

A IMUNIDADE NA FEBRE TIFÓIDE.  
I. A VACINAÇÃO ANTI-TIFOÍDICA DE WRIGHT, 1896 A 1979

ARLETE MOREIRA MILHOMEM\*  
ITALO SUASSUNA\*\*

*A presente revisão aborda a literatura disponível sobre a vacinação anti-tifoídica.*

*Sentiu-se desde o início a falta de um modelo experimental adequado para avaliar a potência da vacina e somente dados incompletos e parciais foram obtidos de modelos humanos e animais em relação aos mecanismos imunológicos básicos da resposta à vacinação. Por esta razão um grande número de diferentes métodos foram propostos e usados, fornecendo variações em vários aspectos, tais como:*

- a) tipo de amostra bacteriana utilizada no preparo da vacina;*
- b) métodos de preparo (germes mortos por aquecimento e adição de preservativo, por éter, álcool, acetona, lisados bacterianos, germes vivos atenuados, etc.);*
- c) composição da vacina;*
- d) vias de inoculação (intradérmica, subcutânea, oral, etc.);*
- e) variação do número de microrganismos;*
- d) variação na dose e/ou intervalo entre as doses.*

*Muitos ensaios de campo não foram conclusivos. Foi considerado que estes ensaios iniciais não tiveram controles adequados os quais foram introduzidos posteriormente em ensaios bem planejados, e patrocinados pela Organização Mundial da Saúde em várias partes do mundo (Iugoslávia, Polônia, União Soviética, Índia e Condado de Tonga).*

*Os dados disponíveis de tais ensaios permitiram as seguintes conclusões:*

- a) a vacina inativada por etanol foi de pouco ou nenhum valor profilático;*
- b) algumas vacinas inativadas ofereceram significativa proteção;*

---

\*Trabalho do Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ. Parte de tese para obtenção do título de Doutor com auxílio do CNPq, CAPES e FINEP.

\*\*Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Av. 28 de Setembro, 87 – 20551 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

c) a vacina inativada por acetona é mais eficaz;

d) não há proteção para as *S. paratyphi A* e *B* nas doses empregadas na TAB. Quando empregada a *S. paratyphi B* em doses maiores, esta proteção é obtida;

e) os testes em animais de laboratórios não podem ser completamente correlacionados com a efetividade no homem bem como o título de anticorpos para os antígenos H, O e Vi;

f) uma dose (0,5 a 1 ml de uma suspensão contendo  $10^9$  bactérias por ml) da vacina inativada por acetona dá razoável proteção por um curto período, enquanto duas doses (intervalo de 4 semanas) dão maior proteção e por tempo mais longo;

g) a proteção oferecida pela vacinação é maior nos jovens que nos adultos;

h) a vacina oral inativada (*Typhoral*) não oferece proteção mesmo em doses elevadas.

Algumas experiências com animais (camundongos, chimpanzés) e voluntários humanos indicaram que uma melhor proteção foi obtida com vacinas vivas atenuadas. Contudo em tais experiências houve persistência tanto da amostra vacinante como da amostra desafio e ainda uma relação significativa entre a amostra da vacina rugosa utilizada para imunização e lesões renais abacterianas de natureza desconhecida.

A febre tifóide constituiu um sério problema de saúde no final do século passado e nas primeiras décadas deste século quando surtos epidêmicos eram frequentes.

Um rápido declínio de sua incidência não pode ser atribuído a programas de vacinação, mas antes a melhorias de condições sanitárias e médico-sociais.

Em países onde estas condições são satisfatórias, a incidência desta enfermidade é muito pequena e raramente ocorrem surtos epidêmicos, o que a torna de pouca importância do ponto de vista epidemiológico.

Um outro fator que modificou o objetivo da vacinação foi a eficácia do tratamento quimioterápico.

Estes fatos, entretanto, não relegaram o problema da vacinação a um interesse apenas acadêmico, uma vez que mesmo em países altamente higienizados, distúrbios da ordem social como guerras ou catástrofes são quase sempre seguidos de epidemias (Spaun, 1957).

Atualmente um aumento de incidência de febre tifóide tem sido descrita em países de elevado padrão higiênico (Rice, Baine & Gangarosa, 1977) bem como a resistência da *Salmonella typhi* a antibióticos de uso tradicional, como o cloranfenicol (Manten et al, 1971). Surtos epidêmicos graves têm ocorrido nos últimos anos no Sudeste Asiático, bem como no Continente Americano, provocados por amostras de *S. typhi* resistentes a antibióticos correntemente utilizados no tratamento desta doença (Dimache et al, 1977).

O interesse dos investigadores sobre o uso de vacinas como agente profilático no combate às salmoneloses sistêmicas e em particular, à febre tifóide, data do século passado e até o presente as tentativas no sentido de definir os mecanismos de virulência da *S. typhi* ou isolar um antígeno protetor, não tiveram sucesso.

Apesar de poder ser controlada, por medidas sanitárias, a vacinação é, até o presente, utilizada em áreas endêmicas e para alguns investigadores ela deveria ser empregada juntamente com medidas sanitárias adequadas (Cvjetanović, Grab & Uemura, 1971).

As vacinas utilizadas no momento não diferem muito das utilizadas pelos introdutores da vacinação; no entanto, a mais abrangente das revisões disponíveis anteriormente,

é devida a Siler e colaboradores, e data de 1941 (Research Laboratories of the Army Medical School, 1941).

#### DADOS LABORATORIAIS E/OU DE CAMPO SOBRE A EFICÁCIA DA VACINAÇÃO ANTI-TIFOÍDICA

O emprego de vacinas anti-tifoídicas foi proposto quase que simultaneamente por Wright (1896) e Pfeiffer & Kolle (1896a). A medida da eficácia da vacina fundamentou-se em dois métodos. Um deles consistia na pesquisa em laboratório, de propriedades bactericidas ou imunizantes no soro de animais ou indivíduos vacinados, enquanto o outro fundamentou-se em dados estatísticos sobre a diferença de mortalidade e de morbidade por febre tifóide entre indivíduos vacinados e não vacinados.

Pfeiffer & Kolle (1896b) observaram que os soros de pacientes convalescentes, bem como os de cabra, cobaias e do homem, vacinados, tinham efeito protetor na peritonite desenvolvida em cobaia pelo bacilo tífico. Os mesmos disseram: “pelo que conhecemos sobre imunidade em febre tifóide, o mais provável é que substâncias bactericidas específicas no sangue do homem com febre tifóide sejam as causas mais aparentes responsáveis pela cura da doença, e se isto é verdade, nós esperamos que nossas injeções profiláticas com germes mortos, levem a uma imunidade do mesmo grau e duração daquela obtida após a cura natural da doença”.

Netter (1906a), ao analisar os trabalhos de Wright, comenta que embora este investigador e seus colaboradores tenham demonstrado o aparecimento de substâncias bactericidas, aglutinantes e opsonizantes no soro de indivíduos vacinados, seus trabalhos se basearam em dados estatísticos. De acordo com Netter (1906b) entre 1896 a 1904 eles realizaram mais de cem mil inoculações em tropas britânicas na Índia, Egito, Chipre e África do Sul, enquanto que na Alemanha, França, Áustria e outros países, as pesquisas estavam confinadas a experiências laboratoriais.

Estas últimas experiências estavam baseadas na pesquisa de aglutininas, opsoninas e outras substâncias bactericidas no soro de animais ou do homem vacinado, e visavam ao desenvolvimento de uma vacina menos tóxica e mais eficaz que a empregada por seus introdutores. Desta maneira, já em 1906 (Apud Netter, 1906a) numerosas modificações na vacinação anti-tifoídica haviam sido propostas. Entre elas: a) variação na dose e/ou intervalo entre as doses; b) vias de inoculação (intradérmica, subcutânea, intramuscular, endovenosa, oral, intraperitoneal); c) métodos de inativação do germe (temperaturas variadas, emprego de agentes químicos como formol e éter); d) emprego de filtrados ou lisados bacterianos obtidos por diversos métodos; e) emprego de germes vivos tratados com imunossoros e, finalmente, o emprego de imunossoro animal na prevenção ou tratamento da doença.

#### *Tipos de vacinas*

O método de preparação da vacina empregada por Wright (1896) e seus colaboradores (Apud Leishman, 1910) consistia em obter uma suspensão de uma amostra de *S. typhi* não muito virulenta para cobaio, inativada a mais ou menos 60°C e adicionada de preservativo, sendo que esta apresentava, em relação à vacina de Pfeiffer & Kolle (1896a), pequenas variações quanto ao método de cultivo da amostra e inóculo empregado.

Os resultados favoráveis dos investigadores britânicos apresentados no “Great Britain Army Council Antityphoid Committee, 1912” constituíram a base mais importante para o moderno uso da vacina e durante quase meio século foram aceitos como evidência do valor profilático da vacina (Apud Spaun, 1957).

Ao lado de experiências que visavam ao desenvolvimento da vacina, eram realizadas pesquisas sobre a biologia do germe, encontrado na literatura com vários nomes,

tais como: *Bacillus typhosus*, *Bacterium typhosum*, *Eberthella typhosa* e finalmente *Salmonella typhi*.

Foi com a *S. typhi*, que Gruber & Durham (1896), quase que simultaneamente com Widal (1896), demonstraram o fenômeno da aglutinação bacteriana específica. Os primeiros investigadores propuseram a utilização do método para a identificação do bacilo enquanto Widal sugeriu seu emprego para o diagnóstico sorológico da febre tifóide.

A primeira etapa da análise antigênica deste germe teve início quando Joós (1902) demonstrou ser o bacilo constituído de dois antígenos. Um destes antígenos era destruído a 60-62°C, dava a aglutinação flocular e foi denominado posteriormente antígeno H. O outro, termoestável, dava aglutinação granular e constituía o antígeno do corpo bacteriano ou seja, o antígeno O.

Sem referência ao trabalho de Joós, quinze anos mais tarde, Weil, Felix & Mitzenmacher (1918) relataram que como no caso de *Proteus*, por eles estudado, havia evidências da presença de dois antígenos em *S. typhi*, deles derivando as designações de antígenos O e H.

Weil & Felix (1920) demonstraram que a imunização de coelhos com o bacilo aquecido a 100°C dava um imunossoro que reagia apenas com o antígeno O. Estes Autores utilizando testes de absorção encontraram uma identidade sorológica entre o antígeno O de *S. typhi* e o do bacilo de Gaertner, enquanto os seus antígenos H não apresentavam identidade.

Estas observações foram o início da elucidação da estrutura antigênica do gênero *Salmonella* e Weil & Felix (1920) propuseram, baseados nestes resultados, uma melhoria do teste de Widal pela análise dos dois tipos de anticorpos no soro de pacientes com febre tifóide.

Posteriormente, Felix (1924) afirmou que podia distinguir o soro de um indivíduo vacinado, em que apenas aglutininas anti-H eram observadas, do soro de um paciente com febre tifóide, em que os dois tipos de anticorpos estavam presentes. O Autor observou também, que no curso da doença, a concentração de anticorpos anti-H caía com o aumento da concentração de anti-O, e que a produção destes, algumas vezes, era pequena em casos severos da doença. Isto levou Felix a considerar que havia uma íntima relação entre o curso e a severidade da doença e a produção de anticorpos anti-O. Assinalou, também, que em virtude da falta de um modelo animal, os resultados em vinte anos de vacinação em forças armadas de diversos países eram baseados em dados estatísticos, com críticas frequentes e severas entre os autores. Segundo Felix, nenhuma influência houve favorável à vacinação, em vários países europeus, durante a primeira Grande Guerra. Tais fatos levaram o investigador a não acreditar no valor profilático das vacinas com germes mortos como eram administradas e a sugerir que no seu preparo deveria ser dada atenção especial ao teor de antígeno O. As observações de Felix & Olitzki (1926) de que anticorpos para este antígeno tinham atividade bactericida reforçou a idéia de que estes fossem considerados o fator mais importante nos mecanismos de imunidade na febre tifóide.

Outro fato que iria ter grande importância nos métodos de preparo da vacina foi a demonstração por Arkwright (1921), de formas rugosas, entre as bactérias patogênicas intestinais, incluindo a *S. typhi*. O Autor verificou que subculturas que aglutinavam em solução salina fisiológica, quando cultivadas em meio sólido davam colônias rugosas, ao contrário do que ocorria com culturas não aglutináveis, que davam colônias lisas. Colônias rugosas e lisas, simbolizadas pelas letras R e S, respectivamente, poderiam sofrer reversões por repiques sucessivos (R → S) ou por envelhecimento (S → R). Através de testes de aglutinação e absorção com imunossoros específicos, Arkwright (1921) demonstrou diferenças sorológicas entre elas.

