

PRUEBA DE LABORATORIO DE LA TOXICIDAD DE VACUNAS ANTITIFOIDICAS UTILIZADAS EN ESTUDIOS DE CAMPO¹

Dres. J. Spaun², Ian Davidson³ y S. Olesen-Larsen⁴

Para el control de las vacunas es importante elaborar métodos que permitan comprobar su toxicidad en el laboratorio. Dos tipos de vacuna antitifóidica que habían producido distintas tasas de reacción entre las personas vacunadas durante amplios estudios de campo ofrecían una excelente oportunidad para explorar la validez de la determinación de su toxicidad en el laboratorio. En este trabajo se describe un plan detallado para la prueba de esta toxicidad en base a los cambios de peso ocurridos en ratones vacunados por vía intraperitoneal. Los resultados de la prueba de laboratorio confirmaron la experiencia obtenida en los estudios de campo.

En los últimos años se ha observado un creciente interés por las pruebas de laboratorio para determinar la toxicidad de las vacunas. Dentro del grupo de vacunas bacterianas inactivadas se ha dedicado especial atención a las pruebas de toxicidad de la vacuna contra la pertussis. Se ha informado con frecuencia de casos de neurotoxicidad en los niños, incluso en estos últimos años (1), lo que ha concentrado el interés en la determinación de dicha toxicidad mediante pruebas de laboratorio.

La vacuna antitifóidica merece una atención análoga. La experiencia, en general, ha demostrado que, con las dosis de esta vacuna actualmente utilizadas para la inmunización humana, son frecuentes las reacciones, aunque en raros casos revisten gravedad. Ritchie, Ashcroft y Nicholson (2) informa-

ron que la mitad de los escolares vacunados por ellos experimentaron reacciones molestas.

A falta de pruebas específicas, por ejemplo para la neuropatogenicidad, se suele considerar que el aumento de peso de animales jóvenes después de la vacunación puede servir para medir en forma apropiada la toxicidad. Sin embargo, raramente se ha dado cuenta de pruebas paralelas, en el laboratorio y en seres humanos, de vacunas de distinta toxicidad. Por consiguiente, hay que poner en duda el valor de la prueba del peso de los animales.

Anteriores experiencias personales con el control del peso de ratones inyectados con varias clases de vacunas antitifóidicas, en distintas dosis, revelaron la necesidad de dedicar especial atención al plan del experimento a fin de obtener resultados concluyentes. Emmens (3) ha subrayado la importancia de este aspecto, indicando que incluso la simple operación de sacar con la mano a los animales de una caja y colocarlos en frascos individuales puede afectar su peso en forma sistemática. Esto sugiere que los primeros animales que vienen a la mano son los más mansos. Finney (4) encarece que se aplique el principio de aleatorización, o

¹ Publicado en inglés con el título "Laboratory Toxicity Test of Field Trial Typhoid Vaccines", en el *Bull Wild Hlth Org*, 33(5):673-679, 1965.

² Director Adjunto, Departamento de Patrones Biológicos (Laboratorio Internacional de la oms de Patrones Biológicos), Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca.

³ Jefe de Investigaciones, Departamento de Patrones Biológicos (Laboratorio Internacional de la oms de Patrones Biológicos), Laboratorio Central de Veterinaria, Weybridge, Surrey, Inglaterra.

⁴ Estadístico, Departamento de Bioestadística, Statens Seruminstitut, Copenhague, Dinamarca.

CUADRO 1 — Datos de los ratones inyectados y de la preparación o vacuna utilizada.

Grupo No.	Animal No.										Preparación y dosis (Número de organismos)
1	15	19	37	57	65	96	103	128	135	156	Vacuna K 1 × 10 ⁶
2	6	28	41	59	71	81	100	118	132	145	Vacuna K 5 × 10 ⁶
3	3	18	48	61	69	94	99	121	136	152	Vacuna K 25 × 10 ⁶
4	7	32	35	62	72	93	104	127	137	151	Vacuna K 125 × 10 ⁶
5	16	31	43	51	70	86	111	124	141	146	Vacuna K 625 × 10 ⁶
6	8	23	40	53	77	84	112	116	139	149	Vacuna L 1 × 10 ⁶
7	1	27	42	55	66	91	97	126	142	150	Vacuna L 5 × 10 ⁶
8	14	20	34	60	76	92	107	122	133	153	Vacuna L 25 × 10 ⁶
9	13	21	46	64	74	85	106	119	131	159	Vacuna L 125 × 10 ⁶
10	9	26	38	56	75	82	109	114	129	158	Vacuna L 625 × 10 ⁶
11	4	30	44	63	78	90	98	125	134	160	0,5 ml de solución salina 0,5 ml de solución salina 0,5 ml de solución salina + fenol al 0,5%
12	10	17	47	58	80	89	110	123	138	157	
13	2	29	39	54	73	83	102	117	130	147	
14	5	24	45	52	67	88	101	115	143	154	
15	11	25	33	49	68	87	108	120	144	155	Sin tratamiento
16	12	22	36	50	79	95	105	113	140	148	Sin tratamiento

sea, distribución al azar, en la distribución, tratamiento y cuidados de los animales de experimentación.

