LA CEPA VACUNAL 1B DE *CHLAMYDIA PSITTACI* INDUCE UNA RESPUESTA CITOTÓXICA SUPERIOR A LA CEPA TIPO SALVAJE EN UN MODELO MURINO

L. Del Rio[1], J. Sánchez[2], A.J. Buendía[1], B. Garcés[2], M.R. Caro[1], M.C. Gallego[1], A. Bernabé[2] y J. Salinas[1]
Departamento de Patología Animal (Microbiología e Inmunología)[1] y Departamento de Histología y Anatomía Patológica[2], Fac. de Veterinaria, Universidad de Murcia.

INTRODUCCIÓN

Chlamydia psittaci es una bacteria intracelular obligada de distribución mundial. El serotipo 1 agrupa a aquellas cepas causantes del aborto enzoótico de los pequeños rumiantes, patología esta que provoca graves daños económicos en nuestro país. Además, esta bacteria es capaz de colonizar la placenta y causar aborto en otros mamíferos, incluida la especie humana, añadiendo por tanto a su importancia económica el tratarse de una zoonosis. Para el control de la enfermedad se han desarrollado diversas vacunas inactivadas, pero el hecho de que se trate de un patógeno intracelular, en cuya respuesta defensiva tiene un mayor peso una respuesta inmune de base celular ha conducido a la obtención de una vacuna viva atenuada (**1**). Esta vacuna atenuada, que produce una fuerte y duradera inmunidad, ha sido introducida recientemente en España, mientras que ha sido ya testada con éxito en Gran Bretaña (**2**). Sin embargo nada se conoce de cuales son los mecanismos inmunológicos que conducen a esta fuerte inmunidad. Por ello el objetivo de este estudio es comparar la respuesta inmune producida contra la cepa vacunal 1B y contra la cepa tipo salvaje AB7, de la que se derivó la cepa vacunal, usando un modelo de infección en ratón ya utilizado anteriormente para testar antígenos vacunales (**3**). Estableceremos el curso de la infección en ambas cepas mediante estudio de la cantidad de clamidias aisladas de bazo, así como con el estudio de la evolución de las lesiones en hígado. Dos aspectos de la respuesta inmune serán evaluados: el análisis de las poblaciones leucocitarias en bazo mediante citometría de flujo y la caracterización de las poblaciones leucocitarias en las lesiones causadas por la infección clamidial en el hígado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ratones. Ratonas CBA/JHa de 8-10 semanas de edad han sido utilizados en este estudio. Esta línea de ratones ha sido previamente caracterizada como altamente sensible a la infección por *C. psittaci* (**4**).

Microorganismos. Han sido utilizadas las cepas del serotipo 1 de *C. psittaci* AB7 (salvaje) y 1B (vacunal), ambas cepas fueron cedidas por la Dr. Rodolakis (INRA-Nouzilly, Francia). Las cepas fueron multiplicadas en nuestro laboratorio en saco vitelino de embrión de pollo y guardadas a -80°C hasta su uso. Para la infección de los ratones, una dosis de $2x10^5$ UFI en 100 µl de PBS estéril fue administrada vía intravenosa, tanto en el caso de AB7 como en el de 1B.

Toma de muestras. A diferentes días post-infección (p.i.): 3, 5, 7, 10 y 14 los ratones fueron sacrificados, el bazo fue recogido en condiciones estériles, utilizándose una mitad para aislamiento y la otra mitad para el análisis por citometría de flujo. Igualmente se tomó un lóbulo hepático para su fijación en formol al 10%, mientras que otro lóbulo fue criofijado en isopentano enfriado con nitrógeno líquido.

Aislamiento de clamidias en cultivo celular. Las muestras de porción craneal de bazo seleccionadas para este fin fueron maceradas, y se procedió al aislamiento de clamidias sobre la línea celular McCoy utilizando la técnica descrita anteriormente (**5**).

Histopatología e inmunocitoquímica. Las muestras de hígado una vez fijadas fueron incluidas en parafina; de los bloques resultantes se obtuvieron cortes de 3 µm, sobre los que se realizó o bien una tinción de hematoxilina-eosina para su estudio histopatológico o bien una técnica inmunocitoquímica ABC utilizando un

anticuerpo monoclonal anti-LPS clamidial como anticuerpo primario para la presencia de antígeno clamidial, tal y como se ha descrito anteriormente (**6**, **7**).

Análisis mediante citometría de flujo. Las muestras de porción caudal del bazo fueron procesadas para calcular los porcentajes de subpoblaciones leucocitarias utilizando anticuerpos monoclonales obtenidos en rata contra los siguientes marcadores leucocitarios, CD4, CD8, CD45R/B220 (células B), GR-1 (neutrófilos), F4/80 (macrófagos) y NK1.1 (células NK) mediante una técnica de inmunofluorescencia directa para ser posteriormente procesados por citometría de flujo.

Caracterización del infiltrado linfocitario hepático. De las muestras de hígado congeladas se obtuvieron cortes de 5 μm sobre los que se realizó una técnica ABC utilizando como anticuerpos primarios los anticuerpos monoclonales citados en el apartado anterior, y como secundario anticuerpos anti-IgG de rata obtenidos en cabra conjugados a la biotina.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Evolución de la infección con ambas cepas de *C. psittaci.* Ambas cepas clamidiales provocaron un síndrome febril a partir del tercer día p.i, continuando este cuadro hasta el día 10 p.i. en los casos más graves (ratones infectados con la cepa AB7). Esta sintomatología fue más leve y desapareció antes en el caso de la cepa vacunal 1B. Los niveles de clamidias en bazo fueron siempre mayores en el caso de la cepa salvaje AB7 (10 veces superior), estos niveles fueron indetectables a partir del día 10 p.i. en el caso de 1B y del 14 en el de AB7. La principal diferencia entre los procesos provocados por ambas cepas en el hígado radicó en que el caso de 1B tanto el número de focos infecciosos como la inmunoreacción de éstos disminuyó rápidamente desde el día 5 p.i., mientras que en caso de AB7 tanto las lesiones hepáticas como la inmunoreacción alcanzaron su máximo nivel en el día 7 p.i. disminuyendo en los días posteriores. En resumen podemos decir que la infección por la cepa vacunal 1B fue resuelta por los ratones con mayor rapidez que la infección con la cepa salvaje AB7 tanto en bazo como hígado, lo que se reflejó en una menor sintomatología clínica.

