

LA BUSQUEDA DE ANTIGENOS PROTECTORES¹

Harry Smith, Ph.D., D.Sc., F.C.Path.²

Hoy se cuenta con vacunas eficaces contra tétanos, tifoidea, tos ferina y un sinnúmero de otras enfermedades. Sin embargo, todavía queda mucho por hacer en este campo. Aún no existen vacunas eficaces contra estafilococos, estreptococos, etc., otras pueden mejorarse, y es menester aun desarrollar otras que no produzcan efectos secundarios. En este trabajo se trata de presentar otros enfoques en la producción de vacunas cuando los métodos convencionales no hayan dado los resultados que se esperaban.

La inmunización activa contra enfermedades infecciosas ya ha salvado innumerables vidas. Se dispone de vacunas eficaces e inocuas contra el tétanos, difteria, tos ferina, fiebre tifoidea, ántrax, tuberculosis, viruela, fiebre amarilla, poliomielitis y unas cuantas otras infecciones (1-4). No obstante, es mucho lo que queda por hacer en este campo, especialmente porque no se ha logrado todavía un dominio eficaz de la quimioterapia de las infecciones víricas, y la resistencia de las bacterias patógenas y los protozoos a los medicamentos va en aumento. No existen buenas vacunas contra infecciones estafilocócicas, estreptocócicas, meningocócicas y gonocócicas ni contra la disentería bacilar, y las vacunas anticoléricas podrían mejorarse de manera considerable (1, 2). Son muchas las vacunas víricas que todavía están por elaborarse; las vacunas contra el sarampión y la rabia tienden a causar efectos secundarios nocivos, la variación antigénica de los virus gripales puede eliminar la eficacia de la vacunación, y la multiplicidad de rinovirus casi imposibilita la vacunación contra el resfriado común (3, 4).

En cuanto a los protozoos, si bien hay ciertas pruebas de inmunidad adquirida contra la enfermedad declarada, solo en el caso de leishmaniasis la vacunación se ha administrado con eficacia (5). Por último, la vacunación contra las micosis apenas se ha ensayado (6).

En las tentativas futuras para elaborar vacunas se emplearán, en primer lugar, los métodos tradicionales, por su conveniencia y porque en algunos casos han demostrado ser satisfactorios. Sin embargo, a juzgar por la experiencia pasada, estos métodos pueden fallar o proporcionar solo productos en parte satisfactorios; este trabajo trata de indicar nuevos procedimientos cuando ocurren fracasos de esta naturaleza.

Antígenos protectores

La meta de las actividades encaminadas a producir una vacuna eficaz consiste en obtener un producto inocuo que proteja adecuadamente de una enfermedad durante largo tiempo y con un mínimo de dosis de refuerzo. Esta meta rara vez se alcanza, y el grado de aproximación a la misma dependerá de la medida en que los antígenos vacunales sean, en primer lugar, los antígenos "verdaderos", y luego, que resulten "buenos". No basta que un producto microbiano sea antigénico. Los microorganismos

¹ Este es el 11° artículo en español de la serie que se publicó en inglés en el *Brit Med Bull* 25(2), 1969. Se reproduce aquí con la autorización de dicha revista. El primer artículo apareció en el *Boletín* de noviembre de 1972.

² Departamento de Microbiología, Universidad de Birmingham, Inglaterra.

patógenos y no patógenos forman numerosos antígenos que no guardan relación alguna con la manifestación o la prevención de la enfermedad. Las bacterias demuestran, en gran parte, esta afirmación, pero sin duda es aplicable a otros microorganismos; por ejemplo, algunos antígenos estructurales y extravíricos constituyen factores concomitantes más bien que determinantes de la infección (7). Los antígenos "verdaderos" son factores que contribuyen a que se produzca la enfermedad en el huésped natural; si se utilizan en vacunas provocan sus correspondientes reacciones de anticuerpos o de elementos celulares. Estos denominados antígenos protectores o inmunógenos (en los que se incluyen productos que provocan no solo inmunidad humoral sino también de base celular) constituyen una pequeña parte de los antígenos totales formados por microorganismos patógenos, pero son los antígenos necesarios para las vacunas. Es natural que para una vacunación eficaz estos antígenos protectores deben ser también "buenos", es decir, han de producir una respuesta vigorosa de anticuerpos protectores o elementos celulares que persistan durante largo tiempo (o que se movilicen rápidamente cuando ocurra infección) con la mínima hipersensibilidad del huésped. El vigor y duración de la inmunidad dependerá de la naturaleza química de los factores microbianos, lo que a su vez influirá en la clase de inmunoglobulinas producidas y el tipo de alteraciones celulares del sistema reticuloendotelial. Es muy poco lo que se conoce acerca de las estructuras químicas que determinan si un producto microbiano es un antígeno "bueno" o "malo", y lo mismo ocurre con los métodos químicos para convertir un antígeno "malo" en "bueno", si bien se han transformado en antigénicos materiales no antigénicos acoplándolos a las proteínas (8-10). Así, por el momento, la vacunación eficaz depende en gran parte de si los factores microbianos causantes de la enfermedad demuestran ser "buenos" anti-

genos. En caso negativo, el único recurso es el empleo de coadyuvantes en las tentativas para mejorar la reacción a los antígenos protectores. Pero estos últimos deben estar presentes, porque es inútil tratar de mejorar una vacuna con coadyuvantes si solo contiene los antígenos "falsos".

