

# Determinantes de las respuestas a vacunas orales en países en vías de desarrollo

David A. Sack<sup>a</sup> Firdausi Qadri<sup>b</sup> Ann-Mari Svennerholm<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Salud Internacional, Facultad de Salud Pública Johns Hopkins Bloomberg, Baltimore, Md., EE.UU.;

<sup>b</sup>División de Ciencias de Laboratorio, Centro Internacional para la Investigación de Enfermedades Diarreicas de Bangladesh, Dhaka, Bangladesh; <sup>c</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad de Gotemburgo, Gotemburgo, Suecia

## Palabras clave

Vacunas orales · Cólera · Rotavirus · Fiebre tifoidea · Poliomiélitis · Shigellosis · Respuesta inmunitaria · Desnutrición · Cinc · Vitamina A · Lactancia materna

## Extracto

Las vacunas orales que se han diseñado para uso global no inducen necesariamente las mismas respuestas inmunitarias en todos los niños de todo el mundo. De hecho, varias vacunas inducen a menudo respuestas medias de anticuerpos menos frecuentes y menores en niños en países en vías de desarrollo, lo que permite suponer que las vacunas pueden producir un efecto menos protector en los niños de estas zonas. Aunque los motivos de esta respuesta menos enérgica no se conocen por completo, parece que factores relacionados con la nutrición, incluyendo la desnutrición de proteínas y calorías y la desnutrición de micronutrientes, son aspectos importantes para comprender la hiporreactividad observada en estos niños. También parecen importantes cuestiones relacionadas, entre las que destacan la lactancia materna, la interferencia a partir de anticuerpos placentarios maternos, infecciones parasitarias intestinales, lesión de la mucosa intestinal y, posiblemente, malnutrición materna durante el embarazo. Las vacunas diseñadas para administración oral tendrán que ser ajustadas a estos problemas potenciales con objeto de incrementar al máximo sus beneficios para todos los niños. Las vacunas orales que se admi-

nistran en niños de países en vías de desarrollo pueden requerir dosis mayores de vacunas, dosis de refuerzo, complementos de calorías, micronutrientes y vitaminas, retirada de la leche materna antes de la administración de las vacunas, medicamentos antihelmínticos u otras medidas para desarrollar sus beneficios totales.

Copyright © 2008 Nestec Ltd., Vevey/S. Karger AG, Basel

## Introducción

La vacunación es una de las estrategias preventivas más potentes para mejorar la salud de las poblaciones de todo el mundo. Los niños que habitan en la mayoría de los países en vías de desarrollo son especialmente vulnerables a las enfermedades infecciosas, tal como indican las elevadas tasas de la mortalidad de lactantes y niños, con la neumonía y las enfermedades diarreicas como causas más importantes de esas infecciones potencialmente letales. Se está llegando a disponer de vacunas para muchos de estos procesos. Además del paquete de vacunas estándar contra la difteria, la tos ferina, el tétanos, la poliomiélitis, el sarampión y la tuberculosis, actualmente, en el Programa Ampliado para Inmunizaciones se incluyen corrientemente vacunas más recientes contra la hepatitis B y *Haemophilus influenzae* de tipo B. Incluso las vacunas más novedosas contra *Streptococcus pneumoniae* y rotavirus se utilizan sistemáticamente en algunos

países en vías de desarrollo, mientras que cabe la probabilidad de que otras vacunas contra la fiebre tifoidea y el cólera se utilicen en el futuro en algunos países. De éstas, varias vacunas se administran por vía oral incluyendo la vacuna antipoliomielítica oral (VPO) y las vacunas antirotavirus, contra el cólera y algunas contra las tifoideas. Además, se están desarrollando vacunas nuevas contra *Escherichia coli* enterotoxígeno (ECET) y contra especies de *Shigella*, que probablemente también se administrarán por vía oral.

La experiencia con diversas vacunas orales ha demostrado que las respuestas inmunitarias pueden no ser tan contundentes o uniformes cuando se administran en niños que habitan en países en vías de desarrollo que cuando se administran en niños de países industrializados. Con respecto a esta lista de vacunas orales es probable que las destinadas a infecciones bacterianas (cólera, ECET, fiebre tifoidea, shigelosis) se utilicen únicamente en niños de países en vías de desarrollo o en viajeros, dado que se trata de personas de riesgo. Aunque la vacuna antipoliomielítica se administra sistemáticamente en todo el mundo, en casi todos los países industrializados se prefiere actualmente la vacuna parenteral en lugar de la VPO. Las nuevas vacunas antirotavirus se administran por vía oral y, teniendo en cuenta que se trata de una infección que aparece en todas las regiones geográficas, la misma formulación se utilizará de modo global.

En este trabajo revisamos estudios en los que se han evaluado vacunas orales en países en vías de desarrollo, especialmente en niños, así como factores nutricionales y de otro tipo capaces de explicar la disminución de la inmunogenicidad y la eficacia protectora frecuentemente registrada en niños del mundo en vías de desarrollo en comparación con los países industrializados. También se incluyen estudios en los que se han examinado variables diferentes que podrían mejorar una vacuna determinada para su uso en países en vías de desarrollo. Este trabajo se centra preferentemente en las vacunas orales en detrimento de las parenterales, dado que en la mayoría de las evaluaciones de las vacunas parenterales se observó que los niños de países en vías de desarrollo y países industrializados responden de un modo similar. Sólo cuando los niños presentan una desnutrición extremadamente grave disminuyen las respuestas inmunitarias a las vacunas parenterales [1]; no obstante, las vacunas orales presentan algunos problemas especiales relacionados con el estado nutricional.

Para desarrollar esta revisión buscamos los términos siguientes en PubMed: VPO, vacunas contra rotavirus, tifoidea, cólera y *Shigella*; al respecto, limitamos nuestra

búsqueda a los trabajos relacionados con estudios de inmunogenicidad o eficacia en países en vías de desarrollo, especialmente relacionados con factores nutricionales. Dado que varias de las vacunas poseen nombres específicos, los incluimos en nuestra búsqueda; por ejemplo, vacunas contra el cólera CVD103-HgR y Perú-15, vacuna contra la tifoidea Ty21a, vacuna contra *Shigella* SC602 y las vacunas antirotavirus RIX4414, RotaRix<sup>®</sup>, RotaTeq<sup>®</sup> y RotaShield<sup>®</sup>. En algunos casos, cuando resultaba precedente, se incluyeron datos no publicados y resultados de estos estudios.