Arkwright (1927) pôs em destaque a importância desta variação em relação à eficácia da vacina, quando, em experiência em cobaio, demonstrou que vacinas preparadas

com formas R davam muito menor proteção quando comparadas com as obtidas de formas S. Verificou também, que as vacinas de formas S davam igual proteção, quer tivessem sido aquecidas a 100°C temperatura em que havia destruição do antígeno H, ou a 53°C temperatura em que a produção de anticorpos para este antígeno não era alterada, e concluiu que o último antígeno não tinha importância como agente profilático. Assinalou o mesmo Autor, que a dedução podia igualmente ser alcançada de resultados de experiências com formas S e R com igual quantidade do antígeno H. Suas conclusões contrastavam com as normas do "Anti-typhoid Committee (1912)" que recomendava o uso de baixas temperaturas para a inativação do germe, bem como emprego de amostras não virulentas para o preparo da vacina. Arkwright (1927) assinalou que um dos critérios desta comissão para analisar a eficácia das vacinas era o nível de aglutininas no soro do homem e animais vacinados, justificando-se assim suas recomendações, uma vez que as aglutininas pesquisadas naquela época eram anti-H. Com base nesse critério, a demonstração de aglutininas específicas para as *Salmonellas paratyphi* A e B foi uma das justificativas para a inclusão destes germes na composição da vacina conhecida como vacina TAB (Davison, 1918).

Grinnell (1930) confirmou as conclusões de Arkwright (1927) baseado em provas "in vitro". Verificou que o soro de indivíduos inoculados com vacina preparada com a amostra "Rawling" rugosa, tinha atividade bactericida mínima quando comparado com o soro daqueles inoculados com vacinas preparadas de amostras lisas recém-isoladas. Determinando o título de aglutininas, relatou que o soro de indivíduos vacinados com amostra rugosa reagia com as duas formas, não havendo relações entre o nível de aglutininas anti-H e a atividade bactericida "in vitro".

Grinnell (1932) estudando amostras "Rawling" empregadas no preparo da vacina por doze laboratórios americanos (E.U.A.), verificou nas mesmas morfologia colonial mais ou menos rugosa e, quando comparadas com amostras lisas recém-isoladas, uma menor virulência e menor efeito protetor para camundongo.

Perry, Findlay & Bensted (1933a) empregando uma amostra "Rawling" utilizada no preparo de vacinas desde 1900, repetiram as experiências de Grinnell (1930, 1932) e confirmaram seus resultados. Posteriormente estes investigadores (Perry et al, 1933b) demonstraram que esta amostra poderia recuperar sua morfologia lisa e tornar-se altamente patogênica, através de passagens em camundongos. Esta nova amostra foi denominada de "Rawling rejuvenescida".

Até aquela data, dos antígenos conhecidos de *S. typhi*, apenas o antígeno O era tido como agente da vacina que desempenhava um papel protetor. As experiências de Felix e seus colaboradores (1934b) trouxeram o conhecimento de um novo antígeno e a introdução de novos métodos de preparo da vacina. Felix & Pitt (1934a) não conseguiram demonstrar, utilizando testes "in vitro", nenhuma diferença antigênica entre amostras de *S. typhi* não aglutináveis e aglutináveis com imunossoro anti-O. Posteriormente (1934b) utilizando a metodologia empregada por Grinnell (1932) e comparando a virulência e o poder protetor destas amostras para camundongos, esses Autores concluíram que a não aglutinabilidade era devida a um antígeno adicional que foi denominado de antígeno de virulência e simbolizado por Vi. Concluíram, também, que a virulência e a toxicidade de *S. typhi* constituíam dois fatores independentes, e que anticorpos para o antígeno O neutralizavam sua ação tóxica enquanto que aqueles para o antígeno Vi representavam os anticorpos protetores.

O comportamento deste antígeno frente ao calor foi uma questão de grande interesse, desde que a maior parte das vacinas era inativada por este tratamento. Baseado em testes sorológicos, Felix & Pitt (1934b) consideraram este antígeno como uma substância termolábil.

Após dez anos de experiência sobre o poder imunizante de vacinas inativadas por diferentes agentes químicos Felix (1941) introduziu um novo método de preparo da vacina, preconizando a inativação e conservação do germe pelo álcool. No mesmo ano

e em publicação simultânea Felix, Rainsford & Stokes (1941) compararam esta vacina com a inativada pelo calor e preservada com fenol e demonstraram, baseados ao nível de aglutininas anti-Vi nos indivíduos vacinados, ser a primeira vacina a mais eficaz.

Outros tipos de vacinas utilizadas na imunização de seres humanos, como as vacinas do tipo químico e a vacina TAB, anteriormente referida, terão suas efetividades discutidas no decorrer deste trabalho. As chamadas vacinas atenuadas embora não utilizadas na imunização humana, exceto por poucas experiências em voluntários, serão sumariamente referidas em virtude de resultados mais promissores que com as vacinas inativadas. Outros imunógenos propostos como possíveis vacinas, serão discutidos em outro trabalho, dada a grande diversidade sobre suas atividades imunogênicas ou imunológicas.

#### *Experiência de campo-inoculação parenteral*

A eficácia, no homem, de vacinas preparadas pelo método de Felix (1941), isoladamente, ou em comparação com a vacina aquecida e fenolada, foi testada em larga escala na Segunda Guerra Mundial. Os trabalhos publicados durante e após a guerra não esclareceram, porém, o valor profilático destas vacinas, consideradas por alguns investigadores como altamente eficazes (Boyd, 1943; Ducan et al, 1946) enquanto outros negaram esta efetividade (Marmion, Naylor & Stewart, 1953).

Como já referido anteriormente, as evidências definitivas da eficácia de vacinas anti-tifoídicas no homem, baseavam-se nos resultados favoráveis de ensaio de campo, realizados por Wright e colaboradores e apresentados no "Antityphoid Committee, 1912". Uma revisão crítica destes resultados, dentro de princípios estatísticos modernos, levou Cockburn (1955) a não aceitar as conclusões desse Comitê.

Em virtude destas observações e de controvérsias existentes sobre o valor profilático de vacinas inativadas por aquecimento e pelo álcool, a Organização Mundial de Saúde (WHO) começou, a partir de 1953, a colaborar e a patrocinar ensaios de campo estritamente controlados com diversos tipos de vacinas anti-tifoídicas e em regiões onde a febre tifóide era endêmica (Cvjetanović, 1961).

Nestes ensaios, ao invés da associação de *S. typhi* e *S. paratyphi* A e B, e que constituía a vacina denominada TAB, foram empregadas vacinas monovalentes obtidas a partir de uma amostra de *S. typhi* denominada Ty 2. De um modo geral estas vacinas foram administradas por via subcutânea, em duas doses, ou às vezes uma, com intervalo de 3 a 4 semanas, contendo meio a um bilhão de germes por dose, para adultos, e quantidade proporcionalmente menor para crianças.

No primeiro destes ensaios, realizado na Iugoslávia no período de 1954 a 1955, foi comparada a efetividade da vacina inativada e preservada com etanol também representada pela letra A ou V e da vacina inativada por aquecimento e preservada com fenol. A primeira vacina foi preparada de acordo com a técnica descrita por Felix (1941) e a segunda de acordo com a técnica tradicionalmente usada de inativação por aquecimento a 56°C por uma hora e preservação com 0,5% de fenol (Yugoslav Typhoid Commission, 1957).

Os resultados deste ensaio (Tabela I) demonstraram que a vacina aquecida e fenolada ofereceu uma proteção estatisticamente significativa, ao contrário da vacina inativa por etanol de pouco ou nenhum valor profilático (Cvjetanović, 1961). Este ensaio, segundo o mesmo Autor, permitiu apontar erros e falhas ocorridas em outros ensaios de campo e cujos resultados não poderiam ser aceitos como prova da eficácia das vacinas testadas. A maioria destes ensaios foi realizada por investigadores soviéticos empregando vacinas constituídas de produtos purificados de *S. typhi*, *S. paratyphi* A e B, *Shigella dysenteriae* e outros antígenos, daí o nome de polivacinas. A finalidade desta mistura seria a de obter, como uma única inoculação, proteção simultânea para várias infecções. Os resultados destes ensaios estão indicados na Tabela I.

TABELA I

Ensaio de campo realizados no período de 1904 a 1958 com vacinas anti-tifoídicas\*

| <i>População e Período do Ensaio</i> | <i>Tipo de Vacina</i>   | <i>Métodos de Imunização</i>  | <i>Grupos Vacinados**</i>       | <i>Grupos Controles**</i> | <i>Efetividade***</i> |
|--------------------------------------|---|---|---------------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Tropas Britânicas<br>1904-1908       | TAB aquecida e preservada<br>com lisol  | Uma ou duas injeções  | 56/10.378                       | 226/8.936                 | 75%                   |
| Itália 1929                          | TAB oral  | Uma pílula diariamente<br>por três dias   | 15/295                          | 2/58                      |                       |
| URSS - 1942<br>1947                  | Polivacina NIISI  | Uma injeção   | 21/12.283<br>15/80.103          | 155/10.304<br>58/86.559   | 86%<br>74%            |
| Yugoslávia 1954-<br>1955             | Monovalente, inativada<br>e preservada com etanol.<br>Monovalente aquecida<br>e fenolada. | Duas injeções com intervalos<br>de três semanas e dose de<br>reforços após um ano | 23/20.930<br>9/20.102           | 31/20.990                 | 25%<br>71%            |
| URSS 1956-1957 <sup>1</sup>          | Polivacina nº 2<br>Polivacina NIISI<br>Tetravacina  | Uma injeção   | 0/16.419<br>10/6.193<br>0/6.544 | 108/16.223                | 100%<br>91%<br>100%   |
| URSS 1958 <sup>2</sup>               | Polivacina IEM<br>Tetravacina<br>Polivacina NIISI   | Uma ou duas injeções  | 5/2.249<br>123/9.893<br>1/1.178 | 42/3.463                  | 88%<br>98%            |
| URSS 1958 <sup>2</sup>               | Polivacina IEM<br>Polivacina IEM<br>Polivacina NIISI                                      | Duas injeções<br>Uma injeção<br>Duas injeções                                     | 3/8.444<br>2/2.106<br>66/8.342  | 28/9.865                  | 89%<br>93%<br>78%     |

\*Dados modificados de Cvjetanović (1961)

\*\*Número de casos de febre tifóide e/ou paratifóides em relação aos grupos testados

\*\*\*Efetividade  $\frac{100(b-a)}{b}$ , a = incidência nos grupos vacinados; b = incidência nos grupos controles

1 - Casos de febre tifóide e paratifóides foram considerados separadamente e a prevenção de paratifóides feita pelas vacinas Polivacina nº 2 e Tetravacina.

2 - Englobam casos de febre tifóide e paratifóides.

Os estudos com as vacinas inativadas por etanol e calor continuaram até 1960 e os resultados finais confirmaram a superioridade da vacina aquecida e fenolada. A efetividade desta vacina foi de 71% com duração de pelo menos três anos, sendo que uma dose de reforço, após um ano das primeiras inoculações não demonstrou diferença significativa nesta proteção (Yugoslav Typhoid Commission, 1962).

Em ensaios posteriores, o etanol foi substituído por acetona para preservação do antígeno Vi em virtude dos resultados laboratoriais favoráveis obtidos por Edssal et al (1960). As vacinas foram preparadas de acordo com as técnicas descritas pela "Division of Immunology, Walter Reed Army Institute of Research" (1964), em forma liofilizada, ao invés da forma líquida utilizada no primeiro ensaio. As vacinas inativadas por acetona e por aquecimento receberam a denominação de vacina K e L, respectivamente. Na Tabela II indicam-se os resultados de ensaios de campo em que a efetividade de duas e de uma dose destas vacinas foi comparada. Nestes ensaios, a vacina inativada por acetona mostrou-se mais efetiva que a vacina aquecida e fenolada. A proteção oferecida pela vacinação teve uma duração de três a cinco anos, e nos ensaios realizados na Guiana Britânica e na Polônia uma dose de vacina foi tão eficaz quanto duas doses (Typhoid Panel, UK Department of Technical Co-operation, 1964; Ascroft et al, 1967). Na Guiana Britânica os resultados obtidos foram mais favoráveis que os da Jugoslávia e atribuídos a diferenças nas condições de vida, dose infectante e idade dos grupos estudados (Yugoslav Typhoid Commission, 1964).

