

Toxicidad de VA-DIFTET[®] por administración a dosis repetida en ratones

Juan F. Infante¹, Sergio Sifontes², Pablo González¹, Enrique Muñoz¹, Anait Martínez¹, Mildrey Fariñas¹, Reynaldo Oliva¹, Osmany Marrero².

¹ Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: jinfante@finlay.edu.cu

² Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, Cuba.

Una vez estudiada la toxicidad de la vacuna VA-DIFTET[®] (vacuna antidiftérica antitetánica) por administración a dosis única en dos especies de animales, se impone la evaluación a dosis repetida, teniendo en cuenta que el esquema de inmunización en humanos prevé la aplicación de tres dosis cuando el componente pertusis de la DPT está contraindicado. Se emplearon 210 ratones OF-1 de ambos sexos. Los grupos experimentales fueron similares a los de la prueba a dosis única con la vacuna dúplex, anatoxina diftérica, anatoxina tetánica, adyuvante, tiomersal, solución salina fisiológica y un grupo control no tratado. Un grupo de hembras y otro de machos fue asignado aleatoriamente a cada tratamiento y para recibir 1, 2 ó 3 dosis por vía intramuscular. Tras cada aplicación se evaluó la aparición de síntomas clínicos, el incremento de peso, el consumo de agua y alimento y la dinámica de la respuesta inmune contra las anatoxinas tetánica y diftérica, específicamente de tipo IgG, mediante ELISA indirecto. Al término de las observaciones los animales fueron sacrificados y se realizaron estudios anatomopatológicos. Además, durante el sacrificio se evaluó el índice relativo de bazo y timo, así como la relación bazo/timo. No se comprobaron alteraciones que evidenciaran toxicidad por parte de la vacuna y sus componentes. Asimismo, se demostró una marcada respuesta inmune en los grupos vacunales e inoculados con las anatoxinas. Se considera que los resultados de la prueba fueron satisfactorios.

Palabras claves: Toxicidad, VA-DIFTET, dosis repetida, ratón

Introducción

La vacunación contra la difteria ha sido una de las campañas mejor logradas y más efectivas contra las enfermedades infecciosas. La enfermedad ha desaparecido casi totalmente de los países en los cuales se ha realizado una inmunización adecuada (1,2). Existen algunos casos de enfermedad, en la mayoría de los individuos que no recibieron el ciclo de inmunización completo durante la infancia o no recibieron la dosis de refuerzo. La introducción de la vacunación no sólo ha eliminado la enfermedad sino también la circulación de la cepa toxigénica *Corynebacterium diphtheriae* (2-4).

El ciclo de vacunación incluye tres dosis por vía intramuscular con un intervalo de ocho semanas entre ellas; la tercera dosis se inocula de 6 a 12 meses después de la segunda (5-8). Títulos superiores o iguales a 0,01UI/mL se consideran adecuados para proteger contra la infección de una cepa toxigénica de *Corynebacterium diphtheriae*, los cuales se mantienen por cinco ó más años en la sangre después de la vacunación primaria, luego suele aplicarse otra dosis de

refuerzo cada 10 años, la cual estimula la producción de altos niveles de antitoxina y una larga inmunidad (9).

En la difteria, la inmunidad depende del contenido de antitoxina en la sangre. La antitoxina formada como resultado de la inmunización activa con la anatoxina contiene anticuerpos de clase IgG e IgA (10). No obstante, no debe excluirse el papel que desempeña en la inmunidad el complejo antibacteriano, el cual está relacionado con la fagocitosis y la presencia de opsoninas, aglutininas, precipitinas y anticuerpos fijadores del complemento. En la difteria la inmunidad tiene un carácter antifeccioso (antitóxico y antibacteriano).

Las reacciones adversas a la vacunación con difteria han sido reportadas (4). Debido a que la anatoxina diftérica siempre es administrada en combinación con anatoxina tetánica y pertusis se hace difícil identificar el componente responsable de los efectos colaterales. Las reacciones observadas del tipo anafiláctico pueden ser inmediatas, mediadas por IgE, así como reacciones retardadas, presumiblemente mediadas por la inmunidad de células T. Pueden ocurrir reacciones

inflamatorias locales del tipo Arthus, de 5 a 7 días después de la dosis de refuerzo, causadas probablemente por las altas dosis de anticuerpos antitoxina circulantes, que forman agregados inmunes y fijan el complemento.