### Vacuna antipoliomielítica oral

La formulación de la VPO, que es una vacuna trivalente, se ajusta de tal modo que cada una de las cepas serotípicas de la vacuna posee una probabilidad elevada de inducir respuestas inmunitarias protectoras frente a cada uno de los 3 serotipos tras la administración de 3 dosis de vacuna. Las respuestas inmunitarias se miden como valores de anticuerpos neutralizantes utilizando un ensayo de cultivo tisular; se considera protector un valor  $\geq 1:8$ . En estudios realizados en países industrializados se ha observado que la inmunización con 3 dosis de VPO trivalente induce valores de anticuerpos protectores en más del 95% de los niños [2]. No obstante, cuando la vacuna se administró en niños de países en vías de desarrollo estimuló respuestas de anticuerpos menores y menos confiables [3–7]. Este hecho se concretó especialmente en el caso del serotipo 3.

Los motivos de la respuesta menos uniforme en niños de países en vías de desarrollo no se conocen a ciencia cierta; no obstante, la mayoría de los estudios se han centrado en el papel potencial de infecciones por virus entéricos competidores, que pueden interferir con la infección intestinal del virus de la vacuna y la posibilidad de que el virus de la vacuna sea neutralizado por anticuerpos de la leche materna. En algunos estudios se ha evaluado también el papel del estado nutricional, por ejemplo, el efecto del aporte complementario de vitamina A, sobre la inmunogenicidad de la VPO.

Los datos son contradictorios con respecto a la interferencia de otros virus entéricos; en algunos estudios se halló una asociación [7, 8], que en otros estudios no se pudo confirmar, si bien se registraron respuestas deficientes incluso en niños sin otra infección por enterovirus [5]. En el estudio de Triki y cols. [7] también se halló una asociación entre respuestas más deficientes y un peor estado socioeconómico, y en la estación estival era proba-

ble que este último factor fuera un sucedáneo de otras infecciones por enterovirus.

Existen datos rotundos a favor de que los anticuerpos de la leche materna pueden interferir con la VPO por neutralización del virus de la vacuna y prevención de la infección de la mucosa intestinal [9]. Esta observación fue respaldada por estudios de Uganda [10] y por estudios experimentales en los que se halló que la leche que contenía anticuerpos neutralizantes en varios momentos antes o después de la vacunación interfería con el éxito de la vacuna [11]. Cuando la leche que contenía anticuerpos se administraba en el curso de 2 horas de la vacunación, la inhibía, al contrario que cuando se intercalaban 6 horas entre la toma de la leche y la vacunación. La separación de 6 horas entre el amamantamiento y la vacunación puede no ser práctica en numerosos países en vías de desarrollo, y en un estudio realizado en India no se halló ninguna asociación entre la administración de leche materna y la inmunogenicidad de la vacuna [12].

En un estudio realizado en Bangladesh se halló una respuesta inmunitaria reducida a la VPO si la vacuna se administraba coincidiendo con una diarrea del niño [13]. Esto daba a entender que el tiempo de tránsito rápido asociado a la diarrea inducía una menor colonización con el virus atenuado de la vacuna; no obstante, no podían excluirse otros factores engañosos, como la nutrición deficiente de los niños con diarrea.

Aunque las estrategias para mejorar las respuestas inmunitarias a la VPO se han centrado generalmente en incrementar el número de dosis de vacuna [14, 15], este procedimiento no siempre resultaba satisfactorio [6]. En un estudio en el que el aumento del número de dosis no fue capaz de mejorar la inmunogenicidad de la VPO, se logró el éxito con una vacuna antipoliomielítica por vía parenteral [6]. En uno de los estudios realizados en India se observó que los aportes complementarios de vitamina A, a las madres poco tiempo después del parto y a los recién nacidos en las visitas del Programa Ampliado para Inmunizaciones, incrementaban los valores del serotipo 1 tras la administración de VPO, pero no afectaban a las respuestas de los demás serotipos [16]. Desde un punto de vista práctico, en programas nacionales se ha intentado administrar dosis adicionales múltiples de VPO, a menudo en combinación con la administración de vitamina A, en Días de Inmunización Nacional, logrando el éxito en la erradicación de la poliomielitis de casi todos los países.

La reducida inmunogenicidad de la VPO en países en vías de desarrollo está completamente admitida y la experiencia con la VPO es significativa para otras vacunas

orales. Parece que otras vacunas orales pueden ser también menos inmunógenas cuando se administran en niños de países en vías de desarrollo y que las lecciones aprendidas de la VPO también pueden ser válidas al respecto. A medida que se extiende el número de vacunas orales se están examinando otros factores, especialmente los relacionados con la nutrición.

### Vacunas antirotavirus

Se han evaluado varias vacunas antirotavirus orales atenuadas tanto en países en vías de desarrollo como desarrollados, incluyendo la vacuna RIT bovina, una WC3 bovina monovalente, la vacuna antirotavirus de rhesus tetravalente (RRV-TV o RotaShield), una vacuna atenuada humana, RIX4414 (RotaRix) y una vacuna de pseudovirión WC3 pentavalente (RotaTeq). RIT y WC3 monovalente eran vacunas preliminares, que si bien parecían prometedoras fueron incapaces de producir un efecto protector suficiente cuando se utilizaron en países en vías de desarrollo [17–20]. RRV-TV resultó eficaz en Europa, EE.UU. y Venezuela, pero parecía tener un efecto menos protector en otros países en vías de desarrollo [21–25]. Una repetición del análisis de los resultados de los ensayos realizados en Perú y Brasil dio a entender que la eficacia de la vacuna era realmente mayor de lo que inicialmente se había apreciado cuando se limitó su empleo a personas con diarrea más grave [26]. Aunque no se explicaron los motivos de la menor eficacia en los países en vías de desarrollo, parecía que estas vacunas antirotavirus rendían en general una eficacia menor cuando se analizaban en tales países.

Tras la retirada de RotaShield del mercado de EE.UU., se desarrollaron vacunas antirotavirus más modernas, RotaRix y RotaTeq, constatando su seguridad y eficacia en países desarrollados y/o de renta media, así como en EE.UU., Europa, América Latina y Asia [27, 28]. No obstante, no habían sido estudiadas en países muy pobres y, por lo tanto, se iniciaron estudios para determinar su seguridad, inmunogenicidad y eficacia en los países muy pobres de Asia y África, elegibles para ser financiados por la GAVI (Alianza Global para Vacunas e Inmunización). Actualmente, se ha comprobado la seguridad y la inmunogenicidad de RotaRix en niños de Sudáfrica y Bangladesh; sin embargo, su inmunogenicidad puede ser algo menor en comparación con niños de otros países [D. Steele y K. Zaman; comunicación personal].

