

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 SÃO PAULO (1962)*

SEBASTIÃO TIMO IARIA ** e JOSÉ ANTONIO ALVES DOS SANTOS ***

INTRODUÇÃO

De há muito constitui a difteria em nosso município, sério problema sanitário a reclamar adequada solução. Altamente endêmica em São Paulo, apresenta exacerbações periódicas na sua incidência, tendo se verificado em 1959 uma epidemia em que cêrca de 2.000 casos e 154 óbitos foram registrados pela SEPG¹⁰.

Estudando essa epidemia, Santos¹⁰ verificou que uma elevada percentagem desses casos ocorria em escolares de 7 a 9 anos de idade.

Com base nos estudos de um grupo de peritos da OMS⁸, reunido em 1950, que considerou a prova de Schick como o método mais prático para avaliar o estado imunitário da coletividade com relação à difteria, Santos realizou, em 1960/61, um inquérito por meio da prova de Schick entre os alunos das primeiras séries de alguns grupos escolares do Município de São Paulo.

Tal inquérito revelou alta percentagem de suscetíveis (41,4%), taxa esta que ultrapassou 50% em determinados estabelecimentos de ensino.

Segundo Topley & Wilson¹¹, o "grau de imunidade revelado pelos indivíduos Schick-negativos está longe de ser absoluto".

Parish⁹, grande autoridade no assunto, fazendo uma revisão da posição atual da prova de Schick, considera-a "um pobre indicador quantitativo da antitoxina circulante" e acentua que "correlação entre a

Recebido para publicação em 26-11-1964.

* Trabalho da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas (Prof. Dácio de Almeida Christovão) e da Cadeira de Epidemiologia e Profilaxia Gerais e Especiais (Prof. Augusto Leopoldo Ayroza Galvão) da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP. Apresentado na Sessão de 4-5-64, do Departamento de Higiene e Medicina Tropical da Associação Paulista de Medicina.

** Instrutor da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas.

*** Professor Assistente da Cadeira de Epidemiologia e Profilaxia Gerais e Especiais.

prova de Schick e o título antitóxico varia em diferentes indivíduos e um nível de antitoxina, marcando a transição entre suscetibilidade e imunidade, não existe". E acrescenta: "a ocorrência de difteria em pessoas Schick-negativas tem também abalado bastante a reputação quanto à validade que esta prova tinha anteriormente; aceita-se agora que a reação negativa não é garantia absoluta de imunidade".

Em que pese a abalada opinião desses autores, acreditamos que, em Saúde Pública, a proporção de Schick-positivos numa comunidade tem, inegavelmente, grande valor. Isto porque os Schick-positivos têm, com exceções, título antitóxico inferior ao nível médio considerado capaz de neutralizar a toxina de Schick inoculada, e que, segundo o próprio Parish, é de 1/200 UA por ml de sangue, nível esse tido como aquele que distinguiria as pessoas imunes das suscetíveis, não obstante outros autores como Zinsser¹⁴, Carter e Smith³, por exemplo, considerarem-no como sendo entre 1/500 e 1/250 UA/ml.

Tendo em vista tais conceitos, procuramos dosar a antitoxina diftérica circulante em crianças não submetidas à vacinação, relacionando-a à prova de Schick.

MATERIAL E MÉTODOS

Elegemos, como campo das nossas observações, meninas internadas em uma instituição de assistência à infância assistidas pelo Centro de Aprendizado da Faculdade de Higiene e Saúde Pública.

O nosso estudo foi feito em crianças entre 4 e 12 anos de idade, do sexo feminino, não vacinadas contra a difteria, realizando-se a prova de Schick e a dosagem de antitoxina diftérica no soro.

Foi feita a prova de Schick em 65 crianças e a dosagem de antitoxina se restringiu a 51.

Antes da inoculação da toxina para a prova de Schick, foram colhidos de cada criança 8 ml de sangue para a posterior determinação do título de antitoxina. No laboratório, os soros obtidos foram conservados em congelador a -70°C até o momento de serem usados na dosagem.