Se sabe por recientes informes⁵ que los cambios de peso de ratones de varias cepas difieren después de inyectarles la vacuna contra la pertussis. Por consiguiente, debe advertirse que en el presente informe no se presta atención al aumento de peso absoluto de los ratones. El análisis de los resultados se basa exclusivamente en la comparación de los cambios de peso observados con el empleo de dos tipos de vacunas. Debe señalarse que, cuando se realizaron estos experimentos, se ignoraba totalmente la tasa de reacción en seres humanos de las dos vacunas antitífoidas objeto de estudio.

Materiales y métodos

Para este estudio se decidió utilizar dos series independientes de números seleccionados al azar para los procedimientos de aleatorización: una serie para la distribución de los ratones en los frascos numerados y otra para la asignación de los frascos a grupos y

para el orden de tratamiento, según se detalla a continuación.

Los ratones se recibieron de la granja de reproducción del Instituto en cajas grandes que contenían de 50 a 60 animales cada una. Se sacaron de las cajas de uno en uno y cada uno fue asignado al azar a un frasco individual numerado. Se utilizó un total de 160 ratones, a los que se asignó los mismos números que a los frascos.

A continuación, los 160 ratones numerados se distribuyeron en 16 grupos de 10 cada uno, utilizándose para ello una segunda serie de números seleccionados al azar. Los animales se inyectaron de acuerdo con esta segunda aleatorización. Todas las operaciones de determinación del peso se realizaron siguiendo el orden numérico.

Después de su distribución, los animales se pesaron el primero, segundo, cuarto y sexto días antes de administrarles la inyección en este último día, y luego diariamente desde el séptimo día al undécimo, inclusive. Se empleó una balanza de precisión de 800 g, fabricada por Mettler, Zurich, y el peso se determinó hasta una exactitud de décimos de gramo. Los animales se pesaron diariamente a la misma hora de la mañana antes

⁵ División de Patrones Biológicos, Institutos Nacionales de Salud, Bethesda, Md., E. U. A.: Pertussis Vaccine Symposium Report, 1963 (trabajo inédito).

CUADRO 2 — Cambios de peso de los ratones antes y después de administrarles la inyección en el sexto día.^a

Preparación	Dosis (Número de organismos)	Día								
		1	2	4	6	7	8	9	10	11
Vacuna K.....	1 × 10 ⁶	16,48	16,90	17,80	19,12	19,53	20,20	20,88	21,53	22,35
	5 × 10 ⁶	16,67	17,62	18,24	19,65	19,93	20,49	20,79	21,48	21,98
	25 × 10 ⁶	17,14	17,90	18,49	20,34	20,66	21,31	21,80	22,39	22,96
	125 × 10 ⁶	16,37	17,18	17,84	19,14	19,10	19,87	20,39	20,87	21,39
	625 × 10 ⁶	16,23	16,88	17,57	18,85	17,54	18,46	19,26	19,62	19,97
Vacuna L.....	1 × 10 ⁶	15,88	16,49	17,06	18,28	18,70	19,34	19,85	20,29	20,98
	5 × 10 ⁶	16,84	17,38	18,14	19,50	20,04	20,47	20,81	21,51	21,94
	25 × 10 ⁶	16,39	16,77	17,62	19,01	19,04	19,85	20,26	20,86	21,26
	125 × 10 ⁶	16,54	16,92	17,82	19,12	18,48	19,55	20,22	20,72	21,40
	625 × 10 ⁶	16,81	17,43	18,05	19,48	18,07	18,77	19,78	19,99	20,58
Solución salina.....	0,5 ml	16,64	16,79	17,86	19,03	19,44	19,92	20,59	20,99	21,40
	0,5 ml	16,72	17,59	18,12	19,56	20,14	20,51	21,13	21,63	22,17
Solución salina + fenol al 0,5%.....	0,5 ml	16,43	17,28	17,86	19,37	19,43	20,13	20,50	21,18	21,78
	0,5 ml	16,37	17,18	17,79	19,19	19,32	19,96	20,67	21,22	21,87
Sin tratamiento.....	—	16,27	16,98	17,85	19,41	19,97	20,63	21,43	22,09	22,61
	—	16,59	17,43	18,20	19,64	20,25	20,78	21,39	21,86	22,47

^a Peso promedio en gramos de los grupos de vacunación, formados por 10 animales, en distintos días.

de alimentarlos. La alimentación consistió en granos y pan remojado en agua. En estos experimentos se utilizaron dos tipos de vacuna antitífóidica (K y L)⁶ que habían sido estudiados en amplios ensayos de campo (2, 5). La vacuna K es inactivada con acetona; y la vacuna L, con fenol y calor. Ambas vacunas se secaron por congelación y no contenían cantidades perceptibles de fenol (6).

