

ELETROIMUNODIFUSÃO NO DIAGNÓSTICO DO CALAZAR COM OS ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA donovani*, *LEISHMANIA brasiliensis* E "*LEPTOMONAS pessoai*" — RESULTADOS PRELIMINARES *

WILLIAM BARBOSA ** ZAIR BENEDITA PINHEIRO *** RAQUEL LOPES DE OLIVEIRA ****

RESUMO

Soros de 11 pacientes de Calazar, comprovados parasitologicamente e acompanhados clinicamente, foram estudados pela técnica de contra-imunoeletroforese com os antígenos de *L. brasiliensis*, *L. pessoai* e *L. donovani*. Os resultados positivos foram, respectivamente, da ordem de 90,9%, 72,7% e 96,6%. Dos soros testemunhas: (16 de doença de Chagas, 12 de Leishmaniose tegumentar, 12 de Tuberculose, 12 de Blastomicose Sul Americana e 8 de outras doenças) apenas 5, sendo 4 de Tuberculose e 1 de Blastomicose Sul Americana, deram reação cruzada com o antígeno de *L. pessoai*. O método, se revelou de grande sensibilidade e elevada especificidade além de ser muito prático e econômico.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico da Leishmaniose visceral em áreas endêmicas, é relativamente fácil e baseia-se em dados clínicos, parasitológicos,

sorológicos e também nas alterações proteicas do soro. Estas últimas, conquanto não sejam patognomônicas e puramente presuntivas, servem como importantes índices da afecção nessas áreas. Até agora a reação de formol — gel, por exemplo, quando positiva em prazo curto, é dado de valor não desprezível no diagnóstico da doença.

O diagnóstico sorológico, propriamente dito, ainda que mais específico, não o é de maneira absoluta seja pela comunidade antigênica dos tripanosomatídeos, seja pela semelhança de pontos imunoestruturais com as micobactérias, condicionando reações cruzadas, as quais, embora em títulos mais baixos, ocorrem entre soros de Leishmaniose visceral e de doenças produzidas por elas, como: tuberculose e lepra.

As técnicas sorológicas empregadas: reação de fixação de com-

* Trabalho do Instituto de Patologia Tropical (IPT) da Universidade Federal de Goiás (UFGO.)

** Prof. Titular dos Departamentos de Parasitologia e Medicina Tropical.

*** Biologista do I.P.T. — Imunologia.

**** Técnica do Laboratório de Parasitologia.

plemento^{13, 18, 22, 24}, hemaglutinação passiva, reação de aglutinação do látex, inibição de cultura, imunofluorescência indireta^{4,6,8,9, 10,11,12,13,15,19,20,21,22,23,24,25,29} todas sofrem, além das restrições gerais, antes apontadas, as limitações impostas pelas próprias técnicas em si mesmas. Quando se trabalha em áreas, em que são comuns, elevada prevalência de doenças produzidas por outras espécies de tripanosomatídeos, e/ou de doenças devidas às micobactérias, aquelas limitações são muito ampliadas.

É assim que se sabe, por exemplo, das dificuldades em relação à fixação do complemento. Nesta reação, a começar pelo soro do paciente, que com frequência é anti-complementar¹⁸ têm-se todas as dificuldades inerentes à própria técnica que exige pessoal adestradíssimo, para sua execução, reativos sob condições precisas, e mais mão de obra muito grande e tempo demasiado, não se prestando, por isso, para rotina clínica.

As reações de hemaglutinação passiva e aglutinação do látex não são rigorosamente padronizáveis e pecam muito quanto à especificidade e reprodutibilidade^{9,16} graças, principalmente, ao curto tempo de validade em boas condições, dos antígenos. Provavelmente a reação de imunofluorescência indireta seria a melhor técnica para o diagnóstico e controle da leishmaniose visceral, não fosse o componente subjetivo do método e a exigência de equipamento dispendioso, a par da dificuldade na padronização da técnica.

Daí a necessidade de se encontrar um método sorológico capaz

de contornar as dificuldades antes apontadas. Com o advento, ou melhor, com a vulgarização das técnicas de imunodifusão estas nos pareceram o caminho mais correto a se trilhar.

Parece que foram aquelas restrições, também, que induziram Ranque e cols²⁷ a usar os métodos de imunodifusão em gel, obtendo linhas de precipitação em número variável de 3 a 5 arcos, em soros de pacientes com leishmaniose visceral e em cães infectados, com antígeno heterólogo de *Crithidia fasciculata*.

