

IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA — II — IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA COM ANTÍGENOS DE "LEPTOMONAS" *peessoai*, *LEISHMANIA brasiliensis*, *LEISHMANIA donovani* e T. CRUZI. *

WILLIAM BARBOSA ** MARILENE DE ALMEIDA *** DORALICE PIMENTEL ALVES *** MARIA DO CARMO MOREIRA DE SOUZA ****

RESUMO

Estudamos 39 soros comprovados, de pacientes com Leishmaniose tegumentar, pela reação de imunofluorescência indireta contra antígenos de "Leptomonas" *peessoai*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* e T. *cruzi*, após testarmos os três primeiros antígenos contra 100 soros — 20 de doença de Chagas, 20 de Pênfigo, 20 de Esquistossomose, 20 de Tuberculose e 20 de Blastomicose sul americana. Dentre os soros do grupo testemunha as falsas reações positivas, (título superior a 20), alcançaram no máximo 9% com um dos antígenos, incluindo a doença de Chagas. Dentre os grupos de pacientes de Leishmaniose tegumentar obtivemos — 32 casos positivos com títulos iguais ou superiores a 20 (82,05%) com todos os antígenos. A *L. brasiliensis* revelou 18 casos (46,13%); a *L. donovani* revelou 15 casos (38,46%); o T. *cruzi* revelou 12 casos (30,76%) e o novo antígeno testado a *L. peessoai* revelou 30 casos (76,87%) sendo ainda que o maior

número de casos com maiores títulos foi também revelado por este antígeno.

INTRODUÇÃO

Os trabalhos de investigação sobre a pesquisa de anticorpos fluorescentes na Leishmaniose tegumentar são controversos e não existe opinião unânime sobre o seu valor, quer como auxiliar ao diagnóstico, quer como ajuda no prognóstico ou como critério de cura (5,7,10,11,20). Tabela I.

Seja porque o agente etiológico provoque diminuta anticorpopogênese ou que as técnicas normalmente usadas sejam pouco sensíveis, é indubitável a dificuldade na demonstração de anticorpos específicos circulantes nesta doença. (20,21). Acrescenta-se

* Trabalho do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás.
** Professor titular do Dept. de Medicina Tropical da Universidade Federal de Goiás.
*** Residentes (bolsistas estagiários) do Dept. de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás.
**** Prof. Assistente — Dept. de Parasitologia do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás.

TABELA I
TABELA SINÓPTICA SOBRE IMUNOFLUORESCÊNCIA NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

<i>AUTOR</i>	<i>ANO</i>	<i>ANTIGENOS</i>	<i>RESULTADOS</i>	<i>OBSERVAÇÕES</i>
ODDO & CASCIO	1963	L.D. (<i>L. infantum</i>) (Promastigoto).	Positivos	Não encontraram resultados falsos negativos em Leishmaniose cutânea e no Calazar infantil.
SADUM & COLS.	1963	Trypanosomas sp.	Positivos	Apenas 2 soros de Leishmaniose (sp) testados.
DUXBURY & SADUM	1964	L.d.	Positivos	Estudaram soros de Calazar. Observaram reações cruzadas com Trypanosomose e Leishmaniose exceto a <i>L. trópica</i>).
SHAW & VOLLER	1964	<i>L. infantum</i> <i>L. brasiliensis</i> e <i>L. shadinni</i> (promastigoto) <i>L. donovani</i> (amastigoto) <i>T. cruzi</i> (epimastigoto e tripomastigoto)	Negativo para Leishmaniose tegumentar	Demonstraram reações cruzadas de grupo em 1 soro de Calazar. Reações negativas em soros de outras doenças e 1 de Leishmaniose tegumentar, variedade Panamá.
KAGAN	1964			Considerou a reação IF, como em fase experimental.
SHUIKINA	1965	L.e	Títulos baixos, em cobaios e humanos. Títulos elevados em coelhos.	Pacientes vacinados. Soros de cobaios infectados com L.e., e coelhos com L.e. e <i>L. trópica</i> .
BRAY & LAISON	1965	Formas promastigoto e amastigoto de <i>L.sp</i> (L.d; L.b) L.i; L.t.	Reações mais fortes com soros específicos e forma promastigoto (<i>Leptomnas</i>) amastigoto.	Soros humanos e imunossoros de coelhos (<i>Calazar L. tegumentar americana</i>) deram reações mais intensas com promastigotos (<i>Leptomonas</i>), L.b. variedade mexicana, os anticorpos circulantes são de doença ou infecção. A absorção por qualquer espécie é total.

