

NOTAS SÔBRE IMUNOLOGIA DAS FILARIOSES

I — Diagnóstico pela técnica de imunofluorescência indireta, em lâmina, com um nôvo antígeno de *Onchocerca volvulus* obtidos dos nódulos. *

WILLIAM BARBOSA ** PALMIRA C. ROMBERT ***

RAUL P. MARTINS DA ROCHA ****

RESUMO

Os autores descrevem um nôvo antígeno constituído de fragmentos do *Onchocerca volvulus* obtidos dos nódulos, para o diagnóstico imunológico das filárias humanas pela técnica de I. F.

Com o referido antígeno examinaram:

- a) — 20 sôros de filarióticos — 7 de oncocercíasis, 7 de loíasis, 5 de bancroftíase, e um de eosinofolia tropical (possivelmente por filariosis).
- b) — 50 sôros (eluatos) de pacientes brasileiros com ancilostomíase e/ou estrogiloidíase, de área não endêmica de filariose.
- c) — 30 sôros, como testemunha, de portugueses, 20 da metrópole e 10 que permaneceram 2 anos na África.

Os resultados permitem concluir que o antígeno é útil para o diagnóstico da filariose humana, não dando resultados positivos a títulos superior 1/40 em qualquer dos sôros não filarióticos.

* Trabalho realizado na Escola Nacional de Saúde Pública e de Medicina Tropical de Lisboa (Cadeira de Entomologia e Helmiatologia e Cadeira de Patologia e Clínica Tropicais).

** Prof. Titular de Doenças Infecciosas e Parasitárias; Prof. Adjunto de Parasitologia (Protozoologia) do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás; Chefe do Departamento de Medicina Tropical e Diretor do Instituto de Patologia Tropical da Universidade Federal de Goiás; Bolsista da Junta de Investigação do Ultramar; Bolsista da CAPES.

*** 2.º Assistente da E.N.S.P.M.T. de Lisboa.

**** 1.º Assistente da E.N.S.P.M.T. de Lisboa.

INTRODUÇÃO

Anàlogamente ao que se tem feito nostras parasitoses, alguns autores têm aplicado a técnica dos anticorpos fluorescentes no estudo imunológico das filaríoses, trabalho iniciado em 1961 por Sadun e cols.

De rotina esta reação tem-se afirmado como das mais práticas e eficientes para inquéritos em larga escala no campo epidemiológico, e é de grande valor no estudo da evolução clínica e patogênica de algumas helmintíases.

Nas filaríoses, todavia, o seu emprêgo tem sido limitado, por dificuldades encontradas na obtenção de um antígeno capaz de permitir boa reprodutibilidade das reações, boa sensibilidade, fácil conservação, especificidade e simplicidade de execução das provas.

Dada a dificuldade de se obter material antigenico proveniente de filárias humanas, em quantidade suficiente, alguns autores têm recorrido ao emprêgo de filárias provenientes de animais (Duxbury e Sadun; 1967; Jayewardene e Wijyaratnam, 1968; Coudert e cols., 1968), embora outros tenham conseguido microfilárias de *Wuchereria bancrofti* (Chowdhury e Schiller, 1962) e de *Onchocerca volvulus* (Lucasse, 1962; Lucasse e Hoeppli, 1963).

Diversos tipos de antígeno têm sido utilizados, como microfilárias inteiras ou fragmentadas por ultra-sons, larvas infetantes e vermes adultos em cortes de congelação, ou sob a forma de antígeno solúvel, e têm sido empregadas técnicas em lâmina e em tubo.

Podemos resumir seguidamente as diversas técnicas utilizadas até agora.

1) Larvas ou microfilárias inteiras

- 1.1 — R.I.F. em lâmina com larvas infetantes, provenientes do vetor, e microfilárias de *W. bancrofti*, fixadas com albumina — Chowdhury e Schiller, 1962.
- 1.2 — R.I.F. em tubo, com microfilárias de *O. volvulus* — Lucasse, 1962; Lucasse e Hoeppli, 1963.
- 1.3 — R.I.F. em tubo, com microfilárias de *W. bancrofti*, *Brugia ceylonensis*, *Dirofilaria repens* e *Settaria sp.* — Jayewardene e Wijyaratnam, 1968.

