

QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS DIFTÉRICOS EM COBAIAS

I PERSISTÊNCIA DO TÍTULO DE ANTICORPOS SÉRICOS EM ANIMAIS INOCULADOS COM UMA DOSE DE TOXÓIDE DIFTÉRICO*

Joana Akiko Furuta **
Raymundo Rolim Rosa **
Edison Paulo Tavares de Oliveira **
Hideyo Iizuka **

FURUTA, J. A. et al. Quantificação de anticorpos diftéricos em cobaias. I — Persistência do título de anticorpos séricos em animais inoculados com uma dose de toxóide diftérico. *Rev. Saúde públ., S. Paulo, 16:97-106, 1982.*

RESUMO: Foi estudado o comportamento da cinética de anticorpo-gênese em cobaias inoculadas com uma dose de toxóide diftérico precipitado pelo alúmen. Paralelamente, foi estudada a dinâmica da imunidade passiva naturalmente transmitida aos filhotes. Em cobaias vacinadas com uma dose de antígeno, foi verificado que a síntese de antitoxina diftérica persiste, em títulos detectáveis, até 36 meses após. Os anticorpos transferidos, passivamente, da mãe vacinada para os filhotes atingiram nestes, concentrações plasmáticas superiores, sendo que a imunidade perdeu em títulos detectáveis até cerca de três meses de idade dos mesmos.

UNITERMOS: Anticorpos diftéricos. Toxina diftérica. Antitoxina diftérica. Vacinação.

INTRODUÇÃO

O sistema imunológico dos mamíferos recém-nascidos é, caracteristicamente, pouco desenvolvido. Antes da maturidade imunológica, estes animais seriam muito susceptíveis às diversas infecções do meio ambiente, se não pudessem contar com a defesa dos anticorpos passivamente recebidos da circulação materna, através da membrana placentária, ou da glândula mamária através do colostro^{4,12,22}. A imunidade transferida, na época do nascimento, é de importância vital para a sobrevivência do novo ser, num mundo contendo grande número de agentes altamente infecciosos.

Ao contrário dos ungulados e ruminantes, a cobaia e o homem pertencem às espécies que já nascem com níveis plasmáticos de anticorpos semelhantes aos verificados em suas mães^{2,4,5,12,21}.

Por outro lado, sabe-se que a imunidade passiva tem duração limitada, tendo sido verificado que ela é evidenciável por um período relativamente curto^{12,21,27,33}, ao passo que a imunidade ativamente induzida pela vacinação é, em muitos casos, mais duradoura^{6,7,9,13,18,25,26}.

Brambell⁴ afirma que no feto de cobaia, cuja mãe foi ativamente vacinada, a antitoxina é detectável a partir do início do se-

* Trabalho apresentado no VIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, Brasil — 1977.

** Do Instituto Butantan - - Av. Vital Brasil, 1500 - - 05503 - - São Paulo, SP - - Brasil.

gundo mês de vida intrauterina, e a sua concentração vai aumentando até atingir o nível mais alto, às vésperas do nascimento.

Considerando essas observações, resolvemos verificar, no presente trabalho, a persistência do título de antitoxina diftérica, em cobaias vacinadas com uma dose de toxóide diftérico precipitado pelo alúmen de potássio e, paralelamente, estudar o comportamento da imunidade passiva, naturalmente transmitida aos seus descendentes, durante o seu desenvolvimento pós-parto.

MATERIAL E MÉTODOS

As presentes observações foram realizadas em cobaias normais, brancas, adultas, de 500 g \pm 10% de peso, divididas em dois lotes de 10 animais e separadas segundo o sexo. As cobaias foram imunizadas, pela via subcutânea, com uma dose de 1 ml de toxóide diftérico, precipitado pelo alúmen de potássio, Partida 71-9, preparado no Instituto Butantan.

O material utilizado para o estudo consta de amostras de soro sanguíneo provenientes de cobaias vacinadas, e sangradas por punção cardíaca, a partir do 33º dia da imunização.

