

*Este informe recoge la opinión colectiva de un grupo internacional de especialistas y no representa necesariamente el criterio ni la política de la Organización Mundial de la Salud.*

**ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD  
SERIE DE INFORMES TECNICOS**

Nº 414

# **INMUNOLOGIA DEL COLERA**

**Informe de un Grupo Científico de la OMS**

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

GINEBRA

1969

© Organización Mundial de la Salud, 1969

Las publicaciones de la Organización Mundial de la Salud están acogidas a la protección prevista por las disposiciones sobre reproducción de originales del Protocolo 2 de la Convención Universal sobre Derecho de Autor. Ello no obstante, los organismos gubernamentales, las sociedades culturales y científicas y las asociaciones profesionales pueden reproducir ilustraciones, datos o extractos de esas publicaciones sin necesidad de pedir autorización a la Organización Mundial de la Salud.

Las entidades interesadas en reproducir o traducir íntegramente alguna publicación de la OMS deberán solicitar la oportuna autorización de la División de Servicios de Edición y de Documentación, Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza. La Organización Mundial de la Salud dará a esas solicitudes consideración muy favorable.

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que se presentan los datos que contiene no implican, por parte del Director General de la Organización Mundial de la Salud, juicio alguno sobre la condición jurídica de ninguno de los países o territorios citados o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras.

La mención de determinadas sociedades mercantiles o del nombre comercial de ciertos productos no implica que la OMS los apruebe o recomiende con preferencia a otros análogos. Salvo error u omisión, las marcas registradas de artículos o productos de esta naturaleza se distinguen en las publicaciones de la OMS por una letra inicial mayúscula.

PRINTED IN FRANCE

## INDICE

	Página
1. Conceptos actuales sobre la inmunidad en el cólera y en las infecciones entéricas . . . . .	5
2. Antígenos y fracciones antigénicas . . . . .	10
3. Los anticuerpos y su determinación . . . . .	13
4. Anticuerpos e inmunidad . . . . .	14
5. Vacunas . . . . .	16
6. Investigaciones recomendadas . . . . .	19

**GRUPO CIENTIFICO DE LA OMS SOBRE INMUNOLOGIA DEL COLERA**

*Teherán, 14-19 de septiembre de 1968*

*Miembros: \**

- Dr. K. Bhaskaran, Central Drug Research Institute, Lucknow, India (*Relator*)  
Profesor W. Burrows, Department of Microbiology, University of Chicago, Ill.,  
Estados Unidos de América
- Dr. G. Edsall, Superintendent, Massachusetts State Laboratory Institute, Boston,  
Mass., Estados Unidos de América
- Dr. J. C. Feeley, Chief, Bacterial Vaccines Section, Division of Biologics Stan-  
dards, National Institutes of Health, Bethesda, Md., Estados Unidos de  
América (*Relator*)
- Dr. O. Felsenfeld, Chief, Division of Communicable Diseases, Tulane University  
Delta Primate Research Centre, Covington, La., Estados Unidos de América  
(*Presidente*)
- Dr. I. Joó, Director Técnico Adjunto, Instituto de Sueros y Vacunas, Budapest,  
Hungria (*Vicepresidente*)
- Dr. Y. Watanabe, Department of Microbiology, University of Texas Medical  
Branch, Galveston, Texas, Estados Unidos de América.
- Profesor R. G. White, Department of Bacteriology and Immunology, Western  
Infirmary, Glasgow, Escocia.

*Secretaría:*

- Dr. B. Cvjetanović, Jefe del Servicio de Enfermedades Bacterianas, OMS, Ginebra  
(*Cosecretario*)
- Dr. H. C. Goodman, Jefe del Servicio de Inmunología, OMS, Ginebra (*Cosecretario*)
- Dr. W. H. Mosley, Chief, Epidemiology Section, Pakistan-SEATO Cholera  
Research Laboratory, Institute of Public Health, Dacca, Paquistán (*Asesor  
temporero*)

*\* No pudieron asistir :*

Profesor Z. V. Ermol'eva, Departamento de Microbiología, Instituto Central  
de Estudios Médicos Superiores, Moscú, URSS

Dr. J. Sterzl, Jefe del Departamento de Inmunología, Instituto de Microbio-  
logía, Praga, Checoslovaquia.

## **INMUNOLOGIA DEL COLERA**

### **Informe de un Grupo Científico de la OMS**

El Grupo Científico de la OMS sobre Inmunología del Cólera se reunió en Teherán del 14 al 19 de septiembre de 1968.

El Dr. A. H. Taba, Director de la Oficina Regional de la OMS para el Mediterráneo Oriental, inauguró la reunión y dio la bienvenida a los participantes en nombre del Director General.

El Grupo nombró Presidente al Dr. O. Felsenfeld, Vicepresidente al Dr. I. Joó, y Relatores a los Dres. K. Bhaskaran y J. C. Feeley.

Este Grupo Científico ha sido el tercero de los reunidos por la OMS para examinar la marcha de las investigaciones sobre el cólera. Sin embargo, mientras los dos anteriores<sup>1</sup> se ocuparon de la investigación en general, el presente Grupo se dedicó exclusivamente a examinar la inmunología de esta enfermedad y especialmente las posibilidades de mejorar la vacunación profiláctica.

#### **1. CONCEPTOS ACTUALES SOBRE LA INMUNIDAD EN EL COLERA Y EN LAS INFECCIONES ENTERICAS**

El Grupo examinó el estado actual de los conocimientos sobre inmunología y su relación con las infecciones entéricas, especialmente con el cólera.

Los ensayos prácticos de vacunas anticoléricas efectuados en tres países durante los últimos años, así como los abundantes datos recogidos sobre la epidemiología del cólera endémico, ponen claramente de manifiesto que tanto la infección natural como la inmunización parenteral van seguidas de la aparición de anticuerpos contra los antígenos del cólera y de una resistencia relativa a la enfermedad.