No se han establecido los motivos para las tasas de seroconversión algo menores para las vacunas antirotavi-

rus en países en vías de desarrollo. Especulativamente se ha propuesto una interferencia de la leche materna, que podría haber neutralizado el virus de la vacuna, o niveles elevados de anticuerpos transplacentarios maternos que, asimismo, podrían haber reducido la respuesta. De este modo, un meta-análisis preliminar reveló que los niños amamantados que recibieron una RRV (serotipo 3) seroconvertían con una frecuencia significativamente menor que los niños alimentados con fórmulas lácteas (48% frente a 70%;  $p < 0,005$ ) [29]. Sin embargo, estudios subsiguientes realizados en EE.UU. no confirmaron estos datos [30]. También se consideró especulativamente un papel inespecífico de la desnutrición o una carencia específica de micronutrientes. En consecuencia, cuando se evaluaba la eficacia protectora de la vacuna RRV-TV de acuerdo al estado nutricional en lactantes que participaban en un ensayo de fase 3 en Perú, se halló una mayor eficacia en los niños que alcanzaban una puntuación Z del peso para la edad superior a  $-1$  y una puntuación Z de la talla para la edad superior a  $-1$  en comparación con niños con puntuaciones menores [31]. No obstante, en un trabajo reciente en países diferentes de América Latina, la eficacia vacunal inducida por la vacuna antirotavirus humano, RIX4414, era similar en lactantes nutridos correctamente y en lactantes desnutridos [32]. En uno de los estudios realizados en Bangladesh se demostró que el aporte complementario de cinc incrementaba los valores de la media geométrica de los lactantes inmunizados con RotaShield [A. Baqui; comunicación personal].

### Vacuna contra la tifoidea

Se dispone de 2 vacunas aprobadas contra la tifoidea que se utilizan corrientemente: una vacuna oral de bacterias atenuadas, Ty21a (Vivotif®), y una vacuna parenteral de polisacáridos Vi (Typhim Vi®). Vi se administra en niños mayores de 2 años y en adultos, pero no en niños pequeños y lactantes, dado que este tipo de antígeno polisacárido no es inmunógeno en los grupos de edad más jóvenes. Una vacuna contra la tifoidea Vi conjugada fue más inmunógena y protectora cuando se examinó en Vietnam [33]. Desafortunadamente, la vacuna conjugada no está todavía disponible.

Aunque la Ty21a está aprobada para niños  $\geq 5$  años, no se ha investigado extensamente en niños más pequeños. En uno de los estudios en los que participaba un pequeño grupo de niños ( $n = 18$ ) de menos de 24 meses se halló que la vacuna era segura; no obstante, en estos niños no se registró ninguna respuesta inmunitaria men-

surable [34]. En otro estudio más extenso, en 634 niños de 2 a 6 años en Tailandia se halló que la vacuna era segura e inmunógena con frecuencias similares de éxitos en todas las edades, sin ningún descenso significativo de la frecuencia de éxitos en los grupos de edad más jóvenes [35]. Pronto se iniciarán estudios para determinar la inmunogenicidad de una formulación líquida de esta vacuna en niños de Bangladesh de 2 a 5 años de edad para relacionar las respuestas inmunitarias con el estado nutricional de los niños y el posible beneficio de un aporte complementario de cinc. Desafortunadamente, con esta vacuna oral no se ha verificado la eficacia en los grupos de edades jóvenes (menos de 5 años), especialmente a la luz de las elevadas tasas de ataques en niños pequeños en algunos países del sur de Asia.

### Vacuna contra el cólera oral atenuada

Se dispone actualmente de dos vacunas orales atenuadas contra el cólera, CVD103-HgR (Orochol®) y Perú-15 (CholeraGarde®), que han sido investigadas extensamente en países tanto en vías de desarrollo como desarrollados. Aunque CVD103-HgR está ya aprobada, Perú-15 se encuentra todavía en fase de desarrollo [36].

CVD103-HgR se administra normalmente a una dosis de  $10^8$  microorganismos por dosis junto a una solución estabilizadora que contiene bicarbonato sódico y ácido ascórbico, cuyo propósito es proteger a las bacterias atenuadas frente al ácido gástrico. Esta formulación fue segura, inmunógena y protectora en voluntarios norteamericanos. Cuando la vacuna se administró en residentes en Chile e Indonesia resultó menos inmunógena de lo esperado, de manera que la dosis se incrementó en 1 log para mejorar su inmunogenicidad [37–40]. Desafortunadamente, incluso la mayor dosis de la vacuna no mostró ningún efecto protector en la única prueba controlada de campo con la vacuna, realizada en Indonesia [40]. Aunque el contraste entre la eficacia elevada cuando se verificaba en voluntarios norteamericanos y la eficacia reducida en Indonesia apenas se comprende, podría estar relacionado con la inmunidad natural preexistente al cólera y, por lo tanto, una disminución del ‘éxito’ por la vacuna atenuada. Además, las tasas de cólera fueron inusualmente bajas durante las fases iniciales de la prueba y, en consecuencia, no pudo determinarse la eficacia a corto plazo.

Entre los factores adicionales que pudieron haber reducido la inmunogenicidad de CVD103-HgR en Indonesia destacan el sobrecrecimiento bacteriano en el intesti-

no delgado, infecciones parasitarias intestinales y subnutrición. De este modo, en uno de los estudios se demostró que el sobrecrecimiento bacteriano en el intestino delgado, tal como se detecta mediante una prueba de hidrógeno espirado, se asociaba a una cierta disminución de la respuesta a CVD103-HgR en Chile [41]. Este dato deja entrever que la mucosa intestinal anormal (por ejemplo, enteropatía tropical), asociada corrientemente al sobrecrecimiento en el intestino delgado, puede ser responsable en parte de la respuesta menos firme en estos sujetos. En otro estudio se examinó el papel potencial de la infección por *Ascaris lumbricoides* y se halló que el tratamiento de esta infección parasitaria antes de la vacunación mejoraba la respuesta inmunitaria de mediación celular a la vacuna [36]. El efecto del tratamiento con albendazol y secnidazol sobre la vacuna contra la tifoidea oral atenuada o la vacuna oral inactivada contra el cólera está siendo planeado para niños que empiezan a andar, afectados de infecciones parasitarias, en Bangladesh.

Con respecto a la otra vacuna oral atenuada contra el cólera, Perú-15, se comprobó su seguridad, inmunogenicidad y efecto protector en voluntarios de EE.UU. [42–44] a dosis de  $2 \times 10^8$ . Esta dosis ha sido verificada actualmente en adultos y niños de Bangladesh. Aunque la tasa de éxitos con esta dosis ha sido elevada en Bangladesh en todos los grupos de edad, los valores de la media geométrica en el grupo de edades más jóvenes (9 a 23 meses) fueron menores que en sujetos de más edad, y una dosis menor en 1 log fue claramente menos inmunógena [45]. La vacuna no ha sido evaluada a título comparativo en niños de EE.UU., por lo que no es posible determinar si la menor respuesta en los niños más pequeños de Bangladesh guarda relación con la edad o con otros factores.

