

ELABORACION DE VACUNAS CONTRA LA SHIGELOSIS: MEMORANDUM DE UNA REUNION DE LA OMS¹

La shigelosis endémica es un problema mundial, con una alta tasa de morbilidad en la mayoría de los países en desarrollo; también puede ser elevada la mortalidad, en especial cuando la enfermedad es causada por *Shigella dysenteriae* serotipo 1. La obtención de vacunas para prevenir la shigelosis es particularmente importante dada la limitada eficacia de las medidas utilizadas en la actualidad para combatir esta infección. En este trabajo se describen las características clínicas e inmunológicas de la enfermedad, se sintetiza la situación actual en cuanto a la elaboración de vacunas adecuadas y se identifican los aspectos que deben tener prioridad en las investigaciones.

En los países en desarrollo, la disentería y la diarrea causadas por *Shigella* constituyen problemas importantes de salud pública. Esta bacteria es uno de los cinco microorganismos patógenos identificados con mayor frecuencia en niños con diarrea aguda o disentería (los otros son los rotavirus, *Escherichia coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxígena y *Campylobacter jejuni*). La infección con *Shigella* puede conducir a muchas complicaciones graves y las tasas de mortalidad pueden ser elevadas. Las epidemias graves suelen ser producidas por *S. dysenteriae* serotipo 1 (bacilo de Shiga).

La elaboración de vacunas para prevenir la shigelosis es particularmente importante ya que las medidas usadas en la actualidad para combatir la infección, en especial las que se relacionan con el tratamiento de los casos y la lucha contra las epidemias, son de eficacia limitada. Por ejemplo, las cepas de *Shigella*, principalmente las del serotipo 1 de *S. dysenteriae* relacionado con epidemias, pueden ser resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles; incluso, cuando la enfermedad es grave es posible que los antibióticos apropiados no produzcan una rápida mejoría clínica o eviten la muerte. Asimismo, la rehidratación oral tiene escaso valor terapéutico en los pacientes con disentería, puesto que la deshidra-

¹ Se publica en el *Bulletin of the World Health Organization*, Vol 65, No. 1, 1987, con el título "Development of vaccines against shigellosis: Memorandum from a WHO Meeting" © World Health Organization, 1987. Basado en el informe de una reunión de la OMS realizada en el Instituto Nacional del Cólera y Enfermedades Intestinales, Calcuta, India, entre el 19 y el 22 de mayo de 1986 (documento inédito WHO/CDD/IMV/86.1). La reunión fue organizada en colaboración con ese instituto y el Centro Internacional de Investigación sobre Enfermedades Diarreicas/Bangladesh, en Dacca. La lista de los participantes aparece en las páginas 445 y 446.

tación no es necesariamente una característica importante de la enfermedad grave. Por otra parte, el tratamiento de los casos graves es costoso, pues es necesaria una atención especializada, que puede requerir la administración de antibióticos nuevos y caros. Además de las vacunas, las medidas útiles para prevenir la shigelosis comprenden la interrupción de la transmisión del agente patógeno mediante el mejoramiento de la higiene personal y las condiciones sanitarias, y el suministro de cantidades adecuadas de agua para las necesidades domésticas. También es probable que la incidencia o la gravedad de la enfermedad se pueda disminuir con intervenciones no específicas tales como la vacunación contra el sarampión, el mejoramiento de la nutrición y, posiblemente, la administración de suplementos de vitamina A.

En este informe se sintetiza la situación actual de los intentos por obtener vacunas contra la shigelosis y se señalan los aspectos que deben tener prioridad en las investigaciones. Se espera que estas recomendaciones sirvan para fomentar nuevos estudios, que finalmente conduzcan a la obtención de vacunas eficaces contra la shigelosis.

Epidemiología y características clínicas

Shigelosis endémica. Es causada principalmente por *Shigella flexneri* (en los países en desarrollo) y *S. sonnei* (en los países desarrollados), y representa un problema mundial. En la mayoría de los países en desarrollo la shigelosis tiene una alta tasa de morbilidad, y en algunos la mortalidad es considerable. Resultan afectados en particular los niños de 1 a 5 años de edad. La transmisión se realiza principalmente de persona a persona y es mayor cuando son deficientes los hábitos de higiene personal y doméstica; los alimentos y el agua también pueden ser fuentes de infección. Los índices de infección secundaria en las familias afectadas pueden llegar a ser de 30 a 50%. No se han descrito animales que actúen como huéspedes naturales (excluidos los macacos rhesus en cautividad) ni reservorios en el medio.

Shigelosis epidémica y pandémica. En 1969 comenzó en América Central una pandemia de shigelosis causada por *S. dysenteriae* serotipo 1, que actualmente se ha extendido por una amplia zona de África central, la India y países próximos a esta. Los análisis de los plásmidos han establecido que la pandemia no es producida por la propagación de un solo clon bacteriano y no se conocen bien las razones de la aparición de grandes brotes en lugares geográficamente distantes. Sin embargo, en todas partes la cepa ha sido resistente a muchos antibióticos, incluidos los más frecuentemente utilizados para tratar la shigelosis; por ejemplo, la cepa actualmente prevalente en Bangladesh es resistente tanto a la trimetoprima-sulfametoxazol como a la ampicilina.

Estrategias de lucha. En la actualidad, las únicas estrategias que pueden prevenir la infección consisten en mejorar las condiciones sanitarias e incrementar el abastecimiento de agua, medidas que reducen la transmisión del microorganismo desde las heces a la boca. Las medidas específicas eficaces comprenden el lavado de las manos con agua y jabón después de defecar

y antes de manipular alimentos, las prácticas higiénicas en la preparación y conservación de los alimentos y la eliminación adecuada de los excrementos. El amamantamiento natural también parece ser eficaz para reducir la gravedad de la infección por *Shigella* en lactantes y niños de hasta 3 años de edad.

