

IMUNIDADE À DIFTERIA FRENTE À PROVA DE SCHICK E À DOSAGEM DE ANTITOXINA DIFTÉRICA CIRCULANTE

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

RESUMO

Dos 95 alunos do 2.º ano de Medicina da F.C.M.S.C., 56 foram submetidos a duas provas de Schick, com 28 dias de intervalo e a três sangrias sucessivas — a segunda e a terceira respectivamente 7 e 28 dias após a primeira — para a medida do nível de antitoxina diftérica circulante pela reação de hemaglutinação passiva. A concordância da prova de Schick com a dosagem do nível de antitoxina diftérica circulante foi de 94,1%, 97,1% e 97,4% nas três dosagens, para o grupo dos Schick negativos. No grupo de Schick positivos a concordância foi de 59,1%, 54,5% e 72% nas mesmas ocasiões. Foram discutidas as alterações do nível de antitoxina diftérica circulante resultantes da realização da prova de Schick e foi recomendada a medida do nível de antitoxina diftérica circulante nos adolescentes e adultos que acusem reação de suscetibilidade na prova de Schick.

INTRODUÇÃO

Existem diferentes critérios sobre a melhor maneira de avaliar-se o estado imunitário em relação à difteria.

A maioria dos pesquisadores tem usado a prova de Schick considerando-a como a maneira mais prática de se avaliar a imunidade a esta doença^{16, 19} e discutindo a sua validade¹⁵.

Outros, como PARISH²³ e WILSON & MILES²⁶, entretanto, consideram a prova

de Schick como “um pobre indicador quantitativo do nível de antitoxina diftérica circulante”, recomendando que para pesquisas sobre a imunidade à difteria se proceda à determinação do nível de antitoxina circulante.

É freqüente também encontrar-se referências à vantagem da prova de Schick de atuar como dose de refôrço nos indivíduos imunes^{25, 1, 17} ou naquêles que te-

Recebido para publicação em 28-11-1966.

Trabalho das Cadeiras de Microbiologia e Imunologia Aplicadas e Epidemiologia e Profilaxia Gerais e Especiais da Faculdade de Higiene e Saúde Pública da USP, e do Departamento de Medicina Social da Faculdade de Ciências Médicas dos Hospitais da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, com a colaboração técnica de Rosa Frederico de Carvalho, da Cadeira de Microbiologia e Imunologia Aplicadas.

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

nham tido contato com o bacilo diftérico ou seus produtos de metabolismo.

Diante destes fatos, resolvemos realizar um estudo mais apurado do efeito estimulante da dose da toxina de Schick sobre os níveis de antitoxina diftérica circulante, assim como sobre o resultado de uma segunda prova de Schick, realizada 28 dias após a primeira, e verificar a concordância entre ambas as medidas de imunidade antidiftérica.

Indubitavelmente, a realização deste estudo foi grandemente facilitada pelo emprêgo da técnica de hemaglutinação passiva para a dosagem dos níveis de antitoxina diftérica circulante, tanto pela facilidade da sua execução quanto pela sua sensibilidade, e é sabido que esta técnica guarda boa correlação com as determinações feitas em coelhos, o que foi verificado por diversos autores^{24, 11, 6}.

Mais recentemente, no entanto, trabalhando com soros de cavalo, LAVERGNE et alii¹² afirmam não haver relação entre os títulos de anticorpos determinados por provas de neutralização e de hemaglutinação passiva. Asseveram que este fato seria válido também para os soros humanos de indivíduos não vacinados, existindo correlação unicamente nos indivíduos vacinados, depois da dose de reforço.

MATERIAL E MÉTODOS

Prova de Schick — A prova de Schick efetuou-se em 95 estudantes do 2.º ano (1966) da Faculdade de Ciências Médicas dos Hospitais da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (F.C.M.S.C.) pela técnica clássica, com as toxinas de

prova e controle preparadas no Instituto Butantan, usando a dose de 0,1 ml contendo 1/50 dmm. As leituras fizeram-se após 3 e 7 dias. Esta prova foi repetida na quase totalidade dos alunos, após 28 dias, aproveitando-se para este trabalho unicamente as respostas de 56 alunos. Estes alunos ainda não tinham freqüentado enfermaria de doenças transmissíveis e nem as freqüentaram no decorrer da presente investigação. Não se obtiveram informações precisas de vacinação anti-diftérica anterior e nenhum aluno relatava ter tido difteria anteriormente.