TABELA I

AUTOR	ANO	ANTIGENOS	RESULTADOS	OBSERVAÇÕES
MAYRINK & COLS	1967	L.d. promastigoto	Títulos mais elevados do que na RFC	Trabalharam com pacientes de Leishmaniose visceral.
QUILICE	1968	L.d.	Títulos de L.F. iguais aos de RFC.	Nos soros de Calazar a reação pode ser aplicada ao diagnóstico. A 1/100 não dá reação cruzada com L. tegumentar.
AZULAY & COLS	1968	L.b. Promastigoto	Positivos	Estudaram apenas 3 casos
BITTENCOURT & COLS	1968	L.b.p. Promastigoto	Positivos	Usaram soros não diluídos de pacientes com L. tegumentar e L. difusa. Afirmaram que os anticorpos diminuem ou desaparecem com a cura da doença.
CAMARGO & REBONATO	1969	L.b. Promastigoto T. cruzi epimastigoto	Positivos reações cruzadas.	A absorção dos soros com os antígenos pode remover a sua reatividade homóloga, heteróloga ou ambas. Desenvolveram uma técnica de inibição de fluorescência para diferenciar Trypanosomíase de Leishmaniose.
CONVIT & PINARDI	1969	L.b.p. amastigoto	Positivos sempre em casos de evolução crônica e nas formas mucocutâneas.	Resultados variáveis em lesões estritamente cutâneas ou de evolução recente. A reação não é indicada para diagnóstico mas como um método de estudo imunológico da doença.
GUIMARÃES & COLS	1969	T. cruzi (culturas) L.b.; L.d. e L.e.	Positivos mais fortes com o antígeno homólogo. Não serve para diagnóstico.	Soro de Calazar, Leishmaniose e doença de Chagas dão reação de grupo. As reações são mais intensas na L. tegumentar quando existem lesões de mucosa. Não há correlação entre a reação de Montenegro ou I.R.M. e o título I.F.

TABELA I

AUTOR	ANO	ANTIGENOS	RESULTADOS	OBSERVAÇÕES
MAYRINK & COLS	1969	L.d. formas promastigoto T.c. (epimastigoto)	Positivas com L.d., no Calazar. Negativa com T.c. em soro diluído L. tegumentar ou visceral.	Os autores afirmaram que o <i>L. donovani</i> e a <i>L. brasiliensis</i> podem ser diferenciadas antigenicamente.
TRUONG & COLS	1969	L.d. amastigoto (corte de tecido de hamster)	Positiva especificamente para soro de Calazar em diluições superiores a 1/20. Negativa na L.t. exceto os casos com reações ganglionares.	Diminuição do Título da reação após o tratamento. Não afirmaram ser fenômeno constante e nem o tempo necessário para a negatificação total da sorologia.
WALTON	1970	L.d., promastigoto	Resultados variáveis positivos.	Embora os soros de alguns poucos casos dessem elevados títulos de anticorpos, à reação falta especificidade e sensibilidade.
CHIARI	1971	L.d., L.b., T.c.	Positivos, com sensibilidade igual à 77,5%. Usando apenas o antígeno homólogo a positividade foi de 16,1%.	Soros de pacientes com <i>L. tegumentar</i> (evolutivamente). Soro de Calazar e soro de doenças de Chagas. Não pode separar antigenicamente a <i>L. donovani</i> da <i>L. brasiliensis</i> pela diferença de títulos. Os títulos de anticorpos decresceram ou desapareceram com o tratamento da <i>L. tegumentar</i> .
WALTON	1972	L.b. (Panamá) amastigoto, formas intracelulares em culturas de tecido roto por osmone	Positivos com 89% dos casos (75 pacientes)	Reações negativas em 93% dos grupos testemunha. Títulos mais altos falsos positivos 1/8 (175 casos testados).

à estas dificuldades o fato conhecido dos antígenos dos tripanosomatídeos serem de grupo, havendo em consequência reações cruzadas entre eles (4,5,6,8,12,13, 14, 16) e ainda mais a variação da sensibilidade e especificidade antigênica demonstrada pelas formas empregadas como antígeno numa mesma espécie (amastigoto, promastigoto (3,19,21) e ou epimastigoto).