Patogénesis. La shigelosis es la más transmisible de las enfermedades intestinales de origen bacteriano: incluso 10 microorganismos vivos pueden provocar la enfermedad en adultos sanos. No se sabe mucho sobre la manera en que *Shigella* (que es sensible a los ácidos) logra sobrevivir al recorrido gástrico y causar diarrea acuosa, característica de algunos casos, o migrar desde la luz al epitelio del intestino grueso. No obstante, está demostrado que, para producir disentería, esta bacteria debe penetrar en las células epiteliales del colon y multiplicarse en ellas. Este proceso provoca la muerte de estas células, inflamación de la mucosa, ulceración epitelial y hemorragia, que constituyen las características anatomopatológicas típicas de la enfermedad.

Características clínicas. Las manifestaciones clínicas de la shigelosis por lo general incluyen deposiciones frecuentes con heces que contienen sangre y moco, fiebre, dolor abdominal y tenesmo rectal. La enfermedad comúnmente comienza con diarrea acuosa, seguida 24 a 48 horas después por la aparición de sangre y moco en las heces. Puede producirse deshidratación, pero solo en una pequeña proporción de los casos. Entre las diversas complicaciones, que pueden presentarse en 15 a 30% de los pacientes hospitalizados y especialmente en los niños, están la anorexia prolongada, deterioro del estado de nutrición, enteropatía con pérdida de proteínas, síndrome urémico hemolítico, reacción leucemoide, neumonía, conjuntivitis, artritis, íleo paralítico, megacolon tóxico, perforación del colon, prolapso rectal y diarrea persistente. Las tasas de mortalidad entre los casos hospitalizados infectados por *S. dysenteriae* serotipo 1 pueden pasar de 10%, a pesar de la administración de los tratamientos recomendados. La enfermedad es más grave y con mayor mortalidad cuando se produce inmediatamente después del sarampión o cuando existe malnutrición previa.

Inmunidad a la shigelosis

La protección producida por una infección anterior. Una serie de pruebas indican que la shigelosis es una enfermedad inmunizante. Dichas pruebas provienen de estudios epidemiológicos, observaciones hechas en voluntarios e investigaciones en animales. Estudios realizados en un asilo para niños con retraso mental grave donde eran endémicas las infecciones por *S. sonnei* y *S. flexneri* serotipo 2a revelaron que los niños con higiene personal

muy deficiente presentaron un índice elevado de ataque de shigelosis clínica durante los primeros 12 a 24 meses posteriores a su ingreso. Después de ese período, el índice de ataque disminuyó abruptamente y persistió bajo durante todo el tiempo de permanencia en la institución, a pesar del contacto frecuente con niños infectados y enfermos. Esta tendencia parece indicar que, después de una o varias infecciones clínicas con *Shigella*, los niños adquieren por lo menos una inmunidad parcial a la reinfección. Del mismo modo, el predominio de la shigelosis en los preescolares de las zonas endémicas señala que la adquisición de inmunidad está relacionada con la edad. Estudios con voluntarios demostraron que los adultos jóvenes que contraían shigelosis después de una primera inoculación experimental estaban protegidos contra la enfermedad cuando se inoculaban posteriormente con la cepa homóloga (*S. flexneri* serotipo 2a); la eficacia de la protección conferida por la infección previa fue de 64%. Sin embargo, no hubo diferencias entre los reinoculados y los voluntarios testigos en cuanto a la tasa de excreción de *Shigella*; es posible que se requiera más de una exposición a la bacteria para que se produzcan altos grados de inmunidad. Por último, las investigaciones en monos y conejos han revelado una sólida protección contra la reinoculación con cepas homólogas efectuada tres a cuatro semanas después de una inoculación virulenta inicial.

Mecanismos de la inmunidad a la shigelosis. La inmunidad a la shigelosis parece depender en gran medida o por completo de mecanismos inmunitarios locales. La vacunación por vía parenteral induce la producción de títulos elevados de anticuerpos circulantes, pero estos no suelen ser protectores. La mayoría de los casos en que se obtuvo protección con la vacunación fue por medio de la presentación de antígenos por vía oral o entérica. No se conocen los mecanismos exactos de la protección, pero pueden estar relacionados con anticuerpos locales, la inmunidad mediada por células de la mucosa, o ambas cosas. Es probable que estos mecanismos obstaculicen la multiplicación de un inóculo pequeño ingerido inicialmente, si bien se ignora en qué lugar se produce este efecto. Tampoco se sabe con certeza si los anticuerpos contra la toxina de Shiga desempeñan una función protectora, especialmente contra la infección por *S. dysenteriae* serotipo 1.

Modelos animales para el estudio de la protección inmunitaria. Los modelos animales que se han usado para estudiar la inmunidad protectora son el de la queratoconjuntivitis en el cobayo (prueba de Séreny), la inoculación oral de macacos rhesus y el modelo recientemente obtenido mediante la inoculación oral de conejos. Parecen preferibles los modelos que utilizan la inoculación oral, porque provocan infección entérica. En las investigaciones relacionadas con las vacunas se ha usado más la inoculación oral del macaco. Las ventajas de este modelo son la similitud de la enfermedad en los macacos con la que afecta al hombre, el hecho de que esos animales en cautividad son muy sensibles a la infección con *Shigella* y la capacidad del modelo para comprobar la protección inducida por las vacunas. Las desventajas son el elevado costo de los macacos rhesus, los problemas técnicos de su

manipulación y la posibilidad de confusión por el efecto de una infección previa por *Shigella* que pasó inadvertida.

Para estudiar la infección por *S. flexneri* se ha creado un modelo que emplea el conejo adulto; implica el tratamiento previo con tetraciclina, seguido de la administración oral de bacterias resistentes a ese antibiótico después de neutralizar el ácido gástrico, y de una sola dosis de opio por vía intraperitoneal. Con este modelo se puede comprobar la colonización del intestino delgado después de inocular 10^6 a 10^9 bacterias viables; se produce la muerte del animal cuando se inoculan 10^{10} bacterias. La colonización inicial proporciona protección segura contra una colonización posterior o la inoculación letal. Este modelo será útil para otros estudios de la inmunidad a *S. flexneri*; sin embargo, no ha resultado adecuado para investigar la inmunidad al serotipo 1 de *S. dysenteriae*, pues las cepas ensayadas se multiplican poco y no producen enfermedad.