Prova de Schick — Para a prova de Schick foi utilizada a toxina para a reação de Schick, do Instituto Butantã, distribuída em ampolas de cor âmbar de 1 ml. É uma toxina padronizada, diluída de modo a conter em 0,1 ml da solução, 1/50 da d.m.m. para cobaia de 250 g de peso.

O controle da prova de Schick foi feito com a mesma toxina, porém inativada pelo aquecimento a fim de se detectar reações alérgicas, preparada igualmente por aquele Instituto.

Para a inoculação, na falta de seringas "Record" de êmbolo metálico, mais apropriadas para provas cutâneas, usamos seringas semelhantes às usadas nas provas de tuberculina, com capacidade de 1,0 ml, graduadas em décimos, e agulhas finas (10-5) de bisel curto, para propiciar inoculações rigorosamente intradérmicas.

As leituras foram feitas sistematicamente no 3.^o dia após a inoculação para se observar reações alérgicas (mais precoces) e no 7.^o dia, com vistas às reações indicativas de suscetibilidade diftérica (mais evidentes no 4.^o ou 5.^o dia).

Titulação da antitoxina diftérica — O método usado neste estudo é o indicado por Frobisher¹ e que, segundo este autor, baseia-se naqueles descritos por Glenny e Llewelyn-Jones, Fraser e Jensen.

Como era nosso propósito determinar níveis de antitoxina até 1/500 UA por ml, procedemos, inicialmente, à padronização da toxina que seria usada nas dosagens dos soros, com a determinação da dose Lr diante de 1/500 UA.

Utilizamos para isso uma toxina diftérica já estabilizada e o soro padrão internacional, este último preparado pelo Serum Institute de Copenhagen e contendo 10 UA por ml, ambos gentilmente cedidos pelo Instituto Pinheiros Produtos Terapêuticos S.A.

Determinação da dose Lr da toxina diftérica frente a 1/500 UA padrão — A 1 ml de diferentes diluições de toxina foi adicionado 1 ml de soro padrão diluído de modo a conter 1/500 UA por ml.

Após um contato de 1 hora a 37°C e 18 horas em geladeira a 4°C, procedemos à inoculação de 0,2 ml da mistura por via intradérmica em coelho, usando para tal seringas do tipo tuberculina e agulhas 10-5.

As leituras, sempre feitas 48 horas após a inoculação, tinham por finalidade verificar o aparecimento de uma reação eritematosa com cerca de 1 cm de diâmetro.

Várias diluições da toxina foram testadas até se conseguir uma capaz de determinar o eritema com a dimensão desejada.

Finalmente, a toxina que seria usada no estudo mostrou uma dose Lr frente a 1/500 UA, na diluição a 1/640. Assim sendo, na determinação dos níveis de antitoxina, a toxina foi sempre diluída a 1/640.

Determinação dos níveis de antitoxina diftérica circulante — Foram dosados os níveis de antitoxina diftérica circulante em 51 crianças submetidas à prova de Schick.

Momentos antes do início da dosagem, os soros foram descongelados, colocando-se os tubos em água fria corrente, por alguns minutos.

Como operação inicial foram feitas as várias diluições necessárias, em solução fisiológica a 0,85%, ou sejam:

- a) diluição do soro a 1/3, 1/9, 1/27, 1/81, 1/243, 1/486 e 1/729, correspondentes aos vários títulos testados e que estão relacionados na tabela 1;
- b) diluição da toxina (estabilizada e padronizada) a 1/640;
- c) diluição do soro padrão internacional a 1/5000 de maneira a conter 1/500 UA por ml.

Posteriormente, numa série de tubos, a 0,5 ml da diluição de toxina, foram adicionados 0,5 ml de soro não diluído no primeiro tubo e 0,5 ml das diversas diluições nos demais tubos. Todos os tubos foram incubados durante 1 hora a 37°C e, a seguir, 18 horas em geladeira a 4°C, após o que foram inoculados, de cada mistura, 0,2 ml por

TABELA 1 — Diluições dos soros e títulos de antitoxina diftérica correspondentes pesquisados nas condições da experiência.