Não bastassem os fatos apontados, são muito escassos os trabalhos em que a par da mera preocupação em detectar os anticorpos imunofluorescentes, houvesse também a intenção de correlacioná-los com evolução clínica ou com a terapêutica (5, 7, 18, 19, 20). Motivos estes que, a nosso ver, tornam o assunto excitante para os investigadores da nosologia tropical e, em nosso caso, particularmente, mais ainda, porquanto além de nos encontrarmos em região onde, recentemente, as grandes expansões pioneiras como abertura de estradas e desmatamentos, fizeram recrudescer surtos epidêmicos sobre surtos epidêmicos de Leishmaniose tegumentar, nos enseja também experimentar um novo antígeno, a **Leptomonas pessoai** como elemento figurado de reação.

No presente trabalho, dando continuidade à investigação da comunidade antigênica da **L. pessoai** com a **L. brasiliensis**, no estudo da imunologia da Leishmaniose tegumentar, apresentamos os resultados comparativos obtidos pelo teste de imunofluorescência indireta, usando como an-

tígenos além da **L. pessoai**, a **L. brasiliensis**, a **L. donovani**, e o **T. cruzi**. A finalidade precípua deste trabalho preliminar foi verificar a potencialidade do novo antígeno — "**Leptomonas**" **pessoai** no teste de imunofluorescência na Leishmaniose tegumentar americana.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígenos — Lâminas para imunofluorescência preparadas com: a) "**Leptomonas**" **pessoai** — Cultura de 3 dias de **L. pessoai** em meio de Ducrey, foram removidas e lavadas em salina tampoadada 3 vezes, depois re-suspensas em tampão fosfato pH 7,2 e distribuídas em lâminas finas marcadas industrialmente com doze espaços, de forma a obter-se campos com cerca de 15 elementos.

b) **Leishmania brasiliensis** e **Leishmania donovani** — Formas promastigoto de ambas, cultivadas por 4 dias em meio de Ducrey foram preparadas da maneira anterior.

c) **T. cruzi** — Foram usadas nas preparações de lâminas formas epimastigotas obtidas em meio de Ducrey que, após lavadas e liofilizadas, foram re-suspensas em salina e distribuídas em lâminas como da maneira anterior.

Todas as lâminas foram guardadas a — 20°C em garrafas de boca larga, contendo sílica gel, envolvidas em papel fino, individualmente, e em papel de alumínio em lotes de 10, até o seu uso.

Conjugados: — Foi usado, inicialmente, um conjugado prepa-

rado no Instituto Adolf Lutz, gentilmente cedido pelo Dr. Hyakutake Saburô e posteriormente conjugado adquirido comercialmente, seja da Hyland ou do Instituto Pasteur (BBL). A titulação do conjugado foi feita para cada um, trabalhando-se com diluições variáveis de 1/50 a 1/100, em média, com diluição de 1/80.

Técnica da Reação: — Foi a técnica standard de imunofluorescência indireta, habitualmente empregada nas reações para toxoplasmose e doença de Chagas em nosso serviço. Para leitura usamos foto-microscópio Zeiss-Jena de pesquisa.

Soros Empregados: — a) Testemunhas — usamos no teste dos antígenos 20 soros de blastomicose sul americana, 20 de tuberculose, 20 de doenças de Chagas, 20 de esquistossomose e 20 de pêfigo foliáceo.

Todos estes soros foram testados inteiros contra os antígenos de: *L. pessoai*, *L. brasiliensis* e *L. donovani*. Os soros com resultados positivos foram diluídos de 1/10, até 1/80 e re-examinados contra todos os antígenos.

b) Imune-soros — foram usa-

dos 39 soros de pacientes com leishmaniose tegumentar, na sua grande maioria, confirmados parasitologicamente e que estiveram sob controles clínico e laboratorial evolutivo em nossas enfermarias ou em ambulatórios.

Dentre eles encontravam-se 28 com doença em fase aguda, de variada gravidade e 11 doentes crônicos, isto é, de mais de 1 ano e 6 meses até mais de 20 anos de doença, cuja sintomatologia era silente ou com surtos de metástases mucosas recentes.

Seus soros foram testados contra todos os antígenos anteriores e mais o *T. cruzi*, previamente diluídos de 1/20, a 1/160.

Aqueles positivos nestas última diluição foram re-estudados até a diluição de 1/1280.

De todos os pacientes, além da reação de Machado Guerreiro, previamente efetuadas dispunhamos ainda da intradermo reação de Montenegro.

RESULTADOS

A reação de imunofluorescência indireta realizada em 39 soros de pacientes com Leishma-

TABELA II

Títulos de anticorpos fluorescentes para Leishmaniose Tegumentar com antígenos homólogo e heterólogos.