Em alguns ensaios, patrocinados ou não pela WHO, outros tipos de vacinas anti-tifoídicas foram estudadas. Entre elas destacam-se os extratos bacterianos obtidos pelos métodos de Westphal e de Grasset modificado por Slopek e absorvidas em hidróxido de alumínio (Polish Typhoid Committee, 1965). Na Tabela III estão condensados os dados relativos a alguns destes ensaios. Cvjetanović & Uemura (1965), analisando os resultados destes ensaios concluíram: a) as vacinas inativadas por acetona e por aquecimento são geralmente superiores aos outros tipos de vacinas, sendo a primeira mais eficaz que a segunda; b) esta efetividade independe de estarem estas vacinas associadas a outros antígenos; c) algumas polivacinas, ou vacinas do tipo químico, dão, relativamente, boa proteção quando administradas em altas doses, enquanto outras não oferecem proteção; d) as vacinas tipo endotoxina dão baixo grau de proteção; e) quando as vacinas são potentes, estas conferem uma boa proteção por longo tempo.

A inclusão de *S. paratyphi* A e B nas vacinas anti-tifoídicas, decorreu das similaridades epidemiológicas e, como já citado, imunológicas, entre a febre tifóide e as paratifóides. Sobre a eficácia destas vacinas na prevenção das febres paratifóides, em ensaios de campo estritamente controlados, poucas observações têm sido realizadas. Os resultados dos ensaios de campo realizados na Jugoslávia (Yugoslav Typhoid Commission, 1962, 1964) e URSS (Hejfec, 1965) mostraram que a vacina monovalente com *S. typhoid* não dá proteção para as febres paratifóides. Em relação ao antígeno paratifóide A, as evidências de seu efeito protetor têm-se limitado a dados laboratoriais de significado duvidoso (Cvjetanović & Uemura, 1965). No que se refere ao antígeno paratifóide B sua efetividade foi avaliada em dois ensaios de campo na URSS. Os resultados do primeiro destes ensaios, realizados no período de 1962-1963, demonstraram que uma vacina divalente (*S. typhi* e *S. paratyphi* B) inativada por aquecimento e em uma dose de  $1,2 \times 10^8$  (*S. paratyphi* B), não ofereceu efeito protetor (Hejfec et al, 1966). Em virtude da possibilidade teórica de que estes resultados fossem decorrentes da pequena dose do antígeno, um novo ensaio foi realizado empregando uma vacina monovalente e em dose cinco vezes mais elevada ( $6 \times 10^8$  *S. paratyphi* B). Os resultados demonstraram que na dose empregada a proteção oferecida foi quantitativamente comparável à vacina monovalente de *S. typhi* obtida pela mesma técnica (Hejfec et al, 1968). Estes investigadores preconizaram a associação de *S. typhi* e *S. paratyphi* B em igual concentração para vacinação de adultos, uma vez que o aumento do teor antigênico poderia trazer para crianças perigo decorrente de reações tóxicas.

As reações indesejáveis resultantes da vacinação anti-tifoídica, ocasionalmente fatais (Mittermayer, 1976), foram desde os estudos iniciais um dos motivos que incentivaram os investigadores a tentarem descobrir uma vacina não tóxica e eficaz. Baseado nestas



TABELA II

Resultados de ensaios de campo patrocinados pela WHO com duas e uma dose de vacinas K e L\*

| Área Geográfica e Período do Ensaio | Idade e Composição dos Participantes                | Grupos Vacinados com duas Doses |                         |           | Efetividade |      | Referências   |   |
|-------------------------------------|---|---------------------------------|-------------------------|-----------|-------------|------|---|---|
|                                     |   | K                               | L                       | Controle  | K           | L    |   |   |
| Yugoslávia<br>1960-1963             | 2-50 anos. Principalmente crianças                  | 16/5.028                        | 37/5.068                | 75/5.039  | 79%         | 51%  | Yugoslav Typhoid Commission (1964)                        |   |
| Güiana Britânica<br>1960-1964       | 5-15 anos. Escolares                                | 6/24.046                        | 26/23.431               | 99/24.241 | 94%         | 73%  | Typhoid Panel UK Department Technical Co-Operation (1964) |   |
| Polônia<br>1961-1964                | 5-14 anos. Escolares                                | 4/81.534                        | 31/83.734               | 31/83.734 | 87%         |      | Polish Typhoid Committee (1965)                           |   |
| URSS 1962-1963                      | Crianças e adultos jovens                           |                                 | 13/36.112               | 50/36.999 |             | 73%  | Hejfec (1965)<br>Hejfec et al (1966)                      |   |
| Condado de Tonga<br>1966-1967       | 0-60 anos. Principalmente crianças e adultos jovens | 8/11.128                        |                         | 18/11.129 | 55%         |      | Tapa & Cvjetanović (1975)                                 |   |
| Güiana Britânica<br>1960-1964       | 5-15 anos. Escolares                                | 0/3.319                         | Com uma Dose<br>3/3.371 |           | 14/3.515    | 100% | 78%   | Typhoid Panel UK Department Technical Co-Operation (1964) |
| Polônia 1961-1964                   | 5-14 anos. Escolares                                | 00/9.136                        |                         | 3/10.067  | 100%        |      | Polish Typhoid Committee (1965)                           |   |
| URSS 1961-1964                      | Principalmente crianças e adultos jovens            |                                 | 12/93.944               | 43/91.425 |             | 74%  | Hejfec et al (1968)                                       |   |
| Condado de Tonga<br>1966-1967       | 0-60 anos. Principalmente crianças e adultos jovens | 9/11.391                        |                         | 18/11.129 | 50%         |      | Tapa & Cvjetanović (1975)                                 |   |

\* Dados modificados de Cvjetanović &amp; Uemura (1965), Tapa &amp; Cvjetanović (1975) e Hejfec et al (1968).

TABELA III

Resultados de ensaios de campo realizados com diversos tipos de vacinas anti-tifoídicas\*

| <i>Área Geográfica e Período do Ensaio</i> | <i>Número e Idade dos Participantes**</i> | <i>Tipos de Vacina (Número de Dose)***</i>  | <i>Efetividade</i>              | <i>Referências</i>              |
|--|---|---|---------------------------------|---------------------------------|
| Polônia 1961-1963                          | 331.617 Escolares de 5 a 14 anos          | Acetona – seca (K) (2)<br>Endotoxina: Grasset-Slopek (T) (2)<br>Formol – Fenol (N) (2)  | 87%<br>61%<br>90%               | Polish Typhoid Committee (1965) |
|  | 359.038 Adultos                           | Endotoxina: Westphal (S) (2)<br>Acetona – seca (P) (2)  | 0%<br>53%                       |                                 |
| URSS 1962-1963                             | 298.561 Escolares                         | Aquecida – fenol – seca (L) (2)<br>Aquecida – fenol – <i>S. typhi</i> + <i>S. paratyphi</i> B (G) (2)<br>Álcool (V) (2)<br>Química, Mečnikov (A) (2)<br>Química, Gamaleja (K) (2) | 74%<br>86%<br>75%<br>61%<br>23% | Hejfec et al (1966)             |
| URSS 1958-1959                             | 12.981 16 a 60 anos                       | Polivacina NIISI: Mečnikov (1)  | 72%                             |                                 |
| URSS 1958                                  | 32.744 7 a 14 anos                        | Química, pequena dose (1)   | 11%                             |                                 |
| URSS 1958                                  | 27.275 13 a 16 anos                       | Polivacina NIISI, pequena dose (1)  | 33%                             |                                 |
| URSS 1959                                  | 52.847 7 a 16 anos                        | Química adsorvida em fosfato de cálcio (1)  | 58%                             | Hejfec (1965)                   |
|  |   | Química adsorvida em hidróxido de alumínio (1)  | 61%                             |                                 |
| URSS 1960                                  | 89.368 Escolares                          | Química adsorvida (1)   | 77%                             |                                 |
|  |   | Química adsorvida (2)   | 68%                             |                                 |
|  |   | Álcool (2)  | 37%                             |                                 |
| URSS 1961                                  | 182.491 Escolares                         | Química adsorvida (1)   | 59%                             |                                 |
|  |   | Aquecida (2)  | 81%                             |                                 |
|  |   | Álcool (2)  | 66%                             |                                 |

\*Dados modificados de Cvjetanović &amp; Uemura (1965)

\*\*Os grupos controles foram vacinados com toxóide tetânico

\*\*\*As letras referem-se aos códigos empregados nas publicações citadas.

reações e na resposta sorológica dos indivíduos vacinados, Leishman (1910) preconizou o emprego de duas doses de vacinas para imunização contra a febre tifóide. Os resultados favoráveis obtidos na Guiana Britânica e Polônia com apenas uma dose das vacinas, levaram Asheroff et al (1967) a sugerirem o emprego de uma única dose. Em ensaios realizados na URSS, Hejfec et al (1968) verificaram que uma dose de vacina aquecida e fenolada ofereceu uma proteção significativa, mas de pouca duração (10 meses) quando comparada com duas doses, pois neste caso, a proteção foi de 30 meses. Baseados nestas observações os Autores recomendaram o emprego das duas doses, quando este tipo de vacina fosse empregado.

Em virtude não só das reações tóxicas como da importância do número de doses em programas de imunização em larga escala, Tapa & Cvjetanović (1976) realizaram uma avaliação do efeito protetor e sua duração, com duas e uma dose de vacina K. Os resultados deste ensaio, realizado no Condado de Tonga e acompanhado durante mais de sete anos, demonstraram que embora uma dose tenha oferecido uma boa proteção, esta foi de duração bem menor (um ano) que a obtida com duas doses (cinco anos).

A eficácia das vacinas K e L utilizadas pela Organização Mundial de Saúde, nos ensaios de campo anteriormente referidos, foi também testada em voluntários humanos. Hornick et al (1967) demonstraram que doses infectantes de 25, 50 e 100% nestes voluntários correspondia a  $10^5$ ,  $10^7$  e  $10^9$  microrganismos, respectivamente. Segundo estes investigadores, estas vacinas somente ofereceram proteção para pequenas doses infectantes ( $10^5$ ). De acordo com Hornick et al (1970) estes achados correlacionaram-se com os resultados dos ensaios de campo, e sugerem que a dose infectante na natureza, quando feita através de água contaminada, aproxima-se de  $10^5$  microrganismos, ao passo que a ingestão de alimentos contaminados com prolongado tempo de incubação e com um maior número de microrganismos permite que estes vençam a imunidade produzida pela vacinação.

#### *Testes em animais*

Nos ensaios de campo acima citados, ao lado da verificação sobre a eficácia destas vacinas, baseada em dados estatísticos, numerosos pesquisadores em diferentes laboratórios e países estiveram empenhados em verificar se os testes laboratoriais se correlacionavam com os resultados destes ensaios.

Na vacinação anti-tifoídica, desde os estudos iniciais, investigadores procuram encontrar um teste de laboratório "in vivo" ou "in vitro" que racionalmente possa avaliar a proteção obtida no homem.

A necessidade de uma resposta para este problema foi assinalada há muitos anos atrás por Metchnikoff & Besredka (1911) quando escreveram: "entre a peritonite tífica do cobaio e a febre tifóide do homem nada há em comum a não ser o nome do micróbio". Marmion, Naylor & Stewart (1953) enfatizaram novamente este problema quando observaram um surto de febre tifóide em tropas vacinadas com preparações de máxima efetividade em testes de proteção em camundongos.

Sendo o *S. typhi*, nas condições naturais, um germe patogênico exclusivo do homem, a falta de um modelo experimental em animal, no qual a doença possa ser reproduzida é para alguns investigadores (Nestoresco, 1961; Beumer, 1974) responsável pelas incertezas e contradições existentes até o presente, quer sob o ponto de vista patogênico, quer sobre os mecanismos imunológicos envolvidos.

Dos animais de laboratório utilizados no estudo experimental da febre tifóide, os chimpanzés foram considerados como os únicos que fazem exceção, e desenvolveram pela ingestão oral de *S. typhi*, uma infecção semelhante à observada no homem.

O primeiro investigador que relatou a reprodução da doença, por inoculação oral de *S. typhi* nestes animais foi Grumbaum (1904). Posteriormente, Metchnikoff & Besredka (1911) publicaram os resultados de experiências que tinham por objetivo a reprodução da doença por inoculação oral de *S. typhi* em vários animais de laboratório (coelhos, cobaios e macacos de diversas espécies) e de acordo com os mesmos, apenas em chimpanzés foi observado um quadro semelhante à febre tifóide humana. Dois anos mais tarde, Metchnikoff & Besredka (1913) empregando apenas chimpanzés, confirmaram os resultados anteriores e concluíram que os mecanismos patogênicos e imunológicos da febre tifóide humana, somente poderiam ser estudados em modelos experimentais através da mesma via de infecção (oral) em que fossem observados um curso clínico e alterações patogênicas que lembrassem a infecção humana.

Várias décadas após, os resultados destes investigadores foram confirmados por Edssal et al (1954, 1960) e por Sprinz et al (1956a, b). Para Edssal et al (1960), somente em chimpanzés podem-se reproduzir as principais características da infecção humana, ou seja, inoculação pelo trato alimentar, invasão da corrente sanguínea e uma acentuada e contínua enterite.