Es interesante destacar que Perú-15 se administra normalmente con un estabilizador consistente en bicarbonato sódico y ácido ascórbico, similar al estabilizador utilizado con CVD103-HgR. En uno de los estudios, cuando se administraba en voluntarios de EE.UU. con un estabilizador de jarabe de arroz, bicarbonato y citrato, los valores de la media geométrica de los anticuerpos fueron superiores que cuando se utilizaba el estabilizador estándar, lo que permite suponer la posible importancia de factores distintos de la dosis de la vacuna [46]. En este estudio, en el que se compararon diferentes estabilizadores, el grupo de control que recibió la vacuna sin estabilizador (única solución salina) presentaba una respuesta de anticuerpos muy deficiente, lo que indicaba que la neutralización del ácido es crítica para la inmunogenicidad de esta vacuna oral atenuada, sensible al ácido.

Se han planificado estudios para evaluar Perú-15 administrado concomitantemente con la vacuna contra el sarampión para excluir una posible interferencia entre la vacuna contra el cólera [anticolérica] y la vacuna contra el sarampión en lactantes menores de 1 año. Este tipo de estudio es necesario, dado que parece probable que las dos vacunas tengan que administrarse aproximadamente en la misma edad.

### Vacunas orales inactivadas contra el cólera

Se dispone de dos vacunas contra el cólera orales inactivadas. La vacuna de células enteras inactivadas con subunidad B recombinante de la toxina del cólera (WC/rCTB; Dukoral®) está aprobada en más de 50 países [47, 48], mientras que otra vacuna de células enteras similar, sin subunidad B, está aprobada en Vietnam [49] y se está investigando actualmente en India. El componente celular entero de la vacuna es estable al ácido; por lo tanto, no necesita ningún estabilizador para protegerlo del ácido gástrico. No obstante, la subunidad B es lábil al ácido y requiere un estabilizador. Tal como se ha documentado en estudios realizados en Bangladesh, Perú y Mozambique, Dukoral es seguro, inmunógeno y protector [50–54]. El estudio de Bangladesh ilustra su beneficio protector en un ámbito con tasas de malnutrición elevadas, y el estudio de Mozambique confirma su beneficio en un ámbito con tasas elevadas de infección por VIH.

Aunque la vacuna produjo efectos protectores en estas diferentes zonas geográficas, las respuestas antibacterianas (vibriocídicas) fueron menos frecuentes en niños pequeños (de 2 a 5 años) en comparación con niños mayores y adultos [55] y fueron necesarias más dosis para obtener una elevada tasa de vacunación con éxito [56]. Análogamente, la magnitud de las respuestas de antitoxinas fue menor en el grupo de edades bajas (2 a 5 años) que en los grupos mayores [57]. La comparación de las respuestas inmunitarias con la vacuna de células enteras con toxina B del cólera (CTB WCV) en niños de edades equiparables (menos de 1 año) en Suecia y Nicaragua, utilizando técnicas serológicas calibradas, reveló que, aunque los niños suecos presentaban valores preinmunización menores, desarrollaron respuestas antitoxínicas y respuestas de anticuerpos vibriocídicos más acusados frente a la vacuna [58]. No obstante, no se conoce a ciencia cierta si estas diferencias guardaban relación con la nutrición u otros factores como la exposición previa a esos antígenos del cólera.

En la década de los 80 se estudió en niños de Bangladesh la asociación entre subnutrición, colonización con *Vibrio cholerae* y respuesta serológica a la CTB administrada por vía oral [59]. Estos estudios revelaron que la subnutrición (determinada como menos del 70% de la referencia del peso para la edad) no se asociaba a la colonización, a la enfermedad ni a la duración o gravedad del cólera. Por otra parte, los niños subnutridos no difirieron de los niños bien nutridos en su respuesta serológica a la colonización, a la enfermedad o a la CTB administrada por vía oral. Se llegó a la conclusión de que la respuesta favorable al componente CTB en niños subnutridos tenía una importancia particular cuando se considerase el empleo de vacunas orales contra el cólera en zonas donde la subnutrición es corriente. No obstante, en recientes análisis repetidos de estudios previos realizados en Bangladesh, cuando niños con desnutrición grave recibían Dukoral, los incrementos  $\geq 4$  veces de las respuestas inmunitarias vibriocídicas fueron significativamente menos frecuentes en niños desnutridos (menos de  $-2$  DE de la puntuación Z de la talla para la edad) que en niños mejor nutridos [Ahmed y cols., en prensa]. De este modo, cabe la posibilidad de que un agente inmunógeno muy potente como la CTB pueda resultar menos afectado por el estado nutricional del niño que los antígenos bacterianos, predominantemente lipopolisacáridos, que inducen respuestas inmunitarias vibriocídicas.

En algunos estudios se ha intentado mejorar la inmunogenicidad de la vacuna WC/rCTB inactivada con el empleo de micronutrientes, basándose en la hipótesis de que algunos niños pueden no responder de forma óptima debido a la carencia de micronutrientes. Los resultados de estos estudios son mixtos. En uno de ellos, los niños recibieron aportes complementarios de vitamina A o cinc, o una combinación de ambas sustancias. Los niños con aporte de cinc presentaron tasas de seroconversión vibriocídica más elevadas que los demás, si bien, curiosamente, tenían menores tasas de respuestas antitoxínicas [60, 61]. Por el contrario, la vitamina A no cambió ninguna de esas respuestas serológicas. En estudios más recientes se registró un efecto altamente significativo sobre las respuestas inmunitarias vibriocídicas a Dukoral en niños de Bangladesh de 9 a 18 meses de edad, que recibieron aportes complementarios de cinc durante 42 días (20 mg/día), empezando 3 semanas antes del comienzo de la vacunación [Ahmed y cols., presentado]. El 77% de los niños con aportes complementarios presentaron un incremento  $\geq 4$  veces de la respuesta de anticuerpos séricos vibriocídicos en comparación con sólo el 56% de los niños que no recibieron dichos aportes. Los beneficios positivos

del cinc no se observaron con respecto a las respuestas inmunitarias antitoxínicas; éstas fueron similares entre los niños que recibieron los aportes complementarios y los niños que no los recibieron. No se registraron diferencias entre las respuestas (vibriocídica o antitóxica) en lactantes menores de 6 a 9 meses que, muy probablemente, no presentaban ninguna carencia de cinc. Los estudios de inmunogenicidad descritos excluyeron a niños con malnutrición grave (puntuaciones Z del peso para la edad  $< 3$ ); no obstante, muchos de los niños sufrían una malnutrición leve a moderada (puntuaciones Z del peso para la edad  $< 1$  a 3).

En estudios recientes de las respuestas vacunales a Dukoral en niños de Bangladesh se observó también que la alimentación con leche materna puede interferir con el efecto beneficioso de la vacuna. Los niños que no fueron amamantados 3 horas antes de la administración oral de la vacuna presentaron respuestas inmunitarias vibriocídicas más frecuentes que los niños a quienes se les privó únicamente de la leche materna durante 1 hora antes de la inmunización [Ahmed y cols., presentado]. No obstante, debe admitirse claramente que la propia alimentación materna ha sido relacionada contundentemente con una reducción considerable del cólera grave. Por lo tanto, en estudios realizados durante los años 80 se observó que niños amamantados presentaban una reducción del 70% del riesgo de contraer cólera grave y que, aunque el riesgo declinaba con la edad, se evidenció claramente en niños de hasta 30 meses de edad [62].

