA, Rehydragel, Reheis, Dublin,

Irlanda), que es un adyuvante de depósito de naturaleza mineral, y un adyuvante derivado purificado de la saponina, procedente de la corteza del árbol *Quillaja saponaria*: QS-21 (QS, Antigenics, Inc. Framingham, MA, USA). Las vacunas experimentales se prepararon tal y como se describe en Caro et al. (2003) y contuvieron 20 µg de antígeno clamidial inactivado con BEI por dosis.

Depleción *in vivo* de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺

Las células de los hibridomas GK1.5 (anti-CD4) y 2.43 (anti-CD8) se mantienen congeladas a -197 °C en nitrógeno líquido hasta el momento de su uso. Para la descongelación de estos hibridomas, su puesta en cultivo, la producción de los AcMo y precipitación de los mismos, se siguió la misma metodología descrita en Buendía et al. (1999a) para el hibridoma RB6-8C5. La eficacia de las depleciones se comprobó mediante un análisis por citometría de flujo de las células de los bazo extraídos de los animales en estudio, como fue descrito por Montes de Oca et al. (2000), utilizando los an-

ticuerpos anti-linfocitos T CD4⁺ (clon CT-CD4) y un anti-linfocitos T CD8⁺ (clon CT-CD8), ambos suministrados por Caltag Laboratorios (Burlingame, CA, USA). Se comprobó que el bazo de los ratones deplecionados de linfocitos CD4⁺ o linfocitos CD8⁺ tenían menos de un 5% de los presentes en los ratones no deplecionados, por lo que la depleción se consideró adecuada.

Diseño experimental

En las experiencias se establecieron cuatro grupos de 32 ratones cada uno: un grupo control no vacunado (NV), y los otros tres grupos inmunizados con las vacunas en estudio (HA, QS y 1B). En cada grupo, 16 ratones se utilizaron para evaluar el papel de los linfocitos T CD4⁺ en animales vacunados y posteriormente infectados con *C. abortus*, y los otros 16 para evaluar el papel de los linfocitos CD8⁺ en las mismas condiciones. Para ello, ocho ratones de cada grupo fueron deplecionados de su población de linfocitos T CD4⁺ ó T CD8⁺, dejando en cada grupo otros ocho ratones no deplecionados. La mitad de los ratones deplecionados y de

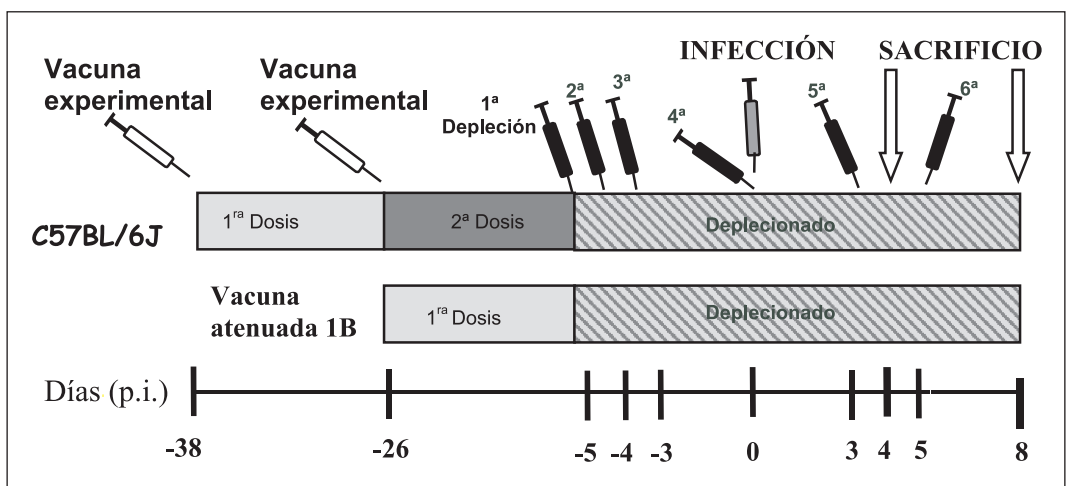


Figura 1: Diseño experimental para el estudio del papel de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en animales vacunados e infectados por *C. abortus*.

los no deplecionados fueron sacrificados en el día 4 p.i., sacrificándose el resto de ratones en el día 8 p.i. Para confirmar la reproducibilidad de los resultados este experimento se repitió con el mismo número de animales.