Como se indicó en el párrafo anterior, los animales fueron inyectados inmediatamente después de haber sido pesados en el sexto día. Todas las inyecciones se administraron por vía intraperitoneal. Las vacunas secadas por congelación fueron suspendidas y diluidas en solución salina. El cuadro 1 contiene datos sobre los animales incluidos en los distintos grupos y sobre las diferentes dosis de vacuna y las inyecciones testigo de solu-

ción salina o de esta solución con fenol al 0,5 por ciento.

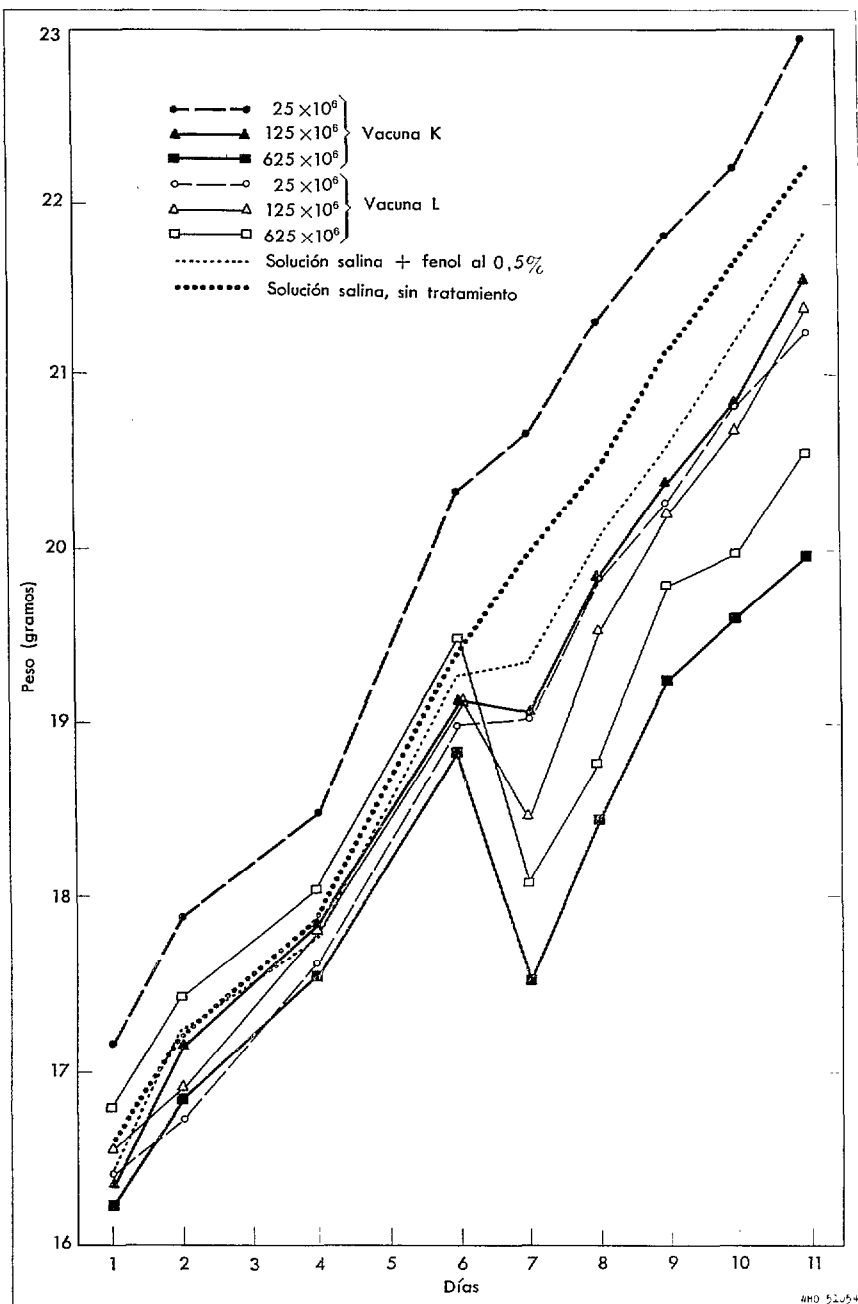
Resultados

En el cuadro 2 se presentan los pesos promedio de los ratones de los distintos grupos de experimentación en cada uno de los nueve días. Los primeros cuatro pesos representan los promedios de cada grupo antes de la administración de las inyecciones, mientras que los correspondientes a los días séptimo a undécimo, inclusive, indican los pesos promedios después del tratamiento.