El problema de si las reacciones adversas observadas con la vacunación, son debido a la inmunidad contra las toxinas o a la inmunidad contra la alta proporción de contaminantes (30-40%) que están presentes en las vacunas convencionales no ha sido totalmente resuelto. Aunque muchos estudios parecen indicar que las anatoxinas purificadas también inducen algunos efectos colaterales no deseados, la mayoría de estos estudios se han realizado con anatoxinas que han sido purificadas después del tratamiento con formaldehído y por tanto contienen muchos contaminantes asociados con la anatoxina (11, 12). En la actualidad existe un consenso generalizado de criterios que sustentan que muchas de las reacciones no deseadas son debido a las impurezas presentes en las vacunas y que la destoxificación de toxinas previamente purificadas deben reducir grandemente la frecuencia de efectos secundarios. Si fueran usadas toxinas altamente purificadas para la vacuna antidiftérica, los únicos efectos adversos que pudieran esperarse, serían reacciones del tipo Arthus a partir de la existencia de altos títulos de anticuerpos circulantes. Estas reacciones pueden ser fácilmente evitadas mediante un distanciamiento adecuado de las dosis de refuerzo (13).

Por la importancia de contar con una vacuna altamente purificada contra el tétanos y la difteria, que disminuya los efectos adversos producidos por las vacunas convencionales se hace necesario que las evaluaciones toxicológicas sean cada día más exigentes. Las pruebas toxicológicas específicas como la evaluación de la potencia de las toxinas, la toxicidad residual de las anatoxinas, el incremento de peso y la reversión a la toxicidad (14,15) no se consideran suficientes y las oficinas de registro solicitan evaluaciones toxicológicas más profundas (16).

Los adyuvantes han sido usados para potenciar la respuesta inmune de los antígenos, disminuyendo la dosis de las anatoxinas en las vacunas (17). Los compuestos de aluminio como el fosfato y el hidróxido son los más recomendados. En algunas ocasiones la dosis de adyuvante requerida para obtener una eficacia adecuada es tan alta que los principales efectos adversos de la vacuna dependen del adyuvante (18).

Materiales y Métodos

Se emplearon 210 ratones OF-1, machos y hembras, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). Estos fueron identificados, seleccionados e incluidos aleatoriamente en grupos experimentales de cinco animales que se alojaron en cajas de macrolón tipo II con camada de bagazo de caña esterilizada. Las condiciones sanitarias fueron convencionales, controlando la temperatura y la humedad relativa en el rango óptimo para esta especie (19). Se les suministró como alimento pienso especializado para ratones, procedente del CENPALAB, y agua potable acidulada, de forma controlada y en cantidades suficientes para permitir su ingestión *ad libitum*.

Se prepararon formulaciones de los componentes de la vacuna, disolviendo cada uno en solución salina fisiológica a una concentración equivalente a la de la vacuna dúplex (Vd):

Anatoxina diftérica (Td)	25 Lf
Anatoxina tetánica (Tt)	10 Lf
Gel de hidróxido de aluminio (Ady)	500 mg
Tiomersal (Tiom)	50 mg
Solución salina fisiológica (SSF)	0,05 mL csp:

Los productos fueron administrados por vía intramuscular (IM) en tres dosis. Para la primera dosis se tomaron 15 ratones machos e igual cantidad de hembras por cada grupo experimental. A los 42 días se les inoculó una segunda dosis a 10 ratones de cada sexo y la tercera dosis a los 84 días a cinco ratones de cada sexo por grupo experimental. Los volúmenes aplicados fueron los máximos permisibles para esta especie (0,05 mL por vía IM). Se usó la vía IM por ser la que se recomienda en el humano (20). Se incluyeron grupos controles que no recibieron ningún tratamiento y otro grupo al que se les administró la vacuna dúplex.

Los animales fueron observados dos veces al día durante los 14 días posteriores a cada inoculación y luego una vez al día. El peso corporal se previó individualmente antes, 3 y 42 días después de cada dosis. Se determinó el incremento de peso en intervalos 0-3, 3-42 y 0-42 días. Se registró diariamente el consumo de agua durante los 7 días posteriores a cada dosis y se calculó el consumo promedio de agua por animal. De modo similar se evaluó el consumo de alimentos.