Serología de la infección con *Shigella*. La shigelosis puede inducir respuestas inmunitarias humorales y mediadas por células, ya sea en la mucosa o de tipo sistémico. Hasta ahora, solo se han estudiado en profundidad las respuestas humorales sistémicas. Se han medido los anticuerpos dirigidos contra el lipopolisacárido (antígeno O) y la toxina de Shiga. Las respuestas a proteínas de la membrana externa (codificadas por el plásmido de virulencia con una masa molecular relativa (M_r) de 140×10^3) han sido estudiadas solo en forma limitada usando el método de inmunoelectrotransferencia (transferencia de Western).

Ensayo de anticuerpos contra el lipopolisacárido de Shigella. Se pueden preparar antígenos puros de lipopolisacáridos (LPS) y usarlos en inmunoensayos con enzimas (IEE) para la determinación de anticuerpos sensibles específicos para la clase. Sin embargo, la mayoría de los antígenos O de *Shigella*, con excepción de *S. sonnei*, reaccionan en forma cruzada con algunos de *E. coli*, fenómeno que reduce la especificidad de la prueba.

El antígeno O de *S. dysenteriae* serotipo 1 está relacionado con el antígeno O de *E. coli* grupo 1, pero es escasa su relación conocida con otros tipos de *E. coli* o con otras enterobacterias. Se ha ideado un inmunoensayo con enzimas sensible y específico, que se puede usar en estudios seroepidemiológicos y para investigar la respuesta inmunitaria que inducen las vacunas en estudio.

Hay cierta relación entre el antígeno O de *S. flexneri* y el de otras enterobacterias, pero existe también una amplia reactividad cruzada entre los serotipos 1 a 5. Por consiguiente, no son factibles, con pocas excepciones, los ensayos con anticuerpos específicos para el serotipo basados en la utilización de antígenos LPS. No obstante, se ha ela-

borado un inmunoensayo con enzimas que es sensible y detecta fácilmente la respuesta de anticuerpos después de la infección natural con *S. flexneri*. Esta prueba puede ser útil para evaluar el poder inmunógeno de las vacunas contra *S. flexneri* que se están estudiando.

S. sonnei tiene un antígeno O singular que, según los conocimientos actuales, es compartido únicamente por un serotipo de *Plesiomonas shigelloides*. Existe un inmunoensayo con enzimas sensible y específico, apropiado para evaluar el poder inmunógeno de las vacunas en estudio y para investigaciones seroepidemiológicas.

Respuestas de anticuerpos sistémica e intestinal. Los estudios de la clase de inmunoglobulina a la que pertenecen los anticuerpos séricos contra el LPS de *Shigella* muestran que en el ser humano la respuesta de la IgA llega a su valor máximo después de dos a tres semanas y permanece elevada durante aproximadamente dos meses; la respuesta de la IgM sigue un patrón similar. En cambio, la respuesta de la IgG alcanza su valor máximo después de tres a seis semanas y continúa elevada durante los 6 a 12 meses posteriores al episodio diarreico.

No se han estudiado a fondo en el hombre las respuestas intestinales de anticuerpos contra *Shigella*. Sin embargo, investigaciones en conejos mostraron que la inoculación de bacterias *S. flexneri* vivas o de híbridos de *E. coli/S. flexneri* en el asa yeyunal de Thirty-Vella induce una marcada respuesta de IgA secretoria contra el LPS. La observación de que esta respuesta puede ser rápidamente reforzada mediante la reinoculación varios meses después aporta otra prueba de que existe memoria en el sistema intestinal de IgA secretoria.

Se han realizado pocos estudios sobre la respuesta de la antitoxina de Shiga posterior a las infecciones por *Shigella*. Las investigaciones preliminares que usaron un inmunoensayo con enzimas para detectar la antitoxina de Shiga revelaron respuestas de anticuerpos en el suero de pacientes infectados con *S. dysenteriae* serotipo 1, pero no en los infectados con *S. flexneri* o *S. sonnei*. No obstante, en otra investigación en que se empleó una prueba con antitoxina sensible y específica, basada en la neutralización del daño provocado por la toxina en monoestratos de células HeLa, se detectaron anticuerpos neutralizantes de la toxina en el suero de pacientes convalecientes de infecciones causadas por *S. flexneri* y *S. sonnei*. No se conoce la razón de esta discrepancia, y son necesarios otros estudios para evaluar la utilidad de estos distintos ensayos.

Determinantes de la virulencia de probable importancia para la obtención de vacunas

Un conocimiento cabal de los mecanismos relacionados con la virulencia de *Shigella* y de los antígenos específicos involucrados en esa virulencia facilitará la elaboración racional de vacunas contra esta bacteria. Los fenómenos fundamentales en la patogénesis de la shigelosis comprenden la invasión de las células epiteliales, la multiplicación intracelular de las bacterias, la necrosis epitelial seguida de la propagación

bacteriana dentro de la mucosa y, finalmente, la destrucción tisular acompañada de intensa inflamación local. A continuación se resumen los conocimientos actuales sobre estos fenómenos y la probable función patogénica de la toxina de Shiga.

Invasión de las células epiteliales. La información disponible indica que una variedad de plásmidos y genes cromosómicos median la capacidad de *Shigella* para invadir las células epiteliales intestinales, multiplicarse dentro de ellas y, finalmente, destruirlas. Un plásmido grande ($M_r = 120-140 \times 10^3$), llamado plásmido de la virulencia, es esencial para que todos los serotipos de *Shigella* induzcan su propia fagocitosis por las células epiteliales y para estimular la rápida proliferación intracelular de las bacterias. No se conocen aún los mecanismos moleculares que intervienen en la fagocitosis de *Shigella* por las células epiteliales; sin embargo, se han identificado varias proteínas de la membrana externa codificadas por el plásmido de la virulencia que pueden desempeñar funciones fundamentales en el proceso. Datos recientes indican que el mismo plásmido codifica una actividad hemolítica por contacto que produce lisis de la membrana de la vacuola fagocitaria y la consiguiente liberación de las bacterias en el citoplasma, donde pueden multiplicarse rápidamente y eludir el ataque de las enzimas lisosómicas.