Este modelo animal, no entanto, somente foi utilizado por um pequeno número de investigadores em estudos que visaram definir fatores associados à patogênese e/ou imunidade (Edssal, 1955; Edssal & Benenson, 1957; Gaines et al, 1958; Gaines, Sprinz & Tully, 1968; Gaines, Tully & Tigert, 1960, 1968; Tully, Gaines & Tiger, 1962, 1963 a, b, 1965).

Com exceção dos trabalhos acima referidos, o estudo experimental da febre tifóide, em animais de laboratório, foi realizado em cobaios, nos estudos iniciais, e posteriormente em camundongos (Edssal et al, 1960).

Em camundongos, os modelos experimentais têm variado amplamente não só em relação às vias de inoculação, como quanto a amostras bacterianas, métodos de avaliação da resposta e linhagem dos animais empregados.

A reprodução da infecção por inoculação oral de *S. typhi* nestes animais foi relatada por Remlinger (1897). Outros investigadores, no entanto, têm demonstrado que, mesmo com patógenos naturais, é necessário um grande inóculo para que se estabeleça uma infecção por esta via (Abrams & Bishop, 1966; Bohnhoff, Drake & Miller, 1954; Bohnhoff, Miller & Martin, 1964; Miller & Bohnhoff 1962, 1963). A necessidade de um elevado número de germes por inoculação oral levou, nos testes de proteção com vacinas, à morte do grupo controle por endotoxemia, o que tornou este modelo (inoculação oral) sujeito às críticas de Collins (1970). Para esse investigador, esta objeção poderia ser contornada pelo tratamento dos animais com agentes antibacterianos que os tornassem mais sensíveis a esta via de infecção (Miller & Bohnhoff, 1963; Savage e Dubos, 1968) ou pelo emprego de animais isentos de germes (Schedler, Dubos & Costelo). Estes modelos, ainda, assim, seriam altamente artificiais e de pouco valor na representação da infecção natural humana.

Com o objetivo de encontrar condições em que este modelo animal mais se aproximasse da infecção natural humana, alguns estudos foram realizados com salmonelas patogênicas para o homem (*S. typhi*, *S. paratyphi* A e B), e salmonelas patogênicas para camundongos (*S. typhimurium* e *S. enteritidis*). Com estes germes, investigações foram realizadas, visando determinar através de inoculação oral, o local, velocidade de penetração no trato gastrointestinal e vias de disseminação a partir destes órgãos.

Na infecção natural e experimental em seres humanos, o local exato e velocidade de penetração no trato gastrointestinal é desconhecido (Hornick et al, 1970). Os resultados de estudos experimentais no homem, realizados pelos investigadores citados, indicaram que a faringe não estava envolvida como porta de entrada e a possibilidade de penetração do germe pela mucosa gástrica seria rara. O jejuno, como local mais provável de

penetração do germe, foi sugerido por Sprinz et al (1966), os quais, através de estudos histológicos de biópsias deste órgão, demonstraram um processo inflamatório antes do aparecimento de bacteremia. Após a penetração, o germe seria retido pelo sistema linfático onde se multiplicaria e atingiria a corrente sanguínea (Sprinz, 1969).

Nos estudos experimentais em camundongos, embora a maioria dos investigadores tenha admitido que o local primário de invasão é o intestino delgado (Gerichter 1960; Miller & Bohnhoff, 1962), opiniões divergentes existem em relação ao modo de disseminação de amostras virulentas e avirulentas para outros órgãos.

A disseminação de amostras virulentas, e em elevadas doses, se processaria através da passagem direta do intestino para a corrente sanguínea, enquanto as de menor virulência atingiriam o sangue, por via linfática (Mueller, 1912). Este modo de disseminação não foi admitido por outros investigadores, que embora tenham concordado com a existência de diferenças de comportamento entre amostras virulentas como *S. typhimurium* e avirulentas como *S. paratyphi* B, demonstraram que as últimas ficaram retidas no sistema linfático regional, enquanto as primeiras atingiram o sangue por esta via (Ørskov, Jensen & Kobayashi, 1928). Estes investigadores consideraram que a *S. typhimurium* causava nestes animais uma infecção com evolução semelhante à febre tifóide humana. Baseado nestas experiências e na identidade antigênica somática entre a *S. typhimurium* e a *S. paratyphi* B, Hobson (1957) concluiu que este modelo animal, com seu patógeno natural, seria satisfatório para o estudo das salmoneloses sistêmicas.

Posteriormente, Gerichter (1960) demonstrou o aparecimento de bacteremia vinte a trinta segundos após inoculação de *S. typhi* e de *S. paratyphi* A e B, o que excluía a passagem de amostras avirulentas pelo sistema linfático destes animais. O local exato de penetração no intestino delgado não foi definido por estes investigadores.

Carter & Collins (1974) não demonstraram bacteremia, mesmo uma hora após a inoculação de amostras virulentas (*S. enteritidis*). Os resultados de suas experiências sugeriram ser o íleo distal o local primário de penetração deste germe, de onde se disseminaria através da via linfática.

O modo de disseminação de amostras virulentas e avirulentas e sua importância nos resultados de estudos experimentais, que visam definir os mecanismos de virulência e de imunoresistência envolvidos na febre tifóide em animais como camundongos, têm sido objeto de discussão entre muitos investigadores. A razão para tais debates é, de acordo com Dutton (1955), devida a diferenças significativas na velocidade e curso de infecção entre as diversas vias de inoculação.

Gerichter (1960) comparou o número de microrganismos (*S. typhi*, *S. paratyphi* A e B) no sangue e baço deste animais, empregando a via oral, subcutânea, intramuscular e intraperitoneal e concluiu que um quadro inteiramente diverso e bem mais severo foi observado com a via intraperitoneal.

Em experiências com amostras de *S. typhimurium* empregando as vias intraocular, peritoneal e oral, Duguid, Darekar & Wheeler (1976) observaram, com esta última via, uma maior virulência de bactérias fimbriadas quando comparadas com amostras não fimbriadas.

Qual das vias de inoculação reflete melhor, em animais de laboratório, os mecanismos da infecção natural é, até o presente, motivo de indagação.

Desta maneira, os investigadores que utilizam animais de laboratório como modelo experimental têm empregado as mais diversas vias de inoculação ou seja: via oral (Smith, 1965; Sato, 1965; Germanier, 1972), via intraperitoneal com amostras bacterianas em suspensão salina fisiológica (Felix, 1951; Jenkin & Rowley, 1965) ou suspensas em mucina (Rake, 1935; Batson, Landy & Brown, 1950; Spaun, 1964), via endovenosa

(Blanden, Mackaness & Collins, 1966) e via intracerebral (Norton & Dingle, 1935; Landy, Gaines & Sprinz, 1957).

Críticas e restrições a resultados obtidos pelo emprego de diferentes vias de inoculação, quer para a imunização ou para infecção desafio, são freqüentes entre os investigadores que discutem a patogenia e/ou imunidade na febre tifóide.

Pela via natural de infecção, como já discutido anteriormente, a dose necessária para produzir a infecção desafio, em testes de proteção é suficiente para matar a maioria do grupo controle, em torno de 48 horas, por endotoxemia (Collins, 1970). Das vias parenterais, as mais utilizadas são a intraperitoneal e a endovenosa. A primeira tem sido criticada por alguns investigadores, tendo em conta que não se observa peritonite quando a via oral é utilizada (Ørskow et al, 1928). Para outros, a inoculação por esta via leva a intensa multiplicação em ausência de anticorpos, sendo o contrário do que ocorre em sua presença, e é desta maneira de limitada significação em testes de proteção (Blanden et al, 1966; Collins, 1969a). Em relação à via endovenosa, as críticas estão relacionadas ao fato de que por esta via os microrganismos não passam primariamente pela barreira linfática como ocorre na infecção natural (Roantree, 1967; Kenny & Herzberg, 1968)..

Para alguns investigadores como MacLeod (1954) a imunidade na infecção natural não poderia ser medida por vias artificiais. Para outros como Collins (1969a, b, 1970) esta medida pode ser realizada, independente da via de inoculação, dependendo do critério de avaliação. Desde os resultados iniciais, esta avaliação tem sido realizada com base na proporção de sobreviventes do grupo vacinado em relação ao grupo controle (MacLeod, 1954; Esposito et al, 1969; Diena et al, 1975). Atualmente, um grupo de investigadores baseia seus resultados na comparação do número de germes, no fígado e no baço no grupo vacinado e no grupo controle (Blanden et al, 1966; Collins, 1970).

Um outro parâmetro, considerado importante quando se utiliza este modelo animal, é uma grande variação em sua resistência natural a seus patógenos. Por técnicas adequadas foi possível segregar populações de camundongos com elevada, intermediária e baixa resistência a estes patógenos (Webster, 1933; Oakberg, 1946; Gowen, 1960).

Nos estudos experimentais em febre tifóide, as mais diversas linhagens destes animais já foram empregadas. Alguns investigadores (Hobson, 1957; Mitsuhashi et al, 1959) empregaram linhagens altamente sensíveis, sofrendo críticas de outros (Kenny & Herzberg, 1968) que consideram este modelo altamente artificial. Finalmente, há os que fazem restrições a este modelo animal por considerarem que sua susceptibilidade à *S. typhimurium* se deve a antígenos de reatividade cruzada, entre os tecidos do hospedeiros e o parasito (Rowley & Jenkin, 1962; Gorzynski, 1976).

As discussões e resultados contraditórios sobre a eficácia das vacinas anti-tifoídicas, como discutido anteriormente, levaram a WHO a patrocinar ensaios de campo estritamente controlados, os quais demonstraram que os diferentes métodos de preparo destas vacinas condicionavam diferenças em sua efetividade para o homem. Paralelamente, estas vacinas tiveram suas potências avaliadas em laboratório através de testes de proteção ativa em camundongos e avaliação da produção, em coelhos, de aglutininas para antígenos H, O e Vi. Testes adicionais, como dosagem destas aglutininas nos soros de indivíduos vacinados e testes de proteção passiva em camundongos, foram freqüentemente empregados.

Os testes de proteção ativa apresentaram uma série de variáveis, quer sob o ponto de vista das vacinas em termos de doses, vias de inoculação, intervalo entre a imunização e o desafio, quer em relação às amostras bacterianas, diluentes, doses e vias utilizadas para o desafio.

As vacinas utilizadas no primeiro ensaio de campo, quando analisadas através de testes de proteção ativa em camundongos, apresentaram resultados discordantes quando comparados com os obtidos no homem. Assim é que a vacina A (inativada por etanol) de

pouco ou nenhum valor profilático para o homem se mostrou mais efetiva que a vacina L (inativada por aquecimento), quando ensaiada por testes de proteção ativa. Neste teste foi empregada a via intraperitoneal, e um intervalo de seis dias entre a imunização e o desafio com uma amostra bacteriana em suspensão de mucina ou em solução salina fisiológica (Edssal et al, 1959). Utilizando o mesmo método de ensaio, mas com a imunização subcutânea, Standfast (1960) não encontrou diferenças na potência destas vacinas. Este Autor analisando os resultados obtidos em outros laboratórios, concluiu que, ou este animal não é adequado para esta avaliação, ou a maneira correta de realização deste teste não teria sido encontrada. Assinala também a necessidade de um ensaio comum não apenas no nome mas em todos os detalhes.

Nos demais ensaios de campo, vinte e um laboratórios analisaram a eficácia das vacinas empregadas nestes ensaios. A cada laboratório foi solicitado que esta avaliação fosse realizada por testes de proteção ativa em camundongos, resposta em coelhos para aglutininas anti-H, O, Vi e um terceiro teste a critério do laboratório (Pittman & Bohner, 1966). Esperava-se encontrar um teste laboratorial que permitisse uma avaliação da efetividade destas vacinas, e assim substituir os ensaios de campo de onerosa e difícil organização (Cvjetanović & Uemura, 1965). Esta expectativa, no entanto, não se concretizou, uma vez que as conclusões da análise dos resultados destes estudos, relatados em um grande número de publicações (Spaun, 1964; Spaun & Uemura, 1964; Polish-Typhoid Committee, 1965; Hejfec et al, 1966) foram as de que nenhum dos testes laboratoriais disponíveis serviam para indicar a verdadeira potência das vacinas anti-tifoídicas, embora alguns testes apresentassem resultados mais satisfatórios que outros.