Sin embargo, los hallazgos realizados en los dos últimos decenios han subrayado la importancia de los factores intestinales locales en la

<sup>1</sup> Los informes preparados por los dos primeros grupos, que se reunieron en 1962 y 1964, no han sido publicados.

inmunidad al cólera. Aparte de no haberse logrado demostrar ninguna lesión tisular significativa ni incluso la penetración del vibrión colérico en los tejidos, cada vez hay más indicios de la formación de anticuerpos en los tejidos del tubo intestinal, sobre todo cuando las circunstancias favorecen el contacto del antígeno con dichos tejidos. Estas observaciones pueden hoy relacionarse con la presencia de un anticuerpo « IgA » secretorio, que ha sido identificado en diversas secreciones epiteliales en las que constituye la inmunoglobulina predominante.

El éxito de la lucha inmunológica contra el cólera parece así depender en gran medida del análisis de los mecanismos inmunitarios locales que actúan en el intestino y no sólo de los estudios sobre la inmunología serológica de la enfermedad.

La respuesta inmunológica se debe estudiar en función de dos tipos relativamente independientes de mecanismos inmunitarios. En el primero, los « mediadores » de la inmunidad son los anticuerpos circulantes, mientras que en el segundo (respuesta inmunitaria específica de base celular) son los linfocitos sensibilizados. En el caso del cólera, apenas hay datos sobre la función que desempeñan las respuestas inmunitarias de base celular, pues las investigaciones han versado principalmente sobre la relación más conocida entre la resistencia y los anticuerpos circulantes.

Durante los últimos años se ha demostrado que los anticuerpos séricos pertenecen a una compleja familia de proteínas emparentadas entre sí y designadas con el nombre genérico de inmunoglobulinas. Al mismo tiempo se ha reavivado el interés por los anticuerpos existentes en las secreciones gastrointestinales o de otro origen que entran en contacto con las mucosas, sobre todo desde que recientemente se ha demostrado que la IgA es la inmunoglobulina predominante en la saliva parotídea, el calostro, las lágrimas, las secreciones nasales y traqueobronquiales y las secreciones del intestino delgado. La IgA « secretoria » difiere en muchos sentidos de la IgA del suero. La IgA sérica es un monómero de 7S, mientras que la IgA del calostro y de la saliva es, al menos en un 60%, un dímero dotado de una cadena peptídica adicional de un peso molecular de 50 000. Esta cadena puede ponerse de manifiesto en el citoplasma de las células epiteliales y ha sido denominada « pieza de transporte », pues se supone que se une a la IgA sintetizada por las células linfoides de la submucosa al atravesar la pared celular para verterse en la secreción externa. Sin embargo, esta hipótesis no ha sido todavía comprobada de manera concluyente.

Está demostrado que las inmunoglobulinas « secretorias » IgA poseen actividad de anticuerpo y en sujetos voluntarios se ha visto que existe una correlación entre la resistencia a ciertas virosis y el nivel de anticuerpos IgA en la secreción nasofaríngea. Asimismo se ha observado que la producción de anticuerpos antigripales específicos en las secreciones de las vías respiratorias es mejor si la vacuna antigripal se aplica localmente

en forma de aerosol que si se inyecta; durante una epidemia, la incidencia de la enfermedad fue menor en el grupo vacunado con el aerosol que en el vacunado por vía parenteral. También se ha comprobado que la formación de anticuerpos en la secreción vaginal es mejor tras la aplicación local del antígeno que tras su administración parenteral.

La « memoria » inmunológica tiene una base celular. Se han emitido muchas teorías acerca de sus mecanismos de programación; en cualquier caso, un hecho demostrado es que la memoria para la formación de IgM dura en general menos que la destinada a la formación de IgG. Esta diferencia es importante para el desarrollo de una inmunidad duradera.

La unión antígeno-anticuerpo es menos firme con las IgM que con las IgG. Al parecer, la avidéz varía según la subclase de Ig de que se trate y aumenta con el tiempo y con la repetición del estímulo antigénico.

Es necesario estudiar más a fondo los mecanismos en virtud de los cuales las vacunas administradas por vía parenteral provocan una respuesta eficaz de anticuerpos contra los vibriones en la luz intestinal. La existencia de un sistema inmunológico que parece exclusivo de ciertas secreciones externas obliga también a evaluar su intervención en la inmunidad intestinal local.

En la patogenia del cólera parecen intervenir al menos dos procesos fundamentales : 1) la infección de la luz intestinal por el *Vibrio cholerae*, y 2) la producción por el germen invasor de una toxina que da origen al síndrome diarreico. A su vez, para cada uno de los dos procesos citados parecen existir mecanismos inmunitarios independientes, que pueden denominarse respectivamente inmunidad antibacteriana e inmunidad antitóxica. Hasta cierto punto, estos dos mecanismos pueden estudiarse por separado en diversos animales.

#### **Inmunidad antibacteriana**

Como la infección se limita a la luz intestinal, es sumamente probable que el proceso de inmunización antibacteriana tenga lugar en la misma luz y no en los tejidos intestinales. Para explicar el mecanismo inmunitario se han emitido varias teorías (inhibición de la adherencia bacteriana, fagocitosis, bacteriolisis) pero ninguna de ellas se apoya en pruebas concluyentes. Por otra parte, todavía se conocen muy mal la relación bacteria-huésped en la luz intestinal del hombre; se ignora, por ejemplo, si el germen puede multiplicarse libremente en la luz intestinal o si su multiplicación está condicionada por una relación especial con los extremos o las criptas de las vellosidades. El estudio de esta cuestión ha de hacerse en el periodo de incubación de la enfermedad o acaso en el de restablecimiento, pero nunca mientras persista el síndrome diarreico agudo durante el cual pueden estar alteradas las citadas relaciones.

En el hombre, la inmunidad antibacteriana puede provocarse por inyección de vacunas que contengan las células muertas enteras o los lipopolisacáridos. El grado de inmunidad se ha podido definir con precisión mediante ensayos prácticos y se ha visto que está en correlación con el título de anticuerpos vibriocidas del suero. El título vibriocida se determina mediante una reacción que exige la presencia del complemento y en la que intervienen las IgM y las IgG pero se ignora si estas inmunoglobulinas desempeñan alguna función en la inmunidad intestinal.