Propagación bacteriana en la mucosa. Para que se produzca la propagación de *Shigella* en la mucosa es preciso que las bacterias sobrevivan y se multipliquen dentro de la lámina propia, proceso que conduce a la inflamación aguda y la destrucción tisular. Se han identificado varios segmentos cromosómicos que especifican funciones bacterianas que podrían intervenir en estos procesos. Esas regiones se han vinculado con I) la formación del antígeno O, II) los sistemas de captación de hierro de gran afinidad, o III) la capacidad de provocar queratoconjuntivitis en los cobayos.

En *S. flexneri*, dos loci cromosómicos especifican la biosíntesis completa del antígeno O. Por otra parte, el antígeno O de *S. sonnei* es codificado por el plásmido grande de virulencia. En el caso de *S. dysenteriae* serotipo 1 para la expresión completa del antígeno O se requieren un plásmido pequeño ($M_r = 6 \times 10^3$) y un locus cromosómico. La función del antígeno O de *Shigella* en la virulencia bacteriana no está definida por completo, pero un lipopolisacárido liso puede ser importante tanto para la supervivencia intraluminal de *Shigella* como para proteger de la actividad bactericida del suero a las bacterias que se encuentran en los tejidos.

La toxina de Shiga. El serotipo 1 de *S. dysenteriae* tiende a causar disentería más grave que la provocada por otros serotipos de *Shigella* y produce también grandes concentraciones de toxina de Shiga; no se sabe si existe una

relación de causalidad entre estas dos características de *S. dysenteriae* serotipo 1. No se ha comprobado uniformemente la producción de toxina de Shiga por otras bacterias *Shigella* y, cuando se ha detectado (en algunas cepas de *S. flexneri* serotipo 2a y *S. sonnei*) la cantidad de toxina fue de 10 000 a 100 000 veces menor que la observada en el caso de *S. dysenteriae* serotipo 1.

La toxina de Shiga producida por *S. dysenteriae* serotipo 1, que inhibe la síntesis proteínica en células eucarióticas, se ha purificado hasta la homogeneidad y se ha caracterizado parcialmente. Está compuesta por una subunidad A que contiene el componente enzimáticamente activo y cinco o seis copias de una subunidad B de enlace con el receptor, y tiene tres actividades biológicas: I) citotoxicidad para ciertas células eucarióticas, II) acción paralizante o letal para diversas especies animales, y III) enterotoxigenicidad para el intestino delgado del conejo. Estas actividades podrían explicar la mayor gravedad de la enfermedad causada por *S. dysenteriae* serotipo 1, la diarrea acuosa que puede ocurrir durante la shigelosis y las lesiones en el endotelio vascular del riñón que caracterizan el síndrome urémico hemolítico que a veces complica la shigelosis.

Vacunas contra *Shigella*

Antecedentes. En investigaciones llevadas a cabo en los años cuarenta y los cincuenta, las vacunas parenterales preparadas con bacterias *Shigella* completas muertas no confirieron protección significativa en la inoculación experimental de voluntarios ni en estudios controlados sobre el terreno en lugares endémicos; algunos intentos de inmunizar monos con bacterias *Shigella* muertas administradas por vía oral produjeron también resultados contradictorios. Desde mediados de los años sesenta las investigaciones se han concentrado principalmente en la elaboración de vacunas orales con bacterias *Shigella* vivas, y ya se han preparado varias cuya inocuidad se ha comprobado en estudios clínicos; algunas de ellas también previnieron la shigelosis en estudios mediante la inoculación experimental de voluntarios, en ensayos controlados sobre el terreno, o en ambas situaciones. No obstante, ninguna de esas vacunas resultó ideal: se requerían demasiadas dosis, a veces se producían reversiones genéticas y en algunas poblaciones se presentaron efectos secundarios (por ej., vómitos).

Con el advenimiento de la tecnología de recombinación del ADN ahora es posible analizar con precisión determinantes importantes de la patogenicidad y la inmunogenicidad bacterianas, tanto en el plano molecular como en el genético. Esta tecnología facilitará la obtención de cepas bacterianas definidas con todas las propiedades que se consideran importantes en una vacuna contra la shigelosis, incluidos la inocuidad, la estabilidad genética, el poder inmunógeno con un número mínimo de dosis y la posibilidad de producir y liofilizar la vacuna en gran escala. Un requisito importante es que esas cepas colonicen o invadan eficientemente el epitelio intestinal para asegurar así la distribución eficaz de los antígenos en el tejido linfático intestinal. Las cepas para vacunas contra otras enfermedades entéricas obtenidas con estos métodos también pueden resultar adecuadas como acarreadoras para la distribución de los antígenos de *Shi-*

gella importantes para la protección, lo que permitirá elaborar vacunas bivalentes o quizá polivalentes. En la actualidad, los investigadores están usando técnicas de ingeniería genética para elaborar varios tipos de vacunas contra *Shigella*.

Las anteriores y actuales vacunas orales en estudio, preparadas con bacterias *Shigella* vivas, pueden ser agrupadas en cuatro grandes clases, que incluyen productos biológicos preparados con:

- mutantes de *Shigella* atenuados;
- "mutantes híbridos" (bacterias *Shigella* atenuadas mediante la incorporación de segmentos de genes de *E. coli*);
- E. coli* que contiene genes incorporados de *Shigella*, y
- otras bacterias acarreadoras (tales como *Salmonella typhi* atenuada) que contienen genes codificadores de la síntesis de antígenos importantes de *Shigella*.

A continuación se describen brevemente las vacunas en estudio que merecen mayor atención.