O doseamento de imunoglobulina diftérica circulante foi realizado pelos métodos preconizados pelo National Institut of Health (NIH)³² e pela técnica intradérmica, inicialmente descrita por Römer e Sames²³ e, posteriormente, modificada por Fraser e Wigham⁸, estabelecendo-se os seus níveis até 24 meses, após a inoculação do toxóide, no grupo dos machos, e 36 meses, no das fêmeas.

Paralelamente, os mesmos doseamentos foram realizados no soro dos filhotes de fêmeas imunizadas. O soro obtido de cada descendente de primeira geração era misturado aos dos demais de uma mesma cria. Desta maneira, foram constituídos quatro grupos de filhotes, cujos títulos séricos médios foram confrontados com os das respectivas mães. O nível de antitoxina diftérica homó-

loga que foi transferido através de imunidade passiva, naturalmente adquirida pela progênie, foi verificado a partir do sétimo dia de vida.

Os títulos de antitoxina circulante foram analisados na amplitude que oscilava entre os valores compreendidos de 0,002 a 10 UI/ml de soro, aferidos frente a antitoxina diftérica, padrão internacional.

Soro e toxina padrões — Utilizamos o soro antidiftérico padrão internacional, proveniente da International Laboratory for Biological Standards, Statens Serum Institute, da Organização Mundial de Saúde, Copenhagen, Dinamarca, acondicionado sob forma líquida, em ampolas, contendo 10 UI/ml de antitoxina diftérica.

A toxina diftérica, Partida 74-6, utilizada nos ensaios biológicos, foi preparada em nosso laboratório, e padronizada "in vivo", ao nível de L+ (Limite morte), quando a dosagem de anticorpos circulantes era realizada segundo a técnica preconizada pelo National Institut of Health (NIH)³². No método de Römer e Sames, modificado⁸ determinava-se o Lr (Limite reagente) da toxina diftérica, frente a 1/500 UI da antitoxina diftérica padrão internacional, de tal modo que a injeção de mistura estabilizada de toxina-antitoxina, no volume de 0,2 ml pela via intradérmica, em coelhos, produzisse, no local de inoculação, uma reação eritematosa, não necrótica, de 10 ml de diâmetro, num período de 48 h de observação.

Para a dosagem das amostras de antitoxina diftérica circulante, as diferentes diluições da mistura toxina-antitoxina eram incubadas, primeiramente, a 37°C durante 60 min. na estufa e, em seguida, a 4°C em geladeira, por um período de 18 h. Após este tratamento, procedíamos a inoculação em volume de 0,2 ml, pela via intradérmica, em coelhos albinos, e observadas a cada 24 h, durante 48 h, quando eram analisadas as reações eritematosas resultantes, correspondentes aos vários títulos testados. Estas reações eram sempre comparadas com a cutirreção provocada pelo controle inoculado.

Animais utilizados - para o doseamento da antitoxina diftérica circulante, foram empregados coelhos albinos adultos, com cêrca de 2.500 g., e cobaias com 250 g. de peso, fornecidos pelo Biotério Geral do Instituto Butantan.

RESULTADOS E DISCUSÃO

Um dos pontos mais interessantes, relativos ao fenômeno da transferência de imunidade passiva, consiste na passagem das moléculas de anticorpos constituídos de proteínas solúveis, da circulação materna para o feto, através de barreiras celulares, de maneira intacta, visto que suas atividades imunológicas são conservadas integralmente.

Ao contrário de muitos mamíferos de outras espécies, nas quais a passagem de imunoglobulinas maternas ao recém-nascido é verificada na fase pós-natal, através do colostro, na cobaia, pelo fato desta espécie possuir estrutura placentária de natureza hemoendotelial, apresentando camadas de pequena espessura, além de ser favorecido pelo saco vitelino relativamente grande, a transmissão de imunoglobulinas maternas para o filho se processa com relativa facilidade^{4,12}. Estrutura placentária semelhante é apresentada também pela espécie humana, o mesmo verificando-se entre outros mamíferos que têm placenta do tipo hemocorial, como nos primatas e roedores^{5,12}. Portanto, esta estrutura permite que os anticorpos, atravessando a barreira placentária, atinja, ao final da gestação, quase a mesma concentração tanto no sangue materno quanto no fetal.