#### **Inmunidad antitóxica**

Aún no se sabe con exactitud dónde actúa la toxina del cólera, si bien los estudios efectuados en el conejo y el perro sugieren que lo hace en la superficie epitelial del intestino. En el perro, el contacto repetido de la toxina con la mucosa intestinal no parece haber producido ninguna inmunidad eficaz contra ulteriores aplicaciones de toxina; en cambio la administración parenteral de una vacuna que contenía toxina colérica confiere al asa intestinal una protección eficaz contra la acción ulterior de dicha toxina. En el hombre no se ha ensayado ninguna vacuna de ese tipo. La infección clínica humana va seguida de la aparición en el suero de anticuerpos neutralizantes que, según se ha comprobado, son IgG. No se ha estudiado la relación entre estos anticuerpos y la inmunidad en el hombre. Así pues, aún está por determinar la importancia respectiva de las inmunidades antitóxica y antibacteriana.

#### **Inmunidad adquirida tras la infección colérica**

Por ahora no se dispone de ningún método satisfactorio para medir la inmunidad que sigue a la infección colérica. Prácticamente no existe ningún estudio bien documentado sobre la reinfección colérica, aunque también es cierto que la probabilidad de que se produzca es remota. Este problema contribuye a que sea difícil apreciar el valor respectivo de la inmunización oral y de la parenteral. De los mencionados estudios experimentales en el perro parece desprenderse que la inmunidad antitóxica acaso no se logre plenamente por vía oral; en cambio, la inmunidad antibacteriana se induce probablemente mejor por vía oral que por vía parenteral. Dos hechos, sin embargo, hacen dudar de esta suposición: el primero es la observación de que la vacuna parenteral provoca una respuesta inmunitaria vibriocida mejor y más sostenida que la producida por la infección clínica y el segundo que, según recientes estudios epidemiológicos, los niños de las zonas de endemia parecen sufrir reinfecciones año tras año. Si esto fuera cierto, no habría más remedio que concluir que la inmunización oral no proporciona suficiente protección contra

el contacto ulterior del vibrión. Así pues, mientras no se disponga de más datos no será posible evaluar las ventajas de la inmunización oral por comparación con la parenteral.

Antes de pronunciarse en favor de una vacuna o de una vía de administración es indispensable conocer a fondo el mecanismo inmunitario que actúa en la luz intestinal. Si se confirma que la IgA secretoria desempeña una función fundamental, la inmunización por vía oral puede adquirir gran importancia.

Importa pues obtener una información más exacta sobre los mecanismos inmunitarios del intestino, sobre la vía que sigue el antígeno hasta llegar a los tejidos que producen anticuerpos en esta región y sobre las formas que adopta la respuesta inmunitaria según que el antígeno ingrese por vía local o por vía parenteral. Estos estudios, por supuesto, exigen una labor previa de definición y caracterización de los antígenos y de la función que éstos desempeñan tanto en la patogenia del cólera como en la aparición de la inmunidad.

En un estudio efectuado en una zona de endemia se ha visto que los lactantes dan las clásicas reacciones de primovacunación y de revacunación cuando se les inyecta una vacuna anticolérica. A medida que van avanzando en edad, la respuesta del niño a una dosis única se va aproximando cada vez más a la de tipo secundario. Es evidente que durante ese periodo se encuentran expuestos a la infección natural, como lo demuestra el continuo aumento (a un ritmo del 5% anual) de la proporción de sujetos con anticuerpos vibriocidas. Parece, no obstante, que este incremento natural de la inmunidad anticolérica no depende exclusivamente del contacto directo con el vibrión, ya que en algunas zonas no endémicas (por ejemplo, Estados Unidos, Checoslovaquia y Hungría) los adultos poseen anticuerpos vibriocidas, en una proporción baja pero significativa, y dan una reacción secundaria a la inyección de una dosis única de vacuna. Estos anticuerpos, aunque suelen calificarse de « naturales » no parecen formarse espontáneamente sino que probablemente se deben a la presencia de otras bacterias antigénicamente afines, como las brucelas y pseudomonas.

Nuestros conocimientos sobre la inmunidad del cólera adolecen de otras muchas lagunas. Algunas personas, por ejemplo, contraen la enfermedad a pesar de tener una tasa de anticuerpos circulantes que teóricamente bastaría para hacerles resistentes al cólera. Por otra parte, la acción patógena del vibrión colérico se debe muy probablemente a la producción de toxinas, bien de algunas o de todas las identificadas hasta la fecha o de otras que aún quedan por identificar. Sin embargo, las vacunas que se han mostrado relativamente eficaces en los ensayos prácticos parecen carecer de antígenos toxínicos.

En las zonas de endemia son corrientes las reinfecciones, pero las recidivas clínicas son raras. La rápida e intensa elevación del nivel de

antitoxinas y el subsiguiente descenso que se observan en los niños residentes en dichas zonas plantean diversos problemas sobre la naturaleza del estímulo antigénico y sobre la respuesta del huésped tras repetidos contactos con vibriones coléricos.

En lo que respecta a los posibles factores que contribuyen a aumentar o a reducir la resistencia al cólera clínico, apenas se dispone de información. Los escasos datos existentes hacen pensar que la desnutrición crónica y el embarazo aumentan el riesgo, pero como la información sobre estos y otros factores comparables es muy incompleta aún habrá que efectuar estudios más detenidos sobre la cuestión. Tampoco se conoce la influencia de los anticuerpos introducidos pasivamente en el organismo sobre la inmunidad anticolérica, en el supuesto de que realmente influyan; por otra parte, la rareza del cólera en los lactantes impide evaluar la importancia de los anticuerpos maternos, si bien los actuales conocimientos no parecen indicar que la transferencia de anticuerpos *in utero* sea eficaz en ningún caso. Por último, es necesario analizar cuidadosamente la posibilidad de que la inmunidad contra el cólera esté determinada por factores genéticos.

No parece probable que la inmunidad celular, de la que ya se ha hablado anteriormente, desempeñe función alguna en el cólera. Sin embargo, como nuestra relativa ignorancia sobre este fenómeno podría llevarnos a darle menos importancia de la que realmente tiene, convendría fomentar las investigaciones en ese sentido.