2) Microfilárias ultrassonadas

- 2.1. — R.I.F. em tubo com fragmentos de microfilárias ultrassonadas — Mantovani e Sulzer, 1966.

3) Antígeno solúvel de verme adulto

- 3.1 — R.I.F. com antígeno solúvel de verme adulto de *D. immitis*, *D. uniformis* e *Dipetalonema viteae*, absorvido em discos de acetato de celulose — Duxbury e Sadun, 1967.
- 3.2 — R.I.F. com antígeno solúvel de *D. immitis* e *W. bancrofti* — Garcia e Cabrera, 1968.

4) Cortes de congelação de vermes adultos

- 4.1 — R.I.F. sobre cortes por congelação de vermes adultos de *D. immitis* e *Dipetalonema viteae* — Coudert e cols., 1968.

À exceção da reação com antígeno solúvel que foi feita segundo o método de Toussaint (1966) tôdas estas reações foram efetuadas segundo a técnica indireta de imunofluorescência em que numa primeira fase se faz atuar o sôro imune sobre o antígeno e secundariamente a globulina marcada com isotiocianato de fluoresceína, anti-animal a que pertence o sôro, e em muitas delas foi usada coloração de contraste, quer pela rodamina conjugada com albumina bovina, quer pelo azul de Evans.

Tôdas as reações empregando microfilárias ou larvas infetantes não conseguiram dar resultados completamente satisfatórios devido à relativa impermeabilidade da bainha das microfilárias e da cutícula da larva. Por outro lado, as reações feitas em tubo são demoradas e dispendiosas por exigirem abundante material parasitário, por haver sempre perda nas lavagens e por necessitarem de mais elevada concentração das globulinas marcadas.

As reações em lâmina, utilizando microfilárias ou larvas inteiras, são de realização delicada, pois o material desloca-se com facilidade.

Por isso, embora essas técnicas possam ter um grau de sensibilidade e de especificidade apropriados, a escassez de material para uso como antígeno limita o seu emprêgo no diagnóstico de rotina desta helmintíase.

Mais recentemente dois novos métodos da R. I. F. vieram facilitar o estudo da imunologia das filaríoses: 1.º) o emprêgo de antígeno solúvel em suporte, (Duxbury e Sadun, 1967 e Garcia e Cabrera, 1968).

Nestas técnicas aqueles autores empregaram como fonte de antígeno vermes de 3 espécies de filárias — *Dirofilaria immitis*, *D. uniformis* e *Dipetalonema viteae*, que podem ser mantidas em animais de laboratório, cães, coelhos e hamsters, respectivamente.

O fato de a reação, que utiliza discos de acetato de celulose, ser lida em fluorímetro, torna-a mais segura, pois elimina o inevitável fator subjetivo da leitura das reações de imunofluorescência.

Esta prova (de pesquisa de anticorpos fluorescentes com antígenos solúveis) pelos satisfatórios graus de sensibilidade e especificidade parece ser de grande valor em inquéritos amplos, realizados por grandes Instituições. A sua limitação restringe-se ao emprêgo habitual na rotina diária em laboratórios comuns porquanto a preparação de antígenos solúveis específicos é trabalhosa, delicada e dispendiosa, e o seu emprêgo em suporte para a R. I. F. é uma alteração ao princípio da própria técnica visto que deixando de lado os antígenos figurados, dificulta a sua obtenção e a simplicidade de execução da reação.

2.º) a outra técnica, recentemente descrita, aplica a reação clássica de imunofluorescência indireta em cortes de congelação de vermes adultos. (*Dirofilaria immitis* e *Dipetalonema viteae*) — Couderd e cols., 1968, e, ao que parece, poderá vantajosamente estender-se a cortes de outras filárias, inclusive humanas, ganhando talvez, com isto maior especificidade. Apesar de ser uma reação em lâmina, econômica do ponto de vista do antígeno, e de ser o antígeno de longa duração (podendo ser conservado a -20°C por vários meses exige preliminarmente os cortes de congelação o que equivale dizer uma aparelhagem cara — o criostato — de manejo delicado, com acessórios de resfriamento e congelação fora do alcance dos laboratórios comuns de rotina diagnóstica.

Baseados nestas considerações, vimos propor uma nova R. I. F. indireta em lâmina, na qual empregamos como antígeno, fragmentos de vermes extraídos de nódulos de Onchocercíase, podendo também realizar-se com outras filárias.