Reação de hemaglutinação passiva — A medida do nível de antitoxina diftérica circulante através da prova de hemaglutinação passiva foi efetuada nos soros de 56 dos 95 estudantes submetidos à prova de Schick, tendo-se realizado três sangrias, a segunda e a terceira respectivamente 7 e 28 dias depois da primeira. A primeira e a terceira amostras de sangue foram coletadas momentos antes da inoculação da toxina de Schick. A totalidade dos soros foi mantida em congelador a — 20°C até o momento da prova.

A técnica da hemaglutinação empregada neste estudo foi a mesma descrita anteriormente⁶ com a modificação referida por COTILLO et alii⁵. As determinações dos níveis de antitoxina nos três soros correspondentes a cada aluno foram feitas simultaneamente.

RESULTADOS

Encontram-se relacionados na Tabela I os resultados das provas de Schick

TABELA I

Resultados das provas de Schick em 95 alunos do 2.º ano da F.C.M.S.C. — 1966

Prova de Schick						Total
Positiva		Combinada		Negativa		
N.º	%	N.º	%	N.º	%	
36	37,9	2	2,1	57	60,0	95

efetuadas nos 95 alunos do 2.º ano (1966) da F.C.M.S.C., assim como seus respectivos percentuais. Pode-se verificar que dos 95 alunos submetidos à prova de Schick, 36 (37,9%) apresentaram resposta positiva, 2 (2,1%), combinada e 57 (60,0%), negativa. Não se encontraram pseudo-reações.

Na Tabela II apresentam-se os resultados da primeira e da segunda provas de Schick, realizadas com intervalo de

segunda provas de Schick e a classificação dos seus títulos de antitoxina diftérica circulante, por ocasião da primeira, segunda e terceira sangrias, em dois grupos, menor ou maior que 0,01 UA/ml. Esta classificação foi feita segundo o critério estabelecido anteriormente^{6, 5}.

As medianas dos resultados das três sangrias, apresentadas na Figura mostram um nítido deslocamento para níveis maiores, pois na primeira dosagem

TABELA II

Resultados das provas de Schick em 56 alunos do 2.º ano da F.C.M.S.C. submetidos a segunda prova de Schick, 28 dias após a primeira — 1966

Prova de Schick	Positiva		Combinada		Negativa		Total
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	
Primeira	20	35,7	2	3,6	34	60,7	56
Segunda	18	32,1	—	—	38	67,9	56

28 dias, dos 56 alunos aproveitados, neste estudo. Verificou-se uma pequena variação nas respostas da segunda prova de Schick em relação à primeira, porquanto nesta obtiveram-se 20 (35,7%) respostas positivas, 2 (3,6%) combinadas e 34 (60,7%) negativas, enquanto que na segunda prova de Schick 18 (32,1%) foram positivas e 38 (67,9%) negativas, não mais se apresentando as respostas combinadas.

A distribuição dos 56 alunos da F.C.M.S.C., segundo os resultados das três medidas dos níveis de antitoxina diftérica circulante, pela reação de hemaglutinação passiva, e das duas provas de Schick, encontra-se na Tabela III. Pode-se observar que os títulos variaram entre < 0,0004 UA/ml e 157,41 UA/ml na primeira dosagem e entre < 0,0004 e 314,81 UA/ml na segunda e terceira.

Apresenta-se na Tabela IV a distribuição dos 56 estudantes da F.C.M.S.C. segundo os resultados da primeira e se-

está ao nível de 0,04 UA/ml, passando na segunda para 0,1 UA/ml e na terceira para 0,4 UA/ml.

Na Tabela V apresenta-se a verificação da influência da toxina de Schick sobre os níveis de antitoxina diftérica circulante dos 56 alunos da F.C.M.S.C., após 28 dias da realização da prova de Schick. Pode-se observar que entre os 34 indivíduos “imunes”, 21 (58,4%) mostraram uma elevação do seu título, de pelo menos 4 vezes, enquanto que 13 (41,6%) não acusaram modificação dessa ordem. Os dois que revelaram reação combinada apresentaram elevação do nível de antitoxina circulante. Por outro lado, dos 20 alunos com reação de suscetibilidade, apenas 2 (10%) acusaram aumento do título antitóxico, enquanto que em 15 (75%) não se pôde constatar modificação e 2 (10%) revelaram mesmo uma diminuição, de pelo menos 4 vezes, do seu título de antitoxina diftérica circulante.