Diluição do soro	Títulos de antitoxina correspondentes (U.A./ml)	
1/1	1/500	(0,002)
1/3	1/166,7	(0,006)
1/9	1/55,6	(0,018)
1/27	1/18,5	(0,054)
1/81	1/6,2	(0,161)
1/243	1/2,1	(0,476)
1/486	1/1,0	(1,000)
1/729	1/0,7	(1,428)

via intradérmica em coelho, usando para isso seringas do tipo tuberculina e agulhas de 10-5, já citadas.

O controle consistiu na inoculação, por via intradérmica, de 0,2 ml de uma mistura de 0,5 ml da toxina diluída, acima referida, e 0,5 ml da diluição de soro padrão internacional, após incubação durante 1 hora a 37°C e, em seguida, 18 horas em geladeira a 4°C.

As leituras foram realizadas, em todos os casos, 48 horas após a inoculação, procurando-se observar reação eritematosa semelhante àquela provocada pelo controle inoculado. Como o soro padrão contém 1/500 UA/ml, se por exemplo o soro testado apresentar na diluição a 1/3 o mesmo resultado que o obtido com o padrão, é porque contém, naquela diluição, 1/500 UA/ml. Conseqüentemente este soro não diluído terá um nível de antitoxina 3 vezes maior que o padrão, ou seja, 1/166,7 UA/ml.

RESULTADOS OBTIDOS

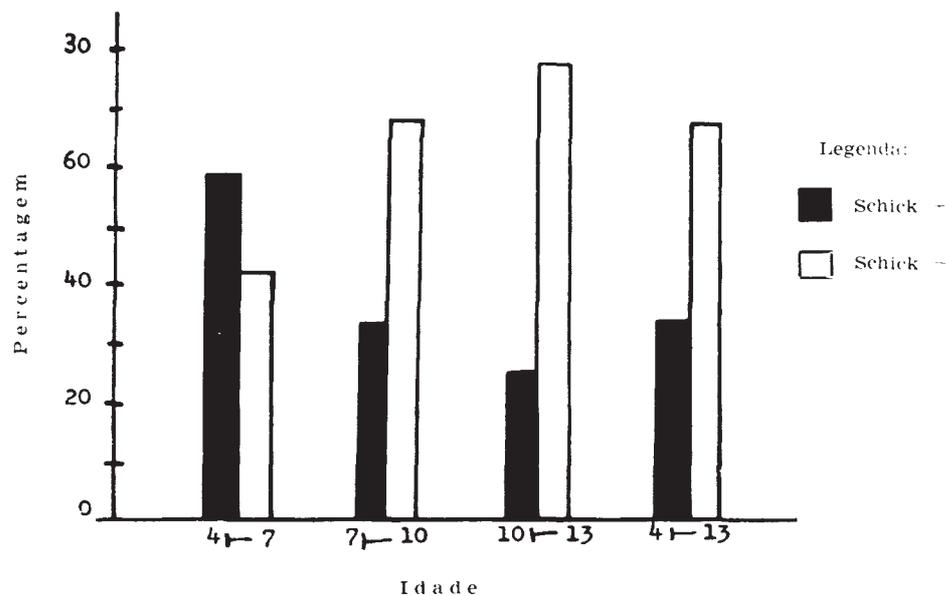
Das 65 meninas submetidas à prova de Schick, 20 apresentaram reação positiva, 2, reação combinada e 43, reação negativa. Não foram observadas pseudo-reações.

TABELA 2 — Resultados da prova de Schick em 65 meninas não vacinadas, segundo a idade, em 1962.

Schick Idade	Positivas		Negativas		Total
	Nº	%	Nº	%	
4—7	7	58,3	5	41,7	12
7—10	9	32,1	19	67,9	28
10—13	6	24,0	19	76,0	25
Total	22	33,9	43	66,1	65

Na tabela 2, são apresentados os resultados das provas de Schick e os respectivos percentuais, segundo o grupo etário, dados que poderão ser também apreciados no gráfico 1.