Vacunas elaboradas con mutantes de bacterias *Shigella* atenuados

A) *T32 Istrati*. Esta cepa es un mutante obtenido en Rumania mediante pases repetidos de una cepa del serotipo 2a de *S. flexneri* en un medio de agar; carece del plásmido que codifica la capacidad invasora y parece ser genéticamente estable. Amplios estudios controlados sobre el terreno realizados en Rumania y China, en los que se aplicó un programa de inmunización que comprendía la administración de cuatro o cinco dosis de hasta 3×10^{11} microorganismos vivos cada una, demostraron que esta vacuna era inocua y eficaz para prevenir la shigelosis clínica; sin embargo, no se sabe si conservará su eficacia al ser liofilizada. Además de esta actividad inmunizante contra el serotipo 2a de *S. flexneri*, en algunos estudios sobre el terreno se observó también que la vacuna proporcionaba una protección significativa contra otros serotipos de *S. flexneri* y de *S. sonnei*. Esta vacuna preparada con una cepa atenuada de mutantes se usa mucho en Rumania, donde la experiencia indica que su eficacia puede ser prolongada mediante la aplicación de dosis bienales de refuerzo. Su mayor desventaja consiste en la necesidad de emplear varias dosis grandes y el refuerzo frecuente.

B) *Vacunas preparadas con mutantes dependientes de la estreptomycinina*. En Yugoslavia se obtuvieron cepas no invasoras dependientes de la estreptomycinina (DEm) de varios serotipos de *S. flexneri* y *S. sonnei*, y se observó que eran inocuas y proporcionaban protección cuando se usaron en vacunas

orales administradas a voluntarios y en estudios controlados sobre el terreno en gran escala realizados en ese país. Después de cuatro o cinco dosis de hasta 5×10^{10} bacterias vivas cada una, estas vacunas estimularon una protección específica contra el serotipo que duraba un mínimo de seis meses, pero menos de un año; una sola dosis oral de refuerzo al cabo de un año mantenía la protección por otro año más. A principios de los años setenta, también se realizaron estudios limitados sobre el terreno con vacunas DEm en los Estados Unidos de América. En uno de ellos, que incluyó a niños recluidos en asilos que estaban muy expuestos a *Shigella*, las vacunas resultaron ineficaces. Además, en algunos estudios se produjo la reversión a la independencia de la estreptomomicina, especialmente con la cepa de *S. sonnei*. No se han realizado otras investigaciones con estas cepas.

C) *Nuevos mutantes atenuados.* Se están investigando nuevos mutantes atenuados de *Shigella*, como los auxótrofos aromáticos (aro⁻) y los carentes de galactosa epimerasa (gal E). Estas vacunas se distinguen de las preparadas con cepas de mutantes T32 y DEm por ser genéticamente definidas y capaces de invadir las células epiteliales. La base de la atenuación consistiría en la incapacidad de las bacterias de proliferar en los tejidos del huésped. Otro método posible para preparar mutantes de *Shigella* atenuados consistiría en la delección de los genes que codifican la producción de la toxina de Shiga, los sistemas de captación de hierro de gran afinidad, o ambas cosas, mientras que se conserva el plásmido que codifica la invasión epitelial.

Vacunas elaboradas con híbridos mutantes. La introducción de segmentos cromosómicos específicos de *E. coli* K-12 (por ej., la región de xilosa-ramnosa) en bacterias *Shigella* patógenas reduce drásticamente su virulencia. La transferencia de estos segmentos a mutantes atenuados de *Shigella* provenientes de colonias produjo una serie de híbridos no invasores relativamente estables, derivados de *S. flexneri* serotipo 2a y *S. dysenteriae* serotipo 1, que protegieron a macacos contra la shigelosis experimental. Se demostró que el híbrido de *S. flexneri* serotipo 2a era genéticamente estable e inocuo, tanto en sujetos adultos sanos como en niños sanos internados en asilos. Sin embargo, el grado de protección observada en voluntarios no fue estadísticamente significativo y se observó que la cepa no proliferó bien *in vivo*. El híbrido de *S. dysenteriae* serotipo 1, si bien resultó genéticamente inestable en uno de los 145 voluntarios, se destacó por producir buena colonización intestinal después de una sola dosis oral. No se efectuaron estudios sobre el terreno para comprobar la eficacia de estas vacunas.

Vacunas elaboradas a partir de *E. coli* con genes que codifican antígenos de *Shigella*. A mediados de los años setenta, se transfirieron a una cepa *E. coli* 08 algunos loci que especificaban antígenos somáticos de *S. flexneri* serotipo 2a específicos para el grupo y el tipo; el resultado fue un híbrido no invasor y genéticamente estable que expresaba el antígeno O de *Shigella*, y que se probó en una vacuna oral preparada con microorganismos vivos. Aunque confirió protección a los macacos y fue inocua en los seres

humanos adultos, esta vacuna no protegió a voluntarios adultos inoculados en estudios experimentales.

Más recientemente, se ha transferido a *E. coli* K-12 el plásmido con $M_r = 140 \times 10^3$ que codifica la invasión de las células epiteliales, junto con genes cromosómicos que codifican los antígenos O de *S. flexneri* serotipo 2a específicos para el grupo y el tipo. El híbrido de *E. coli* resultante expresa el antígeno O liso de *S. flexneri* serotipo 2a e invade las células epiteliales, pero no produce secreción de líquido en segmentos ligados de intestino de conejo. Esta vacuna es inocua y protectora en los macacos. Se están llevando a cabo estudios clínicos con voluntarios adultos sanos para investigar la inocuidad y eficacia de la vacuna. También se han preparado cepas análogas de *E. coli* K-12 que expresan otros antígenos O de *S. flexneri* o el antígeno O de *S. dysenteriae* serotipo 1, y se proyecta realizar estudios con voluntarios.

