

DOSAGEM DE ANTITOXINA DIFTÉRICA CIRCULANTE PELA REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA E SUA RELAÇÃO COM A PROVA DE SCHICK EM ESTUDANTES DE MEDICINA

José da Silva GUEDES ⁽¹⁾
Sebastião Timo IARIA ⁽²⁾
Luis G. COTILLO Z. ⁽³⁾
José Antonio Alves dos SANTOS ⁽⁴⁾
Geraldo Paulo BOURROUL ⁽⁵⁾

RESUMO

Nêste estudo relacionou-se a prova de Schick à dosagem de antitoxina diftérica circulante pela reação da hemaglutinação passiva. Foram escolhidos para esta pesquisa, os alunos do 2.º ano da Faculdade de Ciências Médicas dos Hospitais da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, grupo que em breve passaria a frequentar enfermarias de doenças transmissíveis. Estes alunos não forneceram informações precisas sobre vacinações anti-diftéricas anteriores. A prova de Schick feita em 118 alunos de ambos os sexos, cuja idade variou entre 19 e 30 anos, revelou 35 (29,7%) Schick-positivos, 76 (64,4%) Schick-negativos e 7 (5,9%) com pseudo-reações. Não se observaram reações combinadas. O nível de antitoxina diftérica circulante foi determinado no sêro de 110 dos 118 estudantes, dos quais 35 foram Schick-positivos, 69 Schick-negativos e 6 apresentaram pseudo reações. Dos 35 Schick-positivos, 27 (77,1%) revelaram títulos inferiores a 0,01 UA/ml de sêro e 8 (22,9%) níveis iguais ou superiores a 0,01 UA/ml. Dos 69 Schick-negativos, 51 (73,9%) mostraram-se com níveis iguais ou superiores a 0,01 UA/ml e 18 (26,1%) com títulos inferiores àquele nível. Dos 6 indivíduos que revelaram pseudo-reações, 5 (83,4%) apresentaram nível antitóxico igual ou superior a 0,01 UA/ml e apenas 1 (16,6%) título inferior a 0,01 UA/ml. A prova de hemaglutinação passiva mostrou-se um método aceitável. Poderia ser usado na evidencição da suscetibilidade à difteria, em grupos populacionais, dada a sua simplicidade e rapidez de execução.

Recebido para publicação em 20-4-1966.
Trabalho das Cadeiras de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Dácio de Almeida Christovão) e Epidemiologia e Profilaxia Gerais e Especiais (Prof. Subst. Ary Walter Schmid) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP, e do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas dos Hospitais da Santa Casa de Misericórdia de S. Paulo (Prof. Augusto Leopoldo Ayroza Galvão).

(1) Assistente do Departamento de Medicina Social da F.C.M.S.C.; Instrutor de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.

(2) Instrutor da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas.

(3) Instrutor da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas; Catedrático Auxiliar de Microbiologia-Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Peru.

(4) Professor Assistente da Cadeira de Epidemiologia e Profilaxia Gerais e Especiais.

(5) Assistente do Departamento de Medicina Social da F.C.M.S.C.; Instrutor de Medicina Preventiva da Faculdade de Medicina da USP.

INTRODUÇÃO

A difteria, entre nós, continua a ocupar lugar de destaque entre os problemas sanitários de maior importância.

No último quinquênio (1961-1965) ocorreram no Município de São Paulo, 2.218 casos com 155 óbitos, conforme os registros da Seção de Epidemiologia e Profilaxia Gerais da Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, onde se verifica que, embora a incidência seja maior no grupo etário de 0 a 5 anos, também há elevada morbidade entre indivíduos de grupos etários maiores.

Inquéritos anteriores têm mostrado, por meio da prova de Schick, altas percentagens de suscetíveis entre escolares primários de 7 a 14 anos^{2,6}.

Diante desses resultados, o Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas dos Hospitais da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (F.C.M.S.C.), tendo em vista que os alunos do 3.º ano do Curso Médico passariam a frequentar enfermarias de doenças transmissíveis, envolvendo com isto um risco decorrente do contato com casos de difteria, resolveu avaliar o estado imunitário dos mesmos, em relação a esta doença, por meio da prova de Schick. Dos 113 estudantes submetidos à esta prova, 42 (37,2%) mostraram-se Schick-positivos.