GRÁFICO 1 — Distribuição percentual das meninas Schick-positivas e Schick-negativas, entre as 65 examinadas, segundo a idade - 1962.



Das 65 meninas, foram determinados os níveis de antitoxina circulante em 51 e obtivemos para as Schick-positivas, títulos variando entre menos de 1/500 UA e 1/166,7 UA por ml.

Por outro lado, as Schick-negativas revelaram níveis oscilando entre menos de 1/500 UA e mais de 1/0,7 UA por ml.

Na tabela 3, encontra-se a distribuição por grupo etário das crianças Schick-positivas e Schick-negativas e os respectivos títulos de antitoxina circulante encontrados.

Segundo Parish", a quantidade de antitoxina circulante que neutraliza a dose de toxina de Schick inoculada, varia entre os diferentes indivíduos, porém o nível antitóxico médio necessário para que aquele fenômeno ocorra, é o de 1/200 UA por ml.

Por esse motivo, as crianças examinadas foram distribuídas em grupos segundo o resultado da prova de Schick e segundo o nível de antitoxina circulante, classificados em $<$ ou \geq que 1 166,7 UA por ml. visto ser este o que mais se aproximava daquele nível médio de 1 200 UA por ml.

Isto pode ser observado no gráfico 2 e tabela 4, na qual se encontra também a distribuição por grupo etário.

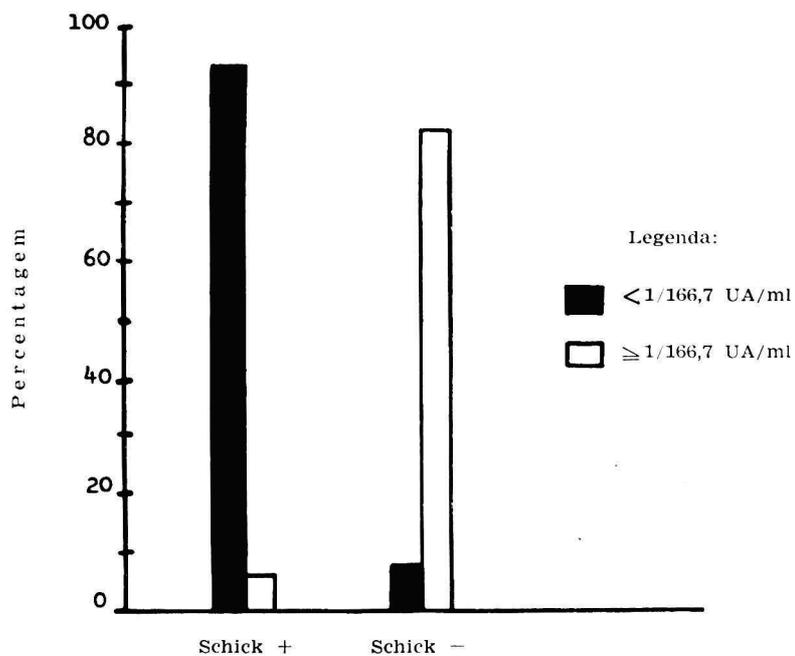
TABELA 3 — Níveis de antitoxina diftérica encontrados nas 51 meninas Schick-positivas e Schick-negativas, segundo a idade — 1962.

Idade Schick	4		5		6		7		8		9		10		11		12		Total		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
< 1/500 (< 0,002)	2						3		1			1	2	2	1		1		10	3	13
1/500 (0,002)	1		1		1	1	1		2	1							1		6	2	8
1/166,7 (0,006)			1										1						1	1	2
1/55,6 (0,018)								1		1		1	1					1	0	5	5
1/18,5 (0,54)		1					1				3					1			0	6	6
1/6,2 (0,161)											2		2					2	0	6	6
1/2,1 (0,476)										2			1						0	3	3
1/1 (1,000)										1			1					1	0	3	3
1/0,7 (1,428)																1			0	1	1
> 1/0,7 (> 1,428)						1							1			2			0	4	4
Total	3	1	2	0	0	2	4	2	3	5	0	7	2	9	1	4	2	4	17	34	51

TABELA 4 — Distribuição das 51 meninas Schick-positivas e Schick-negativas, com títulos de antitoxina diftérica inferior e igual ou superior a 1/166,7 UA por ml, segundo a idade — 1962.