Otras bacterias acarreadoras que expresan antígenos de *Shigella*

A) *Híbridos de Salmonella typhi que expresan antígenos de Shigella.* Las cepas atenuadas de *S. typhi* que se usan en las vacunas orales contra la fiebre tifoidea a base de microorganismos vivos son acarreadoras potenciales para la distribución de antígenos seleccionados de *Shigella* en el tejido linfático del huésped; las cepas de este tipo proporcionarían protección contra la fiebre tifoidea y la shigelosis. Esas cepas atenuadas de *S. typhi*, que incluyen la Ty21a (un mutante gal E químicamente inducido) y la 541Ty (un mutante aro^- , pur^- genéticamente definido), aparentemente llegan al tejido linfático intestinal, donde estimulan mecanismos inmunitarios mediados por células y también, en grado variable, respuestas de anticuerpos circulantes y locales en el intestino.

Una de las vacunas en estudio (5076-IC) está constituida por la cepa Ty21a a la que se ha incorporado el plásmido con $M_r = 140 \times 10^3$ de *S. sonnei*, que expresa el antígeno O de esta especie (y también el de *S. typhi*). En pruebas con voluntarios, se ha demostrado que esta vacuna bivalente es inocua y eficaz contra la inoculación con *S. sonnei*. No obstante, la variabilidad de la eficacia de distintos lotes de vacuna ha retrasado el inicio de ensayos sobre el terreno.

Si se obtienen otras vacunas orales eficaces elaboradas con microorganismos vivos (por ej., con bacilos *Vibrio cholerae* atenuados), también podrían ser útiles como acarreadoras de antígenos de *Shigella*.

B) *Consideraciones generales acerca de la expresión eficaz de antígenos de Shigella por microorganismos acarreadores.* Como se señaló antes, es pro-

bable que para inducir la protección inmunitaria solo sean necesarios uno o, cuando más, unos cuantos antígenos de *Shigella*, como el antígeno O, las proteínas específicas de la membrana externa y, quizás, la toxina de Shiga (en forma de toxoide). Por consiguiente, es factible elaborar una serie de "cassettes" o módulos de plásmidos híbridos que codifiquen estos antígenos, que podrían insertarse en "sistemas distribuidores de antígenos" seleccionados (por ej., *E. coli* o vacunas heterólogas preparadas con bacterias vivas). Así, se ha efectuado la clonación de genes cromosómicos y de plásmidos de *S. dysenteriae* serotipo 1 que codifican la síntesis del antígeno O, y se han combinado en un solo plásmido híbrido para crear de este modo un vehículo adecuado para transferir los determinantes de este antígeno a una variedad de bacterias acarreadoras.

Sin embargo, se requerirán otras investigaciones para definir los requisitos de la expresión eficiente de estos antígenos en una forma inmunógena óptima. Por ejemplo, pueden surgir problemas de transcripción y traducción que exijan el análisis y modificación de los mecanismos genéticos reguladores pertinentes. Del mismo modo, tal vez los microorganismos acarreadores no ensamblen ni presenten los antígenos heterólogos en forma inmunógena óptima. En particular, el ensamblado de un antígeno O heterólogo funcional puede requerir manipulaciones genéticas adicionales que proporcionen un núcleo alternativo de LPS sobre el cual se pueda construir la nueva cadena lateral O. Probablemente también sea conveniente eliminar o modificar la expresión del antígeno O homólogo para que no compita con la fracción heteróloga para unirse al núcleo. Es necesario un mejor conocimiento de las interacciones de las proteínas con otros componentes de la membrana bacteriana, tales como los LPS y el peptidoglucano, pues estas interacciones pueden tener una considerable influencia en las formas en que dichos antígenos se congregan en la superficie bacteriana e interactúan con el sistema inmunitario de la mucosa.

Ensayos sobre el terreno de vacunas contra *Shigella*

Se está planeando la realización de estudios sobre el terreno para determinar la eficacia de las vacunas contra *Shigella* en las condiciones probables de empleo. En estas investigaciones, como en todas las demás, se aplican los conceptos generales de los ensayos clínicos (por ej., la necesidad de una muestra suficientemente grande, una población testigo adecuada y mecanismos sin sesgo para la detección de casos). Se deben incluir también otros aspectos de particular importancia para el ensayo de una vacuna contra *Shigella*. A continuación se describen algunos de estos aspectos generales y específicos.

Población para el ensayo sobre el terreno. Los ensayos sobre el terreno deben incluir poblaciones semejantes a aquellas en las que la vacuna será finalmente usada. Los grupos de sujetos inmunizados y no inmunizados deben ser equivalentes en cuanto a edad, sexo, estado de nutrición e incidencia de infecciones previas con *Shigella*. Se debe definir la población en relación con las características demográficas generales y la presencia de factores de

riesgo particularmente vinculados con la shigelosis (por ej., malnutrición, sarampión y, probablemente, carencia de vitamina A).

Aleatorización. En general, es preferible la designación al azar de los sujetos a quienes se administrará la vacuna o el placebo; sin embargo, algunas de las vacunas con bacterias *Shigella* vivas pueden excretarse con las heces y transmitirse a otros miembros de la familia. En consecuencia, los familiares de los vacunados pueden resultar involuntariamente inmunizados. En el caso de cepas para vacunas potencialmente transmisibles, la unidad del proceso de aleatorización debe ser el núcleo familiar y se administrará la misma preparación a todos los miembros apropiados de ese núcleo.

Fenómenos resultantes. Se pretende que las vacunas contra *Shigella* eviten que las personas contraigan la shigelosis clínica; no obstante, se debe considerar también la posibilidad de que la inmunización pueda disminuir la incidencia de la infección asintomática. Entre los fenómenos resultantes el más importante es la diarrea o la disentería acompañadas de un coprocultivo positivo para *Shigella*, si bien se debe determinar también la incidencia de la infección asintomática.