Experimentamos já com sucesso, fragmentos de *D. immitis* e *Loa loa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Antígenos — O antígeno foi obtido de nódulos de Onchocerca, extraídos de doentes parasitados.

Uns nódulos foram colhidos em formol a 10% onde permaneceram 3 dias, sendo-lhes depois retirados os vermes e guardados no congelador a -30°C em pequena quantidade de soluto tampão de fosfatos (PBS, pH- 7,2).

Outros nódulos foram recolhidos em soro fisiológico, conservados a -30°C e só foram dissecados no momento do uso, sendo então os vermes colhidos cuidadosamente. Por qualquer dos métodos obtiveram-se vermes em condições satisfatórias para a reação.

Os vermes obtidos, por qualquer dos processos, foram separados em dois lotes. Os do primeiro lote foram secos no vácuo num desidecador com sílica-gel a -30°C por 48 horas. Seguidamente, foram triturados em almofariz de porcelana, pesados e suspensos em PBS, pH= 7,2 na proporção de 3/100. Deixados durante toda a noite no frigorífico, foram no dia seguinte centrifugados a 6.000 r.p.m. em

centrífuga refrigerada e foi-lhes retirado o sobrenadante que ficou a constituir um antígeno solúvel para ensaios de imunodifusão.

O sedimento foi ressuspenso em PBS de maneira a conter várias partículas de verme por gota de suspensão e ficou a constituir o antígeno — Ov1.

Os vermes do segundo lote foram liofilizados e seguindo a técnica de Camargo e cols. para a bilharziose (1965) ligeiramente modificada, foram esmagados, deslipidizados por 2 passagens por álcool absoluto e 1 por éter anidro e secos com sílica-gel, no congelador, para eliminar os restos do éter. Após pesagem foram suspensos em PBS a 1% por uma noite e centrifugados em centrífuga refrigerada.

O sobrenadante foi guardado como antígeno para uso em reações de aglutinação e o sedimento novamente suspenso, como descrito para o anterior, ficando a constituir o antígeno Ov2.

Sôros — Foram examinados 50 sôros, dos quais 20 pertencentes a pacientes provindos da África (Guiné e Angola) com filaríases comprovadas clínica e laboratorialmente em 19 casos tratados por um de nós e 30 testemunhas, das quais 20 de indivíduos sem filaríose, portugueses vivendo no Continente e gozando de aparente saúde e 10 de portugueses que estiveram por mais de dois anos na África e que regressaram recentemente. Paralelamente estudaram-se 50 eluatos de sangue, colhidos em papel de filtro, de brasileiros da Região Centro-Oeste do Brasil — Goiás, (zona não endêmica de filaríases) portadores de ovos de Ancylostomídeos nas fezes e/ou larvas de *Strongyloides stercoralis*.

Método — As lâminas foram preparadas a fim de disporem de 8-10 campos de leitura para estudar diversas diluições de cada soro. Por isso, os diversos campos foram separados por um traço de Araldite (Ciba) de modo a evitar a mistura das diferentes diluições.

No 1.º caso, os 6 campos, superiores e inferiores, continham as diluições de 1/20 até 1/640 e os dois últimos eram reservados para 2 diluições de um soro supostamente negativo, nas diluições de 1/20 e 1/40. Posteriormente, no estudo de sôros testemunhas, usamos 10 campos, o que permitia a leitura de 5 sôros por lâmina em 2 diluições — 1/20 e 1/40, ou 4 sôros e 1 testemunha positiva nos últimos campos.

Em cada campo, assim dividido, foi colocada com pipeta Pasteur afilada uma gota de suspensão das partículas de verme, sendo então observado à lupa entomológica para nos assegurarmos de quantidade suficiente de material antigénico.

As lâminas foram depois postas a secar na estufa a 37°C , meia hora e em seguida guardadas no refrigerador, em caixa de vidro, até o momento do uso.

Quando se pretendia efetuar as reações deixavam-se secar naturalmente as lâminas, fixavam-se com acetona e aplicava-se seguidamente a técnica clássica da R. I. F., utilizando a globulina marcada

na diluição de 1/40 e terminando pela contra-coloração pelo azul de Evans a 1/10.000.

A montagem era feita com glicerol tamponado, utilizando-se pequenas lamelas redondas em campo de observação.