Schick Idade	Positivas			Negativas		
	< 1/166,7	≥ 1/166,7	Total	< 1/166,7	≥ 1/166,7	Total
4-7	4	1	5	1	2	3
7-10	7	-	7	2	12	14
10-13	5	-	5	3	14	17
Total	16	1	17	6	28	34
Porcentagem	94,1	5,9	100,0	17,6	82,4	100,0

GRÁFICO 2 — Distribuição percentual das 51 meninas Schick-positivas e Schick-negativas, com títulos de antitoxina inferior e igual ou superior a 1/166,7 UA/ml, segundo a idade — 1962.



DISCUSSÃO

No presente estudo, das 65 crianças examinadas, 33,9% (22) mostraram-se Schick-positivas e 66,1% (3) Schick-negativas. Convém lembrar que, como já foi referido anteriormente, nenhuma destas meninas havia sido vacinada contra a difteria.

Apesar do pequeno número de observações, verificou-se mais uma vez percentagem mais elevada de crianças Schick-negativas nas idades maiores, ocorrendo evidentemente o inverso com as Schick-positivas.

Por outro lado, na determinação dos níveis antitóxicos realizada em 51 das 65 meninas, constatou-se que das 34 Schick-negativas, 28 possuíam título antitóxico \geq que 1/166,7 UA por ml, enquanto que 6 o tinham abaixo desse nível; da mesma forma, das 17 Schick-positivas, 16 apresentavam título menor que 1/166,7 UA por ml e uma delas mostrou nível antitóxico mais alto. Assim, 7 crianças mostraram resultados discrepantes em relação ao nível de 1/166,7 UA por ml pré-estabelecido.

Note-se que aquelas meninas consideradas imunes pelos resultados da prova de Schick ou da dosagem de antitoxina circulante e as tidas como suscetíveis pelas mesmas razões, mas que apresentavam algum nível antitóxico, sofreram um processo de imunização em maior ou menor grau, decorrente do contato com o *C. diphtheriae*, provavelmente por infecções subclínicas.

Vários estudos têm sido realizados comparando a prova de Schick com a dosagem de antitoxina diftérica circulante.

Messeloff e Karsh⁶, dosaram a antitoxina diftérica no sangue circulante de 51 crianças Schick-negativas, e verificaram que 94% apresentavam pelo menos um título de 1/30 UA por ml, não encontrando em nenhuma delas ausência de antitoxina circulante. Atribuíram o encontro de pessoas Schick-negativas com título antitóxico baixo ou ausente, com toda a probabilidade, ao uso de toxina com potência duvidosa.

Em nosso meio, Amaral e Souza e Silva¹, realizaram um inquérito comparando prova de Schick e dosagem de antitoxina diftérica circulante em puérperas e seus filhos. Estes autores observaram que em 121 mães, 94 eram Schick-negativas, 20 Schick-positivas e 7 apresentaram reações duvidosas; dos 123 recém-nascidos, 105 Schick-negativos, 15 Schick-positivos e 3 com reações duvidosas.

Comparando o teor imunitário das mães e dos recém-nascidos, verificaram que os títulos antitóxicos eram praticamente iguais. Relatam, porém, discrepâncias entre os resultados da prova de Schick e a

dosagem de antitoxina tanto nas mães como nos filhos. Mostram, por exemplo, que mães Schick-positivas tinham título circulante maior que 0,03 UA por ml, e outras, Schick-negativas possuíam título menor que 0,03 UA por ml, o mesmo ocorrendo entre os recém-nascidos. Hoje, tais discordâncias observadas por aqueles pesquisadores, talvez fôsem mais restritas, uma vez que atualmente o nível médio antitóxico considerado capaz de neutralizar a toxina inoculada na prova de Schick é de 1/200 UA por ml, ou seja, 0,005 UA por ml.