Los casos se pueden detectar entre los pacientes que asisten a hospitales o clínicas, o mediante la vigilancia activa y frecuente de la comunidad (por ej., dos o tres veces por semana). Es probable que los casos detectados con esta vigilancia activa sean relativamente leves, mientras que los identificados en hospitales y clínicas serán más graves. Es preciso considerar la posibilidad de que la inmunización sea más eficaz para reducir la incidencia de la infección grave que la de la infección leve o asintomática. Esto puede requerir que los métodos de detección de casos hagan hincapié en la vigilancia de los pacientes que asisten a consultorios y hospitales. Por otra parte, la vigilancia activa de la comunidad será especialmente importante cuando se evalúe una vacuna contra *S. sonnei*, pues la enfermedad causada por este serotipo tiende a ser leve. Las infecciones asintomáticas se deben detectar mediante cultivos periódicos en una muestra aleatoria de individuos sanos vacunados y de testigos.

Deben elaborarse definiciones de los casos precisas y aplicables en forma general, que pueda usar fácilmente y sin introducir sesgos el personal que trabaja sobre el terreno. Específicamente, es preciso definir los siguientes términos: "individuo vacunado", "diarrea", "disentería", "shigelosis", "enfermedad leve, moderada y grave", "diarrea persistente" e "infección asintomática". Las definiciones pueden combinar datos clínicos y de laboratorio y deben distinguir entre los casos en los que *Shigella* es el único microorganismo patógeno aislado y las infecciones mixtas

causadas por *Shigella* y otros agentes enteropatógenos. Los cálculos del tamaño de la muestra deben basarse en las tasas establecidas de fenómenos resultantes específicos en la comunidad que se estudia (por ej., disentería o diarrea causada por el serotipo de *Shigella* contenido en la vacuna).

Métodos de laboratorio

A) *Pruebas para detectar leucocitos y sangre en las heces.* Con el fin de distinguir la disentería de la diarrea se deben usar procedimientos estandarizados para comprobar la presencia de leucocitos y sangre en las heces. Es probable que se requiera efectuar con cada muestra de materia fecal una prueba química para detectar sangre y un examen microscópico para establecer la presencia de leucocitos.

B) *Métodos microbiológicos.* Siempre que sea posible, las muestras de materia fecal y las rectales obtenidas con hisopo se deben sembrar de inmediato en un medio sólido. Cuando esto no se puede hacer, hay que transportar las muestras al laboratorio en el término de 24 horas (de preferencia antes), usando como medio para el transporte una solución salina con glicerina amortiguada (enfriada, si es posible). El medio de Cary-Blair no es ideal para el transporte de *Shigella*, pero se debe usar cuando hay que investigar otros microorganismos enteropatógenos.

Para el aislamiento primario se requieren por lo menos dos medios de cultivo. La elección depende de los serotipos que se investiguen; sin embargo, se puede elegir como primera opción el agar de desoxicolato de xilosa y lisina (DXL); la segunda puede ser el medio de MacConkey o el agar *Salmonella-Shigella*. Se puede consultar una descripción detallada de los métodos para aislar e identificar *Shigella*.²

Recomendaciones para las investigaciones

Modelos animales. Es necesario un modelo basado en un animal pequeño, que sea adecuado para estudios detallados y cuantitativos de la patogénesis de la infección con bacterias *Shigella* vivas (incluidas *S. sonnei*, *S. flexneri* y *S. dysenteriae* serotipo 1), la eficacia de las vacunas en estudio y los mecanismos de inmunidad a la infección. Cuando sea posible, se deben usar cepas isógenas de *Shigella* con modificaciones o deleciones genéticas para estudiar los mecanismos de la patogénesis y la inmunidad.

Mecanismos de la virulencia y la inmunidad. 1) Es preciso caracterizar con mayor amplitud los antígenos de la superficie celular de *Shigella* y definir su papel en la patogénesis y la inmunidad. Es necesario también investigar antígenos menores y aún no identificados, incluidos los que se expresan en las condiciones que prevalecen en el intestino. Probablemente se requerirán anticuerpos monoclonales contra esos antígenos.

² Organización Mundial de la Salud. Manual for laboratory investigations of acute enteric infections. Ginebra, 1986. Documento inédito CDD/83.3 Rev. 1, 1986.

2) Se debe determinar la función de la toxina de Shiga en la virulencia de *S. dysenteriae* serotipo 1 (y en otras shigelas), y definir el papel protector de la antitoxina sistémica o de la mucosa, si tal es el caso. Es fundamental para este análisis la generación de mutantes de *S. dysenteriae* serotipo 1 carentes de toxina. Estas cepas deben ser evaluadas mediante métodos estandarizados, preferiblemente en un solo laboratorio de referencia, para confirmar el fenotipo (o genotipo) negativo para la toxina. Es preciso incluir en estos estudios las secuelas de la shigelosis que pueden ser mediadas por la toxina, como el síndrome urémico hemolítico.

3) Es necesario definir el proceso y el mecanismo de colonización de la mucosa por *Shigella* e identificar los antígenos que intervienen. Hay que investigar la captación y el destino de *Shigella* en las células epiteliales M y relacionarlos con el poder inmunógeno de cepas individuales. En estos estudios se deben utilizar mutantes isógenos virulentos y no virulentos.

La inmunidad. 1) Mediante el empleo de modelos animales, investigaciones en voluntarios, estudios longitudinales basados en poblaciones y ensayos de vacunas sobre el terreno, es preciso evaluar en qué medida la protección contra la shigelosis inducida por una infección previa es específica para el serotipo o se extiende también a serotipos heterólogos. Hay que dedicar especial atención a una probable protección cruzada entre serotipos de *S. flexneri*, y entre *S. flexneri* y *S. dysenteriae* o *S. sonnei*.

2) Es necesario definir las funciones que desempeñan los mecanismos de inmunidad humoral y mediada por células, especialmente los que actúan en el interior de la mucosa intestinal o en su superficie. Se deben identificar los antígenos (o las combinaciones de antígenos) que causan estas respuestas.

3) Es preciso determinar si los anticuerpos contenidos en la leche o el calostro proporcionan protección contra la shigelosis y, si es así, definir los antígenos y anticuerpos que intervienen en esa protección y el alcance de esta.