Todas estas consideraciones afectan a la inocuidad y a las pruebas de eficacia de la vacuna. Los antígenos protectores requeridos pueden ser toxinas o sus componentes, que deben convertirse en inocuos antes de su empleo para las vacunas, como en el caso de los clásicos toxoides (2) y de la vacuna contra el ántrax (11). En algunos casos, como en la vacunación antisarampionosa y antirrábica, puede ponerse en peligro la inocuidad del producto porque se requieren vacunas vivas para producir los antígenos protectores necesarios en cantidades significativas. Además, en la vacunación contra enfermedades intracelulares, como la tuberculosis, brucelosis e infecciones víricas, los antígenos inmunógenos solo pueden conferir protección suficiente estimulando la inmunidad celular³ (12, 13) y tal vez sea inevitable alguna hipersensibilidad concomitante. En cuanto al ensayo de vacunas, las pruebas *in vitro*, y en animales de laboratorio, deben ofrecer una medida de los efectos de los antígenos protectores que son activos en el huésped natural. Muchas veces no ocurre así, en especial en lo que se refiere a las pruebas serológicas *in vitro* (14, 15). Las pruebas de la inmunidad activa en animales de laboratorio son más útiles que las serológicas para indicar la posible actividad de una vacuna. Sin embargo, aun estas pruebas pueden ser engañosas porque los antígenos protectores para animales de experimentación no siempre son los que actúan en el huésped natural; por ejemplo, el antígeno Vi de *Salmonella typhi* tiene valor para la virulencia y protección en los ratones pero

³ Véase también "Delayed Hypersensitivity: Specific Cell-Mediated Immunity" (*Brit Med Bull* 1967, Vol. 23, No. 1).—Ed.

su importancia para el hombre es dudosa (1, 15). Es evidente que todas las pruebas de laboratorio deben correlacionarse con la actividad de la vacuna en ensayos clínicos debidamente efectuados.

La identificación y producción de antígenos protectores constituyen los aspectos más importantes de las investigaciones sobre vacunas, y en el resto de este artículo se examinan las dificultades inherentes a esa labor y los métodos que podrían utilizarse para vencerlas. Los antígenos bacterianos constituyen los ejemplos principales, pero se mencionan también los productos víricos, protozoarios y fungosos.

Relación de los antígenos protectores con los factores microbianos de virulencia

Los factores microbianos que determinan la manifestación de enfermedad son los que a) promueven el acceso de los microorganismos a los tejidos susceptibles y su proliferación tisular; b) interfieren en los mecanismos de defensa del huésped (tanto extracelulares como intracelulares), y c) producen efectos nocivos en el huésped mediante la toxicidad directa o el estímulo de reacciones alérgicas (16). Estos factores de virulencia, empleados en vacunas, pueden constituir antígenos protectores. Algunos son derivados o componentes de toxinas (como en el caso de difteria, tétanos y ántrax). Otros son compuestos que entorpecen los mecanismos de defensa del huésped tales como una sustancia de la membrana celular de la *Brucella abortus* que inactiva a la bactericidina del suero bovino (17), y material capsular que interfiere en la fagocitosis (18). Probablemente los virus, los protozoos y los hongos producen factores de virulencia análoga (que podrían ser protectores en las vacunas), pero en la actualidad se desconoce, en gran parte, el mecanismo y virulencia de estos microorganismos (16). Los antígenos de superficie que parecen actuar como factores de virulencia al determinar el enlace de virus con células susceptibles

—virus poliomiélicos (19)— probablemente estimulan los anticuerpos protectores que evitan la infección mediante la neutralización de virus extracelular (seguramente con la destrucción de su capacidad para introducirse en las células). Los productos de acción vírica intracelular, como los que causan citotoxicidad (16), podrían intervenir en la inmunidad celular observada después de algunas infecciones o vacunaciones con virus vivos (4, 7, 13).

La experiencia en el campo bacteriano indica que, si bien los antígenos protectores constituyen factores necesariamente vinculados con la virulencia, a la inversa no ocurre lo mismo. Algunos factores de virulencia, aunque sean antigénicos, no protegen, tales como la α -toxina de estafilococos. Es posible que estos factores no desempeñen una función significativa en la fase primaria de alojamiento de la infección que, para que la vacunación sea eficaz, debe quedar inhibida (13). Algunos factores de virulencia ni siquiera son antigénicos, por ejemplo el ácido hialurónico capsular del *Streptococcus pyogenes*, y el ácido poliglutámico del *Bacillus anthracis* (18). Y la falta de inmunidad que a veces se observa, incluso después de una enfermedad declarada, como en las infecciones estafilocócicas, podría atribuirse a la falta de antigenicidad de los factores de virulencia.

Dificultades de la producción de un complemento íntegro de antígenos protectores de las vacunas

Las vacunas deben contener los antígenos protectores necesarios para provocar reacciones del huésped contra importantes aspectos de la virulencia microbiana. Si un solo factor determinara casi en su totalidad esta virulencia, como la toxina en el caso de la difteria o el tétanos, sería relativamente fácil la producción de vacunas eficaces. Pero no ocurre así, pues la virulencia, y por consiguiente la inmunidad, en el caso de la mayoría de los microorganismos patógenos