Tendo-se encontrado tão elevada taxa de Schick-positivos, resolveu-se realizar a prova de Schick nos alunos do 2.º ano, com o objetivo de se vacinar em tempo útil aqueles que se mostrassem suscetíveis.

Evidentemente a maneira mais correta de se avaliar o estado imunitário em relação à difteria seria a medida do nível antitóxico circulante, classicamente feita por prova intradérmica de neutralização em coelho, que apresenta porém inconvenientes de ordem prática na sua execução.

Dadas as recentes aplicações da reação de hemaglutinação passiva na dosagem de antitoxina diftérica em soros humanos^{2,7,13} resolveu-se usar esta técnica para a determinação dos níveis de anti-

toxina circulante nos soros daqueles estudantes, com o fim de comparar os resultados com os da prova de Schick. Aquela técnica foi escolhida por revelar resultados concordantes com a titulação feita em coelho^{3,7,13} e apresentar a vantagem de ser mais simples, mais rápida e menos dispendiosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Prova de Schick — A prova de Schick foi feita em 118 estudantes do 2.º ano da F.C.M.S.C., segundo a técnica clássica, utilizando-se a toxina de prova e a toxina controle, preparadas no Instituto Butantan. A toxina de prova foi inoculada na dose de 0,1 ml. por via intradérmica, contendo 1/50 dmm. A mesma dose e a mesma via foram usadas para a inoculação da toxina controle. As leituras foram realizadas após 3 e 7 dias com a finalidade de se observar as reações positivas, negativas, combinadas e pseudo-reações.

Reação de hemaglutinação passiva — A dosagem de antitoxina diftérica circulante através da prova de hemaglutinação passiva foi realizada em soros de 110 dos 118 estudantes submetidos à prova de Schick, sendo 96 alunos do sexo masculino e 14 do sexo feminino.

a) **Hemácias humanas** — Na hemaglutinação passiva usaram-se hemácias humanas de doadores do tipo O, Rh negativas, conservadas em A.C.D., em geladeira a 4°C, cedidas pelo Banco de Sangue do Hospital das Clínicas de São Paulo. Estas hemácias contavam sempre com mais de uma semana e não mais de um mês após a sua coleta.

b) **Soluções tamponadas** — Usaram-se soluções tamponadas fosfatadas com pH 7,2 e 6,4. Estas soluções a 0,15 M foram preparadas a partir de soluções estoques de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, ambas a 0,3 M. Preparou-se também uma solução salina tamponada fosfatada, de pH 7,2,

misturando-se 4 partes de solução salina a 0,85% com 1 parte de solução tampão de fosfatos com pH 7,2. Estas soluções foram todas mantidas em geladeira a 4-6°C.

- c) **Solução de ácido tânico** — Preparou-se solução mãe de ácido tânico a 1/1.000 em água destilada que era mantida a 4-6°C ao abrigo da luz e substituída cada 15 dias. A partir desta solução mãe, por diluição a 1/20 em salina tamponada fosfatada, de pH 7,2, prepararam-se, diariamente, as soluções de ácido tânico a 1/20.000.
- d) **Antígeno** — Utilizou-se como antígeno o toxóide diftérico purificado, partida n.º 896A contendo 181,3 Lf/ml, preparado e cedido pelo Instituto Pinheiros Produtos Terapêuticos S. A. Este toxóide foi dialisado a 4-6°C durante três dias em solução salina tamponada fosfatada, de pH 7,2, substituída diariamente, para se retirar substâncias inibidoras da hemaglutinação por ventura presentes.
- e) **Antitoxina diftérica padrão** — Foi usada uma antitoxina padrão contendo 565 UA/ml também preparada pelo Instituto Pinheiros Produtos Terapêuticos S. A. Antes de ser usada foi dialisada nas mesmas condições do toxóide diftérico, para a eliminação de substâncias conservadoras rotineiramente adicionadas aos produtos biológicos.
- f) **Soros humanos** — As amostras de sangue foram coletadas momentos antes da inoculação da toxina de Schick e os soros mantidos em congelador a -20°C.
- g) **Sêro normal de coelho** — O sêro normal de coelho foi obtido pela sangria de vários coelhos normais, absorvido com hemácias humanas do tipo O, Rh negativas. A absorção foi realizada misturando-se partes iguais de sêro normal de coelho e de hemácias humanas lavadas três vê-