Este intento, foi também perseguido recentemente, por Le Ray e cols²⁸ que, em trabalho preliminar, empregando como antígeno o extrato hidrossolúvel de *Leishmania donovani*, forma promastigota, obtiveram, pela análise imunoeletroforética em soros de 4 casos humanos e em 5 casos caninos de Leishmaniose visceral, uma média de 11,6 arcos de precipitação, cuja constância e intensidade permitiram atribuir aquela análise relevante especificidade.

O fato de trabalharmos em área geográfica, endêmica para doença de Chagas, Leishmaniose tegumentar, e onde a prevalência do Calazar aumenta dia a dia, nos motivou a entreter esta pesquisa, desde que já tínhamos alguma experiência com as técnicas de imunoprecipitação, em estudos anteriores^{5,30} e dispunhamos de soros de pacientes de Calazar, comprovados parasitologicamente, através de exames diretos e culturas e que foram acompanhados muito de perto, do ponto de vista clínico.

Neste trabalho damos conta somente dos resultados obtidos com

a técnica de contra-imunoeletroforese no diagnóstico do Calazar e seu controle evolutivo usando, comparativamente, para diagnóstico, além do antígeno homólogo, os antígenos, heterólogos de "*L. pessoai*" e de *L. brasiliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

ANTÍGENOS: A) *Leishmania donovani* cêpa mantida, desde 1970 no Laboratório de Protozoologia do IPT, oriunda da Inglaterra e provinda de Lisboa em 1970.

B) "*Leptomonas*" *pessoai* cêpa "princeps" isolada no IPT, 1968, por Galvão e cols¹⁷;

C) *Leishmania brasiliensis* cêpa (MT) isolada no IPT, em 1970, d'uma epidemia ocorrida em Mato Grosso.

A técnica de preparação de todos os antígenos foi a mesma. O antígeno constou de um extrato hidrossolúvel obtido da seguinte maneira: as formas promastigotas de cultura de 3 dias, para *L. pessoai*, e de 10 dias para *L. brasiliensis* e *L. donovani*, foram cuidadosamente removidas da cultura e lavadas em salina por 6 a 7 vezes, depois ressuspensas em solução de cloreto de sódio 0,017 M, rotas por congelamento e descongelamento por 10 vezes, em seguida homogeneizadas em aparelho "Virtis" 40 r.p.m. e depois liofilizadas. A massa liofilizada foi então diluída em salina, na proporção de 1 para 4 volumes, e mantida em geladeira, por uma noite; após centrifugação a 4°C, 20.000g por uma hora o sobrenadante foi usado como antígeno.

A concentração de proteínas de cada antígeno foi determinada pela técnica de Lowry e foi a seguinte: antígeno de *L. brasiliensis* — 2,63 mg/ml; *L. pessoai* — 3,26 mg/ml e *L. donovani* — 1,79 mg/ml.

SOROS: Os soros empregados foram os seguintes: soros de pacientes com Calazar em número de 11, mantidos em nossa soroteca de março de 1972 a julho de 1973 e/ou de pacientes internados no Departamento de Medicina Tropical do IPT; num total de 60 amostras; soros de 12 pacientes com Leishmaniose tegumentar, estocados em nossa soroteca, com lesão puramente cutânea, todos de casos recentes, num total de 12 amostras;

soros de 12 pacientes com Tuberculose, internados num hospital de tuberculosos (Sanatório JK) com cavernas residuais que se prestavam, na época, a um inquérito sobre Aspergilose;

doença de Chagas — 12 soros de pacientes em fase aguda ou crônica e 4 soros positivos, pela reação de Machado Guerreiro de pacientes assintomáticos;

Blastomicose Sul Americana — 12 soros de 12 pacientes em tratamento no Hospital das Clínicas, no Departamento de Medicina Tropical da UFGO.;

Outras doenças — 8 amostras de soro, uma amostra de cada uma das doenças: Jorge Lobo, Ancilostomose, Cromomicose, Malária, Actinomicose, Toxoplasmose, Febre Amarela e Esquistossomose.