Se fijó el título de anticuerpos antes de cada aplicación y a los 42 días después de la última. Para ello se tomaron muestras de sangre para cuantificar IgG por un ELISA indirecto (21), utilizando como recubrimiento el complejo anatoxina tetánica o diftérica respectivamente y un conjugado anti IgG de ratón fosfatasa alcalina obtenido en nuestro laboratorio.

El sacrificio se realizó 42 días después de la última dosis por un método indoloro (sobredosis de Ketalar, según establece la comisión de ética institucional). Al sacrificar los animales se determinó el peso corporal y el peso de bazo y timo para calcular sus índices relativos así como la relación bazo/timo. También se realizaron estudios macroscópicos y microscópicos al 100% y 25% de los animales respectivamente. Las muestras fueron fijadas en formol neutro al 10%, incluidas en parafina y coloreadas con hematoxilina-eosina.

Los datos fueron comparados por un análisis de varianza de clasificación doble y la prueba de Tukey. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de $P < 0,05$.

Resultados

Los animales no mostraron síntomas clínicos durante los días posteriores a las inoculaciones. Sin embargo, los machos, debido a las reiteradas luchas entre ellos, presentaron lesiones cutáneas en las regiones perianal, escrotal, prepucial y en la piel del dorso, las que en muchos casos llegaron a infectarse convirtiéndose en procesos dermatológicos severos.

Al analizar la ganancia de peso vivo en virtud de las medias generales, no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$) entre los grupos experimentales luego de aplicada la primera dosis. Todos los grupos mostraron incremento de peso vivo durante las primeras 72 h. Los machos aumentaron de peso más que las hembras ($P < 0,01$). Hubo una interacción significativa ($P < 0,05$) entre los factores sexo y tratamiento durante las primeras 72 h. Después de la segunda dosis todos los animales incrementaron su peso corporal. No obstante, se observó que existían diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los grupos tratados y el control, registrándose un mayor aumento de peso vivo en los grupos controles con respecto al resto de los grupos tratados durante las primeras 72 h. Sin embargo durante el resto del periodo evaluado hasta el sacrificio, el comportamiento de todos los grupos fue similar ($P > 0,05$). La tercera dosis no arrojó diferencias estadísticas significativas entre los grupos tratados y el control.

La variable consumo de agua luego de aplicada la primera dosis, mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre el control y los grupos tratados con anatoxina tetánica pertenecientes a ambos sexos y también se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los machos controles y los inoculados con adyuvante. El grupo tratado con la vacuna se comportó de forma similar al control en las tres dosis. En todos los grupos los machos consumieron más que las hembras. No se observó interacción significativa entre el efecto de los diferentes tratamientos y los sexos (Tabla 1).

Tabla 1. Consumo medio diario de agua durante 7 días después de la primera dosis

Tratamientos	Valores medios (mL)					
	Machos	Tukey	Hembras	Tukey	Ambos sexos	Tukey
1. Vacuna dúplex	5,9		4,9		5,4	
2. Anatoxina diftérica	6,2		4,7		5,5	
3. Anatoxina tetánica	5,8	7-4**	4,4	NS	5,1	7-4**
4. Adyuvante	5,6		4,9		5,3	7-3**
5. Tiomersal	6,1		5,1		5,6	
6. Solución salina	6,2		4,3		5,2	
7. Control	6,9		5,3		6,1	
Media General	6,1 ^a		4,8 ^b	ab: **		Interacción: NS

** $P < 0,01$

Después de la primera dosis el consumo diario de alimento en el grupo control fue similar al resto de los grupos. Sólo los machos tratados con tiomersal y las hembras con solución salina fisiológica mostraron

consumos estadísticamente inferiores ($P < 0,01$) al de los controles; sin embargo, las diferencias encontradas carecen de importancia desde el punto de vista biológico (0,3-0,6 g). Luego de la segunda y tercera

dosis el consumo de alimento fue similar ($P > 0,05$) en todos los grupos experimentales. En general los machos consumieron más ($P < 0,01$) que las hembras. Se observó una interacción significativa ($P < 0,01$)

entre los factores tratamiento y sexo con relación al consumo de alimento después de la primera y tercera dosis (Tabla 2).