zes com A.C.D. Após um contáto de 10 minutos em temperatura ambiente procedeu-se a centrifugação e o sobrenadante foi decantado. Em seguida êste sêro absorvido, depois de inativado em banho-maria a 56°C por 30 minutos, foi diluído a 1% em solução salina tamponada de pH 7,2. Esta solução foi sempre mantida a 4-6°C e substituída semanalmente.

- h) **Técnica da hemaglutinação passiva** — O método usado neste estudo foi o preconizado por Stavitsky¹⁴ com ligeiras modificações.

As hemácias após serem lavadas três vêzes com A.C.D., foram ressuspensas em salina tamponada fosfatada, de pH 7,2, de forma a se obter uma suspensão a 3%. Esta suspensão pode ser mantida por 2 dias quando conservada em geladeira a 4-6°C.

A taninização das hemácias foi feita misturando-se partes iguais da suspensão de hemácias a 3% e da solução de ácido tânico a 1/20.000, deixando-se em contato por 10 minutos em banho-maria a 37°C. Após êste tempo de contato, as hemácias foram centrifugadas a 1.500 rpm por 15 minutos e o sobrenadante desprezado e substituído por solução salina tamponada, de pH 7,2, para proceder-se à lavagem das hemácias. Após nova centrifugação por 5 minutos a 1.500 rpm, em tubo graduado, o sobrenadante foi desprezado e as hemácias ressuspensas a 2,5% em solução salina tamponada fosfatada de pH 7,2. Esta suspensão foi conservada a 4-6°C por 24 horas no máximo.

A sensibilização foi realizada misturando-se 1 parte de suspensão a 2,5% de hemácias taninizadas com 4 partes de toxóide diftérico diluído a 1/6 (30,2 Lf/ml) em solução tamponada fosfatada de pH 6,4. Esta concentração de toxóide foi escolhida após serem experimentadas várias concentrações, inclusive as referidas por Landy e colaboradores⁷, Schubert e Cornell,¹³ Butler² e Chatterjee³. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida lavada

duas vezes com solução de soro normal de coelho a 1%.

As hemácias sensibilizadas foram res-suspensas a 2,5% em solução de soro normal de coelho a 1% e a suspensão final conservada por 48 horas a 4-6°C.

Os soros humanos foram descongelados rapidamente colocando-se os tubos em água corrente por alguns minutos e inativados em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Em seguida, partindo-se de 0,5 ml de cada soro, prepararam-se diluições com fator 2, em tubos 12x75 mm, usando-se 0,5 ml de soro normal de coelho a 1% como diluente. O volume final em cada tubo era de 0,5 ml e se juntou a seguir, a cada um, 0,05 ml da suspensão a 2,5% de hemácias humanas sensibilizadas. Após agitação de aproximadamente 30 segundos, os tubos foram mantidos a temperatura ambiente. As leituras da hemaglutinação foram feitas segundo o padrão estabelecido por Stavitsky¹⁴, após 2 e 18 horas, considerando-se a recíproca da maior diluição de soro que correspondesse à leitura de ++ como o título hemaglutinante do soro.

Na reação foram incluídos como controles, misturas compostas de 0,5 ml de soro normal de coelho a 1% mais 0,05 ml de suspensão de hemácias humanas a 2,5% sensibilizadas e de 0,5 ml de soro normal de coelho a 1% mais 0,05 ml de suspensão de hemácias humanas a 2,5% taninizadas.

As dosagens dos soros humanos foram sempre acompanhadas da dosagem da antitoxina padrão. A antitoxina pa-

drão contendo 565 UA/ml foi inicialmente diluída de forma a se ter 1 UA/ml. Partindo-se desta diluição inicial prepararam-se diluições desde 10⁻¹ até 10⁻⁴ com intervalos logarítmicos de 0,1⁵. Em seguida, em uma série de tubos colocou-se em cada um 0,5 ml de cada diluição; isto foi sempre feito em duplicata. Todos os tubos receberam a seguir, 0,05 ml de suspensão de hemácias a 2,5% sensibilizadas. A incubação e as leituras foram realizadas da mesma forma descrita para a titulação dos soros humanos.