En el caso de la vacuna atenuada los ratones fueron vacunados una sola vez y en el caso de las vacunas experimentales los ratones fueron inmunizados en dos ocasiones con un intervalo de 12 días entre ambas (Figura 1), siempre con un volumen de 0,2 ml por vía subcutánea y en la porción dorso lumbar. Para la depleción de los linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺, los ratones recibieron dosis de 0,5 mg del AcMo GK 1.5 (anti-CD4) ó 2.43 (anti-CD8) vía intraperitoneal (i.p.). Las depleciones comenzaron 21 días después de la segunda vacunación siguiendo el protocolo descrito por Morrison y Morrison (2001), de manera que los ratones recibieron su primera, segunda y tercera dosis, para la depleción de los linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺, los días 5, 4 y 3 antes de la infección, respectivamente. La cuarta depleción se realizó el mismo día que fueron infectados. La quinta y sexta depleción se realizaron los días 3 y 5 p.i., respectivamente (Figura 1).

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 lóbulo caudal de cada hígado fue examinado y se calculó el número de UFIs/g los días 4 y 8 p.i. El límite de detección se situó en 2,6 log UFI por muestra.

La importancia de los mecanismos efectores puestos en juego por los linfocitos CD4⁺ ó CD8⁺ durante la infección por *C. abortus* en los animales vacunados se valoró analizando tres parámetros: la mortalidad, la morbilidad, entendida como la pérdida de peso que experimentaron los animales desde su infección a su

sacrificio (día 4 p.i. ó 8 p.i) y la carga clamidial presente en el hígado en el día 4 p.i ó 8 p.i.

Estudio estadístico

El tratamiento estadístico de los datos se realizó mediante el cálculo de las medias aritméticas de los valores correspondientes a los animales de cada grupo \pm desviación típica. Para comparar los resultados entre grupos de ratones se aplicó un test *t* de Student a los datos obtenidos, considerando como diferencias significativas todos aquellos valores de $P < 0,05$.

RESULTADOS

La depleción de los linfocitos T CD4⁺ no provocó la muerte de los ratones en ninguno de los grupos. Además, sorprendentemente, indujo una menor morbilidad, cuantificada mediante la pérdida de peso en comparación con los animales no deplecionados, observándose diferencias significativas en los grupos HA y 1B en el día 4 p.i. (Fig. 2A). No obstante, en el día 8 p.i., aunque se observó una tendencia similar, las diferencias entre los ratones deplecionados y los no deplecionados de los distintos grupos no fueron significativas (Fig. 2B). En cambio, aunque la depleción de los linfocitos T CD8⁺ no indujo mortalidad en los ratones vacunados, el 75% de los no inmunizados habían muerto en el día 8 p.i. (Fig. 2D). Además, no se observaron diferencias significativas en la pérdida de peso en los diferentes grupos vacunados, tanto en el día 4 como en el 8 p.i. (Fig. 2C, 2D).