La vacuna contra el cólera WC inactivada, producida y utilizada en Vietnam, es muy similar a Dukoral exceptuando que incluye células del serotipo O139 de *V. cholerae* y carece de subunidad B [49]. El análisis de un ensayo con esta vacuna halló tasas de eficacia similares en niños y adultos, si bien el periodo de riesgo del cólera quedó limitado a 10 meses, dado que el brote de cólera no persistió. La vacuna de células enteras parecía tan inmunógena en niños como en adultos [63].

### Vacunas orales contra ECET

La única vacuna contra ECET que ha sido investigada extensamente en países en vías de desarrollo, en diferentes grupos de edad incluyendo niños pequeños y lactantes, consiste en una combinación de rCTB y bacterias ECET inactivadas con formalina, que expresan los factores de colonización franjeados de ECET más prevalentes, así como algunos de los antígenos O más prevalentes [64]. En ensayos de fase I y II con esta vacuna ECET rCTB-CF

oral en voluntarios adultos de Suecia, Bangladesh y Egipto, se ha observado que la vacuna es bien tolerada y genera respuestas inmunitarias mucosas comparables en el intestino (líquido de lavado intestinal) o respuestas inmunitarias derivadas de intestino frente a los diferentes antígenos vacunales en una mayoría de las vacunas de ámbitos diferentes. En ensayos clínicos de seguridad e inmunogenicidad análogos con la vacuna ECET rCTB-CF en niños de 2 a 9 años de edad en países en vías de desarrollo, se comprobó que la vacuna era tan inmunógena como en adultos y que también se toleraba bien, excepto en los lactantes más pequeños y los niños que empiezan a andar; estos últimos grupos presentaron respuestas inmunitarias algo menores que los niños mayores [64–67].

Se investigó la eficacia protectora de la vacuna ECET rCTB-CF en ensayos vacunales de fase III controlados con placebo en viajeros norteamericanos con destino a México y Guatemala. En el primer estudio, en el que se incluyó a casi 700 voluntarios, se observó que la vacuna proporcionaba una protección significativa (eficacia protectora del 77%;  $p = 0,039$ ) frente a la enfermedad diarreica por ECET, moderada a grave, definida como la presencia de síntomas que interferían con las actividades diarias de los viajeros o más de 5 deposiciones sueltas al día, aunque sin efecto protector significativo frente a la diarrea por ECET menos grave [68]. Un ensayo subsiguiente de tamaño similar en el mismo ámbito reveló también que la vacuna protegía frente a síntomas más graves en aquellas personas vacunadas en las que podía documentarse el éxito de la vacuna [A.L. Bourgeois, comunicación personal]. No obstante, cuando se verificaba la eficacia de la vacuna ECET rCTB-CF en un ensayo a doble ciego, controlado con placebo, en niños de 6 a 18 meses de edad, que habitaban regiones rurales de Egipto, no se detectó protección alguna [S.J. Savarino, comunicación personal].

Para evaluar si la respuesta baja a la vacuna que fue observada en lactantes de Egipto y Bangladesh podría explicarse por el estado nutricional deficiente, las deficiencias de micronutrientes u otros factores, se planificó la realización de estudios en Bangladesh para evaluar una posible influencia de estos diferentes factores sobre las respuestas inmunitarias. Estos estudios se centrarán especialmente en las respuestas inmunitarias mucosas cuando se administran vacunas orales modelo (Dukoral y Vivotif) con aportes complementarios de cinc. El cinc genera respuestas inmunitarias congénitas y adaptativas (tanto humorales como celulares) en niños afectados de diarrea causada por ECET. Niños con diarrea por ECET, de 6 a 24 meses de edad, que recibieron 20 mg de cinc du-

rante 10 días, mostraron niveles de C3 del complemento significativamente mayores en el suero, mayor actividad fagocítica celular y respuestas superiores de las células T en comparación con niños de edades equiparables que no recibían aportes complementarios. Estos resultados permiten suponer que el aporte complementario de cinc puede ser también útil en la mejora de las tasas de beneficio de las vacunas específicas de ECET y en la reducción de la morbilidad causada por la enfermedad [Larson y Qadri, comunicación personal].

### Vacunas orales contra *Shigella*

Una sola vacuna oral atenuada contra la shigellosis ha sido evaluada en un país en vías de desarrollo. SC602 es una cepa de *Shigella flexneri* 2a menos virulenta debido a las eliminaciones del gen plasmídico de virulencia icsA (que participa en la diseminación intracelular e intercelular) y el locus cromosómico iuc (que codifica la aerobactina) [69]. En voluntarios de EE.UU. se comprobó que era segura, inmunógena, protectora y se excretaba cuando se utilizaba a una dosis de  $10^4$ ; no obstante, causaba disentería si se administraban dosis superiores ( $10^6$  ó  $10^8$ ) [69]. La vacuna se examinó en niños de Bangladesh a dosis de 4, 5 y 6 log. A estas dosis no se registraron efectos secundarios demostrables, así como tampoco respuestas serológicas detectables ni excreción [70]. Debido a los efectos secundarios registrados con dosis más elevadas en EE.UU., no se administraron dichas dosis en los niños de Bangladesh.

No se dispone de un conocimiento evidente de las diferentes respuestas inmunógenas entre los voluntarios de EE.UU. y los niños de Bangladesh; no obstante, la elevada exigencia de hierro en relación con la eliminación de aerobactina deja entrever una posible explicación. Cuando se reproduce in vitro, la cepa necesita hierro adicional en los medios; sin embargo, no se reproducirá en presencia de una concentración baja de hierro. Parece posible que la concentración de hierro en el tracto intestinal de los voluntarios de EE.UU. y los niños de Bangladesh pueden ser bastante diferentes, dado que los niños de Bangladesh ingieren una alimentación muy pobre en hierro, mientras que los adultos en EE.UU. consumen normalmente carne, que contiene hierro heme. Parecería probable que las vacunas bacterianas orales atenuadas que requieren colonización y reproducción, especialmente las que se administran a dosis relativamente bajas, pero que también presentan una elevada exigencia de hierro para reproducirse, puedan precisar estabilizadores que proporcionen ese

micronutriente. Esto puede sustanciarse especialmente cuando la vacuna se destina a sujetos con alimentación deficiente en hierro. No se han realizado estudios para analizar si el suministro de cierto aporte complementario de hierro podría mejorar la inmunogenicidad de la cepa vacunal. La importancia del hierro en las infecciones bacterianas está perfectamente confirmada y no es probable que la infección por una cepa vacunal difiera al respecto de otros tipos de infecciones bacterianas. Debido a la mutación genética específica en esta cepa vacunal, es probable que dependa incluso más de la disponibilidad de hierro. Aunque no es posible excluir que otras carencias nutricionales del hospedador, así como el aporte de leche materna en el momento de la vacunación, pudieran haber desempeñado un papel en el escaso éxito de la vacuna, este aspecto tendrá que verificarse en futuros estudios controlados de candidatos a recibir vacuna oral atenuada contra *Shigella*.