Com base nos resultados da dosagem da antitoxina padrão, estabeleceu-se cada vez um fator que foi utilizado para converter os títulos hemaglutinantes obtidos nos soros humanos, em unidades antitóxicas por ml. Com esta finalidade, converteram-se os títulos hemaglutinantes obtidos em cada uma das séries de diluições de antitoxina padrão em UA/ml e calculou-se a média aritmética de ambos os valores. Dado o fato da prova ter sido realizada utilizando-se 0,5 ml de cada diluição, a média encontrada foi multiplicada por dois a fim de se referir o resultado ao volume de 1 ml de antitoxina padrão.

O cálculo do nível de antitoxina diftérica circulante por ml nos soros humanos foi feito multiplicando-se o valor da recíproca do título hemaglutinante, pelo fator acima referido.

RESULTADOS

Na Tabela I estão relacionados os resultados das provas de Schick rea-

TABELA I
Resultados das provas de Schick em 118 alunos do 2.º ano da F.C.M.S.C. — 1965

Provas de Schick						
Positivas		Negativas		Pseudo-reações		Total
n.º	%	n.º	%	n.º	%	
35	29,7	76	64,4	7	5,9	118

lizadas nos 118 alunos do 2.º ano da F.C.M.S.C. e os respectivos percentuais.

Verifica-se na Tabela I que dos 118 indivíduos submetidos à prova de Schick, 35 (29,7%) revelaram reação positiva, 76 (64,4%) reação negativa e 7 (5,9%) pseudo-reação. Não foram observadas reações combinadas.

Procedeu-se à determinação dos níveis de antitoxina circulante, pela reação de hemaglutinação passiva, nos soros de 110 dos 118 alunos submetidos à prova de Schick. Tais alunos compreendem 69 (62,7%) Schick-positivos, 35 (31,8%) Schick-negativos e 6 (5,5%) com pseudo-reação.

Na Tabela II se encontra a distribuição dos alunos segundo os resultados da prova de Schick e os níveis de antitoxina diftérica circulante medidos pela reação de hemaglutinação passiva.

tinção passiva, variaram entre menos de 0,004 UA/ml e 2,56 UA/ml nos soros dos indivíduos Schick-positivos e entre menos de 0,004 UA/ml e 10,24 UA/ml nos dos Schick-negativos; nos soros dos indivíduos com pseudo-reação os níveis oscilaram entre menos de 0,004 UA/ml e 81,92 UA/ml.

Landy e colaboradores⁷ estudaram, em soros humanos, a relação existente entre os níveis de antitoxina diftérica circulante obtidos com a prova intradérmica de neutralização em coelho e os encontrados pelo método da hemaglutinação passiva. Verificaram estes autores que os valores obtidos pelas duas técnicas mostraram uma correlação positiva e através da análise de variância aceitaram que ambos os processos se equivalem (ao nível de 0,1%).

Estas observações foram confirmadas por Schubert e Cornell¹³ que estuda-

TABELA II
Distribuição dos alunos da F.C.M.S.C. segundo os resultados da prova de Schick e os níveis de antitoxina diftérica circulante medidos pela reação de hemaglutinação passiva, em UA/ml. — 1965

Títulos UA/ml	Prova de Schick			Total
	Positiva	Negativa	Pseudo-reação	
< 0,004	26	16	1	43
0,006	1	2		3
0,01	5	7		12
0,02		4	2	6
0,05		1		1
0,1		1		1
0,16		3		3
0,32		5		5
0,64	1	7		8
0,82		1		1
1,28	1	7		8
2,56	1	8	1	10
5,12		6		6
10,24		1	1	2
81,92			1	1
Total	35	69	6	110

Na Tabela II pode-se verificar que os níveis de antitoxina diftérica circulante, determinados pela reação de hemaglu-

ram também a relação entre os resultados obtidos por estes dois processos de dosagem de antitoxina circulante. Estes

autores dividiram os indivíduos por êles examinados segundo os resultados da Prova de Schick e os níveis de antitoxina diftérica circulante obtidos na dosagem dos respectivos soros, classificando-os em < ou > que 0,01 UA/ml.