A técnica da reação foi a já descrita e constou da micro técnica em lâminas de microscopia

de 75 x 25 mm, recobertas com 3 cm³ de ágar puro a 1% em tampão veronal pH. 8,2. Na lâmina eram feitos 6 pares de orifícios, à distância de 3 mm. No orifício da esquerda, polo negativo, colocava-se o antígeno e à direita, polo positivo, colocava-se o soro a estudar (anticorpo). Fazia-se passar a corrente pelo tempo de 20 a 25 minutos, com a voltagem fixa de 200 volts, o que equivalia cerca de 11mA por lâmina. (Fig. 1). Todos os soros foram estudados sem diluir ou concentrar, preliminarmente, contra cada um dos antígenos. Posteriormente os soros de Calazar de todas as 60 amostras disponíveis, colhidos de regra, com intervalo de 1 ou 2 semanas, durante 1 ou 2 meses, foram estudados diluídos, nas proporções de 1/2 a 1/64, contra o antígeno homólogo. Os soros positivos, na diluição 1/64, foram experimentados até a sua diluição máxima de positividade.

RESULTADOS

Os resultados acham-se resumidos nas tabelas I, II e III. Cabe observar que houve reações positivas, com todos os três antígenos, em proporções bastante elevadas: 96,6%, com o antígeno

homólogo, se se considerar todas as amostras experimentadas, porque neste caso observamos duas amostras negativas, uma, 50 dias após o início do tratamento e a outra 58 dias após o tratamento. Em ambos os casos, ELS e ESV, houve uma coincidência com a queda do teor de gama-globulina e acentuada melhora clínica. O que a rigor faz com que se interprete o antígeno como dando 100% de resultados positivos. O antígeno de *L. pessoai* que foi o menos sensível e menos específico detectou 8 dos 11, 72,7% dos casos e deu reação cruzada com 4 casos de tuberculose e 1 de blastomicose, 8,3% de reações falsas positivas. O antígeno de *L. brasiliensis* foi positivo em 10 dos 11 casos, 90,9% de positividade e mesmo com o soro homólogo não deu resultado positivo com nenhum. Todavia, talvez, pela concentração proteica foi o que detectou com maior frequência, maior número de faixas, individualmente (fig. 2).

COMENTÁRIOS

Como verificamos, a técnica de contra-immunoelctroforese se mostrou muito sensível e bastan-

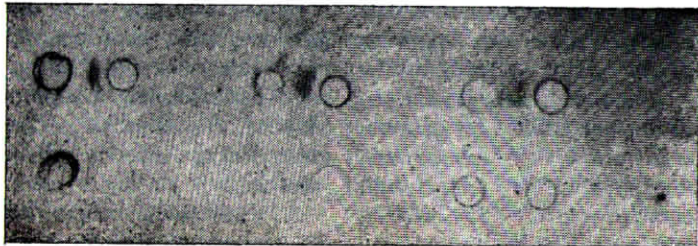


FIGURA 1 — Disposição da lâmina para contra-immunoelctroforese.