Durante el período que precedió a la administración de las inyecciones, los animales aumentaron rápidamente de peso, siendo los promedios de todos los grupos de 16,5 g, 17,2 g, 17,9 g y 19,3 g en el primero, segundo, cuarto y sexto días, respectivamente. Después de la inyección de las distintas dosis de vacuna y de líquidos testigo, el ritmo de aumento de peso disminuyó en varios grupos, y en los grupos que recibieron

⁶ Una parte de cada lote de estas vacunas se estableció como la Preparación Internacional de Referencia de Vacuna Antitífóidica (inactivada con acetona) y de Vacuna Antitífóidica (inactivada con fenol y calor), respectivamente, en 1962 (?).

FIGURA 1 — Promedio de aumento de peso en grupos de ratones inyectados con diferentes dosis de vacunas K y L y en los grupos testigo.



dosis más altas de vacunas K y L se observó una pérdida de peso. La figura 1 se basa en los resultados indicados en el cuadro 2; para mayor claridad, se han combinado en la

figura algunos de los grupos testigo y se han eliminado los grupos vacunados con dosis más bajas.

Como se deduce claramente de la figura 1,

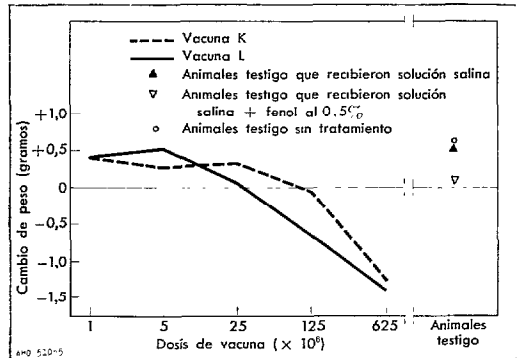
el aumento de peso diario durante el período anterior a la inyección no se produjo de una manera regular de un día a otro, siendo particularmente reducido en el período del segundo al cuarto día. Es posible que este menor aumento se debiera a que el tercer día fue feriado y, por lo tanto, tal vez los animales no fueron suficientemente alimentados. Sin embargo, el peso de todos los grupos siguió la misma tendencia durante este período.

A continuación de las dos dosis más altas de cada vacuna, la disminución de peso llegó a más de 1 g, pero sólo duró un día. En los días sucesivos, los animales recobraron su anterior ritmo de crecimiento.

En el cuadro 3 y en la figura 2 se presenta la respuesta de peso a las distintas dosis de vacuna y a las soluciones testigo. Se ha determinado para cada grupo el promedio de la diferencia entre el peso de los ratones el día de la inyección y su peso al día siguiente.

Al parecer, los grupos que recibieron las dos dosis más pequeñas de cada vacuna no

FIGURA 2 — Cambios de peso en los ratones durante las 24 horas siguientes a la inyección de distintas dosis de vacunas K y L.



acusaron cambios en su tasa de crecimiento, mientras que los sometidos a las dos dosis más altas disminuyeron de peso en forma notable. La dosis que consistía en 25×10^6 organismos apenas produjo efecto alguno con la vacuna K, mientras que la misma dosis de vacuna L detuvo el aumento de peso.

Hubo poca diferencia entre el aumento de peso del grupo de animales que recibieron solución salina y los que no fueron sometidos a ningún tratamiento. Por otra parte, resultó evidente que la adición de fenol al 0,5% a la solución salina redujo el aumento de peso. La diferencia entre este grupo y el que recibió la solución salina resulta estadísticamente significativa. La vacuna L disminuyó el ritmo de crecimiento en mayor grado que la vacuna K en los grupos que recibieron dosis de 25×10^6 y 125×10^6 organismos. La diferencia entre estas dos respuestas sólo es de significación estadística para la última dosis mencionada. Las diferencias de la respuesta a las dosis mayores y menores que las citadas últimamente no fueron estadísticamente significativas.

Análisis de la validez del plan del experimento

Se procedió a una evaluación estadística de la validez de la comparación de los diversos resultados obtenidos.

CUADRO 3 — Promedio de aumento de peso desde el día de la inyección (6° día) hasta el día siguiente (7° día) de los ratones que recibieron diversas dosis de vacunas K y L.