TABELA III

Distribuição dos resultados da primeira e segunda provas de Schick e dos níveis de antitoxina diftérica circulante, em UA/ml, da primeira, segunda e terceira sangrias dos alunos do 2.º ano da F.C.M.S.C. — 1966

Níveis de Antitoxina UA/ml	Primeira Prova de Schick								Segunda Prova de Schick		
	Primeira Sangria 4-8-66				Segunda Sangria 11-8-66				Terceira Sangria 1-9-66		
	Posit.	Comb.	Neg.	Total	Posit.	Comb.	Neg.	Total	Posit.	Neg.	Total
< 0,0004	9	—	—	9	7	—	—	7	10	—	10
0,0004	1	1	—	2	3	—	—	3	1	—	1
0,005	2	—	2	4	2	—	1	3	2	1	3
0,01	—	—	1	1	—	—	—	—	1	1	2
0,02	6	—	4	10	7	—	1	8	3	—	3
0,04	2	—	2	4	1	—	4	5	—	—	—
0,08	—	—	3	3	—	—	1	1	—	—	—
0,1	—	—	5	5	—	—	2	2	—	1	1
0,2	—	—	1	1	—	—	3	3	—	2	2
0,3	—	—	1	1	—	—	3	3	—	4	4
0,4	—	—	3	3	—	—	1	1	—	2	2
0,6	—	—	3	3	—	—	3	3	—	3	3
1,23	—	—	1	1	—	—	3	3	—	3	3
1,64	—	1	—	1	—	—	3	3	—	2	2
2,46	—	—	1	1	—	—	3	3	—	—	—
3,27	—	—	1	1	—	1	—	1	—	1	1
4,92	—	—	2	2	—	—	2	2	—	4	4
6,55	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	2
9,83	—	—	1	1	—	—	1	1	—	2	2
13,11	—	—	1	1	—	—	—	—	—	—	—
19,66	—	—	—	—	—	—	—	—	1	3	4
26,22	—	—	—	—	—	1	1	2	—	2	2
39,32	—	—	1	1	—	—	—	—	—	4	4
157,41	—	—	1	1	—	—	1	1	—	—	—
314,81	—	—	—	—	—	—	1	1	—	1	1
Total	20	2	34	56	20	2	34	56	18	38	56

TABELA IV

Distribuição dos alunos do 2.º ano da F.C.M.S.C., segundo os resultados da primeira e da segunda provas de Schick e a classificação dos seus títulos de antitoxina diftérica circulante, da primeira, segunda e terceira sangrias, em dois grupos, menor ou maior que 0,01 UA/ml — 1966

UA/ml	Primeira Prova de Schick										Segunda Prova de Schick				
	Primeira Sangria					Segunda Sangria 7 dias depois					Terceira Sangria 28 dias após a primeira				
	< 0,01		> 0,01		Total	< 0,01		> 0,01		Total	< 0,01		> 0,01		Total
	N.º	%	N.º	%		N.º	%	N.º	%		N.º	%	N.º	%	
Positivos	12	60,0	8	40,0	20	12	60,0	8	40,0	20	13	72,2	5	27,8	18
Combinados	1	50,0	1	50,0	2	—	—	2	100,0	2	—	—	—	—	—
Negativos	2	5,9	32	94,1	34	1	2,9	33	97,1	34	1	2,6	37	97,4	38
Total	15	26,8	41	73,2	56	13	23,2	43	76,8	56	14	25,0	42	75,0	56