Otra posibilidad puede consistir en que los niños de este entorno hayan desarrollado ya cierta inmunidad frente a antígenos específicos de *Shigella flexneri* 2a por infección natural, que pueda haberles protegido frente a las dosis bajas de la cepa vacunal utilizada. Aunque la protección podría ser superada incrementando la dosis de la vacuna, este tipo de estrategia podría representar también un riesgo para los niños sin inmunidad preexistente en caso de que la vacuna fuera reactógena.

Una vacuna contra *Shigella* parenteral, en la que se utiliza un polisacárido O conjugado a una proteína, fue inmunógena y eficaz cuando se estudió en adultos jóvenes en Israel [71]; no obstante, esta vacuna no se considera en esta revisión dado que no se administra por vía oral y no se dispone de datos referentes a su empleo en niños de países en vías de desarrollo.

### **Factores que influyen sobre las respuestas inmunitarias a las vacunas orales en países en vías de desarrollo**

Tal como se ha destacado anteriormente, numerosos estudios indican que las vacunas orales antipoliomielítica, antirotavirus, contra el cólera, contra ECET y contra *Shigella* pueden no ser tan inmunógenas o protectoras cuando se administran en sujetos de países en vías de desarrollo. Los datos dan a entender que esta inmunogenicidad reducida puede deberse a varios factores, entre los que destacan los siguientes: (1) Subnutrición; (2) deficiencias de micronutrientes incluyendo cinc, hierro o vitamina A; (3) interferencia del anticuerpo de la leche materna

o el anticuerpo transplacentario materno; (4) interferencia de infecciones helmínticas, sobrecrecimiento en el intestino delgado con patología asociada de la mucosa intestinal; (5) interferencia de infecciones intestinales por enterovirus. Hasta la fecha se ha especulado muy poco sobre el papel potencial que desempeña la desnutrición materna sobre el lactante; sin embargo, es posible que la desnutrición materna de macro- [nutrientes] o micronutrientes redujera la capacidad del sistema inmunitario del lactante para responder bien a los antígenos vacunales [72, 73].

En un intento de seleccionar aquellos factores capaces de reducir la inmunogenicidad, la edad parece una variable crítica. Los factores que son importantes para el neonato o el lactante muy pequeño, por ejemplo, leche materna o anticuerpo materno transplacentario, pueden no ser significativos para un niño de 2 años. Es más probable que las respuestas de la vacuna en el niño mayor se reduzcan por subnutrición, que suele ser más pronunciada en niños mayores de 1 año, a menudo en relación con episodios diarreicos repetidos durante la primera infancia, el sobrecrecimiento en el intestino delgado, la patología de la mucosa, las infecciones helmínticas o la deficiencia de micronutrientes.

Aunque en numerosos estudios se ha observado una inmunogenicidad reducida en niños de países en vías de desarrollo, desafortunadamente no se dispone de una pauta evidente que indique cómo mejorar estas respuestas. Por ejemplo, aunque la suspensión de la alimentación materna durante varias horas en el curso de las inmunizaciones puede mejorar eficazmente algunas respuestas vacunales, puede ser que esta recomendación no se cumpla fácilmente en programas a gran escala. La desparasitación puede también mejorar en cierto modo las respuestas, lo cual parecería ser una estrategia práctica especialmente si pudiera incorporarse a programas de inmunización en niños algo mayores. Los aportes complementarios de cinc se recomiendan actualmente para niños durante episodios de diarrea [74]; este procedimiento puede también beneficiar la reactividad de las vacunas, si bien dicho beneficio tendrá que ser demostrado en programas de salud pública. Aunque los aportes complementarios sistemáticos de vitamina A constituyen ahora un componente importante en intervenciones sanitarias de rutina, los datos procedentes de la mayoría de los estudios con vacunas dejan entrever la improbabilidad de que los aportes complementarios adicionales de vitamina A incrementen ulteriormente las respuestas a las vacunas.



Las vacunas bacterianas atenuadas pueden beneficiar si se administran con estabilizadores diseñados para facilitar su colonización intestinal transitoria. Por ejemplo, una vacuna bacteriana diseñada genéticamente puede tener necesidades específicas de nutrientes o minerales (por ejemplo, hierro) y estas necesidades podrían incluirse en el estabilizador que sirva de vehículo a la vacuna.

Es importante tener en cuenta la necesidad de información adicional para determinar las condiciones existentes durante el crecimiento fetal que pudieron intensificar o suprimir el sistema inmunitario del lactante y

afectar la respuesta a las vacunas administradas en una edad temprana. Puede suceder que ciertos micronutrientes, por ejemplo, el cinc administrado a madres gestantes, mejoren la inmunogenicidad de la vacuna para el lactante.

En suma, no se puede dar por sentado que las vacunas para niños de países desarrollados actúen tan favorablemente cuando se administran a niños de países en vías de desarrollo. Por lo tanto, tienen que ser evaluadas y optimizadas para estos niños con objeto de obtener su beneficio máximo.