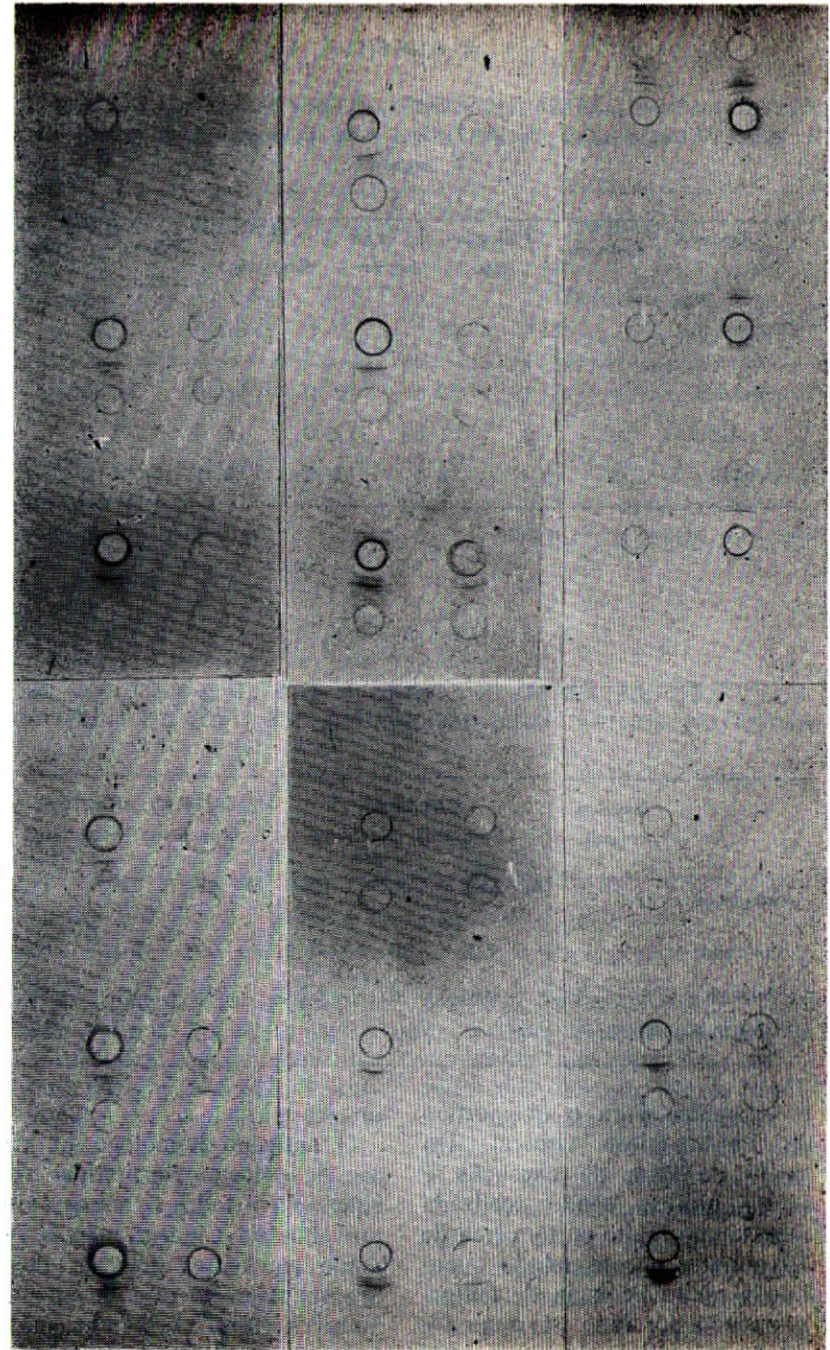


FIGURA 2 — Observar a intensidade das reações e variações do número de faixas.

TABELA I

RESULTADOS DA CONTRA-IMUNOELETROFORESE NOS SOROS DE CALAZAR E TESTEMUNHAS COM OS ANTÍGENOS DE *L. donovani*, *L. brasiliensis* e *L. pessoai*.

| Doença result. Antígenos | Calazar | | Tubercu- lose | | L. tegu- mentar | | D. Chagas | | B.S.A. | | Outras | |
|--------------------------------|---------|---|------------------|----|--------------------|----|--------------|----|--------|----|--------|---|
| | P | N | P | N | P | N | P | N | P | N | P | N |
| <i>L. donovani</i> | 11 | 0 | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 16 | 0 | 12 | 0 | 8 |
| <i>L. brasiliensis</i> | 10 | 1 | 0 | 12 | 0 | 12 | 0 | 16 | 0 | 12 | 0 | 8 |
| <i>L. pessoai</i> | 8 | 3 | 4 | 8 | 0 | 12 | 0 | 16 | 1 | 11 | 0 | 8 |

Obs.: P — positivo; N — negativo

TABELA II

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE CONTRA-IMUNOELETROFORESE COM OS 3 ANTÍGENOS CONTRA SOROS SABIDAMENTE POSITIVOS OU NEGATIVOS

| Doença result. Antígenos | CALAZAR (Amostras positivas) | | | OUTRAS DOENÇAS (Amostras negativas) | | |
|--------------------------------|---------------------------------|----|--------|----------------------------------------|---|-------|
| | N.º Abs. | P | (%) | N.º Abs. | P | (%) |
| <i>L. donovani</i> | 60 | 58 | (96,6) | 60 | 0 | (0) |
| <i>L. pessoai</i> | 11 | 8 | (72,7) | 60 | 5 | (8,3) |
| <i>L. brasiliensis</i> | 11 | 10 | (90,9) | 60 | 0 | (0) |

te específica para o diagnóstico da Leishmaniose visceral. Do ponto de vista da execução é muito prática, sendo realizada num tempo muito curto, cerca de 30 minutos e consumindo quantidade muito pequena de antígeno, sendo por tudo isto mais fácil de se realizar do que a imunoelectroforese ou imunodifusão

simples em gel.