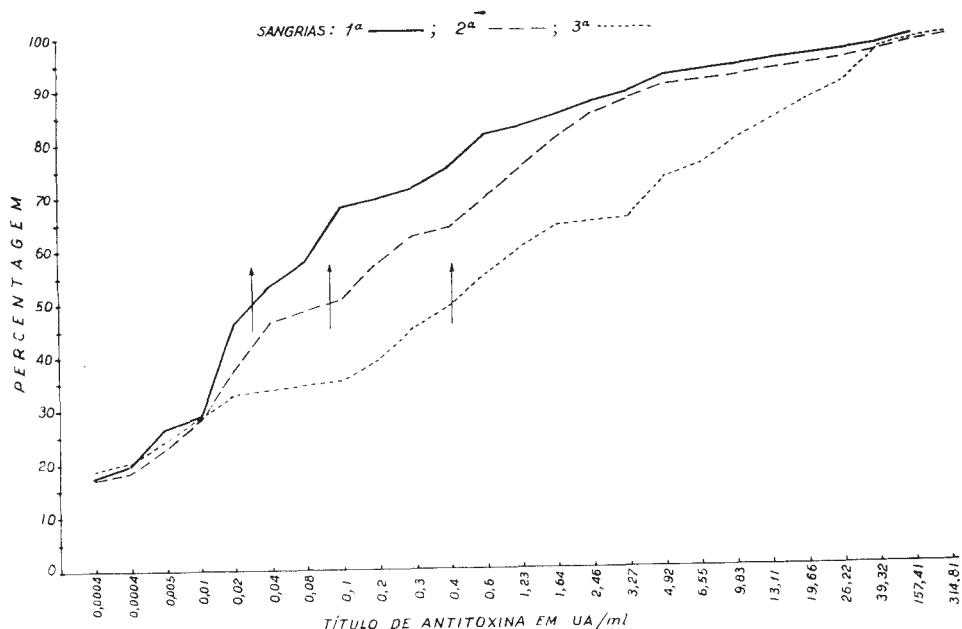


Fig. — Distribuição da frequência acumulada dos níveis de antitoxina diftérica circulante, medidos pela hemaglutinação passiva, nas três sangrias dos 56 alunos de F.C.M.S.C. — Posição das medianas — 1966.

TABELA V

Modificação dos níveis de antitoxina diftérica circulante após 28 dias da realização da prova de Schick, em 56 alunos do 2.º ano de Medicina da F.C.M.S.C. — 1966

Reação de Schick	Modificação do nível de antitoxina diftérica circulante *							
	Aumento		Manutenção		Diminuição		Total	
	N.º	%	N.º	%	N.º	%	N.º	%
Negativa	21	58,4	13	41,6	0	0	34	60,7
Combinada ...	2	100,0	0	0	0	0	2	3,6
Positiva	3	15,0	15	75,0	2	10,0	20	35,7
Total	26	46,4	28	50,0	2	3,6	56	100,00

* Aumento = elevação do título de, pelo menos, 4 vezes.
 Manutenção = variação do título, para mais ou para menos, inferior a 4 vezes.
 Diminuição = diminuição do título de, pelo menos, 4 vezes.

DISCUSSÃO

A percentagem de indivíduos Schick positivos encontrada neste estudo foi bastante elevada (37,9%), fato que con-

corda com os dados anteriormente referidos por nós ⁶, já que nas classes observadas em 1965 constatamos respectivamente para os alunos do 2.º e do 3.º

ano, 37,2% e 29,7% de reações positivas.

O confronto dos resultados da prova de Schick com as determinações do nível de antitoxina diftérica circulante pela reação de hemaglutinação passiva permitiu-nos verificar no grupo "imune" (reações negativas à prova de Schick) uma concordância de 94,1% (32/34) na primeira dosagem, 97,1% (33/34) na segunda e 97,4% (37/38) na terceira. No grupo "susceptível" (reações positivas e combinadas) as concordâncias foram de 59,1% (13/22) na primeira dosagem, 54,5% (12/22) na segunda e 72,2% (13/18) na terceira, sendo as discordâncias assim de 40,9% (9/22) na primeira dosagem, 45,5% (10/22) na segunda e 27,8% (5/18) na terceira.

A alta concordância encontrada entre os resultados da prova de Schick e as dosagens de antitoxina diftérica circulante quando consideramos o grupo de indivíduos "imunes", reafirmam o valor daquela prova na avaliação da imunidade à difteria em grupos populacionais. As discordâncias encontradas podem ser atribuídas à presença de anticorpos tissulares e ausência dos circulantes, como foi discutido por LEDUC et alii¹³ e OAKLEY et alii¹⁸.