Dosis (Número de organismos)	Cambios de peso (gramos) después de la inyección de		
	Vacuna K	Vacuna L	Líquidos testigo
1×10^6	+0,41	+0,42	
5×10^6	+0,28	+0,54	
25×10^6	+0,32	+0,03	
125×10^6	-0,04	-0,64	
625×10^6	-1,31	-1,41	
0,5 ml de solución salina....			+0,50
0,5 ml de solución salina + fenol al 0,5%.....			+0,10
Sin tratamiento. . .			+0,59
Error típico ^a		0,155 ^a	0,109

^a El error típico se ha calculado excluyendo la variancia de los grupos que recibieron la dosis de 625×10^6 organismos.

Se investigó si existía alguna tendencia de cambio de los pesos que dependiera del orden en que se sacaron los ratones de las cajas de transporte. Según Emmens (3), cabía esperar que la distinta actividad física de los animales durante su distribución en frascos individuales se reflejara en su peso. Ahora bien, un análisis de los pesos promedio de grupos de 16 animales, ordenados según se sacaron de las cajas de transporte, no reveló ninguna variación significativa relacionada con la secuencia temporal según la cual se efectuó la distribución.

Un análisis de la variancia reveló que las diferencias de peso de los ratones observadas entre los grupos que recibieron distintas vacunas y los grupos testigo no eran significativas antes de administrarse las inyecciones.

Durante todo el experimento se pesó a los animales siguiendo el mismo orden a fin de eliminar cualquier posible influencia de un cambio a ese respecto. Se efectuó un análisis de la variancia con el objeto de determinar si el orden en que se pesaron los animales afectó los resultados. Este análisis reveló una influencia de poca importancia, pero no pudo relacionarse con ninguna característica determinada del plan ni de las operaciones.

Discusión

Los resultados de este experimento son de interés en cuanto reflejan la experiencia actualmente conocida sobre estudios realizados en seres humanos. Ritchie, Ashcroft y Nicholson (2) dieron cuenta de la tasa de reacción a la vacunación con vacunas K y L. Estos autores registraron el número de niños que manifestaron fiebre, los que estuvieron ausentes de la escuela y los que sufrieron reacciones locales graves y moderadas. Sólo durante las primeras 24 horas posteriores a la primera inyección se observaron diferencias entre las dos vacunas. A los fines del presente estudio, se consideran principalmente las diferencias de las tasas de reacción entre las dos vacunas.

Una prueba χ^2 reveló que el número de niños ausentes y el de los que presentaron reacciones moderadas y graves era significativamente mayor ($2,5\% > P > 1\%$) después de la administración de la vacuna L que después de la administración de la vacuna K, siempre que se combinaran las observaciones de dos escuelas del estudio. No hubo diferencia alguna entre las tasas de ataques de fiebre provocada por las dos vacunas.

Las diversas reacciones registradas al utilizar las mismas dos vacunas en pruebas sobre el terreno en Yugoslavia (5) dan la misma impresión, aunque las diferencias observadas entre las dos vacunas no resultaron significativas desde el punto de vista estadístico.

En la prueba de toxicidad en el ratón, descrita en este trabajo, se demostró también que la vacuna L era más tóxica que la vacuna K. Cabía esperar el curso de la curva de respuesta que se presenta en la figura 2. Las pequeñas dosis no afectaron en absoluto a los animales. Al parecer, las dosis más fuertes de cada vacuna afectaron a los ratones a una tasa máxima para las dos vacunas y, por tanto, no se observó ninguna diferencia en la respuesta. Dosis todavía más fuertes probablemente habrían matado a los ratones. En consecuencia, fue en las dosis comprendidas entre estos dos extremos donde se manifestaron claramente las distintas influencias de las dos vacunas. Es evidente que sólo el plan especial de esta prueba, incluyendo los múltiples niveles de dosis, la frecuente determinación del peso y el minucioso control de las fuentes de variación, permitió reflejar en el laboratorio la experiencia obtenida sobre el terreno. Esto tiene importancia por cuanto ha demostrado que es posible clasificar el grado de reacción producido por las dos vacunas en el mismo orden, tanto en el laboratorio como en la experiencia de campo con los seres humanos. No es posible asignar un valor numérico a la toxicidad relativa de las vacunas en el

hombre. Asimismo, las curvas de respuesta en las pruebas con los ratones tampoco permiten obtener una evaluación estadística válida de la toxicidad relativa en el laboratorio.

Los efectos tóxicos de las vacunas duraron muy poco en los animales. La pérdida transitoria del apetito o la pérdida de líquidos podría explicar esta influencia. Si se hubiera pesado a los ratones a intervalos más largos, la rápida pérdida de peso y el subsiguiente rápido incremento del mismo hubieran ocultado una pérdida de peso durante, por ejemplo, un período de tres días. La determinación del peso de los animales a cortos intervalos aumentó considerablemente la sensibilidad del método. Se habría podido obtener más información si los ratones se hubieran pesado a intervalos aun más cortos, pero esto no fue factible.