## 2. ANTIGENOS Y FRACCIONES ANTIGENICAS

### Antígenos bacterianos

Los antígenos somáticos específicos del vibrión colérico son termoestables, mientras que los antígenos termolábiles son comunes a muchos otros vibriones. Los antígenos específicos comprenden el antígeno de grupo y los dos antígenos de serotipo, pero acaso se puedan identificar otros ulteriormente. Este complejo antigénico (incluida la endotoxina) es lo que provoca la formación de anticuerpos protectores en el ratón.

#### *Estructura, poder antigénico y especificidad de los antígenos vibriónicos*

Los principales antígenos termoestables se designan con letras: *A* representa el antígeno *O* específico del grupo, *B* el antígeno del serotipo Ogawa y *C* el del serotipo Inaba. El serotipo Hikojima contiene a la vez los dos antígenos de serotipo citados y el antígeno específico de grupo. Tanto *in vivo* como *in vitro*, se ha observado la transformación del serotipo Ogawa en Inaba. En fecha muy reciente se han descrito otros antígenos

que probablemente influyen en la aparición de una inmunidad eficaz contra la enfermedad : uno es la toxina colerígena termolábil y el otro una proteína dotada de un importante antígeno que da reacciones de identidad con lipopolisacáridos muy purificados.

#### *Inmunoquímica de los antígenos del vibrión colérico*

La especificidad de los antígenos serotípicos parece estar determinada por fracciones lipopolisacáridas de alto peso molecular (aproximadamente  $1 \times 10^6$ ). Tales fracciones han sido aisladas en gran estado de pureza de ambos serotipos y, según se ha comprobado, provocan la formación de anticuerpos vibriocidas y protectores en el ratón. Se cree que constituyen la endotoxina y sólo se encuentran en la capa sobrenadante de los cultivos líquidos de vibrión colérico autolizados.

Los antígenos representados por la toxina colerígena y la proteína atóxica asociada se encuentran en la sustancia intracelular del vibrión pero no en la membrana. El complejo antigénico se difunde libremente en los medios de cultivo líquidos y la fracción tóxica puede considerarse como una exotoxina. Estos dos antígenos no son separables con los filtros moleculares de Sephadex, pero pueden diferenciarse por cromatografía de intercambio iónico. El antígeno tóxico resulta eluido en primer lugar debido a su carga fuertemente positiva, por lo que ha sido denominado fracción I. La fracción II, que se extrae del Sephadex DEAE<sup>1</sup> mediante una solución 0,5 M de cloruro sódico, es atóxica. Ambas fracciones son lipoproteicas; la fracción I contiene 25-30% de lípidos en forma de glicéridos y la fracción II, 6-8% de lípidos ligados a la serina. Cada una de ellas contiene aproximadamente un 3% de hidratos de carbono, mientras que el resto está constituido por proteínas compuestas de cadenas más o menos clásicas de aminoácidos. La fracción tóxica puede purificarse aún más — v. g., por precipitación en frío en alcohol-éter — y tiene un peso molecular de 10 000 aproximadamente; en su forma purificada contiene dos antígenos identificables por difusión en gel. La proteína atóxica denominada fracción II, cuyo peso molecular oscila entre 30 000 y 35 000, da cuatro líneas de precipitación en la difusión en gel. La línea principal da una reacción de identidad con los lipopolisacáridos altamente purificados y provoca la formación de anticuerpos vibriocidas.

#### **Antígenos de « célula entera »**

No parece probable que todos los antígenos presentes en la célula bacteriana intervengan en la producción de una inmunidad profiláctica eficaz. La mayor parte de las cepas de vibriones son poco toxígenas y las vacunas actualmente utilizadas sólo provocan una inmunidad antibac-

<sup>1</sup> Dietilaminoetanol.

teriana, que se pone de manifiesto *in vivo* mediante la prueba del ratón e *in vitro* por la valoración de poder vibriocida. Aun en el caso de las cepas relativamente toxígenas en las suspensiones salinas de vibriones cultivados en agar sólo se encuentra una pequeña cantidad de toxina con carácter antigénico. En numerosas ocasiones se ha observado que, al menos en ciertas especies, la inmunización de los animales de laboratorio con vibriones vivos produce títulos más elevados de anticuerpos protectores contra la infección colérica experimental que la inmunización con una vacuna muerta.

### Toxinas

Mediante diversos sistemas de valoración se ha demostrado que el vibrión cólerico elabora gran variedad de sustancias tóxicas; así pues, el término « toxina colérica » no sólo resulta inexacto sino que puede inducir a confusión. Por esa razón hoy se recomienda clasificar las toxinas del cólera en tres tipos distintos. En el tipo 1 se incluye el factor letal para el ratón, que probablemente es una endotoxina clásica; es termoestable y no dializable, y sólo aparece en la capa sobrenadante de los cultivos líquidos a consecuencia de la autólisis. Las toxinas del tipo 2 son termolábiles y no dializables, y se difunden en los medios de cultivo líquidos; dentro de este grupo figuran los factores que determinan la migración del agua y de los electrólitos tisulares a la luz del intestino delgado, así como el llamado « factor de permeabilidad », responsable de la actividad tóxica que se pone de manifiesto por inoculación intradérmica, y el factor que ejerce efectos citopáticos en las células cultivadas. Ciertos datos, aún no confirmados, hacen pensar que el factor de permeabilidad y la toxina colerígena no son idénticos; por otra parte, la naturaleza de la actividad citotóxica está todavía por precisar. El tipo 3 comprende los factores termoestables y fácilmente dializables que se manifiestan por la inhibición del transporte activo de sodio en el epitelio de los anuros y por inhibición de la fijación *in vitro* del *p*-amino-hipurato en el tejido renal. Hay indicios, sin embargo, de que el primero de esos efectos está determinado por la presencia de amoniaco; la supresión total del amoniaco también reduce la inhibición de la captación de PAH, aproximadamente en un tercio. De todas estas toxinas, la del tipo 1 es de especial interés porque, en forma de lipopolisacárido altamente purificado, estimula la producción de los anticuerpos vibriocidas en los que parece residir la inmunidad antibacteriana; cierto es que esta función también podría estar a cargo de la fracción II antes mencionada. Las toxinas purificadas del tipo 2 acaso sean el más importante de todos estos antígenos, ya que su actividad se ha puesto de manifiesto en el intestino delgado de diversos animales; sin embargo, las vacunas utilizadas actualmente sólo contienen una cantidad insignificante.