Tabla 2. Consumo medio diario de alimento durante 7 días después de la primera dosis

Tratamientos	Valores medios (g)			
	Machos	Tukey	Hembras	Tukey
1. Vacuna dúplex	6,1		4,9	
2. Anatoxina diftérica	6,0		4,8	
3. Anatoxina tetánica	6,2	6-5**	4,9	7-6**
4. Adyuvante	6,4	7-5**	5,0	
5. Tiomersal	5,9		5,0	
6. Solución salina	6,5		4,7	
7. Control	6,5		5,2	
Media General	6,2 ^a		4,9 ^b	ab: **

** $P < 0,01$

La variable índice relativo de bazo (IRB) no mostró diferencias entre los grupos de hembras tratadas y el control. En los machos, solo aquellos tratados con tiomersal, mostraron un aumento significativo ($P < 0,05$) con respecto a los controles en la primera dosis aplicada.

El índice relativo del Timo (IRT) no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) en ningún caso. Los valores del IRT en las hembras fueron mayores que en los machos ($P < 0,01$). La respuesta a los tratamientos fue similar para ambos sexos ($P > 0,05$).

En la relación bazo/timo se observaron diferencias en el grupo tratado con tiomersal con respecto al resto de los grupos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas ($P > 0,05$) con respecto al control. La relación bazo/timo fue mayor en los machos que en las hembras ($P < 0,01$). Hubo una interacción significativa entre los factores tras la primera dosis.

Los estudios serológicos mostraron un incremento progresivo de la respuesta de tipo IgG específica contra anatoxina diftérica y anatoxina tetánica en el grupo vacuna y en el tratado con la anatoxina correspondiente. Se alcanzaron títulos significativamente mayores ($P < 0,01$) a los de los controles desde la primera inmunización. El comportamiento de los grupos vacunados y de los tratados con las anatoxinas correspondientes fue similar; así como la respuesta de hembras y machos.

En el estudio anatomopatológico macroscópico se observaron aumentos considerables del bazo en los machos, llegando hasta esplenomegalias en algunos casos. En las hembras no aparecieron lesiones de importancia.

En los estudios histopatológicos se observaron en las hembras leves procesos de degeneración de los hepatocitos (turbia y vacuolar) con similar frecuencia en los diferentes grupos. En algunos casos se encontraron procesos granulomatosos macrófagos en el punto de inoculación. Se corroboraron las lesiones macroscópicas encontradas en los machos.

Discusión

No se observaron síntomas típicos del tétanos en los ratones tales como piloerección, agrupamiento, ataxia, convulsiones, posturas anormales, emprostótonos y opistótonos, lo cual es un indicador de la inocuidad de la anatoxina tetánica (22) así como tampoco se observó necrosis e inflamación directa de las mucosas o la piel como manifestaciones de una intoxicación diftérica (23). Las lesiones cutáneas observadas en los machos mostraron similar frecuencia en los diferentes grupos experimentales, incluyendo el control, lo que evidencia su falta de relación con los productos evaluados (24).

El hecho de no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas en la variable peso vivo entre los tratamientos aplicados y con relación al control para la primera dosis, sugiere que los productos

evaluados poseen baja toxicidad. Ensayos similares realizados en ratones utilizando las mismas formulaciones a dosis única y un diseño experimental homólogo, evidenciaron diferencias entre los tratamientos, no obstante, estas no fueron indicativas de toxicidad ya que los menores incrementos se observaron en los grupos tratados con los productos supuestamente menos tóxicos (25). El comportamiento de los grupos tratados con respecto al control en las primeras 72 h de aplicada la segunda dosis, se pudiera atribuir al estrés a que están sometidos debido a su manipulación. Los resultados coinciden con la prueba de inocuidad inespecífica realizada en ratones a varios lotes de VA-DIFTET® y sus componentes, teniendo en cuenta que estos aumentaron de peso en el período evaluado y no mostraron signos de toxicidad.

Las variables consumo de agua y alimento tuvieron un comportamiento similar durante todo el experimento, manteniéndose los valores medios dentro del rango fisiológico reportado para esta especie y categoría (19). El mayor consumo de alimento y agua por parte de los machos debe estar determinado por las diferencias fisiológicas que existen entre los sexos (26, 27).