está determinada por varios factores difíciles de identificar y de clasificar en orden de importancia (16). Si la pérdida de estos factores origina una disminución radical de la virulencia, cabe suponer que un solo factor puede servir eficazmente para la vacuna. Por ejemplo, la producción capsular de ácido poliglutámico y de toxina determinan la virulencia del *B. anthracis*. La pérdida de cualquiera de los dos produce casi una atenuación completa, y la vacunación eficaz se basa en el estímulo de las reacciones del huésped contra uno de ellos, la toxina (20). De todas maneras, la acción de los factores de virulencia en muchos casos parece ser más aditiva, y la pérdida de un factor da lugar a una reducción relativamente pequeña de la virulencia. A este respecto, se puede obtener una inmunidad significativa solo con la inyección de una mezcla de factores de virulencia antigénicos (por lo común en la forma del microorganismo entero, puesto que no se han aislado los factores individuales de virulencia). El hecho de que algunos factores sean no antigénicos (véase pág. 544 "Relación de los antígenos") o difieran en varias cepas de la misma especie (por ejemplo, *Bordetella pertussis*, virus gripales) y en variantes antigénicas que aparecen durante la infección (en la tripanosomiasis y la malaria), no mejora la situación. Por añadidura, al utilizar mezclas de antígenos para la vacunación, la presencia de uno de ellos puede afectar a la respuesta de otro (2). Por consiguiente, el número y la complejidad de los factores que determinan la virulencia y la inmunidad entorpecen las tentativas de elaborar y mejorar las vacunas. A continuación se describe otro de los obstáculos.

En la vacunación se trata de neutralizar los factores que determinan la virulencia en el huésped natural, es decir, factores que se forman cuando microorganismos que son virulentos en su totalidad proliferan *in vivo*. Para producir vacunas debidamente es preciso cultivar microorganismos en medios de

laboratorio (o en cultivo tisular para virus), es decir, en condiciones de multiplicación muy diferentes de las que están presentes durante la infección (14, 20). Estas distintas condiciones de proliferación afectarán al metabolismo microbiano (21) y por lo tanto a la producción de factores de virulencia, algunos de los cuales pueden ser antígenos protectores. Lacey (22) y Meynell (23) han demostrado cómo el ambiente puede influir en la naturaleza de los antígenos de superficie, toxinas y otros factores de virulencia de las bacterias patógenas. La variación de los virus y sus productos controlada por el huésped es bien conocida y a veces afecta a las proteínas de superficie que determina la unión de los virus a las células y que, por consiguiente, pueden ser antígenos protectores (24-26). La pérdida de virulencia de las bacterias cuando se cultivan en medios de laboratorio, y de los virus en cultivo tisular, indica que algunos factores de virulencia no se producen en estas condiciones artificiales (14). La patogenicidad (y por lo tanto la inmunogenicidad) de los protozoos y hongos está relacionada con la forma morfológica que a menudo cambia de manera radical cuando estos microorganismos se cultivan *in vitro* (27, 28). De esta manera, las vacunas preparadas mediante la multiplicación de bacterias en medios o de virus en cultivo tisular pueden resultar deficientes en cuanto a los factores de virulencia antigénica que determinan la protección de la vacunación. Así ocurrirá, con más probabilidades, si se trata de una vacuna muerta (productos microbianos u organismos muertos) en lugar de una viva. En este último caso los microorganismos tendrán oportunidad de multiplicarse (solo en medida limitada, ya que las cepas vacunales están atenuadas) en los tejidos del huésped, y de producir antígenos protectores que tal vez no se hayan producido en condiciones de cultivo *in vitro*. Es posible que a ello se deba la superioridad de algunas vacunas vivas (como las de tuberculosis, viruela, saram-

pión y rabia) sobre las preparaciones muertas.

Métodos de producción de antígenos protectores en las vacunas

Métodos tradicionales

En los métodos tradicionales de preparación de vacunas se cultivan varias cepas de microorganismos en medios apropiados o cultivos tisulares y se examinan estos organismos y sus productos en las pruebas de inmunidad activa antes de proceder a ensayos clínicos en el hombre. Estos métodos han resultado satisfactorios en el pasado y seguramente continuarán dando resultados en el futuro. En el caso de numerosas enfermedades hay que recurrir todavía a las vacunas vivas para conferir una protección suficiente (1, 4), lo que subraya los escasos conocimientos actuales acerca de los antígenos protectores necesarios. Además, puede ocurrir que las vacunas vivas no formen algunos antígenos protectores deseables porque, al ser atenuada para una vacunación inocua, pierden algunos atributos de virulencia que pudieran haber sido antigénicos y protectores.

Antes de examinar un posible método para identificar los antígenos potencialmente protectores, se consideran los métodos tradicionales teniendo en cuenta lo acabado de exponer. No se formarán antígenos protectores si los microorganismos no se cultivan en las condiciones de proliferación requeridas. Unas condiciones sencillas y uniformes de proliferación de los microorganismos facilitan la preparación de vacunas y, como es evidente, en primer lugar se deben investigar estas condiciones. Pero si no se producen los antígenos protectores requeridos, tal vez se tengan que aceptar condiciones de proliferación más complejas. En el supuesto de que la enfermedad declarada proteja en forma activa a los animales contra un segundo ataque, es decir, que algunos atributos de virulencia sean antigénicos, las condi-

ciones de multiplicación que de cualquier modo reflejan aspectos del cultivo *in vivo* pueden dar lugar a la manifestación de antígenos protectores. Podría ensayarse el cultivo continuo para las vacunas bacterianas porque las condiciones de reproducción *in vivo* se parecen más a las de cultivo continuo que a las de cultivo de lotes (21); y los medios de cultivo podrían complementarse con extractos o constituyentes de los tejidos que favorecen la reproducción prolífica de bacterias *in vivo* (véase pág. 547 "Estudio de microorganismos" sobre *Br. abortus*).

Numerosas vacunas víricas todavía se preparan en animales vivos y, aun para las que se preparan en cultivo tisular, deben utilizarse en la actualidad cultivos primarios por los posibles peligros del empleo de estirpes celulares (3, 4). Es indudable que la utilización de estirpes celulares tiene ventajas en lo que se refiere a conveniencia y estandarización (3), pero el empleo de estas estirpes para la producción de vacuna puede originar la pérdida de antígenos protectores puesto que el virus prolifera en condiciones más distanciadas de las que existen en los animales. La prevención de la desdiferenciación de células animales en cultivos tisulares seriados para que puedan utilizarse más estirpes de células "parecidas a las de origen animal" para la proliferación vírica, podría vencer esta dificultad.