Por outro lado, a verificação da dinâmica da anticorpogênese, baseados em estudos realizados em animais de laboratório, apesar de proporcionar boa orientação, não prevê com segurança, efeito da imunização no homem, extrapolando diretamente esses resultados para a espécie humana^{10,35}. Porém no caso da cobaia, esta comparação pode ser feita com boa margem de segurança, como foi demonstrado por Van Ramshorst

e col.³⁴. Estes pesquisadores verificaram que a potência de toxóides adsorvidos, ensaiados em cobaias, apresentaram estreita relação com a resposta obtida pela imunização humana³⁴.

Em nossas observações, verificamos que nas cobaias imunizadas com uma dose de vacina antidiftérica, o teor de antitoxina circulante atingiu a concentração mais elevada no trigésimo dia, a partir da data da administração do antígeno, revelando título médio da ordem de 3,8 UI/ml, no lote de animais machos e apresentando oscilações séricas individuais de 2 a 6,4 UI/ml, como mostra a Tabela 1. A média no lote feminino foi da ordem de 3,5 UI/ml, com valores individuais oscilando de 2 a 4,8 UI/ml (Tabela 2). Portanto, a síntese de imunoglobulina diftérica atingiu o seu clímax em cerca de 30 dias (Figura 1). Após permanecer certo tempo neste platô, a produção de antitoxina começou a declinar, nos dois lotes imunizados, com velocidade relativamente rápida nos três primeiros meses consecutivos, e mais moderadamente nos períodos subseqüentes.

Podemos notar, também, que as médias no lote feminino foram cerca de 10% inferiores, em relação às verificadas no masculino. Esta diferença no nível de títulos antitóxicos é atribuível à queda do teor de anticorpos apresentada pelas cobaias durante o período de prenhez, época em que ocorria a transferência intensa de anticorpos maternos, via transplacentária, para o feto em desenvolvimento.

Um ano após a vacinação, o teor de antitoxina diftérica ainda persistia em nível relativamente alto, revelando cerca de 0,1 UI/ml de soro circulante, indicando que o mecanismo da biossíntese imunológica permanecia em plena atividade.

No 24º mês de observação, os títulos antitóxicos continuavam persistindo em níveis superiores a 0,03 UI/ml. Parece-nos que a partir desta fase, se estabeleceria um equilíbrio entre a destruição metabólica e a síntese de imunoglobulina diftérica,

T A B E L A 1

Níveis de antitoxina diftérica circulante em cobaias machos imunizados durante 24 meses de observação.

Meses de observação	Títulos da antitoxina diftérica em UI/m																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Cobaias N°	3,60	1,50	0,48	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	1,15	0,15	0,15	0,15	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,048	0,036	0,048	0,048	0,048	0,048
581	3,60	1,50	0,48	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	1,15	0,15	0,15	0,15	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,048	0,036	0,048	0,048	0,048	0,048
582	2,60	0,48	0,20	0,26	0,26	0,20	0,20	0,20	0,112	0,112	0,112	0,1	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,036	0,026	0,026	0,026	0,026
583	3,60	2,60	1,12	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,11	0,084	0,084	0,048	0,048	0,026	0,026
584	3,60	2,00	0,48	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,20	0,20	0,20	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,11	0,084	0,084	0,048	0,048	0,026	0,026
585	6,40	1,50	0,48	0,26	0,26	0,20	0,20	0,2	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,11	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018	0,018
801	3,60		0,20																					
802	4,80	2,60	0,64	0,20	0,20	0,20	0,20	-	0,20	0,2	0,2	0,2	0,11	0,11	0,11	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,48	0,48	0,048	0,048
803	3,60	1,50	0,48	0,26	0,26	0,20	0,20	0,20	0,084	0,084	0,084	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026
804	4,80	1,50	0,64	0,36	0,36	0,26	0,26	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
805	2,00	1,50	1,12	0,48	0,48	0,36	0,36	0,26	0,15	0,15	0,1	0,11	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026
Título médio	3,86	1,6865	0,584	0,324	0,324	0,242	0,236	0,212	0,1494	0,1396	0,1396	0,1297	0,0836	0,0836	0,0836	0,0836	0,0836	0,0836	0,0836	0,0525	0,0525	0,0525	0,0525	0,0525
Logaritmo do título médio	0,5865	0,2270	-0,2335	-0,1894	-0,1894	0,6152	-0,6270	-0,6736	-0,8255	-0,8551	-0,8551	-0,8870	-1,0774	-1,2096	-1,2096	-1,2096	-1,2096	-1,2096	-1,2096	-1,2798	-1,2798	-1,4318	-1,4318	-1,4771