Diferencias en la respuesta inmune. El análisis de la respuesta inmune a ambas cepas en bazo e hígado no mostró diferencias significativas en cuanto a los componentes de las respuesta inmune inespecífica (neutrófilos, macrófagos y células NK). Los focos infecciosos del hígado estaban compuestos mayoritariamente de neutrófilos el día 3 p.i. y de macrófagos el día 5 p.i. en las dos cepas estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias en el comportamiento de las células B, cuyo porcentaje descendió significativamente en el bazo respecto al conjunto de células T, apareciendo en muy bajo número en el hígado. Dentro de las células T, las células $CD4^+$ fueron la población que más incrementó su porcentaje en respuesta a la infección por ambas cepas clamidiales; este hecho se produjo tanto en bazo como hígado alcanzando el máximo nivel el día 7 p.i.. Sin embargo las células $CD8^+$ tuvieron un comportamiento claramente diferente. En la infección con 1B el número de estas células en bazo es claramente mayor que en la infección con AB7, como se observa tras el análisis por citometría de flujo de este órgano (**Figura 1**). Además en el 5 p.i., en los focos infecciosos del hígado de los ratones infectados con 1B, las células $CD8^+$ comienzan a aparecer en número apreciable, aunque siempre inferior a las $CD4^+$. La aparición en gran número de las células $CD8^+$ en la infección con AB7 no se produce hasta el día 10 p.i. Estos hechos se ven reflejados en que mientras que para AB7 el ratio CD4/CD8 llega hasta 14 el día 7 p.i., para 1B en ningún momento de la infección este ratio alcanza el valor 4 (**Figura 2**). Un hecho común a ambas infecciones es el que las lesiones e inmunoreactividad en el hígado empiezan a remitir cuando aparece una población importante de células $CD8^+$ en los focos infecciosos, este dato es corroborado por estudios previos que indican que, al contrario que en el patógeno humano *Chlamydia trachomatis*, en *C. psittaci* son las $CD8^+$ las principales células efectoras

encargadas de resolver la infección clamidial (**8**). Por tanto la inducción de una respuesta más rápida de células $CD8^+$ tras la infección con la cepa vacunal 1B explicaría porqué esta infección es resuelta antes y con menor sintomatología que la producida por la cepa tipo salvaje AB7.

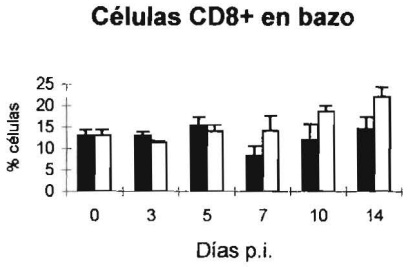


Figura 1. Porcentaje de linfocitos $CD8^+$ en bazo en la infección con AB7 (negro) y 1B (blanco). Resultados expresados como media ± desviación típica.

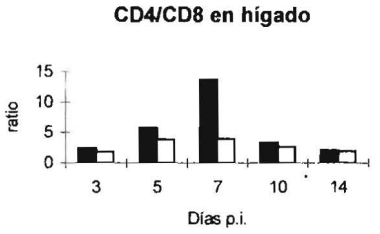


Figura 2. Ratio CD4/CD8 en la infección con AB7 (negro) y 1B (blanco). El número de células fue contado en 20 campos (40 x aumentos) por hígado de cada ratón

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodolakis A. (1983) In vitro and in vivo properties of chemically induced temperature sensitive mutants of *Chlamydia psittaci* var. *ovis* screening in a murine model. *Infect Immun* **42,** 525.
2. Chalmers W.S.K., Simpson J., Lee S.J. & Baxendale W. (1997) Use of a live chlamydial vaccine to prevent ovine enzootic abortion. *Vet Rec* **141,** 63.
3. De Sa C., Souriau A., Bernard F., Salinas J. & 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.
4. Buzoni-Gatel D., Bernard F., Pla M., Rodolakis A. & Lantier F. (1994) Role of H-2 and non-H-2 related genes in mouse susceptibility to *Chlamydia psittaci*. *Microb Pathog* **16,** 229.
5. Kelly K.A., Robinson E.A. & Rank R.G. (1996) Initial route of antigen administration alters the T-cell cytokine profile produced in response to the mouse pneumonitis biovar of *Chlamydia trachomatis* following genital infection. *Infect Immun* **64,** 4976.
6. Sánchez J., Buendía A.J., Salinas J., Bernabé A., Rodolakis A. & Stewart I.J. (1996) Murine granulated metrial gland cells are susceptible to *Chlamydia psittaci* infection in vivo. *Infect Immun* **64,** 3897.
7. 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 populations in a murine model of *Chlamydia psittaci*-induced abortion. *Infect Immun* **66,** 2128.
8. Buzoni-Gatel D., Guilloteau L., Bernard F., Bernard S., Chardes T. & Rocca. A. (1992) Protection against *Chlamydia psittaci* in mice conferred by Lyt-2^+ T cells. *Immunology* **77,** 284.