Es necesario examinar la influencia de la toxicidad de estas dos vacunas en los ensayos de actividad realizados en el laboratorio. Si se supone que el efecto tóxico de las vacunas reduce su inmunogenicidad, cabría esperar que la inmunidad conferida por dosis fuertes (es decir, tóxicas) no sería proporcional a la producida por dosis menores (no tóxicas). Por consiguiente, la curva de respuesta en la prueba de protección de los ratones consistiría en dos partes con declives diferentes. Sin embargo, el análisis estadístico de los amplios estudios de laboratorio llevados a cabo sobre las vacunas K y L (8) no reveló ninguna característica particular a este respecto. Un análisis más minucioso de las curvas de dosis de inmunidad/respuesta de las dos vacunas evaluadas por separado revelaría un efecto de esta naturaleza de la toxicidad sobre la inmunogenicidad.

Sería interesante saber si la administración de las vacunas por vía subcutánea daría resultados similares a los obtenidos con las inyecciones intraperitoneales, mencionados en el presente trabajo. Estos experimentos tal vez contribuirían a explicar

la diferencia registrada en cuanto a actividad relativa entre la vacuna K y la L, inyectadas por vía intraperitoneal, en comparación con las administradas por vía subcutánea (9).

Resumen

Los autores describen una prueba de laboratorio destinada a determinar la toxicidad respectiva de dos vacunas antitífoidicas: la vacuna K (inactivada por medio de acetona) y la vacuna L (inactivada por el fenol y el calor), preparaciones muy utilizadas en campañas de vacunación colectiva. El método empleado se funda en el principio de registrar y comparar las modificaciones del peso en función del producto utilizado, lo que implica la vacunación de animales de laboratorio.

Se administró a grupos de ratones, por vía intraperitoneal, una sola dosis, variable según los lotes de animales, de vacuna K o de vacuna L. Los grupos testigos recibieron una inyección de líquido fisiológico, con o sin fenol, y otros ratones no fueron objeto de tratamiento alguno. Días antes de la inyección, todos los animales fueron pesados en forma regular, y diariamente en los cinco días siguientes. Se adoptaron todas las precauciones posibles para reducir al mínimo las causas de error debidas a las manipulaciones y determinaciones sucesivas del peso.

Las vacunas administradas en dosis débiles no determinaron cambio alguno de la tasa de aumento. Las dosis fuertes (625×10^6 organismos) provocaron una notable reducción del peso inmediatamente después de la vacunación; más adelante, la tasa de aumento recobró su valor normal. Con las dosis intermedias, se puso claramente de manifiesto la diferencia de toxicidad de ambas vacunas: la pérdida de peso en las veinticuatro horas siguientes a la vacunación fue, en forma significativa, considerablemente más acentuada con la vacuna L que con la K. El aumento de peso, normal después de la inyección de líquido fisiológico, se redujo al administrarse la inyección de

solución salina a la que se había agregado fenol.

La determinación de las curvas de toxicidad de cada vacuna permite establecer las diferencias entre ambas preparaciones: las dosis débiles casi no afectan a los animales de experimentación y las dosis muy fuertes tienen una toxicidad máxima idéntica en las dos vacunas; en cambio, en cuanto a las dosis intermedias, es evidente el efecto tóxico mucho más elevado de la vacuna L, evaluado por la pérdida de peso en las 24 horas siguientes a la inyección.

Estas investigaciones revisten importancia por confirmar ciertas observaciones hechas

en el curso de campañas de vacunación: en realidad, las complicaciones posvacunales de la vacuna L son más frecuentes y graves que las debidas a la vacuna K. Asimismo, dichas investigaciones podrían contribuir a una mejor comprensión de las relaciones existentes entre la toxicidad de las distintas vacunas y el valor de su potencia inmunógena, evaluado mediante las pruebas de protección activa efectuadas en el ratón. Por otra parte, sería conveniente recurrir a este método para estudiar la toxicidad relativa de las vacunas antitífoidicas, después de inmunizar a los animales de experimentación por vía subcutánea. □