A leitura pôde ser feita indiferentemente sob luz ultravioleta (HBO 200) com condensador de campo escuro ou claro, usando os filtros de excitação I e II e os de barreira 47 e 50.

No caso da reação positiva encontravam-se fragmentos de vermes e fragmentos de microfíliarias apresentando fluorescência amarela esverdeada específica emoldurando a côr vermelha do fragmento conferido pela coloração de fundo. Tôda a preparação tinha tonalidade esverdeada. Nos casos negativos observava-se a coloração avermelhada geral do preparado, e ausência de fragmentos de vermes com fluorescência específica.

Em qualquer dos casos, podia observar-se a presença de material fluorescente inespecífico, constituído pelos fragmentos da cutícula do verme.

Em lâminas testemunhas sem sôro, não se observou fluorescência inespecífica.

Ao se aumentar as diluições dos sôros vai diminuindo a intensidade das reações, mas observa-se ainda nítida fluorescência em numerosos fragmentos de vermes ao lado de alguns fragmentos sem fluorescência, vermelhos típicos dos sôros negativos.

RESULTADOS

Os resultados obtidos com estas provas estão sumarizados nas tabelas 1, 2, 3, 4 e 5.

Os achados referentes aos pacientes com filariose, ilustram a sensibilidade do procedimento. Todos os sôros de pacientes portadores de filariose foram positivos nas diluições até 1/40 e mantiveram-se positivos ou duvidosos na diluição acima, enquanto nenhum dos sôros testemunhas se apresentou duvidoso ou positivo nesta diluição.

Quanto à especificidade a reação pareceu-nos também bastante boa.

Assim é que pudemos observar pela primeira vez que casos referidos de reações cruzadas entre pacientes de filariose e de estrogiloidíase e ou ancilostomíase são mais aparentes que reais, visto que só obtivemos reação positiva com o antígeno de oncocerca referido, em doentes portadores destas parasitoses em diluições de 1/2 ou 1/10 e mesmo assim em percentagens muito baixas. Devemos, no entanto, referir que nestes casos trabalhamos com eluatos de sangue, colhidos em papel de filtro, mas pensamos que os resultados sejam fiéis, pois vários autores (Anderson e cols., 1961 a Duxbury, 1967 e Sadun, 1961 entre outros) são unânimes, depois de experiências válidas, em os considerar como os resultados dos próprios sôros.

TABELA I

Resultados do exame de 20 sôros de filarioses humanas

Diluições Filaríases	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	POSITIVO Total	
							Nº	%
Oncocercíase 7	7	7	7	5	5	1	7	100
Lofase 7	6	6	6	3	2	1	6	85,7
Bancroftíase 5	5	5	5	2	2	2	5	100
Eosinofilia tropical	1	1	1	1	1	-	1	100
T O T A L	19	19	19	11	8	4	19	95

TABELA II

Resultados de 10 sôros de portugueses que viveram por 2 anos na África

Zona Endêmica de Filaríases

Sôros	Diluição	1/20	1/40	1/80 a 1/320	Observações
	1		N	N	
2		+	+	N	
3		N	N	-	
4		±	±	N	
5		N	N	-	
6		N	N	-	
7		+	±	N	
8		+	±	N	
9		N	N	-	
10		N	N	-	
Total	10	3+ 1±	1+ 3±	0	

TABELA III

Resultados de 50 R. I. F. em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro, de pacientes* eliminando ovos de ancilostomídeos nas fezes ou larvas de Strongyloides stercoralis

Nemátodos	Diluições	1/2	1/10	1/20	1/40	TOTAL	
						Nº	%
Ancylostomídeos 29		5	5	N	N	5	17,2
Ancylostomíase + Estrombilíase 4		N	N	N	N	0	0
Estrombilíase 17		1	1	N	N	1	5,8
TOTAL		6	6	0	0	6	12

* Os pacientes provinham da Região Centro-Oeste do Brasil (Goiás), área não endêmica de filaríases.

