

PROVA DE SCHICK E DOSAGEM DE ANTITOXINA DIFTÉRICA CIRCULANTE PELA REAÇÃO DE HEMAGLUTINAÇÃO PASSIVA EM GRUPOS POPULACIONAIS DE SERRA DO NAVIO E VILA AMAZONAS, NO TERRITÓRIO FEDERAL DO AMAPÁ

Luis G. COTILLO Z. (1)
Sebastião Timo IARIA (2)

Ary Walter SCHMID (3)
Donald WILSON (4)

RESUMO

Foram submetidos à prova de Schick todos os 769 indivíduos de 5 a 19 anos de Serra do Navio e Vila Amazonas, no Território Federal do Amapá, dos quais 640 eram vacinados e 129 não vacinados contra a difteria. Em 284 desses indivíduos, dos quais 247 vacinados e 37 não vacinados, foram determinados os níveis de antitoxina diftérica circulante pela reação de hemaglutinação passiva. As discordâncias encontradas entre ambas as técnicas permitem presumir que elas podem medir respostas imunitárias diferentes, não podendo ser seus resultados sempre comparáveis.

INTRODUÇÃO

No intuito de avaliar o estado imunitário frente à difteria, da população de 5 a 19 anos de Serra do Navio e Vila Amazonas, no Território Federal do Amapá, realizou-se a prova de Schick em todos os 769 indivíduos deste grupo etário e em 284 deles determinou-se também o nível de antitoxina diftérica circulante.

Uma vez que a reação de hemaglutinação passiva^{8, 13, 2, 4, 6} tem mostrado vantagens de ordem prática na medida do nível de antitoxina diftérica circulante, assim como uma boa correlação com a titulação feita em coelho, empregou-se essa técnica no presente trabalho, da-

das as suas qualidades de simplicidade, rapidez e baixo custo. Pôde-se, assim, realizar mais uma comparação entre os resultados da prova de Schick e os títulos de antitoxina diftérica revelados por hemaglutinação passiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Prova de Schick — A prova de Schick foi realizada na totalidade da população de 5 a 19 anos, de Serra do Navio e Vila Amazonas, segundo a técnica clássica, empregando-se a toxina preparada no Instituto Butantan de São Paulo, na dose de 0,1 ml contendo 1/50 dmm. As leituras foram feitas após 3 e 7 dias.

Recebido para publicação em 11-11-1966.

Trabalho das Cadeiras de Microbiologia e Imunologia Aplicadas e Epidemiologia e Profilaxia Gerais e Especiais da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP.

- (1) Instrutor da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas; Catedrático Auxiliar de Microbiologia — Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Marcos, Lima, Peru.
- (2) Instrutor da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas.
- (3) Professor-Associado da Cadeira de Epidemiologia e Profilaxia Gerais e Especiais.
- (4) Professor-Assistente da Cadeira de Epidemiologia e Profilaxia Gerais e Especiais.

TABELA I

Resultados das provas de Schick, por grupo etário, em pessoas vacinadas e não vacinadas contra a difteria, de Serra do Navio e Vila Amazonas, Território Federal do Amapá (1963)

Vacinação contra a difteria	Idade (anos)	Provas de Schick								Total
		Positiva		Negativa		Pseudo- reação		Combi- nada		
		N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
Vacinados	5 — 9	7	1,7	406	97,1	5	1,2	0	—	418
	10 — 14	2	1,1	182	98,4	1	0,5	0	—	185
	15 — 19	0	—	36	97,3	1	2,7	0	—	37
	Total	9	1,4	624	97,5	7	1,1	0	—	640
Não vacinados	5 — 9	3	9,4	28	87,5	0	—	1	3,1	32
	10 — 14	3	7,1	38	90,4	1	2,5	0	—	42
	15 — 19	4	7,3	50	90,9	1	1,8	0	—	55
	Total	10	7,8	116	89,8	2	1,6	1	0,8	129
Total		19	2,5	740	96,2	9	1,2	1	0,1	769