N.º/Soros Testados	Antígenos	R E S U L T A D O S					Sensibilidade
		1:20	1:40	1:80	1,160	Negt.	
39	<i>L. brasiliensis</i>	9	4	4	1	21	46%
	<i>L. donovani</i>	11	1	1	2	24	38%
	<i>L. pessoai</i>	7	7	5	11	9	77%
	<i>T. cruzi</i>	11	1	0	0	27	5%

TABELA III

Frequência dos títulos de anticorpos fluorescentes em soros de pacientes com D. Chagas, Tuberculose, Pênfigo, Esquistossomose e Blastomicose Sul Americana com antígenos de *L. pessoai*, *L. brasiliensis* e *L. donovani* (formas promastigotos).

Patologias	N.º de Soros	A N T I G E N O S															TÍTULOS
		L. p.					L. b.					L. d.					
Doenças	N.º/ Soros	1/1	1/10	1/20	1/40	1/80	1/1	1/10	1/20	1/40	1/80	1/1	1/10	1/20	1/40	1/80	FREQUÊNCIA
Chagas	20	9	4	2	0	0	13	2	0	0	0	5	1	1	1	0	
Tuberculose	20	4	2	1	0	0	4	1	0	0	0	1	1	1	0	0	
Pênfigo	20	7	4	0	0	0	4	2	0	0	0	4	2	2	1	1	
Esquistossomose	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B.S.A.	20	3	1	0	0	0	2	2	0	0	0	2	2	1	1	1	
TOTAL	100	23	11	3	0	0	23	7	0	0	0	12	6	5	3	2	

L. p. *Leptomonas pessoai* — L. b. *Leishmania brasiliensis* e L. d. *Leishmania donovani*.

niose tegumentar, bem documentada — 28 da fase aguda e 11 de fase crônica — escolhidos ao azar, em vários períodos de evolução, comparativamente realizada com antígeno homólogo, e com os seguintes antígenos heterólogos — *Leptomonas pessoai*, *L. donovani* e *T. cruzi*, revelaram respectivamente — 18 positivos (46,1%), 30 positivos (76,8%), 15 positivos (38,4%) e 12 positivos (30,7%) com títulos iguais ou superiores a 20. (tabela II).

A especificidade da reação verificada em relação à 20 soros de pacientes de Tuberculose, 20 de Pênfigo, 20 de Esquistossomose e 20 de Blastomicose sul americana utilizando como antígenos a *L. pessoai*, *L. brasiliensis* e *L. donovani*, revelaram que os soros destas doenças, a partir da diluição de 1/20, praticamente não dão resultados falsos positivos. Tabela III.

A especificidade da reação em relação à pacientes com Leishma-

niose tegumentar e doença de Chagas, foi verificada pelo estudo de 20 soros de pacientes com doença de Chagas, 6 com reações de Machado Guerreiro positivas e 14 soros de fase aguda. Os resultados para os antígenos de *L. pessoai*, *L. brasiliensis* e *donovani* foram respectivamente 2 positivos (10%) — nenhum positivo e 2 positivos (10%). Os resultados encontram-se anexados à tabela anterior.

A frequência dos títulos das reações em 39 soros de pacientes comprovados de Leishmaniose tegumentar, utilizando antígenos homólogos e heterólogos, acham-se resumidos na tabela II.

Quanto à distribuição destes títulos em relação aos pacientes em fase crônica, encontram-se resumidos na tabela IV.

A frequência e os títulos com que estes soros reagiram isoladamente, com um dos antígenos ou concomitantemente com antígeno homólogo e heterólogo, acham-se resumidos na Tabela V.

TABELA IV

Títulos das reações de I.F. indireta com antígenos de *L. pessoai*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* e *T. cruzi* em 2 grupos de pacientes crônicos e recentes de *L. tegumentar*

Forma Clínica	Crônicos (11 casos)				(28 casos) Recentes				Total		
	Antígenos	Títulos	L.p	L.b	L.d	T.c	L.p	L.b		L.d	T.c
1/20			1	1	3	3	6	8	8	8	38
1/40			1	2	0	1	6	2	1	0	13
1/80			1	2	0	0	4	2	1	0	10
1/160			5	0	1	0	6	1	1	0	14
TOTAL			8	5	4	4	22	13	11	8	75

TABELA V

Resultado das reações de imunofluorescência indireta em 32 pacientes de Leishmaniose tegumentar, com antígenos de *L. pessoai*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* e *T. cruzi*.