Grasset⁵, estudando a difteria no meio tropical, realizou um inquérito imunológico entre os Bantus, na África do Sul, por meio da prova de Schick e da dosagem de antitoxina diftérica circulante.

Verificou que tanto nos indivíduos que viviam em cidades, como nos isolados em territórios indígenas, havia uma percentagem apreciável de Schick-positivos, com ausência de antitoxina no sangue. As taxas de reações positivas eram particularmente elevadas nas crianças: 47% nos indígenas de 1 a 5 anos, não atingindo 3% nos adultos com mais de 20 anos.

Observou, ao mesmo tempo, que 30% dos indivíduos com 7 a 10 anos, já apresentavam título de 0,2 a 0,5 UA por ml, taxa essa que se elevava a 47% nos maiores de 40 anos. Embora não haja referência especial, aquelas crianças devem ter se revelado Schick-negativas.

Das 32 meninas de 7 a 10 anos por nós estudadas, 9 eram Schick-positivas e 23 Schick-negativas; 7 destas últimas (21,9%) apresentaram títulos entre 0,161 e 0,476 UA/ml, resultado que se aproxima do encontrado por Grasset⁵ na África do Sul.

No presente trabalho, observamos que conforme o esperado, alguns resultados discreparam da maioria das observações, quer entre as Schick-negativas quer nas Schick-positivas.

Assim, verificamos que uma menina Schick-positiva apresentou 1/166,7 UA por ml de sôro.

Valquist e Hogstedt¹², observaram que uma reação pode ser positiva com título de 1/30 UA por ml, assim como pode ser negativa com menos de 1/100 UA por ml. Entretanto, geralmente, não é comum uma reação positiva com 1/100 UA por ml ou mais, assim como é rara com 1/30 UA por ml ou mais; raramente ocorre reação negativa com menos de 1/500 UA por ml. Êstes fatos corroboram as opiniões de Parish⁹, como já vimos.

Uma segunda dosagem de antitoxina em novas amostras de sangue de 6 das 7 crianças referidas atrás, que mostraram resultados discrepantes, foi realizada 9 meses após a primeira, repetindo-se nessa ocasião a prova de Schick.

Os resultados das dosagens referentes à primeira e segunda amostras de sangue e respectivas provas de Schick, encontram-se na tabela 5. A menina Schick-positiva, após a primeira prova de Schick, foi vacinada com 3 doses de toxóide diftérico.

TABELA 5 — Resultado das duas dosagens de antitoxina diftérica e das duas provas de Schick, realizadas com 9 meses de intervalo, de 6 crianças que apresentaram resultados discrepantes em relação à maioria das observações — 1962.

Nº do Sôro	1ª Sangria		2ª Sangria	
	Schick	Título (U.A./ml)	Schick	Título (U.A./ml)
6	+	1/166,7	-	1/55,6
11	-	1/500	-	1/55,6
22	-	1/500	-	1/55,6
38	-	1/500	-	1/55,6
41	-	1/500	-	1/18,5
50	-	1/500	-	1/500

Mueller⁷ afirma que se a vacinação básica contra a difteria for seguida de doses de reforço, de preferência após 3 e 6 anos, isto propiciará uma população imune na adolescência. Nesta idade, então o assunto se torna mais complexo, dado o aparecimento de alergia aos componentes do toxóide e, ao mesmo tempo, ocorre o esmaecimento da imunidade artificialmente induzida. Porém, nesta fase, realizando-se as provas de Schick e de Moloney, a simples introdução dos antígenos em pequena quantidade, por via intradérmica, é o suficiente para promover aumento razoável de anticorpos naqueles que receberam imunização básica e as doses de reforço adequadas. Se uma segunda prova de Schick for feita com intervalo de 2 meses, naqueles indivíduos que reagiram positivamente, observaremos que uma proporção considerável deles, talvez a maior parte, se torne Schick-negativa.