La depleción de linfocitos T, ya fueran estos CD4⁺ (Fig 3A, 3B) ó CD8⁺ (Fig. 3C, 3D), provocó un aumento en la carga bacteriana detectada en el hígado de los animales vacunados, apreciándose diferencias significativas dentro de todos los grupos vacunados en el día 4 p.i. (Fig 3A, 3C). En el día 8 p.i. (Fig 3B, 3D) la depleción de los linfocitos T impidió que la infección se resolviera en los grupos inmunizados. Así, los ratones del grupo HA deplecionados de lin-

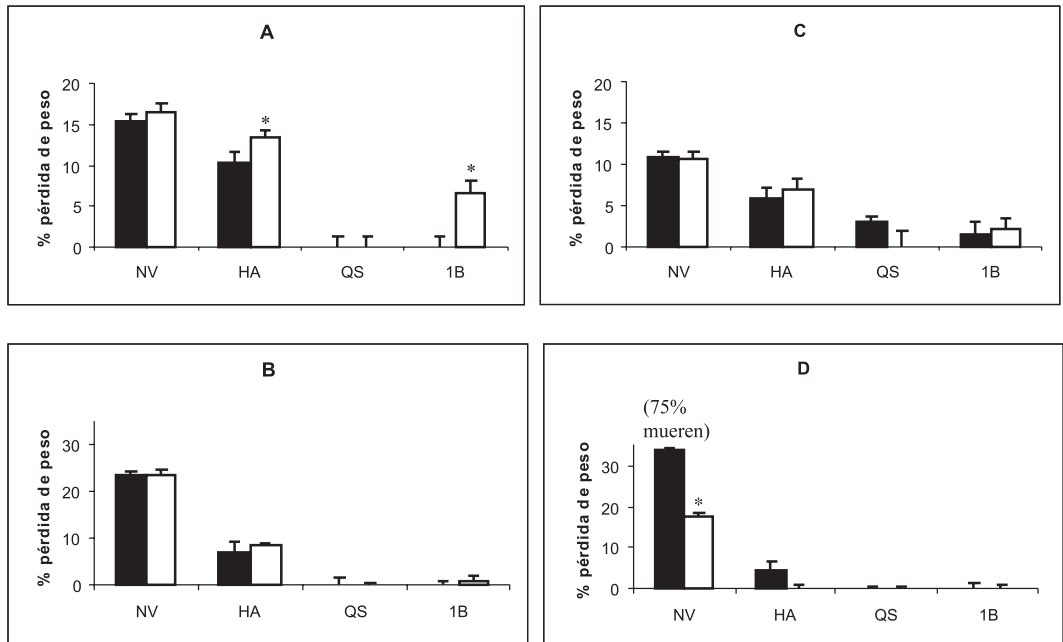


Figura 2: Morbilidad, medida como pérdida de peso. A: Depleccionados de linfocitos T CD4⁺, sacrificados el día 4 p.i.; B: Depleccionados de linfocitos T CD4⁺, sacrificados el día 8 p.i.; C: Depleccionados de linfocitos T CD8⁺, sacrificados el día 4 p.i.; D: Depleccionados de linfocitos T CD8⁺, sacrificados el día 8 p.i. Columnas en negro: Animales depleccionados; columnas en blanco: animales no depleccionados. NV: Control no vacunados; HA: Inmunizados con la vacuna inactivada HA; QS: Inmunizados con la vacuna inactivada QS; 1B: Inmunizados con la vacuna atenuada. * Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los ratones depleccionados y no depleccionados de un mismo grupo.

focitos CD4⁺, mostraron valores de aislamiento clamidial 2 logaritmos por encima de los no depleccionados de linfocitos CD4⁺ (Fig. 3B) ó 1,5 logaritmos por encima de los no depleccionados de los linfocitos CD8⁺ (Fig. 3D). En el grupo QS, el 100% de los ratones depleccionados de linfocitos CD4⁺ y el 75% de los ratones depleccionados de linfocitos CD8⁺ mostraron valores de aislamiento clamidial por encima de los 4 log UFI/g; sin embargo, esta vacuna consiguió que se resolviera por completo la infección en los ratones no depleccionados. En el grupo 1B, la mitad de los animales depleccionados resolvieron la infección; mientras que en la otra mitad, la carga detectada se situó, para ambas

deplecciones, en valores algo inferiores a los 4 log UFI/g (Fig. 3B, 3D). A diferencia de éstos, todos los ratones inmunizados con la vacuna 1B no depleccionados de linfocitos T resolvieron la infección en el hígado en el día 8 p.i.