Pacientes	Títulos observados com os antígenos				Total de Pacientes
	L.p.	L.b.	L.d.	T.c.	
1	40				6
2	40				
3	20				
4	40				
5	20				
6	40				
7	160	20			6
8	160	80			
9	40	40			
10	160	80			
11	160	20			
12	80	20			
13	20		40		3
14	160		160		
15	20		20		
16	20	20	20		5
17	160	40	20		
18	80	80	20		
19	160	80	80		
20	40	20	20		
21	20	20	20	20	
22	80	20	20	20	6
23	160	40	20	40	
24	160	20	20	20	
25	160	160	160	20	
26	20	20	20	20	
27	80		20	20	
28	80	40		20	1
29	160			20	2
30	40			20	
31				20	2
32				20	

Leishmaniose tegumentar, com antígenos de *L. pessoai*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* e *T. cruzi*.

Dos 39 soros examinados contra os antígenos estudados, verificamos que 32 soros deram resultados positivos com títulos iguais ou superiores a 1/20. Apenas 8 soros reagiram isoladamente contra o antígeno de *L. pessoai* e 2 contra o antígeno *T. cruzi*.

Observamos que 11 soros reagiram simultaneamente com os antígenos de *L. pessoai*, *L. brasiliensis* e *L. donovani* e destes, 6 também o fizeram contra o antígeno de *T. cruzi*. (tabela V).

Os dez soros com resultados positivos até o título 1/160 foram re-estudados até a diluição de 1/1280, 3 destes soros foram positivos até esta diluição.

COMENTÁRIOS

O teste preliminar dos antígenos empregados nesta investigação contra 100 soros de pacientes com outras doenças, controlados por nós, inclusive 20 casos de doença de Chagas, nos permitiu verificar que reações falsas positivas pela imunofluorescência indireta só apareciam em soros com diluições inferiores a 1/20. Apenas o antígeno de *L. donovani*, a este respeito se mostrou ligeiramente menos específico com 9% de falsos positivos.

Estabelecido o parâmetro de 1/20 como diluição capaz de detectar anticorpos específicos, verificamos que antígenos empregados foram capazes de diagnosticar 32 casos dentre os 39 estudados, dando a alta percentagem de 82,05% de sensibilidade.

Todavia, o antígeno homólogo se comportou muito modestamente, apenas 18 casos seriam diagnosticados dentre os 39 estudados com o percentual de 46,13%.

O antígeno *L. donovani* revelou 15 casos dentre os 39 estudados, dos quais 11, com o menor título admitido como específico. Seu percentual de sensibilidade foi de 38,46%.

O antígeno de *T. cruzi* detectou apenas 12 casos, sendo 11 com títulos de 1/20 e 1 com título de 1/40 — dentre aqueles, 2 casos não tinham sido revelados por outro antígeno, contribuindo assim para ampliar a faixa de sensibilidade da reação quando analisada globalmente. Cabe, todavia, revelar que dentre estes casos 5 soros eram reagentes na reação de Machado Guerreiro.

O antígeno heterólogo novo, pela primeira vez empregado na investigação da *L. tegumentar*, surpreendentemente, a par de mostrar especificidade adequada, demonstrou sensibilidade superior ao próprio antígeno homólogo, revelando 30 casos positivos, num total de 32, e dentre 39 soros estudados, com o alto percentual de 76,87%, sugerindo que a "*Leptomonas*" *pessoai* é um antígeno de grande valor no estudo da Leishmaniose tegumentar.

Se se levar em consideração que os maiores títulos e em maior número — 5 soros com título 80 e 11 soros com título de 160 foram detectados por este antígeno nesta investigação, é de se admitir o grande interesse que ele de-

verá despertar em experimentações futuras.

Julgamos de importância que trabalhos usando este antígeno deverão ser ensaiados por outros investigadores contra cepas de leishmania de outras regiões do Brasil, bem como contra cepas de *L. brasiliensis* de outras variedades, em outras regiões do mundo. Caso venham a se confirmar as observações aqui verificadas, acreditamos ter se dado um passo importante no estudo de imunologia da Leishmaniose tegumentar.

SUMMARY

IMMUNOLOGY OF AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. INDIRECT IMMUNOFLOUORESCENCE TEST WITH ANTIGENS OF "LEPTOMONAS" PESSOAI, LEISHMANIA BRASILIENSIS, LEISHMANIA DONOVANI AND T. CRUZI.