REFERENCIAS

- (1) Ström, J.: "Is Universal Vaccination Against Pertussis Always Justified?" *Brit Med J*, 2:1184, 1960.
- (2) Ritchie, J. M., Asheroft, M. T. y Nicholson, J. M.: "Controlled Field Trial in British Guiana School Children of Heat-Killed Phenolized and Acetone-Killed Lyophilized Typhoid Vaccines," *Amer J Hyg*, 79:196-206, 1964.
- (3) Emmens, C. W.: *Principles of Biological Assay*. London: Chapman and Hall, 1948.
- (4) Finney, D. J.: *Statistical Method in Biological Assay*. London: Griffin, 1952.
- (5) Yugoslav Typhoid Commission [1964 Report]: "A Controlled Field Trial of the Effectiveness of Acetone-Dried and Inactivated and Heat-Phenol-Inactivated Typhoid Vaccines in Yugoslavia," *Bull Wld Hlth Org*, 30:623-630, 1964.
- (6) Walter Reed Army Institute of Research and International Laboratory for Biological Standards, Statens Seruminstitut: "Physical and Chemical Studies of Two Dried-Inactivated Typhoid Vaccines (Vaccines K and L)," *Bull Wld Hlth Org*, 30:647-652, 1964.
- (7) Organización Mundial de la Salud: Comité de Expertos en Patrones Biológicos, Decimoquinto Informe. *Org mund Salud: Ser Inf técn*, 259, 1963.
- (8) Spaun, J. y Uemura, K.: "International Reference Preparations of Typhoid Vaccine," *Bull Wld Hlth Org*, 31:761-791, 1965.
- (9) Spaun, J.: "Studies of the Influence of the Route of Immunization in the Active Mouse Protection Test with Intraperitoneal Challenge for Potency Assay of Typhoid Vaccines," *Bull Wld Hlth Org*, 31:793-798, 1965.

Laboratory Toxicity Test of Field Trial Typhoid Vaccines (Summary)

The authors describe a laboratory test for measuring the respective toxicity of two typhoid vaccines, vaccine K (acetone-inactivated) and vaccine L (heat-phenol-inactivated); these two preparations are widely used in mass vaccination campaigns. The principle of the method is to record and compare changes in weight, depending on the product used, brought about by vaccinating laboratory animals.

Groups of mice were inoculated intraperitoneally with a single dose, varying according to the groups of animals, of vaccine K or vaccine L. Control groups were given an injection of saline or saline containing phenol; other mice were not given any treatment. All the animals were weighed regularly in the days preceding the injection, and daily in the five days following it. Every precaution was taken to minimize causes

of error due to manipulations and successive weighing.

When administered in low doses the vaccines caused no change in weight development. High doses (625×10^6 organisms) caused a considerable loss of weight immediately after vaccination; subsequently the rate of growth returned to normal. With intermediate doses the differences in toxicity of the two vaccines was clearly evident; the loss in weight in the 24 hours following vaccination was significantly greater with vaccine L than with vaccine K. The gain in weight, which was normal after injection with saline solution, diminished when saline plus phenol was injected. The establishment of response curves for each vaccine makes it possible to illustrate the differences between the two preparations: the weak doses hardly had any effect on the laboratory animals but the highest doses affected the animals

at a maximum rate which was identical for both vaccines; on the other hand, for the intermediate doses the much higher toxic effect of vaccine L, measured by loss of weight in the 24 hours following injection, is quite clear.

The importance of these investigations is to confirm certain observations made in the course of vaccination campaigns: vaccine L causes more frequent and more serious postvaccinal complications than vaccine K. They could also help in gaining a better understanding of the relations between the toxicity of different vaccines and the value of their immunogenic power such as it may be evaluated by mouse-protection tests. It might be advisable to use this method for studying the relative toxicity of typhoid vaccines after immunizing laboratory animals by the subcutaneous route.

Prova de Toxidade, em Laboratório, de Vacinas Antitíficas Experimentadas no Campo (Resumo)

Os autores descrevem uma prova de laboratório para medir a toxidade de duas vacinas antitíficas, a vacina K (inativada por acetona) e a vacina L (inativada por fenol e calor), ambas grandemente utilizadas em campanhas de vacinação em massa. O princípio do método é registrar e comparar as modificações de peso, em função do produto empregado, mediante a vacinação de animais de laboratório.

Vários grupos de camundongos receberam, por via intraperitoneal, uma dose única, variável segundo os lotes de animais, de vacina K ou de vacina L. Os grupos de controle receberam uma injeção de soro fisiológico, com ou sem adição de fenol; outros camundongos, enfim, não receberam tratamento algum. Todos os animais foram pesados regularmente nos dias anteriores à injeção e quotidianamente durante os cinco dias seguintes. Foram tomadas tôdas as precauções no sentido de reduzir ao mínimo a possibilidade de erro em consequência das manipulações e das pesagens sucessivas.