DISCUSIÓN

Estudios previos demostraron que en una primo-infección por *C. abortus* los linfocitos T CD4⁺ tienen un papel limitado en la resolución de la infección, mientras que son los linfocitos T CD8⁺ los que desempeñan un papel esencial en la eliminación del microorganismo (Buzoni-Gatel et al., 1992; Martínez et al., 2006). Nues-

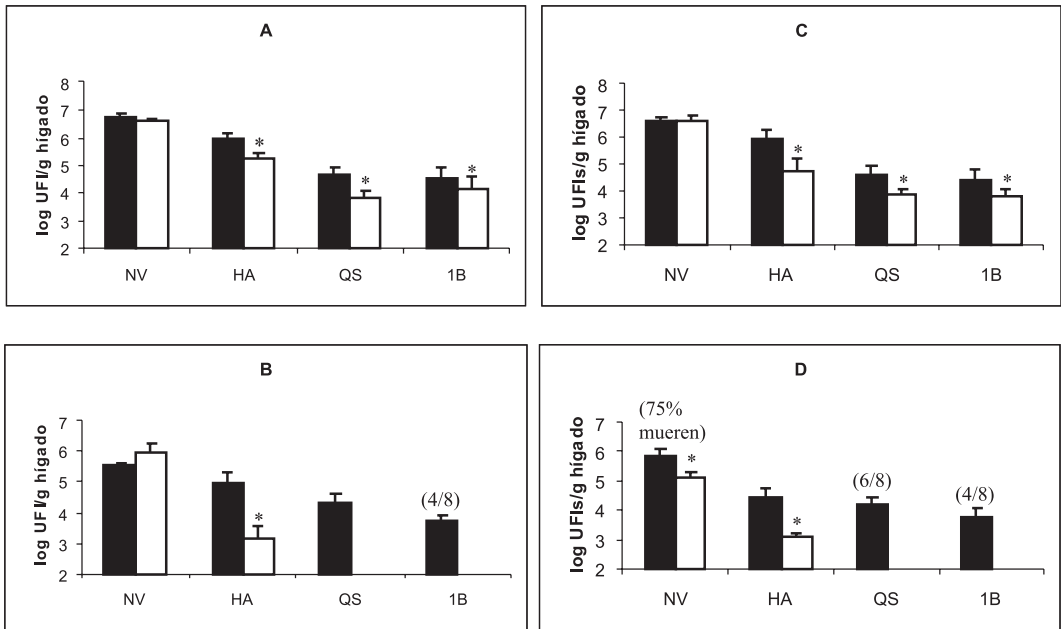


Figura 3: Colonización hepática, medida como aislamiento de *C. abortus* en hígado, y expresado como logaritmo decimal de las UFI por gramo de hígado. A: Depleccionados de linfocitos T CD4⁺, sacrificados el día 4 p.i.; B: Depleccionados de linfocitos T CD4⁺, sacrificados el día 8 p.i.; C: Depleccionados de linfocitos T CD8⁺, sacrificados el día 4 p.i.; D: Depleccionados de linfocitos T CD8⁺, sacrificados el día 8 p.i. Columnas en negro: Animales depleccionados; columnas en blanco: animales no depleccionados. NV: Control no vacunados; HA: Inmunizados con la vacuna inactivada HA; QS: Inmunizados con la vacuna inactivada QS; 1B: Inmunizados con la vacuna atenuada.* Diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los ratones depleccionados y no depleccionados del mismo grupo; entre paréntesis se especifica el número de animales donde se aisló *C. abortus* frente al número de ratones del grupo.