TABELA IV

Resultado do exame de 20 sôros de portugueses tidos como normais

Sôros n ^{os} .	Diluições	1/20	1/40	1/80	1/160	Observações
1		N	N	-	-	
2		N	N	-	-	
3		N	N	-	-	+ 1/10
4		N	N	-	-	
5		N	N	-	-	
6		N	N	-	-	
7		++	+	-	-	N na repepição 1/40
8		N	N	-	-	
9		+	N	-	-	
10		±	±	N	N	
11		N	N	-	-	
12		±	-	-	-	
13		N	N	-	-	
14		±	N	-	-	
15		N	±	N	N	
16		+	±	N	N	
17		N	±	N	N	
18		+	+	N	N	
19		N	N	-	-	
20		N	±	N	N	

TABELA V

Ensaio, em 100 sêros, com antigênico obtido dos nódulos de Onchocerca volvulus

Sêros	Diluições		1/20		1/40		1/80		1/160		1/320		Observações
	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	D	P	
20 sêros de portugueses sem filaríase (vive <u>n</u> do no Continente)	3	4	5	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
10 sêros de portugueses que estiveram na <u>Áfri</u> ca por 2 anos ou mais (zona de filaríase)	1	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
50 eluatos de sangue de brasileiros, com <u>An</u> cilostomíase ou <u>Estron</u> giloidíase da Região Centro-Oeste (Goiás), zona sem filaríase.	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	Os eluatos foram testados a 1/2 e 1/10 dando 6 positivos
20 sêros de filaríase comprovadas clínica e laboratorialmente													Na diluição de 1/640, 4 sêros foram ainda duvid <u>o</u> sos, incluiu-se entre êstes um caso de Eosinofi <u>l</u> ia tropical

Isto parece-nos de muito interesse porquanto todos os que têm trabalhado no assunto referem reações cruzadas entre estas parasitoses, embora desprezem o fato de utilizarem sôros de doentes de áreas endêmicas de filariose.

Ainda recentemente Kanami e Rees (1970) efetuaram um estudo com a R.F.C. para filariose em 72 pacientes de várias regiões do globo (Índia, África Ocidental e América) e apesar de não encontrarem microfíliarias no sangue de 45 dêles, tiveram reação positiva em 75% dêstes. Como êstes pacientes sofriam de estrogiloidíase e como após terapêutica com thiabendazol obtiveram diminuição do título ou reversão da reação, não só atribuíram a positividade da reação em presença dos estrogiloides como concluíram que a R.F.C. com antígeno de *D. immitis* tem valor no diagnóstico da estrogiloidíase.

Isto está em desacôrdo com a nossa experiência atual com sôros de doentes de estrogiloidíase de área não endêmica de filariose que foram negativos, mesmo em fracas diluições.

É bem verdade, ao que parece, que os anticorpos responsáveis pela reação de fixação de complemento e os anticorpos fluorescentes nas helmintíases são diferentes. Todavia, na ancilostomíase, segundo Ball e Bartlett, 1969, que fizeram o estudo comparativo dessas reações, embora os anticorpos não tivessem nenhum paralelismo, coincidentemente ambas as reações foram negativas em 14 e positivas em 2, de 16 crianças, portadoras exclusivamente de *Ascaris*.

Os resultados obtidos em pacientes portugueses, aparentemente sadios e indubitavelmente sem filariose, uma vez que a área não é endêmica da doença, mas dos quais não se pôde afastar a possibilidade de outras parasitoses, mostraram positividade em 4 casos, que não sabemos explicar.

Embora em número muito pequeno de casos (apenas 10), dos portugueses recém-chegados da África, onde viveram por 2 anos e se apresentaram à consulta, por várias outras queixas, em apenas 1 (10%) o resultado foi positivo. Em nenhum dêstes grupos, todavia, foi positiva a reação acima da diluição de 1/40, o que permite admitir uma faixa de segurança para a reação dada a sua sensibilidade, acima dêste título.

No emprêgo prático da reação as diluições poderão iniciar-se a partir de 1/40 no estudo dos casos clínicos e em evolução; nos inquéritos, tôdas as reações duvidosas acima dêste título podem ser consideradas como positivas, porquanto nenhum sôro testemunha deixou de se apresentar completamente negativo.

Em face do apresentado, pela facilidade de obtenção do antígeno, pela facilidade da sua conservação, liofilizado por prazo longo, facilidade de transporte, praticabilidade das reações em lâmina, com várias diluições na mesma lâmina e facilidade de execução em qualquer laboratório, acreditamos ser êste antígeno constituído por frag-

mentos de verme usado segundo a técnica descrita, a forma mais prática até agora utilizada para o estudo imunológico das filariose.