O antígeno homólogo foi capaz de detectar precipitinas circulantes em todos os casos comprovados de Calazar, não o fazendo em outras doenças, mesmo naquelas em que, de alguma maneira seria esperado, tais: Leishmaniose tegumentar e a doença de Chagas. Como se sa-

TABELA III

ESTUDO DOS SOROS DE CALAZAR (SEM DILUIR) EM CONTRA-IMUNOELETROFORESE COM ANTÍGENO DE *L. donovani*

| N.º | Iniciais | Prontuário | Amostras | Result. Posit. | Observações |
|-------|----------|------------|----------|-------------------|--------------------------------------|
| 1 | A.M.S. | 96.860 | 7 | 7 | Todas com uma faixa |
| 2 | D.S.M. | 102.998 | 10 | 9 | Todas com uma faixa, última negativa |
| 3 | E.L.S. | 109.415 | 4 | 3 | 1a. amostra 2 faixas e |
| 4 | E.S.V. | 112.959 | 5 | 5 | 4a. negativa Todos com uma faixa |
| 5 | M.P.C. | 3.607 | 5 | 5 | até a 5a. amostra 2 faixas |
| 6 | P.A.L. | 116.610 | 10 | 10 | |
| 7 | P.M.C. | 119.611 | 10 | 10 | |
| 8 | S.M.R. | 12.650 | 3 | 3 | |
| 9 | S.C.S. | 110.206 | 3 | 3 | |
| 10 | W.C.P. | 95.150 | 3 | 3 | |
| 11 | G.F.S. | 125.527 | 1 | 1 | |
| Total | 11 | — | 60 | 58 | — |

be, os antígenos dos Trypanosomatídeos são de grupo. Na doença de Chagas, entendemos que não se tenham detectado imunoprecipitinas por esta técnica, pois, não tem sido fácil fazê-lo, mesmo com o antígeno homólogo^{1,2,22} e aparentemente, até há bem pouco tempo, se admitia, segundo Muniz²², que as precipitinas fossem, praticamente, apanágio da fase aguda da doença e só, eventualmente, pudessem ser detectadas na fase crônica. Recen-

temente, Afchain, Capron e Prata¹, demonstraram precipitinas circulantes em chagásicos crônicos. Nós mesmos, temos verificado o mesmo. Detectamos 4 positivos para precipitinas, pela mesma técnica, usando antígeno de *T. cruzi* dentre 6 pacientes estudados, e com resultados negativos, com antígeno de *L. donovani*, *L. brasiliensis* e *Leptomonas pessoai*. Não confirmamos, portanto, na imunoprecipitação, por contra-imunoelectroforese, as

reações cruzadas, que já havíamos verificado, entre o antígeno de *T. cruzi* e soro hiperimune de *L. pessoai*³⁰, quando não observamos precipitinas induzidas pelo *T. cruzi* e demonstráveis pelo antígeno homólogo (*T. cruzi*), ao usarmos o antígeno heterólogo de *L. pessoai*. Este fato se deve, provavelmente, à escassa quantidade de anticorpos precipitantes na infecção natural.

Em doentes de Leishmaniose tegumentar, os resultados observados, foram até certo ponto, surpreendentes: sabe-se da dificuldade em se detectar anticorpos circulantes, por diversas técnicas, na Leishmaniose cutânea por *Leishmania trópica*^{26,27}; na leishmaniose sul americana por cêpas do Complexo mexicano, ou *brasilensis*⁷ já são numerosos os trabalhos sobre antígenos obtidos de formas promastigotas, ou amastigotas, de tripanosomatídeos homólogos ou heterólogos, ou mesmo monoxênicos, capazes de detectar, seja pela técnica de imunofluorescência, seja pela técnica de imunodifusão em gel, anticorpos circulantes^{4,6,8,12,23,26,29}. Nesta observação, embora, fosse demonstrado que o antígeno de *L. brasilensis* funcionava bem, pois revelou 10 dos 11 casos de Calazar, ele não foi capaz de detectar precipitinas em soros de pacientes de Leishmaniose tegumentar, é bem verdade que de casos sem comprometimento extenso, sem lesões mucosas ou severa repercussão ganglionar.