TABELA II

Distribuição das 224 pessoas, vacinadas e não vacinadas contra a difteria, de Serra do Navio e Vila Amazonas, Território Federal do Amapá, segundo os resultados da prova de Schick e os níveis de antitoxina diftérica circulante revelados pela reação de hemaglutinação passiva

UA/ml	Vacinados				Não vacinados				Total			
	Prova de Schick				Prova de Schick				Prova de Schick			
	Posit.	Neg.	Pseudo- reação	Total	Posit.	Neg.	Pseudo- reação	Total	Posit.	Neg.	Pseudo- reação	Total
< 0,01	—	22	—	22	2	1	—	3	2	23	—	25
0,01	1	21	—	22	2	1	—	3	3	22	—	25
0,02	—	4	1	5	—	—	—	—	—	4	1	5
0,04	—	10	—	10	1	1	—	2	1	11	—	12
0,08	—	8	—	8	—	1	—	1	—	9	—	9
0,1	—	3	—	3	—	1	—	1	—	4	—	4
0,16	—	8	—	8	—	2	—	2	—	10	—	10
0,20	—	1	—	1	—	—	—	—	—	1	—	1
0,32	—	15	—	15	—	3	—	3	—	18	—	18
0,40	—	2	—	2	—	1	—	1	—	3	—	3
0,64	—	20	1	21	—	4	1	5	—	24	2	26
0,80	2	26	2	30	2	4	—	6	4	30	2	36
1,28	—	32	—	32	—	2	—	2	—	34	—	34
2,58	—	8	—	8	—	1	—	1	—	9	—	9
2,66	—	13	—	13	—	3	—	3	—	16	—	16
5,16	—	6	—	6	—	—	—	—	—	6	—	6
5,32	1	15	—	16	—	2	—	2	1	17	—	18
10,32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
> 10,32	—	25	—	25	—	2	—	2	—	27	—	27
Total	4	239	4	247	7	29	1	37	11	268	5	284

TABELA III

Distribuição dos vacinados e não vacinados contra a difteria, da Serra do Navio e Vila Amazonas, Território Federal do Amapá, 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

Vacinação contra difteria	Schick UA/ml		Positiva				Negativa				Pseudo-reação				Total		
			< 0,01		> 0,01		< 0,01		> 0,01		< 0,01		> 0,01				
			N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%			
	Idade (anos)																
Vacinados	5 — 9	—	—	2	1,3	10	6,5	140	90,9	—	—	—	—	2	1,3	154
	10 — 14	—	—	2	2,5	11	13,8	66	82,5	—	—	—	—	1	1,2	80
	15 — 19	—	—	—	—	1	7,7	11	84,6	—	—	—	—	1	7,7	13
	Total	—	—	4	1,6	22	8,9	217	87,9	—	—	—	—	4	1,6	247
Não vacinados	5 — 9	1	12,5	1	12,5	1	12,5	5	62,5	—	—	—	—	—	—	8
	10 — 14	—	—	2	33,3	—	—	4	66,7	—	—	—	—	—	—	6
	15 — 19	—	—	3	13,1	—	—	19	82,6	—	—	—	—	1	4,3	23
	Total	1	2,7	6	16,2	1	2,7	28	75,7	—	—	—	—	1	2,7	37
Total	1	0,4	10	3,5	23	8,1	245	86,2	—	—	—	—	5	1,8	284	

Soros examinados — Dos soros dos 769 indivíduos, colhidos em 1963, unicamente foram aproveitados os de 284 pessoas, representando 36,9% da população acima mencionada.

Todos êstes soros foram conservados a -60°C até o momento do exame. Desde que êles, na maioria, haviam sido tratados para eliminar anticomplementaridade, a fim de se determinar os seus títulos de anticorpos fixadores de complemento contra o vírus RS³, sòmente foi possível iniciar a dosagem da antitoxina diftérica a partir da diluição 1:8.

Reação de hemaglutinação passiva — A determinação do nível de antitoxina diftérica circulante, pela prova de hemaglutinação passiva, foi efetuada nos soros de 262 habitantes de Serra do Navio e 22 de Vila Amazonas.