4) Hay que definir las respuestas inmunitarias sistémicas y de la mucosa relacionadas con la shigelosis, como son las respuestas a los antígenos O, a proteínas de la membrana externa, a la toxina de Shiga y a otros antígenos de posible importancia patógena.

Obtención y evaluación de las vacunas. 1) Para satisfacer las necesidades de salud pública en los países en desarrollo, las investigaciones se deben concentrar en la obtención de vacunas contra *S. dysenteriae* serotipo 1 y los serotipos de *S. flexneri* de mayor prevalencia (1b, 2a, 3a, 4a). Tal vez se requieran vacunas polivalentes.

2) Hay que hacer hincapié en la obtención de vacunas orales preparadas con microorganismos vivos, que incluyan mutantes no virulentos de *Shigella* y cepas híbridas (vectores heterólogos que expresan antígenos de *Shigella*).

3) Se deben definir los acarreadores óptimos para las vacunas preparadas con híbridos, las cuales pueden incluir cepas vivas de *S. typhi*, bacilos *E. coli* no virulentos y bacterias *Vibrio cholerae* vivas y no virulentas. Es preciso establecer las características que determinan la eficacia de un acarreador.

4) Es necesario definir los métodos óptimos para la preparación y administración de las vacunas orales con microorganismos *Shigella* vivos. Esto implicará efectuar estudios para determinar los medios de formulación que garanticen una máxima recuperación y proliferación de las bacterias en una forma inmunógena adecuada cuando se reconstituyen. Asimismo, hay que determinar si el inóculo necesita o no ser protegido de la acidez gástrica.

5) Las bacterias *Shigella* aisladas de participantes en ensayos sobre el terreno deben ser cuidadosamente conservadas para permitir su evaluación posterior con el fin de establecer posibles diferencias antigénicas entre las bacterias aisladas en los sujetos vacunados y las encontradas en los testigos.

6) La eficacia de la vacuna se debe evaluar en relación con la duración de la protección, la necesidad de dosis de refuerzo, la edad de los vacunados (especialmente los menores de tres años), la gravedad de la enfermedad y el estado de nutrición de los vacunados.

7) Es necesario establecer criterios uniformes para evaluar la eficacia de las vacunas contra *Shigella*, los cuales deben incluir definiciones de la diarrea causada por *Shigella* y pautas para estimar la gravedad de la enfermedad. También es preciso recomendar el empleo de métodos estandarizados para el diagnóstico de laboratorio.

8) En la elaboración de vacunas se debe buscar un producto que sea eficaz e inocuo en niños menores de un año y que pueda ser incorporado a los programas ampliados de inmunización de los países.

Participantes

- C. Ferreccio, Departamento de Apoyo a Programas, Ministerio de Salud, Santiago, Chile.
S. Formal, Departamento de Enfermedades Bacterianas, Instituto Walter Reed de Investigaciones del Ejército, Centro Médico Walter Reed, Washington, DC, EUA.
M. M. Levine, Centro para la Elaboración de Vacunas, Escuela de Medicina de la Universidad de Maryland, Baltimore, MD, EUA.
A. A. Lindberg, Departamento de Bacteriología Clínica, Instituto Karolinska, Hospital de la Universidad de Huddinge, Huddinge, Suecia (*Presidente*).
P. A. Manning, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Adelaide, Adelaide, Australia.
T. Meitert, Instituto Cantacuzino, Bucarest, Rumania.
A. D. O'Brien, Departamento de Microbiología, Universidad de Ciencias de la Salud para los Servicios Uniformados, Bethesda, MD, EUA.
S. C. Pal, Instituto Nacional del Cólera y Enfermedades Entéricas, Calcuta, India.
D. A. Sack, Centro Internacional de Investigación sobre Enfermedades Diarreicas/Bangladesh, Dacca, Bangladesh (*Relator*).

- P. Sansonetti, Servicio de Enterobacterias, Instituto Pasteur, París, Francia.
 Y. Takeda, Departamento de Infecciones Bacterianas, Instituto de Ciencias Médicas, Universidad de Tokio, Tokio, Japón.
 D. Taylor, Instituto de Investigaciones en Ciencias Médicas de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América, Bangkok, Tailandia.
 K. Timmis, Departamento de Bioquímica Médica, Centro Médico Universitario, Ginebra, Suiza.

Observadores:

- M. Bennish, Centro Internacional de Investigación sobre Enfermedades Diarreicas/Bangladesh, Dacca, Bangladesh.
 I. Ciznar, Centro Internacional de Investigación sobre Enfermedades Diarreicas/Bangladesh, Dacca, Bangladesh.
 A. Salam, Centro Internacional de Investigación sobre Enfermedades Diarreicas/Bangladesh, Dacca, Bangladesh.
 F. Tron, Departamento de Investigaciones Clínicas, Vacunas Pasteur, Marnes-la-Coquette, Francia.

Secretaría de la OMS:

- B. B. Gaitonde, Oficina Regional de la OMS para Asia Sudoriental, Nueva Delhi, India.
 N. F. Pierce, Programa de Lucha contra las Enfermedades Diarreicas, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza (*Secretario*). □

C ONFERENCIA INTERNACIONAL SOBRE VIGILANCIA ALIMENTARIA Y NUTRICIONAL EN LAS AMERICAS

Esta conferencia, llevada a cabo en la ciudad de México del 5 al 9 de septiembre de 1988, fue convocada por el Programa de Alimentación y Nutrición de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y patrocinada por el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán de México. Contó también con la colaboración de la Secretaría de Salud de México, el Subcomité de Nutrición del Comité Administrativo de Coordinación de las Naciones Unidas, el Comité de Acción para el Desarrollo Económico y Social de Centro América (CADESCA) y la Junta del Acuerdo de Cartagena. A continuación se comentan algunos aspectos de la conferencia.

Participantes

Se extendió una invitación especial a los representantes de organismos internacionales de asistencia técnica, organismos no gubernamentales y funcionarios que tienen a su cargo la adopción de decisiones a nivel nacional, sectorial y local en la organización, opera-