Spaun (1964), analisando as influências das variáveis dos testes de proteção ativa, chegou à conclusão de que a via de imunização (subcutânea ou intraperitoneal) afetava, de maneira significativa, os resultados de medidas de proteção destas vacinas. Resultados semelhantes foram observados por Pittman & Bohner (1966) que consideraram as demais variáveis sem importância significativa. Para estes investigadores, dos testes de proteção ativa realizados com as vacinas K e L, o que mais se aproximou dos resultados obtidos no homem foi aquele em que a imunização foi realizada pela via intraperitoneal e o desafio pela mesma via com a amostra bacteriana em suspensão em mucina. Este tipo de teste de proteção ativa seria indicado apenas em relação a estas vacinas, uma vez que os mesmos resultados não foram observados quando comparada à efetividade das vacinas A e L. As conclusões destes investigadores não foram aceitas por Joó, Pusztal & Juhasz, (1968) os quais embora tenham admitido uma influência significativa desta, e das outras variáveis do teste, propuseram como o mais indicado a imunização por via subcutânea e o desafio por via intraperitoneal com suspensões bacterianas em solução salina fisiológica, uma vez que este teste foi o que melhor refletiu a efetividade das vacinas anteriormente citadas.

Finalmente, em relação às variáveis deste teste, alguns investigadores chamaram a atenção para aqueles decorrentes da linhagem dos animais (Joó et al, 1968; Esposito et al, 1969). Para Batson (1949) mesmo dentro de uma mesma linhagem, este teste não apresentou resultados constantes.

As discussões e resultados contraditórios, em torno de um único teste, talvez sejam responsáveis pela não definição específica do tipo de teste exigido para a medida da eficácia destas vacinas nas exigências mínimas para vacinas anti-tifoídicas adotadas pelo "Comité OMS d' experts de la Standardisation Biologique" (1967). Nestas exigências são encontradas apenas considerações gerais para realização de dois testes de antigenicidade destas vacinas, ou seja: teste de proteção ativa em camundongos e a produção de aglutininas em coelhos para os antígenos H, O e Vi.

Até o presente, os testes de proteção ativa continuam oferecendo resultados contraditórios quando comparados com os obtidos no homem. Assim é que Levine et al (1976) observaram que, de duas vacinas atenuadas, com igual efetividade neste tipo de teste, uma não teve atividade protetora para voluntários humanos.

Em relação aos testes de proteção passiva em camundongos, eles apresentaram resultados discrepantes, talvez decorrentes da não uniformidade dos testes empregados nos diferentes laboratórios (Spaun & Uemura, 1964).

Teste de proteção passiva utilizando ovos embrionados, ao invés de camundongos, foi proposto por Grabar & Le Minor (1951), baseados nos dados inconsistentes obtidos nestes animais e nas conclusões de Weil & Gall (1941) de que embriões de pintos eram sensíveis a infecções por *S. typhi*. Esta técnica tem sido utilizada principalmente para avaliar poder protetor de soros de coelhos e indivíduos imunizados ou convalescentes (Spaun & Uemura, 1964; Vlădoianu et al, 1965; Eiguer & Staub, 1966; Eiguer et al, 1970). Para Spaun & Uemura (1964) os resultados de alguns laboratórios, que empregaram este teste para avaliar a efetividade das vacinas utilizadas nos ensaios de campo, foram contraditórios e não conclusivos, enquanto Benenson (1964) considerou que seria um teste promissor e recomendou um aprofundamento nas investigações sobre o emprego deste método nos estudos da imunidade anti-tifoídica.

Foi baseado neste teste que Vlădoianu et al, (1965) ao estudarem o efeito protetor de soros de crianças vacinadas oralmente com vacina TAB, preconizaram esta via de imunização para escolares. No entanto, experiências em voluntários humanos e em ensaios de campo controlados demonstraram que a vacina oral, com germes inativados, não ofereceu proteção (Hornick et al, 1970; Chuttani et al, 1971, 1973).

Até o presente, alguns investigadores baseados neste tipo de ensaio definem novos antígenos, para os quais anticorpos protetores são produzidos (Joyeux et al, 1977). Ao lado de experiências com ovos embrionados e *S. typhi*, a existência de um patógeno natural para galinhas (*S. gallinarum*), tem levado à utilização deste animais como modelo experimental (Buxton & Davis, 1963; Barber & Eylan, 1977).

Finalmente em relação ao emprego de outros animais como modelos experimentais, ainda não referidos, e para os quais existem patógenos naturais dentro do grupo das salmonelas resta mencionar a utilização de ratos por alguns investigadores (Sato, 1965) considerados como animais de sensibilidade igual a dos camundongos à infecção por *S. enteritidis* (Welch, Ostrolenk & Bartram, 1941).

Animais como o bezerro (*S. dublin*) e porcos (*S. cholerae-suis*) não foram empregados em virtude de fatores econômicos (Smith, 1965). Mais recentemente, alguns investigadores têm empregado bezerros como modelo experimental (Forbes, Oakley & MacKenzie, 1977; Wray et al, 1977).

#### *Testes "in vitro"*

Em relação a testes laboratoriais "in vitro" o estudo da produção de aglutininas em animais, para os antígenos H, O e Vi, como já citado, foi utilizado na avaliação da potência das vacinas desde os testes iniciais e nos ensaios de campo. Os resultados, tanto no soro de coelho como de indivíduos vacinados que participaram destes ensaios, foram relatados por diversos investigadores entre eles, Edssal et al (1959), Benenson (1964); Spaun & Uemura (1964), Polish Typhoid Committee (1965) e Hejfec et al (1966). Estes Autores não encontraram correlação entre a efetividade destas vacinas no homem e o título de aglutininas para os antígenos O, Vi e H.

#### *Imunização oral*

As vacinas inativadas e administradas parenteralmente, embora tenham se mostrado eficazes em áreas endêmicas, apresentaram uma série de inconvenientes e entre eles como já citados anteriormente as reações tóxicas (Ashcroft et al, 1967; Yugoslav Typhoid Commission, 1964; Polish Typhoid Committee, 1965; Mittermayer, 1976). Para Edwards et al (1974) e Hornick et al (1970) estas vacinas apresentam dois fatores de gran-



de inconveniência, sendo um deles a não proteção para populações de áreas não endêmicas e o outro a sua ineficácia para doses infectantes elevadas.

O emprego de via oral para imunização não só eliminaria os efeitos tóxicos, como levaria a uma estimulação direta dos mecanismos imunológicos ao nível de intestino (Du Pont et al, 1971; Levine et al, 1976) além de maior facilidade de preparo e administração.

As tentativas de desenvolvimento de imunização anti-tifoídica por via oral com germes mortos, datam da época de Wright (1904) que baseado no estudo de propriedades bactericidas dos soros de sete voluntários vacinados por esta via, relatou não ter obtido resultados conclusivos. No mesmo ano, o mesmo tipo de experiência foi realizado em 12 soldados da "Army Medical School, Washington, USA" e teve como consequência, em virtude de um erro na inativação do germe, casos clinicamente severos de febre tifóide e o abandono deste tipo de imunização em seres humanos nessa Instituição (Tigertt, 1959).

A partir destes estudos iniciais, um grande número de investigadores, principalmente franceses e germânicos, estiveram empenhados em avaliar a eficácia da imunização oral para homens e animais de laboratório. Destes estudos, os trabalhos de Besredka (1919, 1925) e Besredka & Basseches (1918), foram os que mais se destacaram, e apesar de polêmicos, tiveram uma grande influência nos conceitos de imunidade, particularmente em relação à imunização oral contra infecções entéricas.

Besredka & Basseches (1918) quando realizavam experiências sobre a eficácia de vacinas anti-tifoídicas por via intradérmica, relataram: "um dia, necessitando de um camundongo para uma experiência controle, na falta deste, tivemos a idéia de utilizar um animal que havia um mês tinha sido inoculado oralmente com bacilos paratíficos. Qual não foi nossa surpresa, quando no dia seguinte constatamos que este animal, no qual havíamos injetado uma dose mortal de uma cultura de bacilos paratíficos virulentos, alegremente comia sua aveia como se nada houvesse recebido. Pensando tratar-se de um erro, repetimos esta experiência com uma série de animais e com bacilos paratíficos vivos e inativados e concluimos que a imunidade por esta via se estabeleceu mais tardiamente, sendo mais sólida com bacilos vivos que inativados."

Besredka (1919) em experiências com coelhos concluiu que a bile facilitava a absorção do germe e deduziu que tanto em animais como no homem (1925) a imunidade estava localizada ao nível da mucosa.

Entre 1918 e 1937, Besredka publicou 48 trabalhos nos quais, baseado principalmente em resultados de experiências em animais de laboratório, defendeu o emprego desta via de imunização (Apud Raettig, 1971).

A grande maioria de publicações sobre a efetividade, para o homem e animais de laboratório, de vacinas administradas por esta via ocorreu entre 1921 a 1941 e uma revisão destes estudos encontra-se no trabalho de Dolman (1948).

O problema da eficácia da vacinação oral com germes inativados foi recentemente reinvestigado tanto no homem como em animais de laboratório, uma vez que, como já discutido, ensaios não controlados bem como resultados de experiências laboratoriais, não constituem até o presente prova da efetividade destas vacinas.

Duas vacinas, em forma de cápsula e comercialmente disponíveis na Europa, foram inicialmente testadas em prisioneiros voluntários por Hornick et al (1970) e Du Pont et al (1971). Uma destas vacinas denominada de "Typhoral" (Behringwerke) e produzida na Alemanha, consistia de cápsulas contendo  $33 \times 10^9$  de *S. typhi* e igual número de *S. paratyphi* A e B inativadas por acetona. A segunda vacina denominada de "Taboral" (Swiss Serum Vaccine Institute) fabricada na Suíça, consistia de cápsula contendo  $100 \times 10^9$  de

*S. typhi*, também inativada por acetona. De acordo com estes investigadores, seus resultados demonstraram que nas doses recomendadas ("Typhoral" dose total de 9 cápsulas e "Taboral" de 6 cápsulas em três dias) não houve efeito benéfico nos indivíduos quando desafiados com uma dose de 100.000 *S. typhi* (ID 25%). Em indivíduos que haviam recebido dose dupla (12 cápsulas) de Taboral e o mesmo desafio, um pequeno efeito benéfico foi observado.

A efetividade das vacinas "Taboral" e "Typhoral" foi também testada em crianças indianas através de ensaios de campo estritamente controlados. Os resultados do primeiro, de dois ensaios realizados, e publicados por Chuttani et al (1971), demonstraram que a imunização com uma cápsula diária de "Taboral" por três dias não ofereceu proteção.

Com o objetivo de verificar se estes resultados estavam relacionados à dose, um novo ensaio foi realizado com vacina "Typhoral" contendo  $300 \times 10^9$  de *S. typhi* e nas mesmas condições da primeira experiência. Os resultados foram novamente insatisfatórios, embora um pequeno grau de proteção tenha sido obtido (Chuttani et al, 1973). Utilizando uma dose de  $400 \times 10^9$  de *S. typhi* por cápsula, resultados insatisfatórios foram obtidos em ainda outro ensaio (Chuttani et al, 1977).

Um ensaio de campo não controlado foi realizado no Chile com uma vacina de procedência alemã, contendo  $5,4 \times 10^8$  de *S. typhi* e  $3,6 \times 10^8$  de *S. paratyphi* B (Borgoño et al, 1972). Os resultados da imunização oral de crianças com esta vacina mostraram-se, ao contrário dos estudos anteriores, altamente satisfatórios. Germanier (1977) relatou porém que um ensaio estritamente controlado, realizado posteriormente no mesmo país, não veio a confirmar estes resultados.

Em dois outros ensaios controlados e realizados na União Soviética em 1964 e 1965 (Hejfec et al, 1976), com vacina TAB, os resultados foram semelhantes aos obtidos por Hornick et al (1970), DuPont et al (1971) e Chuttani et al (1971).

A falta de correlação entre a efetividade de vacinas inativadas e injetadas por via subcutâneas no homem e os resultados de testes laboratoriais, também foi verificada em relação à imunização oral. Experiências utilizando teste de proteção passiva em ovos embrionados indicaram uma efetividade significativa e a indicação, por alguns investigadores (Vlădoianu et al, 1965) desta via de imunização para o homem.

Ao mesmo tempo em que a imunização com germes inativados era motivo de debates, alguns investigadores tentavam avaliar a eficácia do emprego de germes vivos como vacinas. A observação de que salmonelas vivas davam uma imunidade maior para o homem e animais de laboratório de que vacinas inativadas, datam das experiências de Castellani (1909) e da evidência acidental de Besredka & Basseches (1918).

Numerosos estudos quer em animais de laboratório, quer em voluntários humanos, vêm sendo realizados no sentido da aplicação prática de mutantes atenuadas e/ou discussões sobre fatores de virulência e mecanismos imunológicos envolvidos na febre tifóide.