A técnica da reação, com pequena modificação, foi a mesma descrita em trabalho anterior⁶. Hemácias humanas do tipo O, Rh negativas, lavadas duas vezes e suspensas a 2,5%, foram taninizadas com um volume igual de solução de ácido tânico a 1:20.000, durante 15 minutos a 37°C , e centrifugadas a 1.700 RPM. Após uma lavagem com salina tampoadada fosfatada (S.T.F.), pH = 7,2, foram ressuspensas de maneira a se obter a concentração original. Estas hemácias taninizadas sensibilizaram-se a seguir com toxóide diftérico diluído a 1:6 (30,2 Lf/ml) a 37°C por 15 minutos. A mistura foi centrifugada a 1.500 RPM por 10 minutos e o sedimento de hemácias lavado duas vezes com sôro normal de coelho (SNC) a 1% em S.T.F. de pH = 7,2. Finalmente, reconstituiu-se a suspensão original de 2,5% das hemácias em SNC a 1%. Cada lote de hemácias sensibilizadas, assim preparadas, foi conservado a 4°C por 48 horas, no máximo, a fim de se evitar modificação do título hemaglutinante.

Partindo-se de 0,5 ml da diluição de sôro a 1:4 prepararam-se diluições com razão 2, usando-se SNC a 1% como diluente. Ao volume final de cada tubo,

de 0,5 ml, juntaram-se a seguir 0,05 ml da suspensão a 2,5% das hemácias sensibilizadas, agitando-se os tubos. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente e as leituras feitas após 2 e 18 horas, segundo o padrão estabelecido por STAVITSKY¹⁴.

As dosagens dos soros examinados foram sempre acompanhadas da dosagem da antitoxina padrão, contendo 1 UA/ml, a partir da qual prepararam-se diluições com intervalo logarítmico de 0,1⁷.

Com base nos resultados da dosagem da antitoxina padrão estabeleceu-se, para cada lote de hemácias sensibilizadas, um fator que foi utilizado para converter os títulos hemaglutinantes obtidos nos soros humanos em unidades antitóxicas por ml.

RESULTADOS

Na Tabela I estão relacionados os resultados da prova de Schick dos 769 indivíduos de 5 a 19 anos de Serra do Navio e Vila Amazonas, classificados por grupos de idade e condição de vacinado ou não contra a difteria. Verifica-se que dêstes 769 indivíduos submetidos à prova de Schick, 640 eram indivíduos vacinados, apresentando 9 (1,4%) prova de Schick positiva, 624 (97,5%), prova negativa e 7 (1,1%), pseudo-reação. Os 129 restantes eram não vacinados e apresentaram as seguintes respostas à prova de Schick: 10 (7,8%), reação positiva, 116 (89,8%), negativa, 2 (1,6%), pseudo-reação e 1 (0,8%), reação combinada.

Na Tabela II encontra-se a distribuição dos indivíduos segundo a condição de vacinação ou não contra a difteria, os resultados da prova de Schick e os níveis de antitoxina diftérica circulante.

Na Tabela III encontra-se a distribuição dos indivíduos vacinados e não vacinados contra a difteria segundo os resultados da prova de Schick e nível de antitoxina diftérica circulante maior ou

menor que 0,01 UA/ml, de acordo com o critério já empregado anteriormente⁶. Os indivíduos que apresentavam título de antitoxina 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, teor de antitoxina compreendido entre 0,01 UA/ml e o nível imediatamente superior pesquisado.

Verifica-se que dos 284 indivíduos examinados, 247 pertenciam ao grupo vacinado. Dêstes, 4 apresentaram reação de Schick positiva, embora demonstrando título de antitoxina diftérica superior a 0,01 UA/ml, e 239 revelaram-se Schick negativos, dos quais 217 (90,8%) apresentaram nível de antitoxina superior a 0,01 UA/ml e 22 (9,2%), no entanto, revelaram título inferior a 0,01 UA/ml. Os 4 indivíduos vacinados que apresentaram pseudo-reação à prova de Schick tinham todos antitoxina diftérica em nível maior que 0,01 UA/ml.