* Unidades Internacionais por mililitro (OMS); (+) = Morto; (-) = Não feito.

TABELA 2

Níveis de antitoxina diftérica circulante em cobaias fêmeas, nizadas, urante 36 meses de observação.

Cobaias N ^o	Níveis de antitoxina diftérica em UI/m																	
	2	5	6	7	8	9	11	12	15	18	19	21	23	24	26	30	36	
4,8	2,6	0,48	0,26	0,26	-	0,200	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	0,026	
2,6	1,5	0,84	0,20	0,112	0,112	0,112	0,112	0,112	0,112	0,084	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	
2,6	1,12	0,84	0,26	0,084	0,084	0,084	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,048	0,036	
4,8	2,6	0,64	0,64	0,26	0,26	0,26	0,200	0,200	0,200	0,074	0,064	0,064	†	†	†	†	†	
4,8	0,6																	
2,6	1,5	0,84	0,15	0,112	0,112	0,112	0,112	0,112	0,112	0,112	0,084	0,048	0,036	0,036	0,026	0,026	0,026	
3,6	1,5	0,84	0,20	0,200	0,200	0,150	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	
2,0	0,84	0,26	0,26	0,112	0,112	0,112	0,026	0,026	0,026	0,026	0,0112	0,0112	0,0112	0,026	0,0112	0,0112	0,0112	
2,6	2,6	0,64	0,36	0,36	0,26	0,200	0,084	0,074	0,048	0,036	0,0360	0,0360	0,026	0,026	0,026	0,026	0,0112	
4,8	3,6		0,36	0,26	0,20	0,200	0,200	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	
Título médio	3,5200	2,046	0,6725	0,2216	0,2000	0,1952	0,1832	0,1588	0,1037	0,0885	0,0611	0,057	0,03886	0,0368	0,035	0,0338	0,0288	0,0264
Logaritmo do título médio	0,5465	0,3109	-0,1713	-0,6543	-0,6989	-0,7095	-0,7370	-0,7989	-0,9840	-1,0527	-1,0713	1,2136	-1,2441	-1,4104	1,4559	-1,4705	-1,5396	-1,5770

Unidades Internacionais IUI - título e soro (†) = Morte; (-) = Não feito.

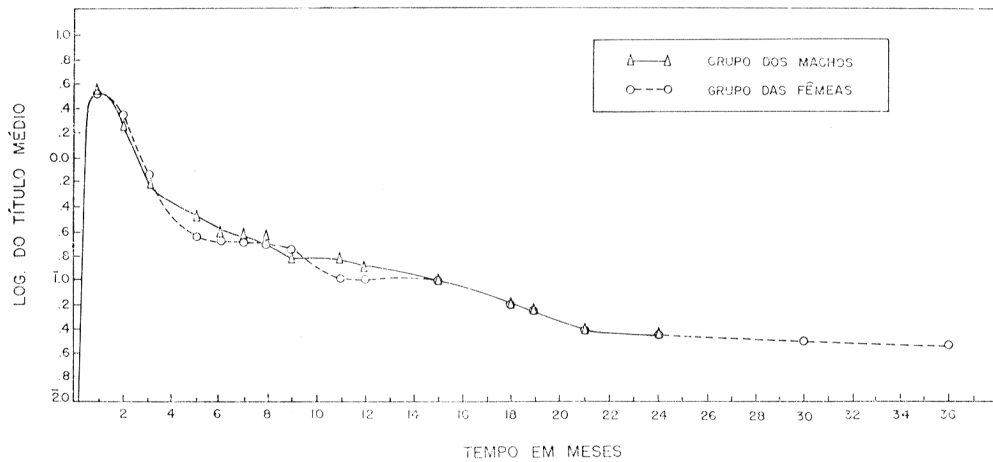


Fig. -- Persistência de anticorpos diftéricos em cobaias inoculadas com uma dose de toxóide diftérico.