As vacinas, administradas em doses pequenas, não produziram alteração alguma do ritmo de crescimento. As doses maiores (625×10^6 germes) provocaram uma diminuição sensível de peso, imediatamente após a vacinação; em se-

guida, a taxa de crescimento readquiriu valor normal. Com as doses intermediárias, a diferença de toxidade das duas vacinas revelou-se claramente: a perda de peso nas 24 horas seguintes à vacinação foi, de maneira significativa, nitidamente mais acentuada com a vacina L do que com a vacina K. O aumento de peso, normal após a injeção de soro fisiológico, baixou com a injeção de solução salina com fenol. A determinação das curvas de toxidade de cada vacina permite ilustrar as diferenças entre as duas preparações: as doses pequenas não afetam quase nada os animais de laboratório e as doses muito grandes têm uma toxidade máxima idêntica para as duas vacinas; em compensação, nas doses intermediárias, o efeito tóxico muito mais elevado da vacina L, medido pela perda de peso nas 24 horas seguintes à injeção, é manifesto.

Essas pesquisas confirmam certas observações feitas no decorrer das campanhas de vacinação: a vacina L traz, com efeito, complicações pós-vacinais mais freqüentes e mais graves que a vacina K. Poderão servir também para ajudar a compreender melhor as relações existentes entre a toxidade das diferentes vacinas e seu poder de imunização, na medida em que é possível avaliá-lo pelas provas de proteção ativa

com camundongos. Seria, aliás, indicado recorrer a esse método para estudar a toxidade relativa

das vacinas antitíficas após a imunização de animais de laboratório por via subcutânea.

Épreuve de Laboratoire de la Toxicité de Deux Vaccines Antityphoïdiques Utilisées au Cours de Campagnes de Vaccination (Résumé)

Les auteurs décrivent une épreuve de laboratoire pour la mesure de la toxicité respective de deux vaccins antityphoïdiques, le vaccin K (inactivé par l'acétone) et le vaccin L (inactivé par le phénol et la chaleur), préparations largement utilisées au cours des campagnes de vaccination de masse. Le principe de la méthode est d'enregistrer et de comparer les modifications de poids, en fonction du produit employé, qu'entraîne la vaccination d'animaux de laboratoire.

Des groupes de souris ont reçu, par voie intrapéritonéale, une dose unique, variable suivant les lots d'animaux, de vaccin K ou de vaccin L. Des groupes témoins ont reçu une injection de liquide physiologique, additionné ou non de phénol; d'autres souris enfin n'ont reçu aucun traitement. Tous les animaux ont été pesés régulièrement dans les jours précédant l'injection et quotidiennement dans les cinq jours qui lui ont succédé. Toutes précautions ont été prises afin de réduire au minimum les causes d'erreur dues aux manipulations et aux pesées successives.

Les vaccins, administrés à faibles doses, n'ont déterminé aucune altération du rythme de croissance. Les doses fortes (625×10^6 germes) ont provoqué une chute de poids notable immédiatement après la vaccination; par la suite, le taux de croissance a repris une valeur normale. Avec les doses intermédiaires, la différence de toxicité des deux vaccins est apparue nettement:

la perte de poids dans les 24 heures suivant la vaccination a été, de manière significative, nettement plus accusée avec le vaccin L qu'avec le vaccin K. Le gain de poids, normal après l'injection de liquide physiologique, a baissé lors de l'injection de solution saline additionnée de phénol. L'établissement des courbes de toxicité de chaque vaccin permet d'illustrer les différences entre les deux préparations: les doses faibles n'affectent quasiment pas les animaux d'expérience, et les doses très fortes ont une toxicité maximale identique pour les deux vaccins; en revanche, pour les doses intermédiaires, l'effet toxique beaucoup plus élevé du vaccin L, mesuré par la perte de poids dans les 24 heures suivant l'injection, est manifeste.

L'intérêt de ces recherches est de confirmer certaines observations faites au cours des campagnes de vaccination: le vaccin L entraîne en effet des complications postvaccinales plus fréquentes et plus sérieuses que le vaccin K. Elles pourraient également aider à mieux comprendre les relations existant entre la toxicité des différents vaccins et la valeur de leur pouvoir immunogène tel qu'il peut être évalué par les épreuves de protection active chez la souris. Il serait par ailleurs indiqué de recourir à cette méthode pour étudier la toxicité relative des vaccins antityphoïdiques après immunisation des animaux d'épreuve par voie sous-cutanée.

NOTAS EPIDEMIOLOGICAS: FIEBRE AMARILLA SELVATICA EN BOLIVIA.—Los últimos informes de casos humanos de fiebre amarilla en Bolivia incluyen sólo los casos letales. Han ocurrido 28 defunciones hasta el 25 de abril; no se dispone todavía del número de casos no letales para algunas de las zonas afectadas. (Tomado de: *Informe Epidemiológico Semanal*, 38(19), 11 de mayo de 1966.)