As amostras bacterianas mais utilizadas têm sido, particularmente *S. typhi*, *S. typhimurium* e *S. enteritidis*, com ou sem atenuação de suas virulências para o hospedeiro animal.

De acordo com o relato de um Grupo da Organização Mundial da Saúde (Rapport d'un Groupe Scientifique de L'OMS, 1972) entre as amostras bacterianas estudadas e consideradas como de possível utilização no preparo de vacinas vivas, em salmoneloses, temos:

1 mutantes em que a virulência está relacionada a um fraco desenvolvimento no hospedeiro, tais como: a) *S. typhi* dependente de purinas ou amino-ácidos (Bacon,

Burrows & Yates, 1951); *S. typhimurium* dependente de purinas (Furness & Rowley, 1956); b) mutantes dependentes de estreptomicina como *S. typhi* (Reitman, 1967) e mutantes sensíveis à temperatura, como *S. enteritidis* (Cooper & Fahey, 1970);

2 – mutantes avirulentos pela perda de antígeno somático: a) mutação lisa para rugosa (S → R); b) diminuição da quantidade de antígeno somático, como na amostra M 206 de *S. typhimurium* (Archer & Rowley, 1969).

Os resultados de alguns estudos, realizados por imunização oral ou parenteral com germes vivos em camundongos (Ushiba et al, 1959; Germanier, 1972; Collins & Carter, 1972) chimpanzés (Cvjetanovic, Mel & Felsenfeld, 1970) e voluntários humanos (Hornick et al., 1970; Levine et al., 1976) confirmaram as observações iniciais sobre uma melhor eficácia da imunização com germes vivos. A superioridade das vacinas atenuadas para camundongos foi particularmente acentuada quando administradas por via oral (Germanier, 1972).

As observações de que camundongos imunizados com vacinas atenuadas poderiam ser ainda superinfectados (Collins, 1972) bem como a ocorrência de uma nova infecção em humanos, meses após a infecção primária (Marmion, Naylor & Stewart, 1953; DuPont et al, 1971) indicaram que a imunidade anti-tifoídica, mesmo em condições ideais, não é absoluta, a não ser em casos de portadores (Collins, 1971).

O emprego de vacinas vivas na imunização anti-tifoídica apesar das vantagens já referidas, sofreu restrições por parte de alguns investigadores, para os quais a imunidade obtida com mutantes rugosos foi acompanhada por lesões renais em animais de experiência (Wray et al, 1977). Desta maneira, até que sejam definidos os componentes da *S. typhi* responsáveis pelos mecanismos de virulência e imunidade, as vacinas anti-tifoídicas não diferirão muito das utilizadas desde o século passado, até o presente.

## SUMMARY

The present comprehensive review deals with the available literature on anti-typhoid vaccines. Among the biological products, no other has raised as much controversy regarding efficacy as this common preventive, since its early introduction by Wright, Pfeiffer & Kile.

From the beginning the lack of an adequate experimental procedure for testing the vaccine potency was felt, and only poor and partial data were gathered, both from human and animal models, in relation to the basic immunological mechanism of the response to vaccination. For this reason a number of different methods have been proposed and used leading to variations in such aspects as:

- a) the nature of bacterial strains for preparing the vaccine;
- b) the handling of vaccine strains-killed by heat, various chemicals (alcohol, ether acetone) or lysed, or employing live avirulent strains;
- c) the addition of different components (preservatives and related microorganisms);
- d) the route of application (subcutaneous, intradermal, oral, etc);
- e) the dose (number of organisms);
- f) the time schedule for application.

Many field trials failed to be conclusive. It is considered that the early field trials lacked proper controls, which were introduced later, in the well planned investigations sponsored by World Health Organization, in several parts of the World (Yugoslavia, Poland, U.S.S.R., India, Tonga).

Data available from such trials permitted the following conclusions:

a) killing of the vaccine strains by ethanol produced a vaccine of weak prophylactic value, if any;

b) killing by other means produced protective vaccines, with advantage for the one treated by acetone;

c) the doses of *S. paratyphi* A and *S. paratyphi* B put together in the usual TAB vaccination were insufficient. With a larger dose, protection was obtained in relation to *S. paratyphi* B;

d) no good correlation was obtained between animal tests and protection in humans. Also, titers to the O, Vi and H antigens did not bear a direct relationship with the vaccine protective effect;

e) one dose of the acetone killed vaccine (0.5 – 1.0 ml of a  $10^9$  ml bacterial suspension), subcutaneously, gave appreciable protection for a short period of time, which improved with two doses, four weeks apart;

f) better protection was observed in young people, as compared with the older;

g) no protective effect was detected when a killed oral vaccine (Typhoral) was used.

Some experiments with animals (mice, chimpanzees) and human volunteers indicated a better protection being conferred by live attenuated vaccines. However, in some experiments persistence of both vaccine and challenge strains was observed as well as a significant relation between the rough vaccine strain used for the purpose and abacterial renal lesions of unknown origin.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, G.D. & BISHOP, J.E., 1966. Effect of the normal microbiol flora on the resistance of the small intestine to infection. *J. Bacteriol.*, 92 :1604-1608.
- ARCHER, J.R. & ROWLEY D., 1969. A quantitative comparison of the antigenic structure of a virulent and an avirulent strain of *Salmonella typhimurium*. *Immunology*, 17 :551-558.
- ARKWRIGHT, J.A., 1921. Variation in bacteria in relation to agglutination both by salts and by specific serum. *J. Pathol. Bacteriol.*, 24 :36-60.
- ARKWRIGHT, J.A., 1927. The value of different kinds of antigen in prophylactic "enteric" vaccines. *J. Pathol. Bacteriol.*, 30 :345-364.
- ASHCROFT, M.T.; SINGH, B.; NICHOLSON, C.C.; RITCHIE, J.M.; SOBRYAN, E. & WILLIAMS, F., 1967. A seven-year field trial of two typhoid vaccines in Guyana. *Lancet*, 2 :1056-1059.
- BACON, G.A.; BURROWS, T.W. & YATES, V.M., 1951. The effects of biochemical mutation on the virulence of *Bacterium typhosum*: the loss of virulence of certain mutants. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 32 :85-96.

- BARBER, C. & EYLAN, M., 1977. Production of precipitating antibodies in chickens infected with *Salmonella gallinarum*. *Zentralb. Bakteriolog. Parasitenkd. Infekt. Hyg. Abt. Orig. Reihe A*, 237 :207-212.
- BATSON, H.C., 1949. The relative significance of graded immunizing and challenge doses in measuring the potency of vaccines. A study of mouse protection by typhoid vaccine. *J. Exp. Med.*, 90 :233-253.
- BATSON, H.C.; LANDY, M. & BROWN, M., 1950. Determination of differences in virulence of strains of *Salmonella typhosa*. *J. Exp. Med.*, 91 :219-229.
- BENENSON, A.S., 1964. Serological responses of man to typhoid vaccines. *Bull. W.H.O.*, 30 :653-662.
- BESREDKA, A., 1919. La vaccination contre les états typhoïdes par la voie buccale. *Ann. Inst. Pasteur.*, 33 :882-903.
- BESREDKA, A., 1925. Immunisation locale, pensements spécifiques. p. 152-200. Masson & Cie. Libraires de L'Académie de Médecine. Boulevard Saint-Germain. Paris.
- BESREDKA, A. & BASSECHES, 1918. Des virus sensibilisés vaccination antiparatyphique B. *Ann. Inst. Pasteur*, 32 :193-201.
- BEUMER, J., 1974. Les vaccins antibactériens: des microbes vivants aux antigènes purifiés. *Bull. Inst. Pasteur*, 72 :35-48.
- BLANDEN, R.V.; MACKANESS, G.B. & COLLINS, F.M., 1966. Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exp. Med.*, 124 :585-600.
- BOHNHOFF, M.; DRAKE, B.L. & MILLER, C.P., 1954. Effect of streptomycin on susceptibility of intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 86 :132-137.
- BOHNHOFF, M.; MILLER, C.P. & MARTIN, W.R., 1964. Resistance of mouse's intestinal tract to experimental *Salmonella* infection. I. Factors which interfere with initiation of infection by oral inoculation. *J. Exp. Med.*, 120 :805-816.
- BORGOÑO, J.M.; GREIBER, R.; BAQUEDANO, F.; CARRILLO, B.; CONCHA, F. & SOLARI, G., 1972. Vacunación antitífica oral. Resultados preliminares. *Rev. Med. Chile*, 100 :1129-1132.
- BOYD, J.S.K., 1943. Enteric group fevers in prisoners of war from the Western desert with special reference to prophylactic inoculation, Jan., 1940, to Feb., 1943. *Brit. Med. J.*, 2 :719-721.
- BUXTON, A. & DAVIES, J.M., 1963. Studies on immunity and pathogenesis of salmonellosis. II – Antibody and accumulation of bacterial polysaccharide in the tissues of chickens infected with *Salmonella gallinarum*. *Immunology*, 6 :530-538.
- CARTER, P.B. & COLLINS, F.M., 1974. The route of enteric infection in normal mice. *J. Exp. Med.*, 139 :1189-1203.
- CASTELLANI, A., 1909. Observations on typhoid vaccination in man with attenuated live cultures. *Zentralb. Bakteriolog. Parasitenkd. Infekt. Abt. Orig.*, 52 :92-95.
- CHUTTANI, C.S.; PRAKASH, K.; GUPTA, P.; GROVER, V. & KUMAR, A., 1977. Controlled field trial of a high-dose oral killed typhoid vaccine in India. *Bull. W.H.O.*, 55 :643-644.
- CHUTTANI, C.S.; PRAKASH, K.; VERGESE, A.; GUPTA, P.; CHAWLA, P.K.; GROVER, V. & AGARWAL, D.S., 1973. Ineffectiveness of an oral killed typhoid vaccine in a field trial. *Bull. W.H.O.* 48 :756-757.
- CHUTTANI, C.S.; PRAKASH, K.; VERGESE, A.; SHARMA, U.; SINGHA, P. & GHOSH, B.R., 1971. Effectiveness of oral killed typhoid vaccine. *Bull. W.H.O.*, 45 :445-450.
- COCKBURN, W.C., 1955. Large-scale field trials of active immunizing agents. With special reference to vaccination against pertussis. *Bull. W.H.O.*, 13 :395-407.

- COLLINS, F.M., 1969a. Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in nonvaccinated mice challenged by various routes. *J. Bacteriol.*, 97 :667-675.
- COLLINS, F.M., 1969b. Effect of specific immune mouse serum on the growth of *Salmonella enteritidis* in mice preimmunized with living or ethyl alcohol-killed vaccines. *J. Bacteriol.*, 97 :676-683.
- COLLINS, F.M., 1970. Immunity to enteric infection in mice. *Infect. Immun.*, 1 :243-250.
- COLLINS, F.M., 1971. Mechanisms in antimicrobial immunity. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 10 :58-99.
- COLLINS, F.M., 1972. Salmonellosis in orally infected specific pathogen-free C57 B1 mice. *Infect. Immun.*, 5 :191-198.
- COLLINS, F.M. & CARTER, P.B., 1972. Comparative immunogenicity of heat-killed and living oral *Salmonella* vaccines. *Infect. Immun.*, 6 :451-458.
- COMITÉ OMS D'Experts de La Standardisation Biologique, 1967. Normes relatives au vaccin antityphoïdique (norme pour les substances biologiques, N° 15). *O.M.S. Sér. Rapp. Techn.*, 361 :63-78.
- COOPER, G.N. & FAHEY, K.J., 1970. Oral immunization in experimental salmonellosis. III. Behavior of virulence and temperature sensitive mutant strains in the intestinal tissues of rats. *Infect. Immun.*, 2 :192-200.
- CVJETANOVIĆ, B., 1961. Controlled field trials of prophylactics (with special reference to typhoid vaccines). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 5 :7-21.
- CVJETANOVIĆ, B.; GRAB, B. & UEMURA, K., 1971. Epidemiological model of typhoid fever and its use in the planning and evaluation of antityphoid immunization and sanitation programmes. *Bull. W.H.O.*, 45 :53-75.
- CVJETANOVIĆ, B.; MEL, D.M., & FELSENFELD, O., 1970. Study of live typhoid vaccine in chimpanzees. *Bull. W.H.O.*, 42 :499-507.
- CVJETANOVIĆ, B. & UEMURA, K., 1965. The present status of field and laboratory studies of typhoid and paratyphoid vaccines: With special reference to studies sponsored by the World Health Organization. *Bull. W.H.O.*, 32 :29-36.
- DAVISON, W.C., 1918. The superiority of inoculations with mixed triple vaccine (*B. typhosus*, *B. paratyphosus A* and *B. paratyphosus B*). *Arch. Intern. Med.*, 21 :437-442.
- DIENA, B.B.; L.S., RYAN, A.; WALLACE, R.; ASHTON, F.E.; JOHNSON, E.M. & BARON, L.S., 1975. Ineffectiveness of Vi and chemically treated endotoxins as typhoid vaccines in mice challenged with a *Salmonella typhosa-Salmonella typhimurium* hybrid. *Infect. Immun.*, 12 :1470-1471.
- DIMACHE, G.; PALADE, R.; DIMACHE, V.; SURDEANU, M.; IORDENESCU, S. & COSMAN, M., 1977. Biological characteristic of some drug resistant *Salmonella typhi* strains. *Ann. Microbiol.*, 128 :401-412.
- DIVISION of Immunology, Walter Reed Army Institute of Research, 1964. Preparation of dried acetone-inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines. *Bull. W.H.O.*, 30 :635-646.
- DOLMAN, C.E., 1948. Oral immunization. *Amer. J. Med. Sci.*, 215 :327-351.
- DUCAN, T.G.; DOULL, J.A.; MILLER, E.R. & BANCROFT, H., 1946. Outbreak of typhoid fever with orange juice as the vehicle, illustrating the value of immunization. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 36 :34-36.
- DUGUID, J.P.; DAREKAR, M.R. & WHEATER, D.W.F., 1976. Fimbriae and infectivity in *Salmonella typhimurium*. *J. Med. Microbiol.*, 9 :459-473.
- DUPONT, H.L.; HORNICK, R.B.; SNYDER, M.J.; DAWKINS, A.T.; HEINER, G.G. & WOODWARD, F.E., 1971. Studies of immunity in typhoid fever. Protection induced by killed oral antigens or by primary infection. *Bull. W.H.O.*, 44 :667-672.