tros resultados confirman estos estudios. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en una primo-infección, tras una vacunación, y por tanto en una respuesta secundaria, ni los linfocitos T CD4⁺ ni los T CD8⁺ mostraron tener un papel *per se* crucial para la resolución de la infección por *C. abortus*. Así, se ha demostrado que la deplección de linfocitos T CD4⁺ en animales vacunados produjo una menor morbilidad en los mismos, tras su infección con *C. abortus*. Este hecho podría estar asociado con la producción de citoquinas de manera exacerbada y con la inducción de apoptosis por parte de los linfocitos T CD4⁺, tal y como ocurre con otros pa-

tógenos intracelulares como *Toxoplasma gondii* (Gavrielescu y Denkers, 2001). Así, en una primo-infección por *C. abortus*, la ausencia de las células T CD4⁺ está típicamente asociada a una reducción de la producción de IFN- γ (Martínez et al., 2006), citoquina esencial en la lucha frente a *C. abortus*, pero que producida en exceso puede inducir patología (Del Río et al., 2001). No obstante, la deplección de los linfocitos T CD4⁺ altera el óptimo desarrollo de una respuesta protectora frente a *C. abortus* inducida por la vacunación, ya que como se vio en los resultados, en los animales vacunados, la deplección de células T CD4⁺ provocó un incremento

de la carga clamidial en hígado en los días 4 y 8 p.i. aunque no causó mortalidad en ninguno de los grupos. Esta reducción del grado de protección de las distintas vacunas fue, sin embargo, proporcional a su eficacia protectora, anteriormente descrita (Caro et al., 2001; 2003).

Por otra parte, la depleción de los linfocitos T CD8⁺ provocó la muerte del 75% de los ratones del grupo NV entre los días 7 y 8 p.i. Estos resultados son similares a los obtenidos anteriormente por nuestro equipo al deplecionar las células T CD8⁺ en una primoinfección con *C. abortus* (Martínez et al., 2006) donde el 100% de los animales deplecionados de células CD8⁺ habían muerto en el día 12 p.i. El papel de los linfocitos T CD8⁺ en una infección primaria por *C. abortus*, frente al ejercido por los linfocitos T CD4⁺, se ha estudiado tanto *in vitro* (Lammert, 1982) como *in vivo* (Buzoni-Gatel et al., 1992; Martínez et al., 2006). Recientemente se apunta la hipótesis de la existencia de una subpoblación de linfocitos T CD8⁺ (CD8⁺ CD28⁻) capaces de regular las respuestas inflamatorias exacerbadas provocadas por los linfocitos T CD4⁺ (Jiang y Chess, 2000). Por tanto, la depleción de células T CD8⁺ impediría el control de éstas respuestas exacerbadas asociadas a los linfocitos T CD4⁺, por lo que la depleción de las células T CD8⁺ provocaría la muerte del animal infectado por *C. abortus*.

En nuestro estudio, las vacunas QS y 1B siguen ofreciendo, incluso en ausencia de cualquiera de las poblaciones de linfocitos T, una mejor protección que la que se consigue con la vacuna HA. Por tanto, parece que las inmunizaciones más efectivas contra el agente del aborto clamidial basan su acción en la adecuada activación inicial de ambas poblaciones de linfocitos T, para constituir una población de células de memoria que reaccionen más rápidamente ante una segunda exposición. En cierto modo estos resultados eran esperables, puesto que el QS21 se caracteriza por potenciar respuestas citotóxicas (Kensil et al., 1998; Mikloska et al., 2000) y la vacuna 1B, al ser una vacuna viva

será presentada de una forma más eficaz a los linfocitos T.