O antígeno de "*Leptomonas pessoai*" foi o menos sensível e dentre os 11 casos de Calazar re-

velou apenas 8. Como já comentamos, deixou de dar reações cruzadas, esperadas, na concentração empregada, com os soros de doença de Chagas e da mesma forma como o antígeno de *Leishmania brasiliensis*, não revelou precipitinas nos doentes de leishmaniose. A surpresa, em relação, a este antígeno foi o encontro de 4 casos de reação cruzada com tuberculose, por provável coincidência imunestrutural e com 1 caso de Blastomicose Sul Americana, cuja explicação, mais plausível, seria o fato de haver associação com tuberculose pulmonar, ocorrência relativamente comum, cerca de 15% dos casos em algumas áreas³, na forma linfática visceral com participação pulmonar.

Em suma, nos pareceu, que estas experiências com os antígenos *L. pessoai*, *L. brasiliensis*, *L. donovani* vieram demonstrar a possibilidade do emprego deles, preferentemente, do antígeno homólogo, numa reação muito sensível e específica, para o diagnóstico do Calazar e capaz de ser adaptada para inquéritos epidemiológicos, graças às facilidades de execução e custo, ao contrário das reações e técnicas até agora disponíveis.

SUMMARY

COUNTERIMMUNOELECTROPHORESIS IN DIAGNOSIS OF VISCERAL LEISHMANIASIS WITH ANTIGENS OF *L. donovani*, *L. brasiliensis* and "*LEPTOMONAS pessoai*". PREVIOUS NOTE.

Sera from 11 patients with visceral leishmaniasis, confirmed by parasitologic

logic examination and clinical control were studied by counterimmunoelectrophoresis using antigens of *Leishmania brasiliensis*, *Leptomonas pessoai* and *L. donovani*.

Positive results were 90,0%; 72,7% and 96,6% respectively. Among 60 control sera tested (16 of Chagas' disease, 12 of mucocutaneous leishmaniasis, 12 of tuberculosis, 12 of South American blastomycosis and 8 of several other diseases) only 4 of tuberculosis and 1 of South American blastomycosis gave cross reaction with the antigen of *L. pessoai*. The method is very practical and cheap and showed high sensitivity and great specificity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFCHAIN, D. CAPRON, A. & PRATA, A. — Anticorpos Precipitantes na Tripanosomiase Humana — *Gaz. Med. Bahia*, 70: 141-47, 1970.
2. AFCHAIN, D.; RAY, D. Le; CAPRON, A. & JADIN, J. — Analyse antigénique comparée, par immunoelectrophorèse, des formes de culture de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*, *Trypanosoma* (*Trypanozoon*) *brucei* et *Leishmania donovani*. Conséquence phylogéniques et diagnostiques. *J. Protozool.* 19: (Supl.) 59-60, 1972.
3. BARBOSA, W. — Blastomicose sul americana — contribuição ao seu estudo no Estado de Goiás — Tese — Oficina da Universidade Federal de Goiás — 1968.
4. BARBOSA, W.; ALMEIDA, M.; ALVES, D.P. & SOUZA, M.C.M. — Imunologia da Leishmaniose Tegumentar Americana — II. Imunofluorescência indireta com antígeno de "*Leptomonas*" *pessoai*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania donovani* e *T. cruzi*. *Rev. Pat. trop.* 4: 403-414, 1972.
5. BARBOSA, W.; BLAU, E.; MENDONÇA, J.R. & OLIVEIRA, R.L. — Crossing over immunoelectrophoresis applied to the study of immunology of South American Blastomycosis — Previous note. *Rev. Pat. trop.* 2:73-76, 1973.
6. BITTENCOURT, A.C.; SODRÉ, A. & ANDRADE, Z.A. — Pesquisa de anticorpos circulantes pelo método de imunofluorescência na Leishmaniose tegumentar. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, 10:247-252, 1968.
7. BRAY, R.S. — Leishmaniasis in the Old World. *Br. Med. Bull.* 28: 39-43, 1972.
8. BRAY, R.S. & LAINSON, R. — The immunology and serology of leishmaniasis. I. The fluorescent antibody staining technique. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 59: 535-544, 1965.
9. BRAY, R.S. & LAINSON, R. — Studies on the immunology and serology of leishmaniasis. V. The use of particles as vehicles in passive agglutination tests. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 61:490-505, 1967.
10. CAMARGO, M.E. — Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18:500-505, 1969.
11. CHANG, S. L. & NEGHERBON, W. O. — Studies on hemoflagellates. III. The specificity of serological reactions of *Leishmania donovani*, *L. brasiliensis*, *L. tropical* and *Trypanosoma cruzi* — *J. Inf. is.* 81: 209-227, 1947.
12. 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. Mimeog. Belo Horizonte, 1971.
13. CUNHA, A.M. DA & DIAS, E. — Sur la préparation d'un antigène stable pour la réaction de fixation du complément dans les leishmanioses. *C.R. Soc. Biol.* 129-991, 1938.
14. DUPONEY, P. & MARECHAL, J. — Structure antigénique des trypanosomes — I. Étude des antigènes de trois espèces de trypanosomes (*T. mega*, *T. cruzi*, *T. gambiense*) par la fixation du complément, la précipitation en gel et l'immunofluorescence. *Ann. Inst. Pasteur* 110: 888-991, 1966.
15. DUXBURY, R.E. & SADUN, E. H. — Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Am. J. trop. Med. Hyg.* 13: 525-529, 1964.
16. FIFE, E.H. — Advances in methodology for immunodiagnosis of parasitic diseases. *Exp. Parasit.* 30: 132-163, 1971.
17. GALVÃO, A.B.; OLIVEIRA, R.L.; CARVALHO, L.M.A. & VEIGA, P. G. — *Leptomonas pessoai* sp. n. (*Trypanosomatidae*, *Kinetoplastida*, *Protozoa*) *Rev. Goiana de Med.* 16: 3-4, 1970.
18. GREVAL, S.D.S.; SEN GUPTA, P. C. & NAPIER, L.E. — Serological reactions in Kalazar complement-fixation. False Wasserman reaction and high anticomplementary titre. *Ind. J. Med. Res.* 27:181-190, 1939.
19. GUIMARÃES, N.F.; LAGE, H.A.; VENANCIO, 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.
20. JADIN, J. RAY, D. Le. & FAMEREE, L. — Diagnostic de la leishmaniose viscérale par la réaction de l'inhibition de la culture. *Bull. Soc. Path. ext.* 63:334-341, 1970.
21. MAYRINK, W.; ARAUJO, F.G. & MAGALHÃES, P.A. — Fluorescent antibody in visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 9:172-174, 1967.
22. MUNIZ, J.; SOARES, R.R.L.; SOUZA, S.M.A., de; QUINTÃO, L.G. — Tripanosomiase Americana (doença de Chagas) dentro dos conceitos da imu-