## Bibliografía

- Moore SE, Goldblatt D, Bates CJ, Prentice AM: Impact of nutritional status on antibody responses to different vaccines in undernourished Gambian children. *Acta Paediatr* 2003;92:170-176.
- Faden H: Results of a clinical study of polio vaccine: the Buffalo experience. *Pediatr Infect Dis J* 1991;10:973-975.
- Agarwal A, Sharma D, Kumari S, Khare S: Antibody response to three doses of standard and double dose of trivalent oral polio vaccine. *Indian Pediatr* 1991;28:1141-1145.
- Sabin AB: Vaccination against poliomyelitis in economically underdeveloped countries. *Bull World Health Organ* 1980;58:141-157.
- John TJ, Jayabal P: Oral polio vaccination of children in the tropics. 1. The poor seroconversion rates and the absence of viral interference. *Am J Epidemiol* 1972;96:263-269.
- Sutter RW, Suleiman AJ, Malankar P, et al: Trial of a supplemental dose of four poliovirus vaccines. *N Engl J Med* 2000;343:767-773.
- Triki H, Abdallah MV, Ben AR, et al: Influence of host related factors on the antibody response to trivalent oral polio vaccine in Tunisian infants. *Vaccine* 1997;15:1123-1129.
- Swartz TA, Skalska P, Gerichter CG, Cockburn WC: Routine administration of oral polio vaccine in a subtropical area. Factors possibly influencing seroconversion rates. *J Hyg (Lond)* 1972;70:719-726.
- Lepow ML, Warren RJ, Gray N, et al: Effect of Sabin type I poliomyelitis vaccine administered by mouth to newborn infants. *N Engl J Med* 1961;264:1071-1078.
- Plotkin SA, Katz M, Brown RE, Pagano JS: Oral poliovirus vaccination in newborn African infants. The inhibitory effect of breast feeding. *Am J Dis Child* 1966;111:27-30.
- Katz M, Plotkin SA: Oral polio immunization of the newborn infant; a possible method for overcoming interference by ingested antibodies. *J Pediatr* 1968;73:267-270.
- John TJ, Devarajan LV, Luther L, Vijayarathnam P: Effect of breast-feeding on seroresponse of infants to oral poliovirus vaccination. *Pediatrics* 1976;57:47-53.
- Myaux JA, Unicomb L, Besser RE, et al: Effect of diarrhea on the humoral response to oral polio vaccination. *Pediatr Infect Dis J* 1996;15:204-209.
- Bhaskaram P, Nair KM, Hemalatha P, et al: Systemic and mucosal immune response to polio vaccination with additional dose in newborn period. *J Trop Pediatr* 1997;43:232-234.
- Chopra K, Kundu S, Chowdhury DS: Antibody response of infants in tropics to five doses of oral polio vaccine. *J Trop Pediatr* 1989;35:19-23.
- Bahl R, Bhandari N, Wahed MA, et al: Vitamin A supplementation of women postpartum and of their infants at immunization alters breast milk retinol and infant vitamin A status. *J Nutr* 2002;132:3243-3248.
- Vesikari T, Isolauri E, d'Hondt E, et al: Protection of infants against rotavirus diarrhoea by RIT 4237 attenuated bovine rotavirus strain vaccine. *Lancet* 1984;i:977-981.
- Hanlon P, Hanlon L, Marsh V, et al: Trial of an attenuated bovine rotavirus vaccine (RIT 4237) in Gambian infants. *Lancet* 1987;ii:1342-1345.
- Georges-Courbot MC, Monges J, Siopathis MR, et al: Evaluation of the efficacy of a low-passage bovine rotavirus (strain WC3) vaccine in children in Central Africa. *Res Virol* 1991;142:405-411.
- De Mol P, Zissis G, Butzler JP, et al: Failure of live, attenuated oral rotavirus vaccine. *Lancet* 1986;ii:108.
- Joensuu J, Koskenniemi E, Pang XL, Vesikari T: Randomised placebo-controlled trial of rhesus-human reassortant rotavirus vaccine for prevention of severe rotavirus gastroenteritis. *Lancet* 1997;350:1205-1209.
- Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH, et al: Safety and efficacy of high-dose rhesus-human reassortant rotavirus vaccines - report of the National Multicenter Trial. *United States Rotavirus Vaccine Efficacy Group. Pediatrics* 1996;97:7-13.
- Lanata CF, Midthun K, Black RE, et al: Safety, immunogenicity, and protective efficacy of one and three doses of the tetravalent rhesus rotavirus vaccine in infants in Lima, Peru. *J Infect Dis* 1996;174:268-275.
- Linhares AC, Gabbay YB, Mascarenhas JD, et al: Immunogenicity, safety and efficacy of tetravalent rhesus-human, reassortant rotavirus vaccine in Belem, Brazil. *Bull World Health Organ* 1996;74:491-500.
- Perez-Schael I, Guntinas MJ, Perez M, et al: Efficacy of the rhesus rotavirus-based quadrivalent vaccine in infants and young children in Venezuela. *N Engl J Med* 1997;337:1181-1187.
- Linhares AC, Lanata CF, Hausdorff WP, et al: Reappraisal of the Peruvian and Brazilian lower titer tetravalent rhesus-human reassortant rotavirus vaccine efficacy trials: analysis by severity of diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:1001-1006.
- Ruiz-Palacios GM, Perez-Schael I, Velazquez FR, et al: Safety and efficacy of an attenuated vaccine against severe rotavirus gastroenteritis. *N Engl J Med* 2006;354:11-22.
- Vesikari T, Matson DO, Dennehy P, et al: Safety and efficacy of a pentavalent human-bovine (WC3) reassortant rotavirus vaccine. *N Engl J Med* 2006;354:23-33.
- Pichichero ME: Effect of breast-feeding on oral rhesus rotavirus vaccine seroconversion: a metaanalysis. *J Infect Dis* 1990;162:753-755.
- Rennels MB, Wasserman SS, Glass RI, Keane VA: Comparison of immunogenicity and efficacy of rhesus rotavirus reassortant vaccines in breastfed and nonbreastfed children. *US Rotavirus Vaccine Efficacy Group. Pediatrics* 1995;96:1132-1136.
- Linhares AC, Carmo KB, Oliveira KK, et al: Nutritional status in relation to the efficacy of the rhesus-human reassortant, tetravalent rotavirus vaccine (RRV-TV) in infants from Belem, Para state, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002;44:13-16.
- Perez-Schael I, Salinas B, Tomat M, et al: Efficacy of the human rotavirus vaccine