Urge disponer de una prueba serológica que permita titular *in vitro* los anticuerpos que neutralizan las toxinas. Entre los métodos serológicos, la hemaglutinación parece prometedora; también puede utilizarse la prueba cuantitativa de fijación del complemento. La aglutinación con bentonita y con látex parece menos interesante. La obtención de un método serológico específico, sin embargo, exige un mejoramiento de los métodos físicos y químicos de fraccionamiento del complejo tóxico, a fin de conseguir un producto homogéneo desde el punto de vista antigénico. Estos estudios químicos, por consiguiente, deben recibir especial prioridad.

### Anatoxinas

Algunos autores afirman que el poder inmunógeno se destruye en gran parte por la acción del formol y otros han obtenido respuestas inmunitarias más débiles utilizando material inactivado con ese producto. En cambio, la toxina denominada « factor de permeabilidad » posee un poder antigénico mayor si se trata con formol que si no se trata. Sin embargo, se han expresado ciertas dudas sobre la necesidad de una « destoxificación », ya que las preparaciones purificadas resultan inocuas cuando se administran por vía parenteral.

## 3. LOS ANTICUERPOS Y SU DETERMINACION

Como los actuales métodos de determinación de anticuerpos aglutinantes, vibriocidas y neutralizantes de las toxinas (toxina colerígena y factor de permeabilidad) parecen seguros, el Grupo se ocupó sobre todo de la naturaleza de los anticuerpos. En la actividad vibriocida intervienen por lo menos dos inmunoglobulinas (IgM e IgG), en general con predominio de la IgM. Los antígenos tóxicos parecen comportarse como la mayor parte de los restantes antígenos proteicos. La fisiopatología del cólera obliga a tener muy en cuenta la importancia de los coproanticuerpos, pese a que aún se conoce mal su naturaleza; la IgA y la IgG (y acaso la IgM) se han encontrado en las heces de los enfermos coléricos y en las secreciones intestinales de los monos infectados, pero todavía se ignora la función que desempeñan estos anticuerpos en la inmunidad intestinal. En la actualidad todas las pruebas de neutralización de toxinas se efectúan en el animal y por ello no es posible examinar muestras numerosas, como es de rigor en las encuestas serológicas. Convendría pues obtener un método de titulación *in vitro* de las antitoxinas. Por otra parte, el hecho de que los sueros utilizados para estudiar las respuestas inmunitarias a diversos antígenos procedan de animales hiperinmunes

dificulta la valoración cuantitativa del poder antigénico de las diversas preparaciones.

#### 4. ANTICUERPOS E INMUNIDAD

No ha sido fácil determinar la función que desempeñan los anticuerpos en la destrucción y la eliminación de las bacterias vivas. La bacteriolisis (fenómeno de Pfeiffer) se descubrió al estudiar la actividad de un anticuerpo sérico que actúa en la sangre o en el medio intraperitoneal; se ignora hasta qué punto interviene en la luz intestinal. En todo caso, antes de extraer conclusiones sobre la significación de la tasa de anticuerpos, cualquiera que sea la técnica de determinación empleada, es menester aclarar las funciones de las diferentes fracciones antigénicas en la patogenia de la enfermedad.

Cuando se trata de una infección local y superficial como la difteria, la patogenia está condicionada fundamentalmente por la exotoxina y la inmunidad puede evaluarse midiendo la tasa de antitoxinas del suero en unidades arbitrarias mediante una prueba de neutralización. Sin embargo, ni aún en el caso relativamente sencillo de la difteria existe una correlación exacta entre el título de anticuerpos y la inmunidad, ya que, en virtud del proceso de formación acelerada de antitoxina que se pone en marcha en la respuesta secundaria, un sujeto con un título sanguíneo inicialmente bajo puede producir a tiempo los anticuerpos adicionales necesarios.

En una infección intestinal como el cólera, la confrontación crítica entre los vibriones y los anticuerpos tiene lugar en un medio particular: la luz intestinal. Así pues, los títulos de los distintos anticuerpos séricos sólo están indirectamente relacionados con la actividad vibriocida intraluminal. En la actualidad no es posible hacerse una idea clara del grado de participación de los anticuerpos vibriocidas en este proceso, ya que la actividad vibriocida se determina en sueros que contienen, además del anticuerpo específico, todos los componentes del complemento hasta C'9, así como lisozima y otros factores como los absorbibles en bentonita. Es muy dudoso que un anticuerpo específico (IgM e IgG) que necesita todos esos componentes para actuar pueda hacerlo en la luz intestinal, si bien cabe la posibilidad de que, en virtud de alguna reacción que aumente la permeabilidad de los vasos intestinales (por ejemplo, una interacción alérgica antígeno-anticuerpo), dichos componentes afluyan en cantidad suficiente del plasma a la luz intestinal. También es posible que la inmunidad dependa enteramente de la fracción de IgA capaz de ejercer un efecto vibriocida en presencia de una cantidad suficiente de lisozima pero en ausencia casi total del complemento; sin embargo, tampoco es de esperar aquí que entre la concentración útil de esta fracción de anticuerpos en la luz intestinal y la concentración sérica del anticuerpo específico IgA

exista una correlación total, ya que los elementos celulares presentes en la pared intestinal producen localmente cantidades variables pero importantes de IgA.

Como es posible que la actividad vibriocida sea el factor decisivo de la inmunidad anticolérica, no parece prudente atribuir gran significación a las determinaciones de antitoxina sérica basadas en la neutralización de la toxina colerígena (por ejemplo, en un asa intestinal de conejo o por cutirreacción). En teoría, el hallazgo de una cifra alta de antitoxina colerígena puede tomarse como un indicio de inmunidad al cólera clínico, pero no garantiza que los vibriones coléricos no puedan multiplicarse en la luz intestinal. En cambio, en presencia de suficientes anticuerpos vibriocidas, la inmunidad al cólera puede existir incluso con un nivel bajo de antitoxina. Asimismo cabe pensar que si los mecanismos vibriocidas son suficientemente activos pueden anular la eficacia inmunógena de una dosis de vibriones coléricos.