No presente estudo os indivíduos examinados foram agrupados seguindo-se o critério de Schubert e Cornell¹³ e isto pode ser observado na Tabela III. Os indivíduos que apresentaram teor antitóxico circulante igual a 0,01 UA/ml foram incluídos no grupo classificado como tendo mais que 0,01 UA/ml dada a probabilidade daqueles indivíduos possuírem, realmente, título compreendido entre 0,01 UA/ml e o nível imediatamente superior pesquisado.

riaram entre 19 e 30 anos sendo a média de 22 anos aproximadamente. Neste grupo verificou-se uma percentagem de indivíduos Schick-positivos considerada alta, a exemplo dos resultados do inquérito realizado nos alunos do 3.º ano da mesma escola.

A determinação dos níveis de antitoxina diftérica circulante, pela reação da hemaglutinação passiva, realizada em 110 dos 118 estudantes acima referidos, mostrou que dos 35 indivíduos Schick-positivos 27 (77,1%) apresentaram título antitóxico inferior a 0,01 UA/ml e 8 (22,9%) igual ou superior a êsse nível; dos 69 Schick-negativos, 18 (26,1%) revelaram nível inferior a 0,01 UA/ml enquanto que 51 (73,9%) apresentaram título igual ou

TABELA III

Distribuição dos alunos da F.C.M.S.C., segundo os resultados da prova de Schick, e título de antitoxina diftérica menor ou maior que 0,01 UA/ml, determinado pela reação de hemaglutinação passiva — 1965

UA/ml \ Schick	< 0,01		> 0,01		Total
	n.º	%	n.º	%	n.º
Positivos	27	77,1	8	22,9	35
Negativos	18	26,1	51	73,9	69
Pseudo-reação	1	16,6	5	83,4	6
Total	46	41,8	64	58,2	110

DISCUSSÃO

Dos 118 alunos da F.C.M.S.C., submetidos à prova de Schick, 35 (29,7%) revelaram-se Schick-positivos enquanto que 76 (64,4%) mostraram-se Schick-negativos e 7 (5,9%) apresentaram pseudo-reações. Não foram observadas reações combinadas.

Convém ressaltar-se que não se obtiveram informações precisas com referência a vacinações antidiftéricas anteriores nos indivíduos por nós examinados. Por outro lado, salienta-se que as idades va-

superior a 0,01 UA/ml; dos 6 alunos com pseudo-reação, 1 (16,6%) tinha nível inferior a 0,01 UA/ml e 5 (83,4%) mostraram-se com título igual ou superior a 0,01 UA/ml de antitoxina diftérica circulante.

O encontro de 8 indivíduos Schick-positivos com título igual ou superior a 0,01 UA/ml poderia ser atribuído a resultados falsos positivos, fato êste já referido por vários autores^{4 1 9 10 11}.

Com relação aos níveis encontrados nos soros dos indivíduos que apresenta-

ram pseudo-reações, considerados sempre como imunes, embora hipersensíveis a substâncias presentes nas toxinas empregadas na prova de Schick, os resultados obtidos através da reação de hemaglutinação passiva estariam de acordo com o esperado, pois tivemos apenas um caso discordante. Ressalta-se entretanto o pequeno número de observações.

Schubert e Cornell¹³ estudando a relação entre os níveis encontrados nas dosagens de antitoxina diftérica circulante em coelhos e os revelados pela hemaglutinação passiva, verificaram que 80% dos Schick-negativos tinham 0,01 UA/ml ou mais, nas provas «in vivo», enquanto somente 42% apresentavam este nível nas de hemaglutinação passiva.

No presente estudo verificou-se que dos 69 indivíduos Schick-negativos examinados, 51 (73,9%) revelaram níveis de antitoxina diftérica circulante iguais ou superiores a 0,01 UA/ml pela prova de hemaglutinação passiva.

Com relação aos Schick-positivos, aqueles autores, em 18 casos estudados, verificaram que todos, com exceção de um, apresentaram títulos menores que 0,01 UA/ml, tanto na prova «in vivo» quanto na hemaglutinação passiva.