Las diferencias encontradas en el índice relativo del bazo pudieran estar relacionadas con las erosiones en la piel, que con mayor gravedad se observan en los machos tratados con tiomersal a consecuencia de riñas entre ellos y que en la mayor parte de los casos se presentaron infectadas. De esta manera consideramos lógica la respuesta del bazo con una significativa esplenitis ante procesos supurativos prolongados y

graves como los observados. Este aumento del bazo en los machos coincide con el observado en los estudios macroscópicos (28).

El comportamiento del índice relativo del timo evidencia la marcada respuesta inmune desencadenada por los ratones a las anatoxinas tetánica y diftérica en los grupos tratados con vacuna y con cada anatoxina respectivamente (29).

El elevado valor de la relación bazo/timo en los machos tratados con una dosis de tiomersal era de esperarse según los altos IRB encontrados en este grupo experimental en comparación con el resto.

El incremento progresivo de la respuesta serológica de tipo IgG específica contra Tt y Td en el grupo vacuna así como en cada uno de los grupos tratados con la anatoxina correspondiente, evidenció una marcada respuesta inmune en los grupos vacunales e inoculados con las anatoxinas, lo que demuestra la efectividad de la vacuna a dosis repetida en esta especie, constituyendo una evidencia preclínica de gran valor.

Las lesiones degenerativas turbia y vacuolar leve a nivel de los hepatocitos observadas en los estudios microscópicos pueden tener relación con la dieta, rica en grasas y carbohidratos, conocidos como elementos altamente energéticos (30). Los procesos granulomatosos observados en algunos casos se piensa que sean causa del adyuvante de depósito, como se ha descrito en otras vacunas que emplean el gel de hidróxido de aluminio como adyuvante (31).

Referencias

1. Robins JB & Schneerson R. Polysaccharide-protein conjugate: A new generation of vaccines. *J. Infect. Dis.* 1990; 161:821-32.
2. Gupta RK.& Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine.* 1995; 13:1263-76.
3. Pappenheimer AM. and Sherwood LH. Immunization of adults with diphtheria toxoid. III. Highly purified toxoid as an immunizing agent. *Am. J. Hyg.* 1984; 47:241.
4. Pappenheimer AM. Jr. Diphtheria. En: Germanier R, ed. *Bacterial Vaccines.* New York: Academic Press; 1984:37.
5. Mortimer, E.A. and Plotkin. Diphtheria toxoid. *Vaccines.* 1988:31-43.
6. Deugrove J., Lee E.J. Heiner D.C., et al. IgG and subclass specific antibody responses to diphtheria and tetanus toxoids in newborns and infants given DTP immunization. *Pediatr. Res.* 1986; 20:735-9.
7. Berubaum JC., Daft A. Anolik R., et al. Response of preterm infants to diphtheria and tetanus toxoids vaccine. Clinical and immunological response when administered as the primary series. *J. Pediatr. Infect. Dis.* 1986; 5:428-30.
8. Galazka A. Diphtheria vaccine and immunization. WHO/UNICEF Satellite Meeting on diphtheria control in European countries. Ankara, Turkey, 31 Jan-1 Feb. 1995.
9. Baró M. y col. Vacuna dúplex. Estudio de la reactogenicidad e inmunología de las preparaciones importadas y cubanas (con diferentes dosis de anatoxinas). *Revista Cubana de Farmacia.* 1991; 25(2):106-114.
10. Olson, J.C. Use of synthetic peptides and site-specific antibodies to localize a diphtheria toxin. Sequence associated with ADP-ribosiltransferasa activity. *J. Bacteriol.* 1993; 175:898-901.