Actualmente existen microtécnicas que pueden utilizarse en encuestas en gran escala y que permiten determinar, mediante pruebas de neutralización, los anticuerpos vibriocidas y aglutinantes y el factor de permeabilidad cutánea (FP). En las zonas de cólera endémico se ha comprobado así que existe una elevada correlación entre el título de anticuerpos vibriocidas y la resistencia a la enfermedad. Esta prueba serológica, por consiguiente, puede ser útil para el ensayo preliminar de la actividad de las vacunas así como para interpretar los resultados de los ensayos prácticos de vacunación y para evaluar la eficacia de las campañas y apreciar el estado de inmunidad anticolérica de una población.

Las pruebas de neutralización de los anticuerpos vibriocidas y del FP también son útiles en los estudios epidemiológicos destinados a descubrir infecciones subclínicas por *V. cholerae*. Por desgracia, no se ha podido establecer una correlación entre los títulos de neutralización del FP y la inmunidad.

Sería muy necesario disponer de una prueba que permitiera determinar los anticuerpos específicos contra la toxina « diarreica » (colerígena) y que fuera aplicable en encuestas prácticas en gran escala, a fin de aclarar la función que desempeñan tales anticuerpos en la inmunidad al cólera.

Teniendo en cuenta la gran cantidad de información complementaria que pueden aportar los estudios serológicos, las encuestas de este tipo deben convertirse en un elemento esencial de todos los ensayos prácticos de vacunación anticolérica que se efectúen en lo sucesivo. Ahora bien, para apreciar en su justo valor la utilidad de tales pruebas serológicas habrá que aclarar los mecanismos inmunitarios que intervienen en el tubo intestinal y precisar la relación existente entre los anticuerpos séricos medidos por ellas y los anticuerpos que actúan localmente en el intestino.

## 5. VACUNAS

El Grupo examinó los resultados de los ensayos prácticos realizados en Paquistán Oriental (1963, 1964 y 1966), Filipinas (1964 y 1966) y la India (Calcuta) (1964 y 1965). Salvo en los ensayos en que se utilizó vacuna con coadyuvante oleoso (Filipinas, 1964), en todos se obtuvieron resultados análogos en líneas generales. En la mayor parte de los casos, la protección máxima osciló entre 30 y 80% y la inmunidad sólo se mantuvo a un nivel apreciable de tres a seis meses. La vacuna con coadyuvante oleoso proporcionó una protección más duradera, pero también produjo graves reacciones locales en una proporción inadmisibles. La protección fue menor en los grupos más jóvenes (menos de 10 años de edad), sobre todo en la zona fuertemente endémica del Paquistán Oriental. En opinión del Grupo, los datos recogidos hasta la fecha hacen pensar que las actuales vacunas líquidas no provocan ni un grado elevado de inmunidad ni una protección duradera en las poblaciones expuestas.

Las tentativas de establecer una correlación entre los resultados de los ensayos prácticos y los datos de laboratorio sobre actividad de las vacunas no se han visto totalmente coronadas por el éxito. La OMS organizó una valoración internacional de las vacunas utilizadas en Calcuta en 1964-1965, pero la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la eficacia de tales vacunas impide afirmar que los resultados de laboratorio (protección del ratón y otras pruebas) reflejen la verdadera eficacia práctica de las vacunas. En el ensayo realizado en Filipinas en 1964 se observó que la vacuna líquida El Tor resultaba algo más activa, tanto en el hombre como en el ratón, que la vacuna líquida « clásica », pero también esta diferencia carece de significación estadística. La comparación con los resultados sobre el terreno obtenidos en el Paquistán Oriental parece indicar que la vacuna de mayor actividad en el ratón es la que también resulta más eficaz en la práctica humana. Merece señalarse que la prueba de protección del ratón ha permitido clasificar las vacunas según su poder antigénico aproximadamente en el mismo orden establecido en Paquistán Oriental por titulación de los anticuerpos vibriocidas en los niños pequeños.

En cuanto a la fabricación de vacunas anticoléricas de gérmenes muertos, el Grupo subrayó la necesidad de utilizar cepas S estables y de gran poder antigénico (a ser posible cepas cultivadas de características conocidas y adecuadamente conservadas, de preferencia a las recién aisladas). Desde el punto de vista de la fabricación no se ha encontrado ninguna diferencia significativa entre el biotipo « El Tor » y el « clásico », ya que ambos poseen una estructura antigénica casi idéntica. Las cepas « clásicas » parecen perfectamente adecuadas y protegen contra la infección por vibriones El Tor. Respecto a la elección de medios y condiciones de

cultivo y al empleo de sustancias vibriocidas o conservadoras, el Grupo considera que los datos clínicos y de laboratorio disponibles no autorizan a recomendar ningún procedimiento de preferencia a los demás.<sup>1</sup>

El Grupo examinó también la posibilidad de utilizar vacunas de vibriones vivos avirulentos, que pueden ser de gran interés para la vacunación por vía oral y sobre las cuales se están realizando estudios en la India. Las ventajas teóricas que reportaría una vacuna de gérmenes atenuados eficaz por vía oral son evidentes, pero su obtención entraña difíciles problemas. En primer lugar hay que prestar gran atención a la inocuidad del preparado: las cepas utilizadas deben ser capaces de multiplicarse en el intestino humano sin producir efectos patológicos, poseer un alto grado de estabilidad y no mostrar tendencia alguna de reversión a la virulencia, y presentar rasgos genéticos distintivos que permitan su exacta identificación. Dejando aparte la selección de las cepas, también plantean problemas importantes los métodos y las pautas de administración. Aun reconociendo que las investigaciones sobre el empleo de gérmenes atenuados resultan muy prometedoras, se necesitará bastante tiempo para perfeccionar tales vacunas con miras a su aplicación al hombre en ensayos en gran escala. Es preciso, pues, emprender este trabajo seriamente y lo antes posible. Mientras tanto, convendría tratar de alcanzar objetivos más asequibles, como la preparación de vacunas mixtas bacterianas y de toxina-antitoxina, o de vacunas con coadyuvantes. Al mismo tiempo que se investiga la vacuna viva oral, deberán realizarse estudios sobre vacunas muertas administrables por dicha vía.