En cuanto a las posibles vacunas de hongos y protozoos, las tentativas de cultivo de estos microorganismos *in vitro* deben orientarse hacia la producción de formas morfológicas apropiadas. Por ejemplo, los hongos dimorfos patógenos se reproducen en forma de levadura *in vivo* y en formas micelianas (o artrospóricas) *in vitro*. Se han producido algunas formas de levadura *in vitro* mediante modificaciones apropiadas de las condiciones de proliferación (27). La forma de levadura de *Coccidioides immitis* produce antígenos distintos de los de la forma artrospórica (29), y la primera es más eficaz que la segunda para proteger

a animales de infecciones de las vías respiratorias (6).

Estudio de microorganismos en ambientes más naturales para identificar posibles antígenos protectores

Uno de los métodos para identificar antígenos protectores consiste, en primer lugar, en examinar el problema no desde el punto de vista de la prevención sino de la iniciación de una enfermedad. Si se identificaran los factores que determinan la manifestación de enfermedad y demostraran ser antigénicos se dispondría en seguida de posibles antígenos protectores. Si cualquier factor de virulencia importante demostrara que no es antigénico, surgiría la posibilidad de mejorar en la naturaleza (es decir, el efecto inmunizante de la enfermedad declarada) porque el factor de virulencia debe convertirse en antigénico mediante los métodos descritos por White (9) y Staub (10). Por lo tanto, podrían producirse vacunas no solo contra enfermedades (v.g., infecciones estafilocócicas) en que la infección declarada no confiere inmunidad, sino también contra las enfermedades en las que la existencia de tipos antigénicos diferentes de la especie causante impide la vacunación eficaz, siempre que los tipos posean un factor común de virulencia (inherentemente no antigénico).

El método propuesto para identificar los posibles antígenos protectores no es nuevo. La inmunización antidiftérica y antitetánica siguió a la identificación de las toxinas respectivas como los factores más importantes en la enfermedad. Sin embargo, como ya se indicó, la mayoría de las enfermedades no son como estas toxemias, en que la patogenicidad se determina por un solo producto bacteriano producido *in vitro* con facilidad. Por lo común entra en juego una serie de factores de virulencia desconocidos, y el problema estriba en concebir métodos para la identificación de estos factores. Algunos factores de virulencia se producirán en cultivos normales de labora-

torio. Pero por las razones mencionadas (pág. 544 "Dificultades") y con más detalle en otra ocasión (14, 16, 20), los microorganismos multiplicados *in vitro* pueden ser incompletos o engañan en lo que se refiere a la profesión de atributos de virulencia. Por consiguiente se sugiere, para los problemas de patogenicidad que hasta la fecha no se han logrado resolver con los procedimientos tradicionales de cultivos *in vitro*, un estudio del comportamiento microbiano *in vivo*. De esta manera los factores hasta ahora desconocidos, que intervienen en la patogenicidad, podrían ser revelados para la reproducción subsiguiente *in vitro* mediante los cambios apropiados de las condiciones de cultivo. Luego podrían investigarse estos factores de virulencia en relación con la actividad protectora en las vacunas. En otra ocasión se han examinado los métodos para estudiar el comportamiento microbiano *in vivo* (14, 20). En la parte restante de este artículo se resumen ejemplos de los trabajos sobre el cultivo bacteriano *in vivo* que han revelado factores de virulencia de posible empleo para vacunas.

Se preparó, mediante los procedimientos tradicionales, una buena vacuna no viva contra el ántrax con substratos de cultivos de *B. anthracis* en medios especiales (30, 31). Ahora bien, los estudios sobre la causa de defunción por ántrax han indicado: a) que esta vacuna en algunos casos podría ser inadecuada y b) la manera en que se podría mejorar. El complejo tóxico del ántrax, observado originalmente en el plasma de cobayos que morían de esa enfermedad (20), y luego en otros animales, se acepta de modo general como el causante de la muerte (32). Posteriormente el complejo tóxico se produjo *in vitro*, y sus componentes fueron examinados. Los aspectos importantes de este trabajo en relación con la vacunación son los siguientes. El complejo está integrado por tres elementos que ejercen una interacción sinérgica en las pruebas de toxicidad (4). La vacuna tradi-

cional se basa particularmente en uno de estos componentes (33, 34); sin embargo, los otros componentes afectan de manera significativa a la inmunogenicidad de las mezclas (35, 36). Por ello, es posible que una vacuna a base de un factor no confiera suficiente resistencia contra una cepa de *B. anthracis* en cuyo complejo tóxico predominan los otros dos factores. De ahí que tal vez podrían mejorarse las vacunas contra el ántrax incluyendo uno de los factores adicionales, (o ambos) que intervienen en la actividad tóxica. La actividad tóxica de estos factores es inestable y puede reducirse con facilidad para la preparación vacunal.