No caso das crianças por nós observadas, aquelas Schick-negativas que apresentaram título antitóxico menor que 1/166,7 UA por ml e

que foram submetidas a nova dosagem de antitoxina diftérica circulante, revelaram aumento desse nível. Este fato já foi assinalado por diversos autores, entre os quais Valquist e Hogstedt¹² que, em trabalho bem fundamentado, verificaram que a pequena quantidade de toxina inoculada na prova de Schick exerce um estímulo antigênico, que aumenta o nível antitóxico, às vezes, apreciavelmente; mais recentemente, Anderson e Arnstein² afirmam, textualmente, que: "a própria prova de Schick pode atuar como dose de estímulo se a criança já tiver sido, anteriormente, imunizada".

A redosagem, infelizmente, só foi realizada 9 meses após, período esse relativamente longo que não nos permite tirar qualquer conclusão, pois o aumento do teor antitóxico pode ter ocorrido pela simples inoculação da toxina de Schick, por si só ou complementada por infecções frustas ou subclínicas, uma vez que estas meninas não foram vacinadas previamente.

CONCLUSÕES

O método mais prático para avaliar o estado imunitário em relação à difteria numa comunidade ainda é a prova de Schick.

No campo estudado, observou-se uma apreciável concordância entre os resultados da prova de Schick e o nível de antitoxina mais geralmente aceito como indicador de imunidade diftérica.

Alguns resultados mostraram-se discordantes, principalmente entre as Schick-negativas. Assim, 6 das 34 meninas Schick-negativas e uma das 17 meninas Schick-positivas revelaram resultados discrepantes. Num segunda dosagem de antitoxina realizada em 5 daquelas 6 crianças Schick-negativas, verificou-se aumento apreciável do título antitóxico, que pode ser atribuído a um estímulo provocado pela própria toxina de Schick ou por estímulos naturais, por infecções subclínicas, ou por ambos. Em face dos resultados obtidos e da opinião categorizada dos diversos autores citados, estes achados sugerem pesquisa visando observações mais numerosas e adequadamente controladas, com o fito de se poder relacionar a prova de Schick a aumento do teor antitóxico circulante, principalmente nos indivíduos Schick-negativos, o que se nos afigura de grande valor prático do ponto de vista epidemiológico.

RESUMO

Neste trabalho, a prova de Schick foi relacionada à dosagem de antitoxina diftérica circulante em crianças em idade escolar.

Foram escolhidas para campo de estudo, meninas internadas em uma instituição de assistência à infância, assistidas pelo Centro de

Aprendizado da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

A pesquisa foi efetuada em crianças de 4 a 12 anos, do sexo feminino, não vacinadas contra a difteria.

A prova de Schick foi feita em 65 e dosaram a antitoxina circulante em 51. Das 65, encontraram 22 (33,9%) Schick-positivas e 43 (66,1%) Schick-negativas. As Schick-positivas revelaram níveis variando entre menos que 1/500 UA por ml e 1/166,7 UA por ml, enquanto os títulos das Schick-negativas variaram entre menos que 1/500 UA por ml e mais que 1/0,7 UA por ml.

Das 17 Schick-positivas, 16 (94,1%) apresentaram título antitóxico menor que 1/166,7 UA por ml e apenas 1 (5,9%) revelou nível igual a 1/166,7 UA por ml. Das 34 Schick-negativas, 28 (82,4%) apresentaram título igual ou maior que 1/166,7 UA por ml e 6 (17,6%) nível menor que 1/166,7 UA por ml.

S U M M A R Y

In the present study, the results of the Schick-Test with the diphtheria antitoxin titers in children were compared.

The sample comprised children from an institution attended by the Health Center of the School of Hygiene and Public Health.

The study was carried out in 4 to 12 year old females not vaccinated against diphtheria.