- DUTTON, A.A.C., 1955. The influence of the route of injection on lethal infections of mice. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 36 :128-136.
- EDSSAL, G., 1955. Infection and immunity in experimental typhoid fever. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 31 :776.
- EDSSAL, G. & BENENSON, A.S., 1957. Experimental typhoid fever in chimpanzees. IV – Effectiveness of immunization against a freshly isolated strain. *Bact. Proc.*, 79.
- EDSSAL, G.; CARLSON, M.C., FORMAL, S.B. & BENENSON, A.S., 1959. Laboratory tests of typhoid vaccines used in a controlled field study. *Bull. W.H.O.*, 20 :1017-1032.
- EDSSAL, G.; GAINES, S.; LANDY, M. & TIGERTT, W.D., 1954. Typhoid fever in chimpanzees infected orally with *Salmonella typhosa*. *Fed. Proc.*, 13 :490.
- EDSSAL, G.; GAINES, S.; LANDY, M.; TIGERTT, W.D.; SPRINZ, H.; TRAPANI, R.J.; MANDEL, D.D. & BENENSON, A.S., 1960. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. I Typhoid fever in chimpanzees orally infected with *Salmonella typhosa*. *J. Exp. Med.*, 112 :143-166.
- EDWARDS, E.A.; JOHNSON, D.P.; PIERCE, W.E. & PECKINPAUGH, R.O., 1974. Reactions and serologic responses to monovalent acetone-inactivated typhoid vaccine and heat-killed TAB when given by jet injection. *Bull. W.H.O.*, 51 :501-505.
- EIGUER, T.; BINSZTEIN, N.; CETRANGOLO, R. & STAUB, A.M., 1970. Recherche du pouvoir protecteur pour l'embryon de poulet de divers sérums anti-*Salmonella typhi* de lapin et d'homme. *Ann. Inst. Pasteur*, 119 :646-662.
- EIGUER, T. & STAUB, M.; 1966. Études immunologiques sur l'antigène Vi – I. Propriétés d'une préparation d'antigène Vi: effect de l'acétolyse et du traitement par le formol. *Ann. Inst. Pasteur*. 110 :707-726.
- ESPOSITO, V.M., FEELEY, J.C.; LEEDER, W.D. & PITTMAN, M., 1969. Immunological response of three mouse strains to typhoid vaccine and Vi antigen. *J. Bacteriol.*, 99 :8-12.
- FELIX, A., 1924. The qualitative receptor analysis in its application to typhoid fever. *J. Immunol.*, 9 :115-192.
- FELIX, A., 1941. A new type of typhoid and paratyphoid vaccine. *Brit. Med. J.*, 1 :391-395.
- FELIX, A., 1951. The preparation, testing and standartization of typhoid vaccine. *J. Hyg.*, 49 :268-287.
- FELIX, A. & OLITZKI, L., 1926. The qualitative receptor analysis. II. Bactericidal serum action and qualitative receptor analysis. *J. Immunol.*, 11 :31-80.
- FELIX A. & PITT, R.M., 1934a. Virulence of *B. typhosus* and resistance to O antibody. *J. Pathol. Bacteriol.*, 38 :409-420.
- FELIX A. & PITT, R.M.; 1934b. A new antigen of *B. typhosus*. Its relation to virulence and to active and passive immunization. *Lancet*, 227 :186-191.
- FELIX, A ; RAINSFORD, S.G. & STOKES E.J., 1941. Antibody response and systemic reactions after inoculation of a new type of T.A.B.C. vaccine. *Brit. Med. J.*, 1 :435-440.
- FORBES, D.; OAKLEY, G.A. & MACKENZIE, J.A., 1977. Experimental *Salmonella dublin* infection in calves. *Vet. Rec.*, 101 :220-224.
- FURNESS, G. & DOWLEY, D., 1956. Transduction of virulence within the species *Salmonella typhimurium*. *J. Gen. Microbiol.*, 15 :140-145.
- GAINES, S.; SPRINZ, H. & TULLY, J.G., 1968. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VII. The distribution of *Salmonella typhi* in chimpanzee tissue following oral chal-

- lenge, and the relationship between the numbers of bacilli and morphologic lesions. *J. Infect. Dis.*, 118 :293-306.
- GAINES, S.; TULLY, J.C. & TIGERT, W.D., 1960. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. II. Susceptibility of recovered animals to re-exposure. *J. Exp. Med.*, 112 :1023-1036.
- GAINES S.; TULLY, J.G. & TIGERT, W.D., 1968. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VIII. Intravenous and intralymph node challenge of chimpanzees with *Salmonella typhi*. *J. Infect. Dis.*, 118 :393-401.
- GAINES, S.; TULLY, J.G.; TIGERT, W.D. & MANDEL, A.D., 1958. Experimental typhoid fever in chimpanzees. V. Re-challenge of recovered animals. *Bact. Proc.* 77.
- GERICHTER, C.B., 1960. The dissemination of *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* and *Salmonella paratyphi B* through the organs of the white mouse by oral infection. *J. Hyg. Camb.* 58 :307-319.
- GERMANIER, R., 1972. Immunity in experimental salmonellosis. III. Comparative immunization with viable and heat-inactivated cells of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.*, 5 :792-797.
- GERMANIER, R., 1977. Situacion actual de la inmunizacion contra la fiebre tifoidea. *Bol. Ofic. Sant. Pan.*, 82 :300-311.
- GORZYNSKI, E.A., 1976. Cross-reactivity between mouse tissue and enterobacterial common antigen (CA). *Mil. Med.*, 141 :610-612.
- GOWEN, J.W., 1960. Genetic effects in nonspecific resistance to infections resistance to infectious disease. *Bacteriol. Rev.*, 24 :192-200.
- GRABAR, J. & S. Le MINOR, S., 1951. Test de séro-protection antityphoidique sur l'embryon de poulet. *Ann. Inst. Pasteur*, 81 :528-540.
- GRINNELL, F.B., 1930. A study of the comparative value of rough and smooth strains of *B. typhosus* in the preparation of typhoid vaccines. *J. Immunol.*, 19 :457-463.
- GRINNELL, F.B., 1932. A study of the dissociation of the Rawlins strain of *Bacterium typhosum* with special references to its use in the production of antityphoid vaccine. *J. Exp. Med.*, 56 :907-918.
- GRUBER, M. & DURHAM, H.E., 1896. Eine neue methode zur raschen erkennung des cholera vibrio und des typhus bacillus. *Munchen Med. Wochenschr.*, 13 :285-286.
- GRUNBAUM, A.S., 1904. Some experiments on enterica, scarlet fever, and measles in the chimpanzee. *Brit. Med. J.*, 1 :817-819.
- HEJFEC, L.B., 1965. Results of the study of typhoid vaccines in four controlled field trials in the USSR. *Bull. W.H.O.*, 32 :1-14.
- HEJFEC, L.B.; LEVINA, L.A.; KUZ' MINOVA, M.L.; SALMIN, L.V.; SLAVINA, A.M.; & VASIL' EVA, A.V., 1968. Controlled field trials of paratyphoid B vaccine and evaluation of the effectiveness of a single administration of typhoid vaccine. *Bull. W.H.O.*, 38 :907-915.
- HEJFEC, L.B.; LEVINA, L.A.; SALMIN, L.V.; ANTONOVA, A.A.; SEGAL, L.S.; KUZ' MINOVA M.L.; SLAVINA, Kh. M. & VASIL' EVA, A.V., 1976. Assessment of effectivity of oral killed typhoid and paratyphoid B vaccines and aerosol chemical typhoid vaccine in controlled field trials. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 20 :292-299.
- HEJFEC, L.B.; SALMIN, L.V.; LEJTMAN, M.Z.; KUZ' MINOVA, M.L.; VASIL' EVA, A.V.; LEVINA, L.A.; BENCIAANOVA, T.G.; PAVLOVA, E.A. & ANTONOVA, A.A., 1966. A controlled field trial and laboratory study of five typhoid vaccines in the USSR. *Bull. W.H.O.*, 34 :321-339.
- HOBSON, D., 1957. The behavior of a mutant strain of *Salmonella typhimurium* in experimental mouse typhoid. *J. Hyg.*, 55 :322-333.



- HORNICK, R.B.; GREISMAN, S.E.; WOODWARD, T.E.; DuPONT, H.L.; DAWKINS, A.T. & SNYDER, M.J., 1970. Typhoid fever: pathogenesis and immunologic control (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 283 :686-691.
- HORNICK, R.B.; WOODWARD, T.E.; McCRUMB, F.R.; SNYDER, M.J.; DAWKINS, A.T.; BULKELEY, J.T.; MACORRA, F. & COROZZA, F.A., 1967. Typhoid fever vaccine—yes or no? *Med. Clin. North-Amer.*, 51 :617-623.
- JENKIN, C.R. & ROWLEY, D., 1965. Partial purification of the protective antigen of *Salmonella typhimurium* and its distribution amongst various strains of bacteria. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, 43 :65-78.
- JOÓ, I.; PUSZTAI, Z. & JUHÁSZ, U.P., 1968. Mouse-protective ability of the international reference preparations of typhoid vaccine. *Z. Immunitätsforsch. Allergie Klin. Immunol.*, 135 :365-387.
- JOÓS, A., 1902. Untersuchungen über die verschiedenen agglutinine des typhusserums. *Centralb. f. Bakteriol. Parasitenk. Infektionskr. Abt. Orig.*, 33 :762-783.
- JOYEUX, Y.; JOUIN, H.; LELUC, B. & STAUB, A.M., 1977. Recherche sur l'antigène X responsable de la production des anticorps anti *Salmonella typhi* protecteurs pour l'embryon de poulet. *Ann. Immunol.*, 128 :221-223.
- KENNY, K. & HERZBERG, M., 1968. Antibody response and protection induced by immunization with smooth and rough strains in experimental salmonellosis. *J. Bacteriol.*, 95 :406-417.
- LANDY, M.; GAINES, S. & SPRINZ, H., 1957. Studies on intracerebral typhoid infection in mice. I — Characteristics of the infection. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 38 :15-24.
- LEISHMAN, W.B., 1910. The Harben Lectures. Anti-typhoid inoculation. Lecture. I. *J. Roy. Inst. Pub. Hlth.*, 28 :385-401.
- LEVINE, M.M.; DuPONT, H.L.; HORNICK, R.B.; SNYDER, M.J.; WOODWARD, W. & GILMAN, R.H., 1976. Attenuated streptomycin-dependent *Salmonella typhi* oral vaccine: potential deleterious effects of lyophilization. *J. Infect. Dis.*, 133 :424-429.
- MacLEOD, D.R.E., 1954. Immunity to *Salmonella* infection in mice. *J. Hyg.*, 52 :9-17.
- MANTEN, A.; GUINEE, P.A.M.; KAMPELMACHER, E.H. & VOOGD, C.E., 1971. An eleven-year study of drug resistance in *Salmonella* in the Netherlands. *Bull. W.H.O.*, 45 :85-93.
- MARMION, D.E.; NAYLOR, G.R.E. & STEWART, I.O., 1953. Second attacks of typhoid fever. *J. Hyg.*, 51 :260-267.
- METCHNIKOFF, E. & BESREDKA, A., 1911. Recherches sur la fièvre typhoid expérimentale. *Ann. Inst. Pasteur.*, 25 :193-221.
- METCHNIKOFF, E. & BESREDKA, A., 1913. Des vaccinations antityphiques. *Ann. Inst. Pasteur.*, 27 :597-606.
- MILLER, C.P. & BOHNHOFF, M., 1962. A study of experimental *Salmonella* infection in the mouse. *J. Infect. Dis.*, 111 :107-116.
- MILLER, C.P. & BOHNHOFF, M., 1963. Changes in mouse's enteric microflora associated with enhanced susceptibility to *Salmonella* infection following streptomycin treatment. *J. Infect. Dis.*, 113 :59-66.
- MITSUHASHI, S., KAWAKAMI, W.; GOTO, S.; YOSHIMURA, T. & HASHIMOTO, H., 1959. Studies on the experimental typhoid. IV. The microorganisms in the organs of infected mice. *Jap. J. Exp. Med.*, 29 :311-321.
- MITTERMAYER, C., 1976. Lethal complications of typhoid-cholera vaccination. *Beitr. Pathol.*, 158 :212-224.