En lo que se refiere a la vacunación contra la peste, probablemente sería eficaz para el hombre un producto que inmunizara a los ratones y los cobayos (37). Hasta fechas recientes se aceptaba de modo general que, si bien las vacunas vivas atenuadas inmunizaban a los cobayos así como a los ratones, las vacunas muertas inyectadas sin coadyuvantes resultaban relativamente ineficaces para los cobayos pero suficientes para los ratones (37). Un producto —fracción— de *Pasteurella pestis* proliferado *in vitro* protegió a los ratones sin coadyuvante, pero en cambio este se necesitó para proteger a los cobayos (38). Unos estudios sobre la *P. pestis* aislada directamente de cobayos que morían de peste reveló la presencia de un producto de la membrana celular, antifagocítico que demostró ser inmunógeno tanto para los cobayos como para los ratones (39-41). Este producto contenía poca fracción I pero posiblemente *in vivo* el complejo de la membrana celular actuó de coadyuvante del componente menor. Después, el material de membrana celular producido *in vitro* constituyó la base de una vacuna filtrada que, sin coadyuvante, protegió a los cobayos y los ratones de la infección subcutánea y respiratoria de *P. pestis* (42).

En el pasado, para la vacunación contra la brucelosis bovina se empleaba una vacuna viva preparada con la cepa S19 lisa de *Br.*

abortus, pero hace poco se introdujo una vacuna muerta que contiene coadyuvante, preparada con la cepa 45/20 rugosa. Esta última cepa es no aglutinógena (y permite distinguir entre animales infectados y vacunados) y, sin embargo, parece producir inmunidad suficiente mediante la formación del denominado anticuerpo incompleto (43, 44). Un producto aglutinógeno que es probable que contribuya a la actividad inmunizante de las vacunas de cepa lisa, es un complejo de membrana celular que contiene proteína, lípidos y carbohidratos que fue identificado por Paterson, Pirie y Stableforth (45) y purificado por Ellwood *et al.* (17). Este producto interfirió en la acción bactericida del suero bovino y se introdujo desde la pared celular en el medio vecino (17, 46). La cepa 45/20 rugosa liberó una cantidad más pequeña de este producto o un material menos inmunógeno (46) a lo que podría atribuirse el hecho de que solo provocara anticuerpo incompleto. Es posible que estos materiales no sean los únicos antígenos protectores de *Br. abortus*. La inmunidad a la brucelosis se basa más bien en elementos celulares que humorales (12, 47), y tal vez sea también importante para la vacunación un factor de virulencia identificado recientemente que contribuye a la supervivencia intracelular de la *Br. abortus* en fagocitos. La identificación de este factor ha sido examinada en otra ocasión (16), y este artículo se limita a los puntos más destacados. La *Br. abortus* virulenta obtenida de cultivo en monocitos de cobayos o de tejido placentario bovino infectado, mostró una mayor capacidad de supervivencia intracelular en cultivos de mantenimiento de fagocitos, en comparación con la misma cepa cultivada en medios de laboratorio (48, 49). El material de membrana celular de los organismos procedentes de placenta bovina infectada inhibió la destrucción intracelular de una cepa avirulenta de *Br. abortus*. No se observó este efecto con material de membrana celular

obtenido de cepa virulenta o avirulenta cultivada *in vitro*, y el material quedó neutralizado por un antisuero contra *Br. abortus* virulenta viva (49). El material que evitó la destrucción intracelular de *Br. abortus* se diferenciaba del material de membrana celular inmunógeno antes descrito. Este último interfirió en las bactericidas intracelulares de suero bovino y células de costra flogística, pero no en la actividad bactericida intracelular de los fagocitos bovinos (49, 50). Una vez identificado el material de membrana celular que contribuye a la supervivencia intracelular, mediante observaciones en *Br. abortus* cultivada *in vivo*, se produjeron organismos *in vitro* que poseen este material complementando los cultivos de laboratorios con líquidos fetales bovinos (51). Así, los organismos resistentes a las bactericidas intracelulares pueden prepararse en gran cantidad y ser extraídos para determinar la naturaleza e inmunogenicidad del material que contribuye a la supervivencia intracelular. Ya se ha demostrado que estos organismos son más inmunógenos en los ratones que los organismos procedentes de medios no complementados (52).

Las vacunas anticólicas podrían mejorarse de manera considerable; contra la *Escherichia coli* no existe ninguna vacuna (1, 2). Gracias a la reciente identificación de enterotoxinas causantes de los efectos patológicos de infecciones por *Vibrio cholerae* y cepas enteropatógenas de *E. coli* pueden elaborarse nuevas vacunas (53-59). Anteriormente algunos investigadores trataron, sin demasiado éxito, de implicar la endotoxina y una serie de otros productos en los efectos patológicos de las dos bacterias. El escaso éxito se debió a la dificultad de obtener un animal experimental o una prueba biológica en que pudieran simularse los efectos de la infección humana; por ejemplo, si bien el ratón podía matarse con la inyección intraperitoneal de *V. cholerae*, vivo o su endotoxina, en ninguno de los

casos se observaron signos manifiestos de cólera. Se acaban de obtener ciertos progresos con el empleo de sistemas biológicos más naturales y examinando en ellos la conducta del *V. cholerae* o *E. coli* antes de estudiar sus productos cultivados *in vitro*. La infección entérica de conejos y perros jóvenes, la infección de secciones intestinales ligadas de conejo, y la prueba cutánea en cobayos y conejos con respecto a los factores que aumentan la permeabilidad capilar, han resultado valiosas para las investigaciones sobre el cólera. Y la técnica del intestino ligado se ha utilizado en una serie de animales para investigar las infecciones de *E. coli*. En los trabajos sobre el cólera se examinaron productos de *V. cholerae* producidos en el huésped natural (es decir, en las heces riciformes de enfermos de cólera). En la actualidad ya se han identificado y producido *in vitro* enterotoxinas de *V. cholerae* y *E. coli* distintas de las endotoxinas. Se están esperando los resultados de la incorporación de las correspondientes enterotoxinas en las vacunas.