The Schick-Test was performed on 65 subjects and circulating antitoxin level was determined in 51. 22 Schick-positives (33.9%) were found as compared with 43 (66.1%) Schick-negatives. It was found that Schick-positives showed levels varying between less than 1/500 UA/ml and 1/166.7 UA/ml, and Schick-positives, between less than 1/500 UA/ml and more that 1/0.7 UA/ml.

Of the 17 Schick-positives, 16 (94.1%) had antitoxic levels below 1/166.7 UA/ml and only one (5.9%) showed a titer of 1/166.7 UA/ml as compared the 34 Schick-negatives which showed 28 (82.4%) subjects with levels of 1/166.7 UA/ml or more and 6 (17.6%) a titer under 1/166.7 UA/ml.

A G R A D E C I M E N T O

À Srta. Rosa Frederico de Carvalho, técnica do Departamento de Microbiologia e Imunologia Aplicadas, que nos prestou valioso auxílio técnico na execução deste trabalho, o nosso reconhecimento.

BIBLIOGRAFIA

1. AMARAL, J. P. do & SOUZA E SILVA, O. R. Imunidade antidiftérica na mãe e no recém-nascido. Suas relações com o Schick Test. *Mem. Inst. Butantan*, 43:9-20, 1944-1945.
2. ANDERSON, G. W. & ARNSTEIN, M. G. Profilaxia das doenças transmissíveis, tradução dos Drs. Nelson Luiz de Araujo Moraes e Oswaldo Lopes da Costa. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Higiene & S.E.S.P., 1950. p. 271-289.
3. CARTER, C. F. & SMITH, A. L. Microbiology and pathology. 5th ed. [St. Louis, C. V. Mosby Company] 1953. p. 292-309.
4. FROBISHER Jr., M. The Diphtheria bacillus. (*In* American Public Health Association, New York. Diagnostic procedures and reagents... 3rd. ed. New York [1950] p. 156-190.
5. GRASSET, E. La diphtérie en milieu tropical: étude de l'épidémiologie, de l'immunologie et de la prophylaxie. *Bull. Org. mond. Santé*, 5(3):321-332, 1952.
6. MESSELOFF, C. R. & KARSH, M. J. Antitoxin content of the blood serum of children with negative reactions to the Schick Test. *Am. J. Dis. Child.*, 44(5):999-1012, Nov. 1932.
7. MUELLER, J. H. The diphtheria bacilli and the diphtheroids. (*In* DUBOS, R. J. Bacteriological and mycotic infections of man, 2nd ed. Philadelphia, J. B. Lippincott [1952]. p. 222-243).
8. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. Vaccination contre las maladies contagieuses courantes de l'enfance: rapport d'un groupe... Genève, 1950 [20 p.]. (Sér. Rapp. techn., n.º 6).
9. PARISH, H. J. & CANNON, D. A. Diphtheria the Schick Test and active immunization. (*In* Antisera, toxoids, vaccines and tuberculins in prophylaxis and treatment. 5th ed. Edinburg, E. & E. Livingstone, 1961. p. 93-111).
10. SANTOS, J. A. A. dos. Contribuição para o conhecimento da epidemiologia da difteria no Município de São Paulo. São Paulo, 1963. 93 p. (Tese de Doutorado — Fac. Hig. Saúde Públ. USP).
11. TOPPLEY, W. W. C. & WILSON, G. S. Principles of bacteriology and immunity. 4th ed. by WILSON, G. S. & MILES, A. A. London, Arnold, 1955. v. 2, p. 1563-1605.
12. VALQUIST, B. & HOGSTEDT, C. Studies on diphtheria. *Journ. Immunol.* 62: 277-291, 1949.
13. — Citado por TOPPLEY, W. W. C. & WILSON, G. S.¹¹.
14. ZINSSER, H. Bacteriology. 11th ed. by DAVID T. SMITH et alii. New York, Appleton-Century-Crofts, Inc., c1957. p. 321-333.