- MUELLER, M., 1912. Der nachweis von fleischvergiftungsbakterien in fleisch und organen von schlachttieren auf grund systematischer untersuchungen uber den verlauf und den mechanismus der infektion des tierkorpers mit bakterien der enteritis und paratyphusgruppe, problem der bakterien auf experimenteller basis. *Centralb. F. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionkr. Abt. Orig.*, 62 :335-373.
- NESTORESCO, N., 1961. La résistance spécifique conférés par la vaccination antityphoparatyphoïdique, comparée à l'état d'immunité des anciens malades de fièvre typhoïd, critères d'appréciation de l'efficacité du vaccin T.A.B. *Arch. Roum. Pathol. Exper.*, 20 :321-333.
- NETTER, A., 1906a. Les inoculations préventives contre la fièvre typhoïd. III. Apparition de propriétés nouvelles dans le sang des inoculés. *Bull. Inst. Pasteur.*, 4 :921-927.
- NETTER, A., 1906b. Les inoculations préventives contre la fièvre typhoïd. *Bull. Inst. Pasteur.*, 4 :873-883.
- NORTON, J.F. & DINGLE, J.H., 1935. Virulence tests for typhoid bacilli and antibody relationships in antityphoid sera. *Amer. J. Pub. Hlth.*, 25 :609-617.
- OAKBERG, E.F., 1946. Constitution of liver and spleen as a physical basis for genetic resistance to mouse typhoid. *J. Infect. Dis.*, 78 :79-80.
- ØRSKOV, J.; JENSEN, K. & KOBAYASHI, K., 1928. Studien uber breslau infektion der mause, speziell mit rucksicht auf die bedeutung des retikuloendothelialgewebes. *Z. Immunforsch. Exp. Ther.*, 55 :34-68.
- PERRY H.M.; FINDLAY, H.T. & BENSTED, H.J., 1933a. Antityphoid inoculation. The role of *Bacterium typhosum*, strain Rawlings. *J. Roy. Army Mil. Corps.*, 60 :241-254.
- PERRY, H.M.; FINDLAY, H.T. & BENSTED, H.J., 1933b. Antityphoid inoculation. Observations on the variation of *Bacterium typhosum* in vivo. *J. Roy. Army Mil. Corps.*, 61 :81-89.
- PITTMAN, M. & BOHNER, H.J., 1966. Laboratory assays of different types of field trial typhoid vaccines and relationship to efficacy in man. *J. Bacteriol.*, 91 :1713-1723.
- PFEIFFER, R. & KOLLE, W., 1896a. Ueber die spezifische immunitats reaction der typhusbacillen. *Z. Hyg. Infectionskr.*, 21 :203-245.
- PFEIFFER, R. & KOLLE, W., 1896b. Experimentelle untersuchungen zur frager der schutzimpfung des menschen gegen typhus abdominalis. *Deut. Med. Wochenschr.*, 46 :735-737.
- POLISH Typhoid Committee, 1965. Evaluation of typhoid vaccines in the laboratory and in a controlled field trial in Poland. (Preliminary report). *Bull. W.H.O.*, 32 :15-27.
- RAETTING, H., 1971. L'immunisation "locale" au moyen de microorganismes inactivés, cent ans après la naissance de Besredka. *Bull. Inst. Pasteur.*, 69 :91-97.
- RAKE, G., 1935. Enhancement of pathogenicity of human typhoid organisms by mucin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 32 :1523-1524.
- RAPPORT d'un Group Scientifique de l'OMS, 1972. Les vaccins buccaux contre les entérobactéries. *O.M.S. Sér. Rapp. Tech. 500* :3-36.
- REITMAN, M., 1967. Infectivity and antigenicity of streptomycin dependent *Salmonella typhosa*. *J. Infect. Dis.*, 117 :101-107.
- REMLINGER, P., 1897. Fièvre typhoïd expérimentale par contamination alimentaire. *Ann. Inst. Pasteur.*, 11 :829-836.
- RESEARCH Laboratories of the Army Medical School. Immunization to Typhoid Fever. *Amer. J. Hig. Monographic Ser. n° 17*. The Johns Hopkins Press. Baltimore 1941.
- RICE, P.A.; BAINE, W.B. & GANGAROSA, E.Y., 1977. *Salmonella typhi* infections in United States, 1967-1972: increasing importance of international travelers. *Amer. J. Epidemiol.*, 106 :160-166.

- ROANTREE, R.J., 1967. *Salmonella* O antigens and virulence *Ann. Rev. Microbiol.*, 21 :443-466.
- ROWLEY, D. & JENKIN, C.R., 1962. Antigenic cross-reaction between host and parasite as a possible cause of pathogenicity. *Nature*, 193 :151-154.
- SATO, G., 1965. Infection of *Salmonella pullorum*, *Salmonella newington* or *Salmonella enteritidis* in laboratory rats by oral inoculation. *Jap. J. Vet. Res.*, 13 :19-32.
- SAVAGE, D.C. & DUBOS, R., 1968. Alterations in the mouse cecum and its flora produced by antibacterial drugs. *J. Exp. Med.*, 128 :97-110.
- SCHEDLER, R.W.; DUBOS, R.J. & COSTELO, R., 1965. Association of germ-free mice with bacteria isolated from normal mice. *J. Exp. Med.*, 122 :77-82.
- SMITH, H.W., 1965. The immunization of mice, calves and pigs against *Salmonella dublin* and *Salmonella cholerae -suis* infections. *J. Hyg. Camb.*, 63 :117-135.
- SPAUN, J., 1957. Typhoid vaccine. Vi antigen and Vi antibody. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. (Suppl. B.)* 123 :11-79.
- SPAUN, J., 1964. Studies on the influence of the route of immunization in the active mouse protection test with intraperitoneal challenge for potency assay of typhoid vaccines. *Bull. W.H.O.*, 31 :793-798.
- SPAUN, J. & UEMURA, K., 1964. International reference preparations of typhoid vaccine. A report on international collaborative laboratory studies. *Bull. W.H.O.*, 31 :761-771.
- SPRINZ, H., 1969. Pathogenesis of intestinal infections. *Arch. Pathol.*, 87 :556-562.
- SPRINZ, H.; GANGAROSA, E.J.; WILLIAMS, M.; HORNICK, R.B. & WOODWARD, T.E., 1966. Histopathology of the upper small intestines in typhoid fever: biopsy study of experimental disease in man. *Amer. J. Dig. Dis.*, 11 :615-624.
- SPRINZ, H.; LANDY, M.; GAINES, S. & EDSSAL, G. 1956a. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. Pathogenesis and development of the infection. *Fed. Proc.*, 15 :748.
- SPRINZ, H.; LANDY, M.; GAINES, S. & EDSSAL, G., 1956b. Experimental typhoid fever in chimpanzees. III. Pathogenesis. *Fed. Proc.*, 15 :614-615.
- STANDFAST, A.F.B., 1960. A report on the laboratory assays carried out at the Lister Institute of Preventive Medicine on the typhoid vaccines used in the field study in Yugoslavia. *Bull. W.H.O.*, 23 :37-45.
- TAPA, S. & CVJETANOVIĆ, 1975. Controlled field trial on the effectiveness of one and two doses of acetone-inactivated and dried typhoid vaccine. *Bull. W.H.O.*, 52 :75-80.
- TIGERTT, W.D., 1959. The initial effort to immunize american soldier volunteers with typhoid vaccine. *Mill. Med.*, 124 :342-349.
- TULLY, J.G.; GAINES, S. & TIGERTT, W.D., 1962. Attempts to induce typhoid fever in chimpanzees with non-Vi strains of *Salmonella typhosa*. *J. Infect. Dis.*, 110 :47-54.
- TULLY, J.G.; GAINES, S. & TIGERTT, W.D., 1963a. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. IV – Role of H antigen in protection. *J. Infect. Dis.*, 112 :118-124.
- TULLY, J.G.; GAINES, S. & TIGERTT, W.D., 1963b. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. V – Respiratory challenge of chimpanzees with *Salmonella typhosa*. *J. Infect. Dis.*, 113 :131-138.
- TULLY, J.G.; GAINES, S. & TIGERTT, W.D., 1965. Studies on infection and immunity in experimental typhoid fever. VI – Response of chimpanzees to endotoxin and the effect of tolerance on resistance to oral challenge. *J. Infect. Dis.*, 115 :445-455.

- TYPHOID Panel, UK Department of Technical Co-Operation, 1964. A controlled field trial of acetone dried and inactivated and heat-phenol-inactivated typhoid vaccines in British Guiana. *Bull. W.H.O.*, 30 :631-634.
- USHIBA, D.; SAITO, K.; AKIYAMA, T.; NAKANO, M.; SUGIYAMA, T. & SHIRONO, S., 1959. Studies on experimental typhoid bacterial multiplication and host cell response after infection with *Salmonella enteritidis* in mice immunized with live and killed vaccines. *Jap. J. Microbiol.*, 3 :231-242.
- VLĂDOIANU, I.R.; DIMACHE, G.; ANTOHI, S.; VLĂDOIANU, C. & ZARMA, O., 1965. Laboratory tests on the effectiveness of oral vaccination of young children against typhoid and paratyphoid A and B. *Bull. W.H.O.*, 32 :37-45.
- WEBSTER, L.T., 1933. Inherited and acquired factors in resistance to infection. II – A Comparison of mice inherently resistant or susceptible to *Bacillus enteritidis* infection with respect to fertility, weight, and susceptibility to various routes and types of infection. *J. Exptl. Med.*, 57 :819-843.
- WEIL, A.J. & GALL, L.S., 1941. Chemo-therapeutic and immuno-therapeutic testing of *Eberthella typhosa* in the developing chick embryo. *J. Immunol.*, 41 :445-452.
- WEIL, E. & FELIX, A., 1920. Ueber den doppeltyphus der rezeptoren in der typhus-paratyphus-gruppe. *Z. Immunonitatsforsch. Exper. Therap.*, 29 :24-91.
- WEIL, E.; FELIX, A. & MITZENMACHER, F., 1918. Ueber die doppelnatur der rezeptoren in der typhus-paratyphus-gruppe. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 31 :1226-1228.
- WELCH H.; OSTROLENK, M. & BARTRAM, M.T., 1941. Role of rats in the spread of food poisoning bacteria of the *Salmonella* group. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 31 :332-340.
- WIDAL, M.F., 1896. Sérodiagnostic de la fièvre typhoid. *Semaine Médic.*, 16 :259.
- WRAY, C.; SOJKA, W.J.; MORRIS, J.A. & MORGAN, W.J.B., 1977. The immunization of mice and calves with gal E mutans of *Salmonella typhimurium*. *J. Hyg. Camb.*, 79 :17-24.
- WRIGHT, A.E., 1896. On the association of serous haemorrhages with condition of defective blood-coagulability. *Lancet.*, 2 :807-809.
- WRIGHT, A.E., 1904. A short treatise on anti-typhoid inoculation. p. 27-31. Westminster: Archibald Constable & Co., Ltd.
- YUGOSLAV Typhoid Commission, 1957. Field and laboratory studies with typhoid vaccines. (A preliminary report). *Bull. W.H.O.*, 16 :897-910.
- YUGOSLAV Typhoid Commission, 1962. A controlled field trial of the effectiveness of phenol and alcohol typhoid vaccines. (Final Report). *Bull. W.H.O.*, 26 :357-369.
- YUGOSLAV Typhoid Commission, 1964. A controlled field trial of the effectiveness of acetone-dried inactivated and heat-phenol inactivated typhoid vaccines in Yugoslavia. *Bull. W.H.O.*, 30 :623-630.