Do grupo dos indivíduos não vacinados examinaram-se 37 soros. Dentre os 7 indivíduos que apresentaram reação de Schick positiva, 6 (85,7%) mostraram nível de antitoxina diftérica circulante maior que 0,01 UA/ml e somente 1 (14,3%) nível menor que 0,01 UA/ml. De outro lado, dos 29 Schick-negativos estudados, 1 (3,4%) apresentou título inferior a 0,01 UA/ml e os 28 (96,6%) restantes, cifra superior ao referido nível. O soro do único indivíduo com pseudo-reação apresentou nível antitóxico superior a 0,01 UA/ml.

DISCUSSÃO

Verifica-se pelos resultados das provas de Schick realizadas na população de 5 a 19 anos de Serra do Navio e Vila Amazonas, que no grupo vacinado se apresentaram 624 (97,5%) indivíduos com reação negativa e 7 (1,1%) com pseudo-reação, convencionalmente consideradas indicativas de imunidade, e

unicamente 9 (1,4%) com resposta positiva, indicadora de suscetibilidade à difteria.

De outro lado, no grupo não vacinado, 116 (89,8%) apresentaram reação negativa e 2 (1,6%) pseudo-reação, enquanto que 10 (7,8%) mostraram reação positiva e 1 (0,8%) reação combinada.

Êstes dados permitem apreciar a eficácia da vacinação, mesmo realizada em épocas variáveis, já que pôde ser apreciada a presença de 631 indivíduos "imunes" (98,6%) e unicamente 9 (1,4%) suscetíveis no grupo de vacinados, enquanto entre os não vacinados se encontraram 11 (8,6%) suscetíveis.

Por outro lado, no grupo não vacinado encontraram-se 118 (91,4%) indivíduos não suscetíveis à difteria, o que mostra que a imunização devida a infecções naturais é muito comum naquela região do país.

Na determinação do nível de antitoxina diftérica circulante, efetuada pela reação de hemaglutinação passiva em 284 indivíduos desta mesma população, com o intuito de verificar a concordância de seus resultados com a prova de Schick, encontrou-se que no grupo de 247 indivíduos vacinados, de 243 respostas "imunes" (reação negativa ou pseudo-reação) à prova de Schick, 221 (90,9%) apresentaram título superior a 0,01 UA/ml e 22 (9,1%) título inferior a este nível, e que todos os 4 indivíduos vacinados com resposta positiva à prova de Schick, apresentaram nível superior a 0,01 UA/ml.

No grupo de 37 indivíduos não vacinados encontraram-se entre os 30 "imunes", 29 (96,7%) com nível superior a 0,01 UA/ml e 1 (3,3%) com título inferior, enquanto que no grupo dos 7 "suscetíveis", 6 (85,7%) possuíam nível superior a 0,01 UA/ml e 1 (14,3%) título inferior a este nível.

Portanto, no caso dos indivíduos vacinados, as duas provas revelaram resultados concordantes em 89,5% (221/247)

das vezes e discordante em apenas 10,5% (26/247). Para os não vacinados houve concordância em 81,1% (30/37) e discordâncias em 18,9% (7/37). Entretanto, a diferença entre as taxas de concordância encontradas nos dois grupos não se mostrou estatisticamente significativa, ao nível de 5%.

As discordâncias aparentes encontradas neste estudo, no qual indivíduos Schick-positivos apresentam anticorpos em quantidade maior que 0,01 UA/ml, nível médio considerado como protetor, enquanto que indivíduos Schick-negativos mostram níveis inferiores a 0,01 UA/ml, permite-nos supor que a relação entre a imunidade humoral, determinada pelos anticorpos circulantes, e a imunidade tissular, determinada pelos anticorpos celulares ou teciduais, não é absoluta e que alguns indivíduos poderiam apresentar unicamente uma delas, enquanto que a maioria apresentaria as duas. Diversos autores têm encontrado estas discordâncias, atribuindo-as a resultados falsos positivos^{1, 10, 5, 11, 12} e a outros fatores^{8, 6}.

CONCLUSÕES

Os resultados das provas de Schick e das dosagens dos níveis de antitoxina diftérica circulante, pela reação de hemaglutinação passiva, admitindo-se 0,01 UA/ml como o nível médio protetor, nos permitem apresentar as seguintes conclusões:

No grupo de indivíduos vacinados contra a difteria, a concordância entre ambas as provas foi de 89,5%, enquanto que a discordância atingiu unicamente 10,5% e no grupo de indivíduos não vacinados, a concordância foi de 81,1% e a discordância de 18,9%.