visto que no grupo as cobaias fêmeas, os teores antitóxicos praticamente continuaram estáveis. Mostra este fenômeno o título médio revelado no 36º mês, que foi superior a 0,02 UI/ml, apresentando variações individuais entre 0,01 a 0,04 UI/ml de soro (Tabela 2).

A análise dos títulos individuais constantes nas Tabelas 1 e 2 mostrou-nos que todos os animais vacinados revelaram proteção sólida contra a difteria, durante todo período experimental, em virtude de conseguirem produzir antitoxina diftérica circulante em concentrações superiores a 0,01 UI/ml, título a partir do qual normalmente confere imunidade à doença^{14,15,19,20,29}.

Este mecanismo regulador da concentração de Ig G, garantindo a persistência prolongada dos anticorpos, parece ser controlado pela imunidade potencial adequada ou memória imunológica estabelecida pelo estímulo primário^{1,11,12}. Nas condições de nosso experimento, parece-nos que os níveis apreciáveis de antitoxina seriam mantidos na circulação, indefinidamente, como ocorre com quase todos os membros da nossa comunidade, que estão em contato freqüente

com os microrganismos produtores de toxina diftérica, condições em que estas infecções subclínicas funcionariam como pequenas doses de antígeno, agindo como estímulo secundário e como doses de reforço^{6,9,13}.

Black e col.³ verificaram que uma dose vacinante pode proteger durante cerca de 20 meses, ao imunizarem uma população feminina rural de Bangladesh, através da inoculação de toxóide tetânico-diftérico (dT), adsorvido pelo alumínio.

McLennan e col.¹⁷ chegaram a demonstrar que os níveis médios de anticorpos, em 3 a 4 semanas, ultrapassam 0,01 UI/ml, com a aplicação de uma dose simples de antitoxina adsorvida pelo alumínio. Afirmam também que a resposta ao estímulo primário é influenciada pela concentração de antígeno, teor de adjuvante, assim como pela ação sinérgica destes dois componentes, concluindo que a resposta imunitária provocada por uma dose única mais imunogênica permite entrever a possibilidade de recorrer a este esquema de vacinação. Esta conclusão explica-se, pois o esquema tradicional de imunização humana, baseado em duas ou três doses apresenta inúmeras dificuldades,

e problemas, em muitas circunstâncias, principalmente em regiões remotas ou em países em desenvolvimento¹⁷.

Diversos autores verificaram que em indivíduos adequadamente vacinados, a antitoxina pode persistir, em níveis protetores, durante muitos anos^{6,7,25,26}.

Quanto à imunidade passiva, pelas observações que constatamos em cobaias, filhos de mães vacinadas e cujos resultados estão consubstanciados na Tabela 3, verifica-se que ao nascimento, o título médio de antitoxina homóloga circulante, passivamente recebida

da circulação materna, era da ordem de 0,4 UI/ml. Devemos salientar que, nesta mesma época, os níveis médios de antitoxina diftérica detectada na circulação materna era de 0,2 UI/ml, isto é, exatamente 50% do título observado na progênie.

Toivanen e col.³¹ explicam que o teor de gamaglobulina fetal poderá exceder ou não ao que pode ser encontrado na circulação materna, e a sua transferência através da membrana placentária é verificada quando existe um substancial gradiente de concentração^{12,16}. Desta maneira, a pro-

T A B E L A 3

Níveis de antitoxina diftérica circulante em cobaias, nascidas de animais vacinados.