- RIX4414 in malnourished children. *J Infect Dis* 2007;196:537–540.
- 33 Lin FY, Ho VA, Khiehm HB, et al: The efficacy of a *Salmonella typhi* Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. *N Engl J Med* 2001;344:1263–1269.
  - 34 Murphy JR, Grez L, Schlesinger L, et al: Immunogenicity of *Salmonella typhi* Ty21a vaccine for young children. *Infect Immun* 1991;59:4291–4293.
  - 35 Cryz SJ Jr, Vanprapar N, Thisyakorn U, et al: Safety and immunogenicity of *Salmonella typhi* Ty21a vaccine in young Thai children. *Infect Immun* 1993;61:1149–1151.
  - 36 Cooper PJ, Chico M, Sandoval C, et al: Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with suppression of the interleukin-2 response to recombinant cholera toxin B subunit following vaccination with the live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *Infect Immun* 2001;69:1574–1580.
  - 37 Lagos R, Avendano A, Horwitz I, et al: Tolerance and immunogenicity of an oral dose of CVD 103-HgR, a live attenuated *Vibrio cholerae* 01 strain: a double-blind study of Chilean adults. *Rev Med Chil* 1993;121:857–863.
  - 38 Simanjuntak CH, O’Hanley P, Punjabi NH, et al: Safety, immunogenicity, and transmissibility of single-dose live oral cholera vaccine strain CVD 103-HgR in 24- to 59-month-old Indonesian children. *J Infect Dis* 1993;168:1169–1176.
  - 39 Suharyono, Simanjuntak C, Witham N, et al: Safety and immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in 5–9-year-old Indonesian children. *Lancet* 1992;340:689–694.
  - 40 Richie EE, Punjabi NH, Sidharta YY, et al: Efficacy trial of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR in North Jakarta, Indonesia, a cholera-endemic area. *Vaccine* 2000;18:2399–2410.
  - 41 Lagos R, Fasano A, Wasserman SS, et al: Effect of small bowel bacterial overgrowth on the immunogenicity of single-dose live oral cholera vaccine CVD 103-HgR. *J Infect Dis* 1999;180:1709–1712.
  - 42 Sack DA, Sack RB, Shimko J, et al: Evaluation of Peru-15, a new live oral vaccine for cholera, in volunteers. *J Infect Dis* 1997;176:201–205.
  - 43 Cohen MB, Giannella RA, Bean J, et al: Randomized, controlled human challenge study of the safety, immunogenicity, and protective efficacy of a single dose of Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine. *Infect Immun* 2002;70:1965–1970.
  - 44 Kenner JR, Coster TS, Taylor DN, et al: Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis* 1995;172:1126–1129.
  - 45 Qadri F, Chowdhury MI, Faruque SM, et al: Peru-15, a live attenuated oral cholera vaccine, is safe and immunogenic in Bangladeshi toddlers and infants. *Vaccine* 2007;25:231–238.
  - 46 Sack DA, Shimko J, Sack RB, et al: Comparison of alternative buffers for use with a new live oral cholera vaccine, Peru-15, in outpatient volunteers. *Infect Immun* 1997;65:2107–2111.
  - 47 Clemens JD, Sack DA, Harris JR, et al: Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh. *Lancet* 1986;ii:124–127.
  - 48 Holmgren J, Clemens J, Sack DA, Svennerholm AM: New cholera vaccines. *Vaccine* 1989;7:94–96.
  - 49 Trach DD, Clemens JD, Ke NT, et al: Field trial of a locally produced, killed, oral cholera vaccine in Vietnam. *Lancet* 1997;349:231–235.
  - 50 Clemens JD, Sack DA, Harris JR, et al: Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh: results from three-year follow-up. *Lancet* 1990;335:270–273.
  - 51 Concha A, Giraldo A, Castaneda E, et al: Safety and immunogenicity of oral killed whole cell recombinant B subunit cholera vaccine in Barranquilla, Colombia. *Bull Pan Am Health Organ* 1995;29:312–321.
  - 52 Sanchez JL, Vasquez B, Begue RE, et al: Protective efficacy of oral whole-cell/recombinant-B-subunit cholera vaccine in Peruvian military recruits. *Lancet* 1994;344:1273–1276.
  - 53 Taylor DN, Cardenas V, Sanchez JL, et al: Two-year study of the protective efficacy of the oral whole cell plus recombinant B subunit cholera vaccine in Peru. *J Infect Dis* 2000;181:1667–1673.
  - 54 Lucas ME, Deen JL, von Seidlein L, et al: Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *N Engl J Med* 2005;352:757–767.
  - 55 Taylor DN, Cardenas V, Perez J, et al: Safety, immunogenicity, and lot stability of the whole cell/recombinant B subunit (WC/rCTB) cholera vaccine in Peruvian adults and children. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61:869–873.
  - 56 Clemens JD, Stanton BF, Chakraborty J, et al: B subunit whole-cell and whole-cell only oral vaccines against cholera: studies on reactogenicity and immunogenicity. *J Infect Dis* 1987;155:79–85.
  - 57 Sack DA, Clemens JD, Huda S, et al: Antibody responses after immunization with killed oral cholera vaccines during the 1985 vaccine field trial in Bangladesh. *J Infect Dis* 1991;164:407–411.
  - 58 Hallander HO, Paniagua M, Espinoza F, et al: Calibrated serological techniques demonstrate significant different serum response rates to an oral killed cholera vaccine between Swedish and Nicaraguan children. *Vaccine* 2002;21:138–145.
  - 59 Glass RI, Svennerholm AM, Stoll BJ, et al: Effects of undernutrition on infection with *Vibrio cholerae* O1 and on response to oral cholera vaccine. *Pediatr Infect Dis J* 1989;8:105–109.
  - 60 Albert MJ, Qadri F, Wahed MA, et al: Supplementation with zinc, but not vitamin A, improves seroconversion to vibriocidal antibody in children given an oral cholera vaccine. *J Infect Dis* 2003;187:909–913.
  - 61 Qadri F, Ahmed T, Wahed MA, et al: Suppressive effect of zinc on antibody response to cholera toxin in children given the killed, B subunit-whole cell, oral cholera vaccine. *Vaccine* 2004;22:416–421.
  - 62 Glass RI, Stoll BJ: The protective effect of human milk against diarrhea. A review of studies from Bangladesh. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989;351:131–136.
  - 63 Trach DD, Cam PD, Ke NT, et al: Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Viet Nam. *Bull World Health Organ* 2002;80:2–8.
  - 64 Svennerholm AM, Steele D: Microbial-gut interactions in health and disease. Progress in enteric vaccine development. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:421–445.
  - 65 Savarino SJ, Hall ER, Bassily S, et al: Introductory evaluation of an oral, killed whole cell enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine in Egyptian infants. *Pediatr Infect Dis J* 2002;21:322–330.
  - 66 Qadri F, Ahmed T, Ahmed F, et al: Reduced doses of oral killed enterotoxigenic *Escherichia coli* plus cholera toxin B subunit vaccine is safe and immunogenic in Bangladeshi infants 6–17 months of age: dosing studies in different age groups. *Vaccine* 2006;24:1726–1733.
  - 67 Walker RI, Steele D, Aguado T: Analysis of strategies to successfully vaccinate infants in developing countries against enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) disease. *Vaccine* 2007;25:2545–2566.
  - 68 Sack DA, Shimko J, Torres O, et al: Randomised, double-blind, safety and efficacy of a killed oral vaccine for enterotoxigenic *E. coli* diarrhoea of travellers to Guatemala and Mexico. *Vaccine* 2007;25:4392–4400.
  - 69 Coster TS, Hoge CW, VanDeVerg LL, et al: Vaccination against shigellosis with attenuated *Shigella flexneri* 2a strain SC602. *Infect Immun* 1999;67:3437–3443.
  - 70 Anonymous: Future needs and directions for Shigella vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2006;81:51–58.
  - 71 Cohen D, Ashkenazi S, Green MS, et al: Double-blind vaccine-controlled randomised efficacy trial of an investigational *Shigella sonnei* conjugate vaccine in young adults. *Lancet* 1997;349:155–159.
  - 72 Wellinghausen N: Immunobiology of gestational zinc deficiency. *Br J Nutr* 2001;85 (suppl 2):S81–S86.
  - 73 Golden MH, Jackson AA, Golden BE: Effect of zinc on thymus of recently malnourished children. *Lancet* 1977;ii:1057–1059.
  - 74 Walker CF, Black RE: Zinc and the risk for infectious disease. *Annu Rev Nutr* 2004;24:255–275.