As discordâncias encontradas entre a prova de Schick e a dosagem de antitoxina diftérica circulante permitem-nos supor que, ao menos em determinada percentagem de indivíduos, estas duas técnicas meçam respostas imunitárias diferentes.

O emprêgo da prova de hemaglutinação passiva em inquéritos epidemiológicos de larga escala faz-se altamente recomendável, dada a sua simplicidade de execução e baixo custo.

SUMMARY

In the present investigation all 769 inhabitants between 5 and 19 years of age of Serra do Navio and Vila Amazonas, Território Federal do Amapá, Brazil, were studied for immunity against diphtheria by the Schick-test. At the same time titres of circulating diphtheria antitoxin of 284 of these subjects were determined by passive hemagglutination test. Of the 769, 640 people had been immunized against diphtheria and 129 had not. Of the 284 submitted to hemagglutination tests 247 had been immunized and 37 had not. Differences encountered between the results given by both types of tests permit the assumption that each may measure a different kind of immunity response and their results may not always be comparable.

AGRADECIMENTOS

As enfermeiras da Divisão de Saúde da Indústria e Comércio de Minérios S.A. (ICOMI) e à Srta. Rosa Frederico de Carvalho, técnica da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas da F.H.S.P. pela colaboração prestada na execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUNCH, C. P. et alii — Studies on the immunization of adults with diphtheria toxoid. *J. Immunol.*, 39(5):427-440, Nov. 1940.
2. BUTTLER, W. T. — Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. Effect of bis diazobenzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen. *J. Immunol.*, 90(5):663-671, May 1963.
3. CANDEIAS, J. A. N. & CHRISTOVÃO, D. de A. — Pesquisa de anticorpos fixadores de complemento para vírus respiratório sincicial em grupos da população do Território Federal do Amapá, Brasil. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20(1): 89-97, jun. 1966.

COTILLO Z., L. G. et alii. Prova de Schick e dosagem de antitoxina diftérica circulante pela reação de hemaglutinação passiva em grupo populacionais de... *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20:215-221, 1966.

4. CHATTERJEE, S. C. — A comparative study on 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.
5. COHEN, P.; SCHNECK, H. & DUBOW, E. — False positive reactions to the Schick test. *JAMA*, 142(6):390-392, Feb. 1950.
6. GUEDES, J. da S. et alii — Dosagem de antitoxina diftérica circulante pela reação de hemaglutinação passiva e sua relação com a prova de Schick em estudantes de medicina. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20(1):107-115, jun. 1966.
7. HORSFALL, F. L. & TAMM, J. — Fractional dilution procedure for precise titration of hemagglutinating viruses and hemagglutination-inhibiting antibodies. *J. Immunol.*, 70(3):253-259, Mar. 1953.
8. LANDY, M. et alii — Comparison of a hemagglutination procedure and the rabbit intradermal neutralization test for the assay of diphtheria antitoxin in human sera. *Amer. J. Hyg.*, 61(2):143-154, Mar. 1955.
9. MOLONEY, P. J. & FRASER, C. J. — Immunization with diphtheria toxoid (Antitoxine Ramon). *Amer. J. Publ. Hlth*, 17(10):1027-1030, Oct. 1927.
10. PAPPENHEIMER, A. M., Jr. & LAWRENCE, S. H. — Immunization of adults with diphtheria toxoid. II. An analysis of the pseudo reactions to the Schick test. *Amer. J. Hyg.*, 47(2):233-240, Mar. 1948.
11. PAPPENHEIMER, A. M., Jr. et alii — A study of reactions following administration of crude and purified diphtheria toxoid in an adult population. *Amer. J. Hyg.*, 52(3):353-370, Nov. 1950.
12. ————— Use of diphtheria toxin and toxoid in the study of immediate and delayed hypersensitivity in man. *J. Immunol.*, 75(4):259-264, Apr. 1955.
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.