11. Gupta R.K. Pharmacological studies of PRP *Haemophilus influenzae type b* – diphtheric toxoid conjugate in Guinea pigs. *Biologicals*. 1987; 13: 49-55.
12. OPS. Casos notificados de enfermedades del PAI. Boletín informativo PAI. 1992; 1:1-8.
13. Rappuoli R. New and improved vaccines against Diphtheria and Tetanus. En: G.C. (ed). *New generation vaccines*. New York: Marcel Dekker; 1990:251-268.
14. Food and Drug Administration. HHS. Additional standards for bacterial products. Pertussis vaccine. 1987:67-8.
15. Chuprinina R.P., Bychenko B.D., Simirnov V.D. Development the pertussis vaccine of a new generation. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 1990; 10:89-94.
16. Ministerio de Salud Pública de la República de Cuba. *Regulaciones metodológicas para la evaluación preclínica de medicamentos*. Ciudad de La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 1993:2-4.
17. Gupta R.K., and Siber R.G. Adjuvants for human vaccines current status, problems and future prospects. *Vaccine*. 1995;13:1263-76.
18. Stewart-Tull, D.E.S. *The Theory and practical application of adjuvants*. Chichwter: John Wiley and Sons Ltd.; 1994.
19. Canadian Council on Animal Care. *Guide to the Care and Use of Experimental Animals*. Vol 1, Ottawa, Ontario, 1980:84.
20. Norton S. Methods in Behavioral Toxicology. En Wallace AH eds. *Principles and Methods of Toxicology*. New York: Ed Raven Press; 1982:353-375.
21. Maughi A.M., Pasetti F.M. and et al. Development of an alternative method for testing the immunogenicity of diphtheria vaccines. *Vaccine*. 1995:13.
22. Maninger-Mocsy. *Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos*. Tomo I: *Enfermedades infecciosas*. Ciudad de La Habana: Instituto Cubano del Libro., Ed. Revolucionaria. 1970:27-31.
23. Piakin K and Krivoshein Yu. *Corynebacterium*: Agente etiológico de la difteria. En: *Microbiología*. 1989:389-397.
24. Cook MJ. Anatomy. *The mouse in biomedical research*. Vol III, New York: Academic Press; 983:112-9.
25. Infante JF, Sifontes S, Pérez Ramírez P, Gonzáles P. Toxicología de VA-DIFTET por aplicación a dosis única en ratones. *Revista Española de Toxicología*. 1998; 15(2):59-63.
26. Loomis T. *Influencia de la vía de administración sobre la toxicidad*. *Fundamentos de la toxicología*, cap. 5. Zaragoza: Ed. Acribia;. 1983:97-98.
27. Sotolongo M. *Metabolismo y excreción de los compuestos extraños*. En: *Elementos de toxicología* cap.3. Ed. Pueblo y Educación; 1987:11-21.
28. Peña JM. Distribución de las células inmunocompetentes. *Organos linfoides primario y secundario*. *Inmunología. Bases moleculares y celulares*. Madrid: Edición Pirámide; 1994:69-74.
29. Roitt I. *La respuesta inmune*. *Inmunología esencial*. Cuba: Edición revolucionaria; 1982.
30. Noa M, Walker D. Hallazgos morfológicos en dos variedades de ratas alimentadas con dietas hipercolesterolémicas. *Revista Cubana de Ciencias Veterinarias*. 1990; 21:57-9.
31. Infante JF., Sierra GG., Campa HC., Muñoz CE., Pérez AV. Evaluación anatomopatológica y serológica en ratones Balb/c inoculados con VA-MENGOC-BC® vía intramuscular. *VacchiMonitor*. 1997; (9):10-13.

VA-DIFTET toxicity after repeated dosing in mice

Abstract

Considering that the expected immunization schedule for man includes three doses of VA-DIFTET, once demonstrated that this vaccine is safe for two animal species, the study of its toxicity by repeated dosing in mice was imperative, taking into account that in humans a three-dose schedule is used when the pertussis component is contraindicated. Two-hundred and ten OF1 mice of both sexes were used. Experimental groups were similar to those used in the single-dose toxicity study: duplex vaccine, diphtheria toxoid, tetanus toxoid, adjuvant, thiomersal, physiologic saline solution), and a non-treated control group. One group of male and another of female mice were randomly assigned to each treatment to receive 1, 2 or 3 intramuscular doses. Clinical symptoms, body weight increase, water and food intakes and the antibody titers (IgG by indirect ELISA) against the tetanus and diphtheria toxoids were evaluated after each administration. Finally, all mice were sacrificed and anatomopathological studies performed. The relative indexes of spleen and thymus and the spleen/thymus rate were also studied post-mortem. No evidence of toxicity was observed; however, those mice inoculated with the vaccine or the toxoids showed a significant immune response. Final results were considered satisfactory.

Key words: Toxicity, VA-DIFTET, repeated dosing, mouse