- nopatologia — Rev. Bras. Malar. doen. trop. 22:355-410, 1970.
23. NOGUCHI, H. — Comparative studies of herpetomonads and leishmanias. II. Differentiation of the organisms by serological reactions and fermentation tests. J. exp. Med. 44:327-337, 1926.
24. NUSSENZWEIG, V. — Reação de fixação do complemento para leishmaniose visceral com antígeno extraído do bacilo da tuberculose. Técnica, sensibilidade e especificidade. Hospitatl 51: 217-226 (Rio de Janeiro, 1957).
25. QUILICI, M.; DUNAN, S. & RANQUE, J. — L'immunofluorescence dans les leishmanioses, comparaison avec la réaction de fixation du complément. Méd. trop. 28: 37-43, 1968.
26. RANQUE, J. & DUNAN, S. — Comportement antigénique de divers flagellés au cours des leishmanioses cliniques et expérimentales. Ann. Parasit. 39: 117-130, Paris, 1964.
27. RANQUE, J.; QUILICI, M. DUNAN, S. & ASSADOURIAN, Y. — Réactions d'immunoprécipitation en gélose dans les leishmanioses. Méd. trop. 29 70-75, 1969a.
28. RAY, D. Le; AFCHAIN, D.; JADIN, J. CAPRON, A.; YASAROL, S.; LANOTTE, G. & FAMERRE, L. Diagnostic immunoelectrophoretique de la Leishmaniose viscerale — A l'aide d'un extrait antigenique Hydrosoluble de Leishmania donovani. Results preliminaires Ann. Soc. Belge. Méd. trop. 53: 31-41, 1973.
29. SHUIKINA, E.E. — Use of indirect fluorescent antibody technique in studies of cutaneous leishmaniasis. Med. Parasit. and Parasit. 15. Moscow, 34: 576-582, in Trop. Dis. Bull. 63:136, 1965.
30. SOUZA, M.C.M. & BARBOSA, JW. — Immunological relationship between "*Leptomonas*" *peessoai* (Strain princips) *C. fasciculata*, *L. brasiliensis* and *T. cruzi* by the agar gel diffusion technique previous note. Rev. Pat. trop. 415-419, 1972.