También debe estudiarse la posibilidad de utilizar vacuna viva por vía parenteral, ya que se han efectuado varios estudios en animales, que ponen de relieve el mayor poder antigénico de los vibriones vivos.

El uso de antígenos altamente purificados, como el lipopolisacárido de Ogawa y el complejo polisacárido-proteolípido de Inaba, ofrece en teoría la posibilidad de administrar dosis más elevadas de un antígeno eficaz que contenga menos sustancias extrañas reactivas. En un ensayo práctico realizado en el Paquistán Oriental, el lipopolisacárido de Ogawa sólo confirió protección a los adultos; cierto es que la mayoría de las infecciones descubiertas en este ensayo se debían al serotipo Inaba, siendo así que el antígeno utilizado era muy específico del serotipo Ogawa. La fracción antigénica purificada de Inaba será sometida a un ensayo práctico en otoño de 1968. Aunque ambas sustancias ejercen un fuerte efecto protector en el ratón, el antígeno de Ogawa parece provocar una respuesta inmunitaria algo menos intensa que la vacuna de gérmenes enteros tanto en el hombre como en los animales.

<sup>1</sup> Las normas para la vacuna anticolérica (Normas para Sustancias Biológicas número 4), publicadas por la OMS, han sido revisadas recientemente teniendo en cuenta los últimos datos prácticos y de laboratorio (*Org. mund. Salud Ser. Inf. técn.* 1969, N° 413, Anexo 1).

El Grupo también estudió el valor del antígeno de toxina colerígena como inductor de inmunidad activa y tomó nota de que, según los estudios realizados en conejos y perros, la inmunidad antitóxica parece ser un importante elemento del mecanismo inmunitario. Las actuales vacunas apenas provocan la formación de antitoxinas. A juicio del Grupo, sería de la máxima utilidad combinar la toxina (o tal vez la anatoxina) con otros antígenos capaces de provocar inmunidad antibacteriana. Sin embargo, la preparación de una toxina purificada plantea varios problemas. La toxina purificada obtenida de un asa intestinal es lábil y pierde rápidamente sus propiedades toxígenas e inmunógenas. Por otra parte, no se ha logrado preparar ninguna anatoxina satisfactoria a partir de la toxina aislada del intestino delgado, y los productos obtenidos hasta la fecha no han dado resultados dignos de mención. En cambio, del factor de permeabilidad se ha obtenido una anatoxina bruta experimental que parece ejercer en los animales un efecto antigénico más potente que la propia toxina. Las vacunas preparadas con toxina muy purificada serían de gran interés teórico para aclarar el mecanismo o los mecanismos inmunitarios; sin embargo, es probable que su producción resultase excesivamente cara. El Grupo estima que, en general, las mejores perspectivas de aumentar en breve plazo la eficacia de las vacunas anticoléricas residen en la adición de toxina (o anatoxina) a los antígenos de capacidad inmunógena comprobada que se utilizan en las vacunas actuales.

Las esperanzas depositadas en los antígenos de toxinas se han visto un tanto atenuadas a consecuencia de algunos estudios realizados en el perro y el conejo, cuyos resultados muestran que es necesario neutralizar la toxina dentro de la luz intestinal antes de que se fije en los puntos reactivos. Ello significa que es preciso provocar una respuesta inmunitaria rápida y eficaz que garantice la presencia continua de una cantidad suficiente de antitoxinas en las secreciones intestinales. La situación es tan apremiante en estos casos que no es posible esperar a que se produzca una respuesta anamnésica, a diferencia de lo que sucede en otras enfermedades (v.g., en el tétanos).

Se sabe que la vacuna anticolérica puede combinarse satisfactoriamente con otros antígenos, como los de las vacunas antitífóidica y antitetánica. Es evidente que el uso sistemático de la asociación de la vacuna anticolérica con la anatoxina tetánica (o diftérica) sería de gran interés sanitario en los países en desarrollo, ya que tanto el tétanos como la difteria son muy frecuentes en las zonas donde el cólera es endémico.

En vista de la duración relativamente breve de la inmunidad conferida por las vacunas actuales, resulta muy interesante la posibilidad de utilizar coadyuvantes para reforzar y prolongar la respuesta inmunitaria. Los coadyuvantes más inofensivos son los compuestos de aluminio, de los que ya se posee una amplia experiencia por haberse empleado con otras vacunas; así pues, nada se opone a su utilización inmediata en la vacuna anticolérica,

tanto más cuanto que hay pruebas de que refuerzan la respuesta inmunitaria. Los coadyuvantes oleosos son más eficaces que los compuestos aluminicos, pero su uso plantea muchos problemas que aún están sin resolver, sobre todo en relación con su inocuidad, ya que su adición a la anatoxina tetánica y a las vacunas anticolérica y antitifoídica ha dado lugar a reacciones inesperadamente graves. En cambio, añadidos a las vacunas antigripales, han resultado perfectamente inofensivos. Teniendo en cuenta el superior efecto coadyuvante de las emulsiones oleosas, conviene alentar su estudio, en especial sobre los aceites metabolizables y los emulsionantes distintos del «Arlacel A».

La vacuna anticolérica no suele plantear problemas de reacciones secundarias cuando su contenido de antígeno está bien comprobado y se elimina toda sustancia reactiva procedente del medio de cultivo. Aún no se conoce bien la causa de las reacciones provocadas en Filipinas por la vacuna con coadyuvante oleoso, aunque es posible que en ellas haya influido el hecho de haberse empleado la vía subcutánea en lugar de la intramuscular. En el caso del Arlacel, la hidrólisis enzimática quizá explique en parte los accidentes registrados con este coadyuvante. Es de esperar que los compuestos de aluminio resulten menos tóxicos.