La vacunación contra infecciones estafilocócicas resistentes a los antibióticos sería conveniente en los hospitales. Puesto que la infección declarada no estimula una apreciable inmunidad activa, debe considerarse la posible existencia de factores de virulencia no antigénicos. Ninguno de los numerosos factores de virulencia producidos en mayor cantidad por cepas virulentas que por cepas avirulentas *in vitro* parece revestir mayor importancia en la infección, y los factores de virulencia hasta ahora desconocidos pueden producirse *in vivo* (60-62). Los estudios de Gellenbeck (63) y Beining y Kennedy (64), que revelaron diferencias entre los estafilococos cultivados *in vivo* e *in vitro*, estimularon la investigación de esos factores. En fecha reciente (65) se ha demostrado que los estafilococos aislados directamente de infecciones en conejos son más virulentos que la misma cepa cultivada *in vitro* y más resistentes a las bactericidas

de suero de conejo, de células polimorfonucleares de conejo intactas y de lisatos preparados con ellos. En otras investigaciones se demostrará si esta resistencia a los mecanismos de defensa del huésped se debe a un factor de virulencia desconocido (como α -toxina, leococidina, coagulosa) o a un factor nuevo de posible empleo para las vacunas.

Antes de terminar este examen de la búsqueda de antígenos protectores, hay que mencionar el posible efecto que ejercería sobre la profilaxis de un conocimiento mayor de los compuestos causantes de las especificidades en el huésped (y en los tejidos) de los microorganismos patógenos (16). En la preocupación por los mecanismos de la inmunidad adquirida, puede suceder que se olvide que, a menudo, las diferencias en la susceptibilidad a la infección entre especies o huéspedes exceden de las que ocurren entre los huéspedes inmunizados y no inmunizados de la misma especie. Si las bases de las especificaciones del huésped pudieran identificarse y neutralizarse, química o inmunológicamente, se dispondría de otro método de profilaxis para complementar la vacunación tradicional.

Resumen

Los organismos patógenos, así como los no patógenos, forman numerosos antígenos que no guardan relación alguna con la manifestación o prevención de la enferme-

dad. Los "verdaderos" antígenos para las vacunas son productos microbianos —factores de virulencia— que contribuyen a la manifestación de enfermedad en el huésped natural; cuando se emplean en vacuna provocan las correspondientes reacciones de anticuerpos o de elementos celulares. Estos denominados antígenos protectores o inmunógenos (en los que se incluyen productos que provocan no solo inmunidad humoral sino también de base celular), constituyen únicamente una pequeña proporción de los antígenos totales que forman los microorganismos patógenos, pero deben estar presentes para que una vacuna sea eficaz. Así mismo, estos antígenos deben ser "buenos" antígenos, es decir, deben producir una respuesta vigorosa de anticuerpos protectores o elementos celulares que persistan durante largo tiempo o que se movilicen rápidamente cuando ocurra la infección. La protección ineficaz se debe a que los factores de virulencia son "malos" antígenos, o con más frecuencia, a que están ausentes de las preparaciones vacunales porque las condiciones de cultivo *in vitro* resultan inadecuadas para su producción. Esto último ocurre *in vivo*, y uno de los métodos para revelar los antígenos posiblemente protectores consiste en examinar sus organismos y sus productos obtenidos de animales infectados. Una vez identificado un factor de virulencia, su producción *in vitro* puede obtenerse modificando en forma debida las condiciones de proliferación. □

REFERENCIAS

- (1) Standfast, A. F. B. En Cruickshank, R. y Weir, D. M., ed. *Modern trends in immunology* 2, pág. 1. Butterworths: Londres, 1967.
- (2) Oakley, C. L. En Gell, P. G. H. y Coombs, R. R. A., ed. *Clinical aspects of immunology*, 2a ed., pág. 1179. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1968.
- (3) Perkins, F. T. *Scient Basis Med A Rev* pág. 93, 1968.
- (4) Perkins, F. T. y Kaplan, C. En Gell, P. G. H. y Coombs, R. R. A., ed. *Clinical aspects of immunology*, 2a ed., pág. 1208. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1968.
- (5) Manson-Bahr, P. E. C. y Weitz, B. En Gell, P. G. H. y Coombs, R. R. A., ed. *Clinical aspects of immunology*, 2a ed., pág. 1232. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1968.
- (6) Kong, Y. C. M. y Levine, H. B. *Bact Rev* 31:35, 1967.
- (7) Fenner, F. En Horsfall, F. L., Jr. y Tamm, I., ed. *Viral and rickettsial infections of*