Por outro lado, no grupo dos "susceptíveis" a elevada percentagem de discordâncias mostra a necessidade de se determinar o nível de antitoxina diftérica circulante nos adolescentes e adultos, pois neste estudo aproximadamente 40% destes indivíduos apresentaram títulos que permitiam considerá-los "imunes". Este fato foi verificado também por GLENY⁷, que chegou mesmo a classificar os Schick positivos em quatro grupos: imunes, potencialmente imunes, sub-imunes e susceptíveis. Vários autores^{2, 20, 4, 21, 22, 8} têm feito referências similares, entre eles KUHNS & PAPPENHEIMER^{9, 10}, que demonstraram o papel dos anticorpos não precipitantes na reação positiva à prova de Schick.

Quanto ao papel da toxina de Schick como dose estimulante, GLENY⁷ já refe-

rira que nos indivíduos "imunes" ela funciona como dose de refôrço, fato êste confirmado posteriormente por vários autores^{25, 1, 17}.

No presente estudo, de 34 alunos Schick-negativos, apenas 21 (58,4%) acusaram elevação do nível de antitoxina diftérica circulante e os 13 (41,6%) restantes não revelaram aumento maior de pelo menos 4 vezes.

No grupo dos "susceptíveis", dos 3 (15%) alunos que apresentaram elevação do seu nível de antitoxina circulante após 28 dias, dois passaram ao grupo dos Schick-negativos e um, embora revelando aumento desta ordem do seu título, mostrou-se ainda Schick-positivo por ocasião da segunda prova. Os 15 (75%) que mantiveram o mesmo título ou apresentaram variação, para mais ou para menos, inferior a 4 vezes, não revelaram mudança da resposta à prova de Schick. É de notar que 2 alunos acusaram diminuição de pelo menos 4 vezes no título de antitoxina diftérica circulante, o que poderia ser consequência da combinação de antitoxina com a toxina inoculada.

Os dois alunos que apresentaram reações combinadas na primeira prova de Schick, mostraram resposta negativa por ocasião da segunda e paralelamente apresentaram na segunda e terceira dosagem de antitoxina, títulos bastante elevados. Êste fato concorda com a opinião de MAXCY¹⁴ de que as reações combinadas podem ser interpretadas como sugestivas de prévio contato com o bacilo diftérico ou seus produtos, denotando no mínimo um estado potencial de imunidade.

CONCLUSÕES

Verificou-se mais uma vez, elevada taxa de Schick-positivos entre alunos de Medicina da F.C.M.S.C.

No grupo de indivíduos "imunes", considerando como tais os Schick-negativos e os que apresentaram pseudo-reação, a alta concordância dos resultados

da prova de Schick e da dosagem de antitoxina diftérica circulante, pela reação de hemaglutinação passiva, reafirma o valor da primeira prova em inquéritos epidemiológicos de larga escala.

As discordâncias no grupo "susceptível", os Schick-positivos, levam-nos a recomendar, pelo menos em se tratando de adolescentes e adultos, a dosagem de antitoxina diftérica circulante, como rotina, a fim de se verificar o seu real estado imunitário.

Verificou-se que após a realização da prova de Schick houve aumento de pelo menos 4 vezes dos níveis de antitoxina diftérica circulante em 58,4% dos indivíduos Schick-negativos e em 15,0% dos Schick-positivos; também se observou diminuição do título de antitoxina, de pelo menos 4 vezes, em 2 alunos, ambos Schick-positivos. As reações combinadas denotariam estado potencial de imunidade.

SUMMARY

Of the 95 second year medical students of the F.C.M.S.C., 56 were submitted to the Schick test, which was performed on two occasions with 28 days interval between each one. Blood was drawn from the subjects on three occasions: before the first Schick test and seven and twenty-eight days after the said test. Diphtheria antitoxin was titrated in blood by the passive hemagglutination test. In Schick-negative subjects, both tests agreed in 94.1%, 97.1% and 97.4% on first, second and third titrations respectively. In Schick-positive subjects agreement was observed in 59.1%, 54.5% and 72.0% for same titrations. Alterations of antitoxin levels due to performance of the Schick test itself are discussed. Diphtheria antitoxin titration is recommended in adults and adolescents which show susceptibility to the Schick test.

AGRADECIMENTOS

Aos alunos do 2.º ano da Faculdade de Ciências Médicas dos Hospitais da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pela colaboração prestada à realização desta pesquisa.