En algunas ocasiones se han registrado reacciones de hipersensibilidad provocadas por la vacuna contra el cólera. El Grupo, teniendo en cuenta la frecuencia de las revacunaciones y la perspectiva de que aparezcan antígenos y coadyuvantes más potentes, estima que toda cautela es poca a este respecto y que nunca hay que perder de vista la posibilidad de que se produzcan fenómenos inmunológicos indeseables.

## 6. INVESTIGACIONES RECOMENDADAS

El Grupo recomienda orientar las investigaciones sobre el cólera hacia los siguientes objetivos:

### A. Inmunología general y patogenia

1. Ampliar los conocimientos generales sobre la infección y la inmunidad, especialmente al nivel del intestino.
2. Determinar el mecanismo y la dinámica de la inmunidad local en el intestino.
3. Determinar la localización y la cinética de la infección colérica.
4. Aclarar la posible función de la inmunidad celular en el cólera.
5. Identificar los factores accesorios o inespecíficos — nutricionales, genéticos, etc. — que influyen sobre la resistencia o la susceptibilidad al cólera.

6. Mejorar los conocimientos actuales sobre la cinética de las reacciones antígeno-anticuerpo en el cólera.
7. Determinar la función de los anticuerpos séricos en el intestino.
8. Aclarar las relaciones existentes entre la IgA sanguínea y la IgA intestinal.
9. Evaluar la utilidad de los coadyuvantes aún no ensayados, como los aceites vegetales y la vitamina A, y estudiar las posibilidades de reforzar por ese medio la inmunización oral.
10. Aclarar las relaciones existentes entre el «factor de permeabilidad» y el «factor diarreico».

Teniendo en cuenta que hoy se dispone de un tratamiento eficaz del cólera, puede examinarse la posibilidad de utilizar voluntarios humanos para estudiar los problemas que no puedan resolverse por experimentación animal o ensayos prácticos, a condición de observar en tal caso todas las precauciones pertinentes. Los objetivos 2, 3, 4 y 7, antes citados, son ejemplos de temas de investigación que sólo pueden abordarse con provecho mediante el estudio directo de voluntarios humanos.

#### **B. Mecanismos inmunológicos específicos**

1. Establecer una correlación entre la susceptibilidad o la inmunidad al cólera y los títulos de anticuerpos vibriocidas, los de antitoxina y cualquier otro indicador serológico que se descubra.
2. Búsqueda de nuevas pruebas útiles para evaluar la inmunidad al cólera, con vistas sobre todo a sus aplicaciones en epidemiología serológica.
3. Analizar más a fondo las respuestas inmunitarias en el cólera, estudiándolas tanto en el hombre como en los animales por todas las técnicas modernas pertinentes.
4. Fraccionar, purificar y caracterizar la toxina colerígena. Este estudio debe hacerse a fondo con objeto de aclarar la naturaleza de la fracción tóxica, descubrir una reacción serológica específica para la titulación *in vitro* de los anticuerpos neutralizantes y obtener un antígeno inmunógeno estable.
5. Identificar los posibles mecanismos inmunopatológicos resultantes de la infección o de la inmunización, prestando especial atención a la posibilidad de que el germen provoque alteraciones renales o degeneración amiloide. Los sujetos hiperinmunes se prestan bien a estas investigaciones.

#### **C. Producción y ensayo de vacunas**

1. Elaborar vacunas de gérmenes vivos atenuados y caracterizarlas por sus rasgos genéticos, su estabilidad y sus propiedades inmunológicas.

Tales vacunas deberán ser objeto de estudios preliminares en grupos humanos reducidos, con objeto de obtener datos fundamentales sobre la reactividad, la tolerancia y el poder inmunógeno.

2. Determinar la posible utilidad de la vacunación parenteral con gérmenes vivos atenuados.
3. Evaluar la eficacia de la vacunación oral con gérmenes vivos o muertos.
4. Evaluar las pautas de vacunación mixtas en las que se utilicen al mismo tiempo las vías oral y parenteral.
5. Evaluar en ensayos prácticos las vacunas anticoléricas administradas en un vehículo mineral.
6. Recoger datos fundamentales sobre la reactividad y el poder inmunógeno de la toxina colerígena y de la «fracción II» (capacidad para provocar la formación de anticuerpos vibriocidas). Importa a este respecto efectuar estudios preliminares en grupos humanos reducidos con una vacuna parcialmente purificada.
7. Mejorar las vacunas parenterales, especialmente en lo referente a la duración del efecto protector.
8. Buscar la manera de estabilizar las toxinas y las anatoxinas coléricas.
9. Preparar vacunas mixtas de toxinas y gérmenes, y ensayarlas en la práctica si los estudios preliminares (véase el apartado 6) lo autorizan.
10. Ampliar el ámbito de aplicación de las pruebas serológicas y utilizarlas en los ensayos prácticos para descubrir tanto los casos clínicos de cólera como los inaparentes.
11. Fijar pautas de vacunación, dosis y vías de administración óptimas, prestando especial atención a la posibilidad de espaciar más las revacunaciones.
12. Construir modelos matemáticos útiles para organizar e interpretar los ensayos de vacunación en el hombre.
13. Evaluar en ensayos prácticos las nuevas vacunas que reúnan los requisitos de inocuidad, actividad y tolerancia señalados en este informe.
14. Estudiar las posibilidades de combinar la vacuna anticolérica con la anatoxina tetánica en la primovacunación.
15. Mejorar los modelos de laboratorio utilizados para evaluar las vacunas contra el cólera y efectuar paralelamente ensayos prácticos para determinar la correlación de los resultados experimentales con la inmunidad efectivamente conferida al hombre.

El Grupo recomienda también que se organicen estudios internacionales en colaboración sobre la titulación de los anticuerpos, el ensayo de antígenos, etc., y que se facilite a ese efecto el material necesario (sueros de referencia, cepas de vibriones, etc.). Es de esperar asimismo que la OMS favorezca y fomente las investigaciones de carácter fundamental sobre la inmunología del cólera.

## NOTA

El Grupo da las gracias al Dr. D. Barua, del Servicio de Enfermedades Bacterianas de la OMS, por la valiosa ayuda que le ha prestado en el curso de las deliberaciones.