- man, 4a ed., pág. 356. Lippincott: Filadelfia, Pa., 1965.
- (8) Cinader, B. *Brit Med Bull* 19:219, 1963.
- (9) White, R. G. *Brit Med Bull* 19:207, 1963.
- (10) Staub, A. M. En Landy, M. y Braun, W., ed. *Bacterial endotoxins*, pág. 38. Rutgers University Press: Nueva Jersey, 1964.
- (11) Smith, H. y Stoner, H. B. *Fedn Proc Fedn Amer Socs Exp Biol* 26:1554, 1967.
- (12) Elberg, S. S. *Bact Rev* 24:67, 1960.
- (13) Coombs, R. R. A. y Smith, H. En Gell, P. G. H. y Coombs, R. R. A., ed. *Clinical aspects of immunology*, 2a ed., pág. 423. Blackwell Scientific Publications: Oxford, 1968.
- (14) Smith, H. *Symp Soc Gen Microbiol* 14:1, 1964.
- (15) Standfast, A. F. B. *Symp Soc Gen Microbiol* 14:64, 1964.
- (16) Smith, H. *Bact Rev* 32:164, 1968.
- (17) Ellwood, D. C., Keppie, J. y Smith, H. *Brit J Exp Path* 48:28, 1967.
- (18) MacLeod, C. M. y Bernheimer, A. W. En Dubos, R. J. y Hirsch, J. G., ed. *Bacterial and mycotic infections of man*, 4a ed., pág. 146. Pitman Medical: Londres, 1965.
- (19) Holland, J. J. *Bact Rev* 28:3, 1964.
- (20) Smith, H. *A Rev Microbiol* 12:77, 1958.
- (21) Woods, D. D. y Foster, M. A. *Symp Soc Gen Microbiol* 14:30, 1964.
- (22) Lacey, B. W. *Symp Soc Gen Microbiol* 11:343, 1961.
- (23) Meynell, G. G. *Symp Soc Gen Microbiol* 11:174, 1961.
- (24) Schaffer, F. L. y Schwerdt, C. E. En Horsfall, F. L., Jr. y Tamm, I., ed. *Viral and rickettsial infections of man*, 4a ed., pág. 94. Lippincott: Filadelfia, Pa., 1965.
- (25) Henderson, J. R.; Levine, S. I.; Stim, T. B., y Karabatsos, N. *J Immunol* 99:935, 1967.
- (26) McGee-Russell, S. M. y Gosztonyi, G. *Nature (Londres)* 214:1204, 1967.
- (27) Mariat, F. *Symp Soc Gen Microbiol* 14:85, 1964.
- (28) Weitz, B. *Symp Soc Gen Microbiol* 14:112, 1964.
- (29) Landay, M. E.; Wheat, R. W.; Conant, N. F., y Lowe, E. P. *J Bact* 94:1400, 1967.
- (30) Belton, F. C. y Strange, R. E. *Brit J Exp Path* 35:144, 1954.
- (31) Wright, G. G.; Hedberg, M. A., y Slein, J. B. *J Immunol* 72:263, 1954.
- (32) Nungester, W. J. *Fedn Proc Fedn Amer Socs Exp Biol* 26:1485, 1967.
- (33) Smith, H.; Tempest, D. W.; Stanley, J. L.; Harris-Smith, P. W., y Gallop, R. C. *Brit J Exp Path* 37:263, 1956.
- (34) Thorne, C. B.; Molnar, D. M., y Strange, R. E. *J Bact* 79:450, 1960.
- (35) Stanley, J. L. y Smith, H. *J Gen Microbiol* 31:329, 1963.
- (36) Mahlandt, B. G.; Klein, F.; Lincoln, R. E.; Haines, B. W.; Jones, W. I., Jr., y Friedman, R. H. *J Immunol* 96:727, 1966.
- (37) Girard, G. *A Rev Microbiol* 9:253, 1955.
- (38) Spivack, M. L.; Foster, L.; Larson, A.; Chen, T. H.; Baker, E. E., y Meyer, K. F. *J Immunol* 80:132, 1958.
- (39) Cocking, E. C.; Keppie, J.; Witt, K., y Smith, H. *Brit J Exp Path* 41:460, 1960.
- (40) Keppie, J.; Cocking, E. C.; Witt, K., y Smith, H. *Brit J Exp Path* 41:577, 1960.
- (41) Smith, H.; Keppie, J.; Cocking, E. C., y Witt, K. *Brit J Exp Path* 41:452, 1960.
- (42) Smith, H. y Packman, L. P. *Brit J Exp Path* 47:25, 1966.
- (43) McDiarmid, A. *Annlis Inst Pasteur (Paris)* 102:792, 1962.
- (44) Cunningham, B. *Vet Rec* 82:7, 1968.
- (45) Paterson, J. S.; Pirie, N. W., y Stableforth, A. W. *Brit J Exp Path* 28:223, 1947.
- (46) Keppie, J.; Witt, K., y Smith, H. *Brit J Exp Path* 44:84, 1963.
- (47) FitzGeorge, R. B.; Solotorovsky, M., y Smith, H. *Brit J Exp Path* 48:522, 1967.
- (48) Stinebring, W. R. *J Infect Dis* 111:17, 1962.
- (49) Smith, H. y FitzGeorge, R. B. *Brit J Exp Path* 45:174, 1964.
- (50) MacRae, R. M. y Smith, H. *Brit J Exp Path* 45:595, 1964.
- (51) FitzGeorge, R. B. y Smith, H. *Brit J Exp Path* 47:558, 1966.
- (52) Keppie, J.; Witt, K., y Smith, H. *Brit J Exp Path* 50:219, 1969.
- (53) De, S. N.; Ghose, M. L., y Sen, A. *J Path Bact* 79:373, 1960.
- (54) Finkelstein, R. A.; Norris, H. T., y Dutta, N. K. *J Infect Dis* 114:203, 1964.
- (55) Craig, J. P. *Nature (Londres)* 207:614, 1965.
- (56) Craig, J. P. *J Bact* 92:793, 1966.
- (57) Sack, R. B.; Carpenter, C. C. J.; Steenburg, R. W., y Pierce, N. F. *Lancet* 2:206, 1966.
- (58) Taylor, J. y Bettelheim, K. A. *J Gen Microbiol* 42:309, 1966.
- (59) Smith, H. W. y Halls, S. *J Path Bact* 93:531, 1967.
- (60) Burns, J. y Holtman, D. F. *Ann N.Y. Acad Sci* 88:1115, 1960.
- (61) Koenig, M. G.; Melly, M. A., y Rogers, D. E. *J Exp Med* 116:601, 1962.
- (62) Blair, J. E. *Ann N.Y. Acad Sci* 128:451, 1965.
- (63) Gellenbeck, S. M. *J Bact* 83:450, 1962.
- (64) Beining, P. R. y Kennedy, E. R. *J Bact* 85:732, 1963.
- (65) Adlam, C.; Pearce, J. H., y Smith, H. *Nature (Londres)* 219:641, 1968.