Também conseguimos bom resultado com antígeno obtido de modo semelhante a partir de vermes adultos de *D. immitis* e acreditamos que o mesmo possa acontecer com outras filárias.

No entanto, esta técnica tem uma certa dificuldade na sua interpretação e a sua leitura requer algum treino.

SUMMARY

Fragments of adult *Onchocerca volvulus* were used as antigen in the F.A.T. A total of 100 individual serums were tested, including 7 with loiasis, 7 with onchocerciasis, 5 with wuchereriasis, 50 with ancylostomiasis and/or strongyloidiasis from no endemic areas of filariasis and 30 healthy controls.

For dilutions over 1/40 only the serum from cases filariasis gave positive results and the total sensitivity of the reactions was 90%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, R. I.; SADUN, E. H. & WILLIAMS, J. S. — A technic for use of minute amount of dried blood in the fluorescent antibody test for schistosomiasis. *Exp. Parasitol.* 11:111-116, 1961.
2. BALL, P. A. J. & BARTLETT, A. — Sorological reactions to infectious with *Necator americanus*, *Trans. R. Soc., Trop. Med. Hyg.* 63: 362-369, 1969.
3. CAMARGO, M. E.; HOSHINO, S. & LACAZ, C. S., — A slide antibody technique with adult worm antigen for the serological diagnosis of *S. mensoni*, *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.* 7:327-331, 1965.
4. CROWDHURY, A. B. & SCHILLER, E. L. — Preliminary observations on the application of the fluorescent antibody technique in the laboratory diagnosis of filariasis. *Bull. of Calcutta School Trop. Med.* 10: 97-99, 1962.
5. COUDERT, J.; AMBROISE; THOMAS, P.; TRUONG, K. & MILLE, TERRENO, S. — Diagnostic sérologique des filariose par immuno-fluorescence sur coupes de *Dirofilaria immitis* et de *Dipetalonema vitae*, Résultats préliminaires portant sur 200 examens. *Bull. Soc. Path. Exot.* 61: 435-441, 1968.
6. DUXBURY, R. E. & SADUN, E. H. — Soluble antigen fluorescent antibody test (SAFA) for human filariasis, *Exp. Parasitol.* 20:77-82, 1967.
7. GARCIA, E. G.; CABRERA, B. D. & LAPA, E. D. — Diagnosis of human filariasis by passive — hemagglutination and soluble antigen fluorescent antibody technique (SAFA) — *J. Phillyp. Med. Ass.* 44: 149-155, 1969.
8. JAYWARDENE, L. C. & WIJAYARATNAM, Y. — The fluorescent antibody test in the serological diagnosis of the causative organisms of tropical eosinophilia and filariasis — *J. Helminth.*, 42: 7-64, 1968.
9. KANANI, S. A. & REES, P. H. — The diagnosis of strongyloidiasis with special reference to the value of the filarial C. F. T. as a screening test — *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 64: 1970.
10. LUCASSE, C. — Fluorescent antibody test for Onchocerciasis — *J. Trop. Med. Parasit.* 13: 404-408, 1962.

11. LUCASSE, C. & HOPPLI, R. — Immunofluorescence in Onchocerciasis. *J. Tropen med. Parasit.* 14:262-269, 1963.
12. MANTOVANI, A. & SULZER, A. J. — Indirect fluorescent antibody technique for diagnosis of canine filariasis. *Am. J. Vet. Res.* 28:351-354, 1967.
13. SADUN, E. H.; ANDERSON, R. I. & WILLIAMS, J. S. — El uso de anticuerpos fluorescentes en el diagnostico de la esquistosomiasis y de otras helmintiasis. (Apresentado en el 2.º Congreso Lationamericano de Microbiologia, São José, Costa Rica, 9-16 Dic. 1961). *Arch. Venezolanos de Med. Trop. y Parasit. Med.* 4:107-127, 1962.
14. SADUN, E. H.; ANDERSON, R. I. & WILLIAMS, J. S. — Fluorescent antibody test for the laboratory diagnosis of schistosomiasis in human using dried blood smears on filter paper — *Exp. Parasitol.* 11:117-120, 1961.
15. TOUSSAINT, A. J. — Improvement of the soluble antigen fluorescent antibody procedure. *Exp. Paarsitol.* 19:71-76, 1966.