No nosso estudo, de 35 indivíduos Schick-positivos, 27 (77,1%) revelaram níveis inferiores a 0,01 UA/ml na reação de hemaglutinação passiva.

As discordâncias por nós obtidas em relação aos resultados apresentados por Schubert e Cornell¹³, poderiam ser atribuídas ao modo diverso de obtenção do fator de conversão do título hemaglutinante em UA/ml. Enquanto aqueles autores empregaram na padronização, diluições seriadas usando o fator 2, o nosso fator de conversão foi obtido usando-se diluições com intervalos logarítmicos de 0,1 de acordo com o processo apresentado por Landy e colaboradores⁷.

Vários autores^{4,8} têm encontrado discordâncias entre a dosagem do nível de antitoxina circulante e os resultados da prova de Schick, mostrando provas positivas em indivíduos com títulos altos e

provas negativas em indivíduos com títulos baixos.

Diante destes fatos, admite-se que a maneira mais correta para se avaliar o estado imunitário em relação à difteria seria dosar o teor de antitoxina circulante.

Tendo sido já demonstrada uma boa concordância dos resultados das dosagens da antitoxina feitas pela prova em coelho e pela hemaglutinação passiva e levando-se em conta as vantagens de ordem prática que esta apresenta, a prova de hemaglutinação passiva mostra-se aceitável para a avaliação da suscetibilidade à difteria em grupos populacionais.

CONCLUSÕES

Os resultados das provas de Schick e das dosagens de antitoxina diftérica circulante pela reação de hemaglutinação passiva, realizadas no presente trabalho, nos permitem apresentar as seguintes conclusões:

Dos 118 estudantes do 2.º ano de medicina, 35 (29,7%) revelaram-se Schick-positivos, 76 (64,4%) mostraram-se Schick-negativos e 7 (5,9%) apresentaram pseudo-reação. Não se constatarem reações combinadas.

Dos 35 Schick-positivos, 27 (77,1%), revelaram níveis inferiores a 0,01 UA/ml de soro e 8 (22,9%) níveis iguais ou superiores a 0,01 UA/ml. De 69 Schick-negativos, 51 (73,9%) mostraram níveis iguais ou superiores a 0,01 UA/ml e 18 (26,1%) níveis inferiores a 0,01 UA/ml. De 6 indivíduos com pseudo-reação, 5 (83,4%) apresentaram níveis iguais ou superiores a 0,01 UA/ml e 1 (16,6%) nível inferior.

A elevada percentagem de suscetíveis encontrada neste estudo, vem ressaltar a importância da recomendação de se pesquisar a suscetibilidade à difteria no pessoal médico, para-médico, bem como em todas aquelas pessoas que venham a frequentar enfermarias de doenças transmissíveis, antes de entrarem em contato com tal ambiente.

A prova de hemaglutinação passiva mostrou-se um método aceitável e que

poderia ser usado na evidenciação da suscetibilidade à difteria, em grupos populacionais, dada a sua simplicidade e rapidez de execução.

SUMMARY

The results of the Schick tests and the levels of diphtheria antitoxin as determined by passive hemagglutination test were compared. For this investigation, the 2nd year students of the «Faculdade de Ciências Médicas dos Hospitais da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo» (Brazil) were chosen, as they would soon be subject to contact in communicable disease wards. It was not possible to obtain precise information regarding their diphtheria immunization history. The Schick test was performed in 118 students, 19-30 years old of both sexes showing 35 (29.7%) Schick-positives, 76 (64.4%) Schick-negatives and 7 (5.9%) pseudo-reactors. No combined reaction was observed. The circulating diphtheria antitoxin levels were determined in the sera from 110 of the 118 students. These 110 students comprised 35 Schick-positives, 69 Schick-negatives and 6 pseudo-positive reactions. From of the 35 Schick-positives, 27 (77.1%) had antitoxic levels below 0.01 U./ml and 8 (22.9%) had titers of 0.01 U./ml or more. Of the 69 Schick-negatives 51 (73.9%) showed antitoxic levels of 0.01 U./ml or more and 18 (26.1%) had titers below 0.01 U./ml. Of the 6 subjects with pseudo-positive reactions, 5 (83.4%) showed antitoxic titers of 0.01 U./ml or more and one had less than 0.01 U./ml. The passive hemagglutination test revealed itself as an acceptable method. It might be useful in revealing diphtheria susceptibility in mass studies, as it is simply and rapidly performed.