The Search for Protective Antigens (Summary)

Pathogenic as well as non-pathogenic microorganisms form numerous antigens which have nothing to do with either the production or prevention of disease. The "right" antigens for vaccines are microbial products—virulence factors—which contribute to the production of disease in the natural host; used in vaccines they evoke corresponding antibodies or cellular responses. These so-called protective or immunogenic antigens (used here to cover products evoking not only humoral but also cell-mediated immunity) constitute only a small proportion of the total antigens formed by pathogenic microorganisms, but they must be present for a vaccine to be effective. Also these antigens must be "good" antigens, that is

they must produce a strong response of protective antibody or cellular elements which persist for a long time or are rapidly mobilized on infection. Ineffective protection is due either to virulence factors being "bad" antigens or, more often, to their absence in vaccine preparations because the cultural conditions *in vitro* are inadequate for their production. The latter occurs *in vivo* and one method of revealing potentially protective antigens is to examine organisms and their products obtained from infected animals. Once a virulence factor has been recognized in this manner its production *in vitro* can be achieved by appropriate changes in growth condition.

A procura do antígeno protetor (Resumo)

Tanto os micro-organismos patogênicos como os não patogênicos determinam a formação de antígenos que não chegam a provocar a doença nem a preveni-la. O antígeno "certo" são produtos microbianos —fatores de virulência— que contribuem para que o hóspede natural contraia a doença. Quando usados em vacinas, tais antígenos produzem os anticorpos correspondentes ou reações celulares. Os chamados antígenos protetores ou imunogênicos (denominação que agrange produtos que conferem imunidade não somente humoral mas também imunidade celular mediata) constituem apenas pequena proporção do total de antígenos formados pelos micro-organismos patogênicos. Entretanto, sua presença na vacina é indispensável para que esta seja eficaz. Tais antígenos também devem ser "bons" antígenos, ou

seja, devem provocar intensa formação de anticorpos ou elementos celulares de proteção, que subsistam durante longo tempo ou sejam rapidamente mobilizados em caso de infecção. A proteção é inadequada quando os fatores de virulência são "maus" ou, o que é mais freqüente, quando não se acham eles presentes nas vacinas em virtude de condições de cultura *in vitro* inadequadas na sua preparação. Tais condições se verificam *in vivo* e um dos métodos para comprovar a presença de antígenos protetores consiste em examinar os organismos, bem como seus produtos em animais infectados. Reconhecido desse modo o fator de virulência, poder-se-á conseguir sua produção *in vitro* mediante o melhoramento das condições de proliferação.

A la recherche d'antigènes protecteurs (Résumé)

Les micro-organismes pathogènes et non pathogènes forment de nombreux antigènes qui n'ont aucun rapport avec la production ou la prévention des maladies. Les "bons" antigènes pour les vaccins sont des produits microbiens —facteurs de virulence— qui contribuent à la production de la maladie chez l'hôte naturel; employés dans les vaccins, ils produisent des anticorps correspondants ou des réponses cellulaires. Ces antigènes dits protecteurs ou immunogènes (employés ici pour couvrir des produits qui ne suscitent non seulement une

immunité par voie cellulaire) ne constitue qu'un faible pourcentage de l'ensemble des antigènes formés par les micro-organismes pathogènes, mais ils doivent être présents pour qu'un vaccin soit efficace. En outre, il faut que ces antigènes soient de "bons" antigènes, c'est-à-dire qu'ils doivent produire une forte réponse d'éléments protecteurs anticorps ou cellulaires que persistent pendant longtemps ou qui sont rapidement mobilisés lorsque survient une infection. Une protection inefficace est imputable soit aux facteurs de virulence qui sont de "mauvais"

antigènes ou, plus souvent, à leur absence dans les préparations vaccinales du fait que les conditions de culture *in vitro* ne permettent pas leur production. C'est ce qui se produit *in vivo*, et une méthode permettant de révéler des antigènes éventuellement protecteurs serait

d'examiner les organismes et leurs produits provenant des animaux infectés. Une fois qu'un facteur de virulence a été reconnu de cette manière, sa production *in vitro* peut être réalisée en provoquant des changements appropriés dans la condition de croissance.

MALARIA

A fines de 1972, la población estimada de las zonas originalmente maláricas en las Américas era de 190,448,000 habitantes, de los cuales 86,634,000 (45.5%) residían en áreas que ahora se encuentran libres de la enfermedad y en la fase de mantenimiento de la campaña de erradicación. Durante 1972 hubo en esas zonas algunos focos activos de infección provocados por casos importados. Así mismo, 42,016,000 habitantes (22.0%) vivían en zonas que hoy se encuentran en fase de consolidación; 61,645,000 habitantes (32.4%) en zonas que se encuentran en fase de ataque y 153,000 (0.1%) en zonas donde no se ha iniciado ningún programa.

De acuerdo con el informe presentado a la XXII Reunión del Consejo Directivo de la Organización Panamericana de la Salud, celebrada del 8 al 18 de octubre de 1973, 79,835,000 habitantes (41.9%) de las zonas originalmente maláricas residen ahora en zonas donde existen buenas perspectivas de lograr la erradicación de la enfermedad, mientras que 23,979,000 personas (12.6%) habitan en zonas donde el programa de erradicación no ha logrado progresar satisfactoriamente por falta de fondos y debido a serios problemas de operación o técnicos.