Como conclusión, en nuestro estudio no se han encontrado diferencias significativas entre la depleción de linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺ en animales previamente vacunados, aunque la ausencia de cualquiera de estas poblaciones celulares se asocia con un incremento de la carga bacteriana en hígado y con un retraso en la resolución de la infección. Por tanto, no podemos adjudicar a ninguna de estas poblaciones un papel *per se* crucial en la inducción de una respuesta de memoria protectora, independientemente de la vacuna empleada. Una vez más se constata que las vacunas QS y 1B son las que mejor protegen frente a la infección por *C. abortus*, incluso en ausencia de la población de linfocitos T CD4⁺ ó CD8⁺.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por fondos del proyecto concedido por el Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2004-06571). Los autores agradecen al Dr. I. Rodríguez Barbosa (Servicio de Inmunología del Hospital Clínico Virgen de la Arrixaca de Murcia) la cesión de los hibridomas GK1.5 y 2.43, a la Dra. C.R. Kensil (Antigenic Inc., Framingham, USA) la cesión del adyuvante QS-21 y al Dr. A.J. Buendía por la lectura crítica del manuscrito. La Dra. Nieves Ortega fue beneficiaria de una beca Predoctoral de la Universidad de Murcia.

BIBLIOGRAFÍA

- Aitken, I.D., Clarkson, M.J., Linklater, K. 1990. Enzootic abortion in ewes. *Vet. Rec.* 126: 136-138.
- 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.

- Buendía, A.J., Montes de Oca, R., Navarro, J.A., Sánchez, J., Cuello, F., Salinas, J. 1999a. 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. 1999b. Differences in the immune response against ruminant chlamydial strains in a murine model. *Vet. Res.* 30: 495-507.
- Buendía, A.J., Fallon, P.G., del Río, L., Ortega, N., Caro, M.R., Gallego, M.C., Salinas, J. 2002. Previous infection with the nematode *Nippostrongylus brasiliensis* alters the immune specific response against *Chlamydomyphila abortus* infection. *Microb. Pathog.* 33: 7-15.
- Buendía, A.J., Martínez, C.M., Ortega, N., del Río, L., Caro, M.R., Gallego, M.C., Sánchez, J., Navarro, J.A., Cuello, F., Salinas, J. 2004. Natural Killer (NK) cells play a critical role in the early innate immune response to *Chlamydomyphila abortus* infection in mice. *J. Comp. Path.* 130: 48-57.
- 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. 121.
- Buzoni-Gatel, D., Rodolakis, A., Plommet, M. 1987. T cell mediated and humoral immunity in a mouse *Chlamydia psittaci* systemic infection. *Res. Vet. Sci.* 43: 59-63.
- 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 *Chlamydomyphila 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 designs inactivated vaccines against the enzootic abortion of ewes in a mouse model. *Vaccine.* 21: 3126-3136.
- Chalmers, W.S., Simpson, J., Lee, S.J., Baxendale, W. 1997. Use of live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Vet. Rec.* 141: 63-67.
- del Río, L., Buendía, A.J., Sánchez, J., Garcés, B., Caro, M.R., Gallego, M.C., Bernabé, A., Cuello, F., Salinas, J. 2000. *Chlamydomyphila 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.
- 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 *Chlamydomyphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1) infection in mice. *Infect. Immun.* 69: 4808-4815.
- García de la Fuente, J.N., Gutiérrez-Martín, C.B., Ortega, N., Rodríguez Ferri, E.F., del Río, M.L., González, O.R., Salinas, J. 2004. Efficacy of different commercial and new inactivated vaccines against ovine enzootic abortion. *Vet. Microbiol.* 100: 65-76.
- Gavrilescu, L.C., Denkers, E.Y. 2001. IFN-gamma overproduction and high level apoptosis are associated with high but not low virulence *Toxoplasma gondii* infection. *J. Immunol.* 167: 902-909.
- Jiang, H., Chess, L. 2000. The specific regulation of immune responses by CD8⁺ T cells restricted by MHC class Ib Molecule, Qa-1. *Ann. Rev. Immunol.* 18: 185-216.
- Jones, G.E., Jones, K.A., Machell, J., Brebner, J., Anderson, I.E., How S. 1995. Efficacy trials with tissue-culture grown, inactivated vaccines against chlamydial abortion in sheep. *Vaccine.* 13: 715-723.