Aos Drs. Alcino Corrêa (do Instituto Píneiros) e Oswaldo Melone (do Hospital das Clínicas) pelo apoio prestado à execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, G. W. & ARSTEIN, M. G. — Profilaxia das doenças transmissíveis; tradução de Nelson Luiz de Araujo Moraes e Oswaldo Lopes da Costa. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Higiene, 1950. p. 271-289.
2. BUNCH, C. P. et alii — Studies on the immunization of adults with diphtheria toxoid. *J. Immunol.*, 39(5):427-440, Nov. 1940.
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 Schick test. *JAMA*, 142(6):390-392, Feb. 1950.
5. COTILLO Z., L. G., et alii — 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. *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 20(2), dez. 1966.
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. GLENY, A. T. — The principles of immunity applied to protective inoculation against diphtheria. *J. Hyg. Camb.*, 24(3/4):301-320, Dec. 1925.
8. 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 São Paulo (1962). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo*, 18(1/2):119-132, jun./dez. 1964.
9. KUHNS, W. S. & PAPPENHEINER, A. M. — Immunochemical studies of antitoxin produced in normal and allergic individuals hyperimmunized with diphtheria toxoid. I. Relationship of skin sensitivity to purified diphtheria toxoid to the presence of circulating, non-precipitating antitoxin. *J. Exp. Med.*, 95(4):363-374, 1952.

10. ————— Immunochemical studies of antitoxin produced in normal and allergic individuals hyperimmunized with diphtheria toxoid. II. A comparison between the immunological properties of precipitating and non-precipitating (skin-sensitizing) antitoxins. *J. Exp. Med.*, 95(4):375-392, 1952.
11. LANDY, M. et alii — Comparison of 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.
12. LAVERGNE, M. et alii — Influence de l'avidité des anticorps anti diphtériques de cheval sur le titre de la réaction d'hémagglutination passive. *Ann. Inst. Pasteur*, 109(5):94-119, Nov. 1965.
13. LEDUC, E. H. et alii — Studies on antibody production II. The primary and secondary responses in the popliteal lymph node of the rabbit. *J. exp. Med.*, 102(1):61-71, Jul. 1955.
14. MAXCY, K. F. — Rosenau preventive Medicine and Hygiene. 7th ed. New York, Appleton-Century-Crofts, Inc., 1951. p. 98.
15. MESSELOFF, C. R. & KARSH, M. J. — Antitoxin content of the blood serum of children with negative reactions to the Schick test. *Amer. J. Dis. Child*, 44(5):999-1012, Nov. 1932.
16. MOLONEY, P. J. & FRASER, C. J. — Immunization with diphtheria toxoid (Antitoxine Ramon). *Amer. J. Publ. Hlth*, 17(10):1027-1030, Oct. 1927.
17. MUELLER, J. H. — The diphtheria bacilli and the diphtheroids. In DUBOS, R. J. — Bacteriological and mycotic infections of man. 2th ed. Philadelphia, J. B. Lippincott, 1952. p. 222-243.
18. OAKLEY, C. L. et alii — Local production of antibodies. *J. Path. Bact.*, 63(1):33-44, Jan. 1951.
19. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ — Vaccination contre les maladies contagieuses courantes de l'enfance: rapport d'un groupe... Genève, 1950 (*Ser. Rapp. techn.*, n. 6).
20. PAPPENHEIMER Jr., A. M. & 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.
21. PAPPENHEIMER Jr., A. M. et alii — A study of reactions following administration of crude and purified diphtheria toxoid in a adult population. *Amer. J. Hyg.*, 52(3):353-370, Nov. 1950.
22. ————— Use diphtheria toxin and toxoid in the study of immediate and delayed hypersensitivity in man. *J. Immunol.*, 75(4):259-264, Apr. 1955.
23. PARISH, H. J. & CANNON, D. A. — Antisera, toxoids, vaccines and tuberculin in prophylaxis and treatment. 6th ed. Edinburg, E. & Livingston Ltd., 1962. p. 104.
24. 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.
25. VALQUIST & HOGSTEDT — Studies on diphtheria. *J. Immunol.*, 62:277-291, 1949.
26. WILSON, G. S. & MILES, A. A. — Topley and Wilson's principles of bacteriology and immunity. 4th ed. London, Edward Arnold Ltd., 1955. p. 1223.