Observação (a) Cobaias Nº	Títulos em UI/ml(b)					
	7d	15d	1m	2m	3m	4m
311						
312						
313		0,26	0,048	0,0048	0,002	0,0
314						
321						
322			0,036		<0,002	0,0
323						
331						
332	0,4	0,26	0,064	0,0064	<0,002	0,0
333						
334						
341						
342			0,112	0,0064	<0,002	0,0
343						
Título Médio	0,4	0,26	0,065	0,0055	0,0012	0,0

(a) d = Dias; m = Mês(es); (—) = Não feito.

(b) Para o cálculo das médias, os títulos <0,002 foram considerados igual a 0,001.

porção entre as quantidades de imunoglobulinas presentes na circulação materna e no recém-nascido é variável^{30,31}. Alguns autores têm verificado que tanto os genitores como os seus descendentes imediatos, apresentam valores semelhantes^{5,21}; todavia, os nossos resultados estão de acordo com aqueles que constataram concentração de imunoglobulina em níveis mais elevados em descendentes, do que na circulação da genitora^{2,18,24,28,33}.

Em nosso meio, Guidolin e col.¹¹ verificaram que o nível médio de anticorpos observados em cobaias com cerca de dois meses de idade, cujas mães tinham sido vacinadas com uma dose de vacina antitetânica, variaram entre os títulos de 0,001 a 0,01 UI/ml. Estes valores são compatíveis com os nossos dados, quando o nível de imunidade passiva antidiftérica foi determinado aos dois meses de idade.

Ao contrário da imunidade ativa, verificamos que na imunidade passiva os anticorpos homólogos têm vida média muito curta no organismo do animal, perdendo seu título rápida e progressivamente. O valor inicial de cerca de 0,4 UI/ml de antitoxina diftérica, declinou no terceiro mês de vida ao nível de 0,001 UI/ml e, no quarto mês, desapareceu completamente em nossas condições experimentais (Tabela 3), mostrando que o seu comportamento cinético é muito diferente da imunidade ativa (Tabelas 1 e 2).

Estes resultados estão de acordo com as observações de vários autores^{12,21,27,33}, entre os quais, a de Smith²⁷, que verificou que a imunidade passiva decresce gradual-

mente com a evolução da idade da descendência, e com o aumento de peso do animal, e que ao final de três meses, não há quase mais anticorpos advindos do sangue materno.

CONCLUSÕES

1. Em dois lotes de cobaias estudadas, imunizadas com uma dose de toxóide diftérico precipitado pelo alúmen de potássio, os títulos séricos médios de antitoxina circulante atingiram os níveis mais altos em aproximadamente 30 dias, sendo que no grupo de animais machos, foi detectado um nível médio de cerca de 3,8 UI/ml, e no de fêmeas, de aproximadamente 3,5 UI/ml.
2. A partir de então, os títulos séricos começaram a declinar, mais acentuadamente, nos três primeiros meses, e moderadamente, nos períodos subseqüentes, atingindo os níveis de 0,1 UI/ml no 12º mês; 0,03 UI/ml no 24º mês, e estabilizando-se praticamente desde então, com título ao redor de 0,02 UI/ml verificado no 36º mês de observação.
3. A concentração de anticorpos no sangue de cobaias, filhos de mães vacinadas, foi superior àquela detectada no sangue de suas mães, por ocasião do parto.
4. A imunidade passiva decresce gradualmente com o desenvolvimento do animal, e, ao final de três meses de idade, as cobaias, descendentes de mães vacinadas não mais apresentavam anticorpos maternos.

FURUTA, J.A. et al. Quantificação de anticorpos diftéricos em cobaias. I — Persistência do título de anticorpos séricos em animais inoculados com uma dose de toxóide diftérico. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 16:97-106, 1982.

FURUTA, J. A. et al. [Quantitative determination of diphtheria antibodies in guinea pigs. I — Persistency of diphtheria antitoxin levels in sera of animals inoculated with diphtheria toxoid]. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 16:97-106, 1982.