AGRADECIMENTOS

Aos alunos do 2.º ano da Faculdade de Ciências Médicas dos Hospitais da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, o nosso reconhecimento pelo apoio prestado à realização desta pesquisa, submetendo-se à prova de Schick e doando o seu sangue para as dosagens de antitoxina.

Aos Drs. Alcino Corrêa (do Instituto Piniheiros) e Oswaldo Melone (do Hospital das Clínicas) e à Srta. Rosa Frederico de Carvalho,

técnica da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas da F.H.S.P., o nosso agradecimento pela colaboração prestada na execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUNCH, C. P. et al. — Studies on the immunization of adults with diphtheria toxoid. *J. Immunol.*, 39(5): 427-440, Nov. 1940.
2. BUTLER, W. T. — Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. Effect of Bisdiazobenzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen. *J. Immunol.*, 90(5): 663-671, May 1963.
3. CHATTERJEE, S. C. — A comparative study of the hemagglutination and bioassay procedures for the assay of Guinea-pig anti-diphtheria and anti-tetanus sera. *Ind. Jour. Med. Res.*, 52(12): 1241-1249, Dec. 1964.
4. COHEN, P., SCHNECK, H. & DUBOW, E. — False positive reactions to the Schick test. *JAMA*, 142(6): 390-392, Feb. 1950.
5. HORSFALL, F. L. & TAMM, I. — Fractional dilution procedure for precise titration of hemagglutinating viruses and hemagglutination-inhibiting antibodies. *Jour. Immunol.* 70(3): 253-259, March 1953.
6. IARIA, S. T. & SANTOS, J. A. A. dos — Dosagem de antitoxina diftérica circulante e prova de Schick em crianças escolares não vacinadas, internadas em uma instituição de assistência à infância no Município de S. Paulo (1962). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 18(2): 119-132, jun./dez. 1964.
7. LANDY, M. et alii — Comparison of a hemagglutination procedure and the rabbit intradermal neutralization test for the assay of diphtheria antitoxin in human sera. *Am. J. Hyg.*, 61(2): 143-154, Mar. 1955.
8. MOLONEY, P. J. & FRASER, C. J. — Immunization with diphtheria toxoid (Antitoxine Ramon). *Am. J. Publ. Hlth*, 17(10): 1027-1030, Oct. 1927.
9. PAPPENHEIMER, A. M., Jr. & LAWRENCE, S. H. — Immunization of adults with diphtheria toxoid II. An analysis of the pseudo reactions to the Schick test. *Am. J. Hyg.*, 47(2): 233-240, Mar. 1948.
10. ——— et alii — A study of reactions following administration of crude and purified diphtheria toxoid in an adult population. *Am. J. Hyg.*, 52(3): 353-370, Nov. 1950.
11. ———. Use of diphtheria toxin and toxoid in the study of immediate and delayed hypersensitivity in man. *J. Immunol.*, 75(4): 259-264, Apr. 1955.

GUEDES, J. da S. *et alii* — Dosagem de antitoxina diftérica circulante pela reação de hemaglutinação passiva e sua relação com a prova de Schick... *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, **20**:107-115, 1966.

12. SANTOS, J. A. A. dos — Contribuição para o conhecimento da epidemiologia da difteria no Município de São Paulo, 1963. (Tese de Doutorado — Fac. Hig. Saúde Pública Univ. S. Paulo).
13. SCHUBERT, J. H. & CORNELL, R. G. — Determination of diphtheria and tetanus antitoxin by the hemagglutination test in comparison with tests in vivo. *J. Lab. & Clin. Med.*, **52**(5): 737-743, Nov. 1958.
14. STAVITSKY, A. B. — Micromethods for the study of proteins and antibodies. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein - treated red blood cells. *J. Immunol.*, **72**(5): 360-367, May 1954.