39 sera from patients with confirmed cutaneous leishmaniasis have been tested by indirect immunofluorescence against antigens of "*Leptomonas*" *pessoai*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* and *T. cruzi*. The first three antigens have also been tested against 100 - sera - 20 from patients with Chagas disease, 20 with pemphigus, 20 with Schistosomiasis, 20 with tuberculosis and 20 with South American blastomycosis. Among the sera of the control group, false positive reactions, (titers over 20) were seen in about 9% with one of the antigens, including Chagas disease.

32 positive reactions (titers as high or over 20) corresponding to 82,05%, were obtained with all antigens in the patients with cutaneous leishmaniasis. *L. brasiliensis* revealed 18 positive cases (46,13%); *L. donovani* revealed 15 positives cases (38,46); *T.*

cruzi revealed 12 positive cases (30,76%) and the antigen of *L. pessoai* revealed 30 positive cases (76,87%). Thus, the largest number of cases, with the highest titers have been revealed by the antigen of *L. pessoai*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AZULAY, R.D. — Imunofluorescence in mucocutaneous leishmaniasis. *An. Brasil. Derm.*, 43-76, 1968.
2. BARBOSA, W., SOUZA, M.C., RASSI, D.M., OLIVEIRA, R.L. & MOTTA, L. — Imunologia da leishmaniose tegumentar — I — Intradermo reação concomitante com antígenos de *L. pessoai* e *L. brasiliensis*. *Rev. Pat. Trop.* 1: (3): 377-383, 1972.
3. BITTENCOURT, A.C. SODRÉ, A. & ANDRADE, Z.A. — Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na leishmaniose tegumentar. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 10: 247-252, 1968.
4. BRAY, R.S. & LAINSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis. I — The fluorescent antibody staining technique. *Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 59: 535-544, 1965.
5. CAMARGO, M.E. — Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am.J. Trop. Med. Hyg.*, 18: 500-505, 1969.
6. CHIARI, C. de A. — Pesquisas de anticorpos circulantes na leishmaniose tegumentar americana pela reação de imunofluorescência indireta. Tese de mestrado. I.C.B. Universidade Federal de Minas Gerais. Mimeografada. Belo Horizonte, 1971.
7. CONVIT, J. & PINARD, M.E. — Applying the indirect immunofluorescence test to the study of American cutaneous leishmaniasis. *Derm. Inter.*, January-March: 17-20, 1969.
8. DUXBURY, R.E. & SADUN, E.H. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 13: 525-529, 1964.
9. GUIMARÃES, N.F., LAGE, H.A., VERNANCIO, J.A. & GRZYMBERG, N.F., Estudo comparativo da reação indireta de anticorpos fluorescentes em doença de Chagas, Leishmaniose tegumentar e calazar, com vários antígenos de *Leishmania* e *Trypanosoma*. *O Hospital*, 75: 299-313, 1969.
10. KAGAN, I.G. — Evaluation of routine serologic testing for parasitic disease. U.S. Department of Health, Education and Welfare. Atlanta, Georgia: 1-5, oito tabelas, 3 páginas bibliográficas, 1964.
11. MAYRINK, W. ARAÚJO, F.G. & MAGALHÃES, A. — Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. I — Sensibility of the test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 9: 172-174, 1967.

12. MAYRINK, W. ARAÚJO, F.G. & MARGALHÃES, A. — Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. II — Studies on the specificity of the test. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10: 41-45, 1968.
13. ODDO, F.G. & CASCIO, G. — II test di immunofluorescence nelle leishmaniosi viscerale e cutanea. *Rev. Inst. Seroter. Ital.*, 38: 138-145, 1963.
14. QUILICI, M. DUNAN, S. & RANAUE, J. — L'immuno-fluorescence dans les leishmanioses. Comparaison avec la reaction de fixation du complement. *Med. Trop.*, 28: 37-43, 1968.
15. SADUN, E.H., DUXBURY, R.E., WILLIAMS, J.S. & ANDERSON, R.I. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Africa and American Trypanosomiasis in man. *J. Paras.*, 19: 385-388, 1963.
16. SHAU, J.J. & VOLLER, A. — The detection of circulating antibody to Kala-Azar by means of immunofluorescent techniques. *Trans. roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 58: 349-352, 1964.
17. SHUIKINA, E.E. — Use of indirect fluorescent antibody technique in studies of cutaneous leishmaniasis. *Med. Parasit. and Parasit. is., Moscow*, 34: 576-582, in *Trop. Dis. Bull.*, 63: 136, 1965.
18. WALTER, C.B., BROOKS, W.H. & ARJONA, I. — Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 21: 296-299, 1972.