ABSTRACT: The behavior of the kinetic genesis of antibodies in guinea pigs inoculated with doses of an alum precipitated diphtheria toxoid was studied. In a parallel study the dynamic of passive immunity, naturally transmitted to the offspring, was examined. In immunized guinea pigs, it was verified that the diphtheria antitoxin synthesis maintains detectable titers up to 36 months. Antibodies transferred via placenta by the vaccinated mother reached a plasmic concentration in the newborn superior to that of the mother, and the passive immunity persisted in the circulation of the offspring at titers detectable for up to approximately three months.

UNITERMS: Antibodies, diphtheric. Diphtheria antitoxin. Diphtheria toxin. Vaccination.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BARR, M. & GLENNY, A.T. Some practical applications of immunological principles. *J. Hyg.*, London, 44:135-42, 1945.
2. BARR, M.; GLENNY, A.T. & RANDALL, K.J. Concentration of diphtheria antitoxin in cord blood and rate of loss in babies. *Lancet*, 2:324-6, 1949.
3. BLACK, R.E.; HUBER, D.H. & CURLIN, G.T. Redution of neonatal tetanus by mass immunization of non-pregnant women: duration of protection provided by one or two dosis of aluminium adsorbed tetanus toxoid. *Bull. Wld Hlth Org.*, 58:927-30, 1980.
4. BRAMBELL, F.W.R. The passive immunity of the young mammal. *Biol. Rev.*, 33:488-531, 1958.
5. CONDREA, P.; POENARU, E.; ESRIG, M. & FILIPESCO, I. Immunisation antitétanique du nouveau-né par la vaccination pendant la grossesse. *Arch. roum. Path. exp.*, 20:549-64, 1961.
6. CVJETANOVIC, B.; GRAB, B. & UEMURA, K. Dynamics of acute bacterial diseases. Epidemiological models and their application in public health. *Bull. Wld Hlth Org.*, 56:103-43, 1978.
7. DIPHTHERIA and tetanus toxoids and pertussis vaccine: surveillance summary. *Morb. Mort. Wkly Rep.*, 26:401-7, 1977.
8. FRASER, D.T. & WIGHAM, H.E. The use of rabbits for intracutaneous virulence tests of *B. diphtheriae* or titration of diphtheria antitoxin. *J. Amer. med. Ass.*, 82:1114-5, 1924.
9. GALAZKA, A. & SPORZYNSKI, Z. Immunity to tetanus and diphtheria in various age groups of Polish population. *Arch. Immunol. Ther. exp.*, 27:715-26, 1979.
10. GREENBERG, L. & BENOIT, R. Control of potency and the dosage of diphtheria and tetanus toxoid. *J. Amer. med. Ass.*, 160:108-13, 1956.
11. GUIDOLIN, R.; ZELANTE, F.; MEDEIROS, E.H. & LACRETA, P.R.V. Possível interferência da antitoxina tetânica pré-existente, na vacinação antitetânica. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 15:205-10, 1981.
12. HUMPHREY, J.H. & WHITE, R.G. *Imunologia médica*. 3ª ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan, 1972.
13. IARIA, S.T. & SANTOS, J.A.A. 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*, 13:119-32, 1964.
14. IIZUKA, H.; FURUTA, J.A. & OLIVEIRA, E.P.T. Difteria. Situação imunitária de uma população infantil urbana de São Paulo, SP, Brasil. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 14:462-8, 1980.

FURUTA, J.A. et al. Quantificação de anticorpos diftéricos em cobaias. I — Persistência do título de anticorpos séricos em animais inoculados com uma dose de toxóide diftérico. *Rev. Saúde públ.*, S. Paulo, 16:97-106, 1982.