- Kensil, C.R., Wu, J.Y., Anderson, C.A., Wheeler, D.A., Amsden, J. 1998. QS-21 and QS-7: purified saponin adjuvants. *Dev. Biol. Stand.* 92: 41-47.
- Lammert, J.K. 1982. Cytotoxic cells induced after *Chlamydia psittaci* infection in mice. *Infect. Immun.* 35: 1011-1017.
- Martínez, C.M., Buendía, A.J., Ortega, N., Sánchez, J., Caro, M.R., Gallego, M.C., Navarro, J.A., Cuello, F., Salinas, J. 2006. Differential importance of CD4 and CD8 T cells in the resolution of *Chlamydomphila abortus* primary infection in mice. *J. Comp. Pathol.* 134: 297-307.
- McCafferty, M.C. 1990. Immunity to *Chlamydia psittaci* with particular reference to sheep. *Vet. Microbiol.* 25: 87-99.
- McCafferty, M.C., Maley, S.W., Entrican, G., Buxton, D. 1994. The importance of interferon- in an early infection of *Chlamydia psittaci* in mice. *Immunology.* 81: 631-636.
- McEwen, A.D., Stamp, J.T., Littlejohn, A.I. 1951. Enzootic abortion of ewes II. Immunisation and infection experiments. *Vet. Rec.* 63: 197-201.
- Mikloska, Z., Rückholdt, M., Ghadiminejad, I., Duckley, H., Denis, M., Cunningham, A.L. 2000. Monophosphoril lipid A and QS-21 increase CD8 T lymphocyte cytotoxicity to herpes simplex virus-2 infected cell protein 4 and 27 though INF- and IL-12 production. *J. Immunol.* 164: 5167-5176.
- Montes de Oca, R., Buendía, A.J., Sánchez, J., del Río, L., Seva, J., Navarro, J.A., Salinas, J. 2000. Limited role of polymorphonuclear neutrophils in a pregnant mouse model of secondary infection by *Chlamydomphila abortus* (*Chlamydia psittaci* serotype 1). *Microb. Pathog.* 29: 319-327.
- Morrison R.P., Feilzer, K., Tumas, D.B. 1995. Gene knockout mice establish a primary protective role for Major Histocompatibility Complex Class II-restricted responses in *Chlamydia trachomatis* genital tract infection. *Infect. Immun.* 63: 4661-4668.
- Morrison, S.G., Morrison, R.P. 2001. Resolution of secondary *Chlamydia trachomatis* genital tract infection in immune mice with depletion of both CD4⁺ and CD8⁺ cells. *Infect. Immun.* 69: 2643-2649.
- Rodolakis A, Souriau, A. 1979. Clinical evaluation of a commercial vaccine against chlamydial abortion of ewes. *Ann Rech Vet.* 10: 41-48.
- Rodolakis, A., Salinas, J., Papp, J. 1998. Recent advances on ovine chlamydial abortion. *Vet. Res.* 29: 275-288.
- Rodolakis, A., Souriau, A. 1983. Response of ewes to temperature-sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* var. ovis obtained by NTG mutagenesis. *Ann. Rech. Vét.* 14: 155-161.
- Rottenberg M.E., Gigliotti Rothfuchs, A., Wigzell, H. 2002. The role of IFN-gamma in outcome of chlamydial infection. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 444-451.
- 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 granulosa metrial gland cells are susceptible to *Chlamydia psittaci* infection *in vivo*. *Infect. Immun.* 64: 3897-3900.
- Su, H., Caldwell, H.D. 1995. CD4⁺ T cells play a significant role in adoptive immunity to *Chlamydia trachomatis* infection of the mouse genital tract. *Infect. Immun.* 63: 3302-3308.
- 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.