15. IPSEN Jr., J. Immunization of adults against diphtheria and tetanus. *New Engl. J. Med.*, 251:459-66, 1954.
16. KOHLER, P.F. & FARR, R.S. Elevation of cord over maternal Ig G immunoglobulin: evidence for an active placental Ig G transport. *Nature*, 210:1070-1, 1966.
17. McLENNAN, R.; LEVINE, L.; NEWELL, K.W. & EDSALL, G. The early primary immune response to adsorbed tetanus toxoid in man. *Bull. Wld Hlth Org.*, 49:615-26, 1973.
18. MATTOS, A.G. Treze anos de campanha contra o tétano umbilical. *Pediat. prat.*, 33:269-76, 1962.
19. MILLIAN, S.J.; CHERUBIN, C.E.; SHERWIN, R. & FUERST, H.T. A serological survey of tetanus and diphtheria immunity in New York City. *Arch. environm. Hlth*, 15:776-81, 1967.
20. NAZARI, F.; MIRCHMSY, H.; ALÉ-AGHAT, S. & MAHINPOUR, M. A model for developing countries of mass serological survey of children vaccinated against diphtheria and tetanus. *J. biol. Stand.*, 4:329-33, 1976.
21. NICOL, L.; GIRARD, O.; CORVAZIER, R.; CHEYROUX, M.; RECLARD, P. & SIZARET, P. Étude comparée de la transmission de l'immunité des mères aux nouveau-nés. *Rev. Immunol.*, Paris, 24:16-23, 1960.
22. PATT Jr., J.A. Factors affecting the duration of intestinal permeability to macromolecules in newborn animals. *Biol. Rev.*, 52:411-29, 1977.
23. RÖMER, H.P. & SAMES, T. Zur Bestimmung sehr kleiner Mengen Diphtherie-antitoxins. *Z. Immun.-Forsch. exper. Therap.*, 3:344-51, 1909.
24. RUH, H.O. & CLELLAND, J.E. Comparison of diphtheria immunity in the mother and in the new-born. *Amer. J. Dis. Child.*, 25:59-62, 1923.
25. SCHEIBEL, I.; BENTZON, M.W. & CRISTENSEN, P.E. Duration of immunity after tetanus immunization. In: International Conference on Tetanus, 2nd Bern, 1967. *Proceedings*. Bern, Huber, 1967. p. 245-52.
26. SCHEIBEL, I.; BENTZON, M.W.; TULLINIUS, S. & BOJLÉN, K. Duration of immunity to diphtheria and tetanus after active immunization. *Acta path. microbiol. scand.*, 55:483-95, 1962.
27. SMITH, T. The degree and duration of passive immunity to diphtheria toxin transmitted by immunized female guinea pigs to their immediate offspring. *J. med. Res.*, 16:359-79, 1907.
28. STANFIELD, J.P. & GALL, D. Single-dose antenatal tetanus immunization. In: International Conference on Tetanus, 3rd, São Paulo, 1972. Washington, D.C., Pan American Health Organization, 1972. p. 105-10. (PAHO-Scient. Publ., 253).
29. STOLLERMAN, G.H. Bacterial vaccines and toxoids: review of safety and efficacy. *Adv. intern. Med.*, 23:405-34, 1978.
30. SURI, J.C.; DHILLON, H. & GREWAL, H.S. Active immunization of women in pregnancy for prevention of neonatal tetanus. *Bull. Wld Hlth Org.*, 31:349-57, 1964.
31. TOIVANEN, P.; MANTYJARVI, R. & HIRVONEN, T. Maternal antibodies in human fetal sera at different stages of gestation. *Immunology*, 15:395-403, 1968.
32. US. National Institute of Health. *Minimum requirements: diphtheria antitoxin*. 2nd rev. Washington, D.C., 1946.
33. VAHLQUIST, B. Transfert d'immunité de la mère a l'enfant par la voie transplacentaire et par l'allaitement. *Rev. Immunol.*, Paris, 24:3-15, 1960.
34. VAN RAMSHORST, J.D.; COHEN, H.; LEVINE, L. & EDSALL, G. The relation between animal potency tests and the human response to adsorbed tetanus toxoid. *J. biol. stand.*, 1:215-20, 1973.
35. VAN RAMSHORST, J.D.; SUNDARESAN, T.K. & OUTSCHOORN, A.S. International collaborative studies on potency assays of diphtheria and tetanus toxoids. *Bull. Wld Hlth Org.*, 46:263-76, 1972.

Recebido para publicação em 30/10/1982

Aprovado para publicação em 17/02/1982