

ARTIGOS

IMUNIDADE HUMORAL E CELULAR EM INDIVÍDUOS CURADOS DE LEISHMANIOSE VISCERAL

Roberto Badaró, Edgar M. Carvalho, Maria de La Glória Orge Orge, Rodolfo S. Teixeira e Heonir Rocha.

Foi realizada avaliação imunológica em 48 indivíduos com história pregressa de leishmaniose visceral (L. V.) e em seis pacientes durante a fase aguda da doença e após o tratamento. Títulos significativos de anticorpos determinados pela técnica de imunofluorescência e/ou ELISA foram observados em 32 (67%) dos 48 casos. A avaliação da resposta imune humoral e celular nos seis pacientes durante a fase ativa da doença demonstrou títulos elevados de anticorpos (média 9536 ± 7169) e resposta linfoproliferativa ausente (323 ± 24). Após o tratamento (3 e 6 meses) os títulos de anticorpos só caíram em três dos seis pacientes, ao passo que linfócitos passaram a responder "in vitro" a antígenos de leishmânia (11909 ± 5637). Estes dados demonstram que os indivíduos que adquirem leishmaniose visceral não são geneticamente incapacitados de responder a antígeno de leishmânia e que a persistência de títulos elevados de anticorpos anos após o tratamento, sugere que o parasita permaneça no hospedeiro após a cura clínica da doença.

Palavras chaves: Leishmaniose visceral. Calazar. Sorologia. Imunidade celular. Imunidade humoral.

Várias anormalidades imunológicas têm sido documentadas em pacientes com leishmaniose visceral (LV) tais como: hiperglobulinemia²⁶, ausência de resposta a testes intradérmicos¹, resposta linfoproliferativa "in vitro" deprimida a antígeno de leishmânia^{9 12}, diminuição do número de linfócitos T^{9 26} e presença de complexos imunes circulantes^{10 19}. Apesar da ocorrência de uma depressão da resposta imune celular, pacientes com leishmaniose visceral apresentam títulos elevados de anticorpos anti-leishmânia^{4 11 28} os quais têm inclusive sido recentemente utilizados como critério de diagnóstico da doença^{13 25}.

Embora cura parasitológica baseada no desaparecimento da leishmânia em esfregaços de material obtido de medula óssea ocorra após terapêutica eficaz, não tem sido bem determinado se as alterações da

resposta imune se modificam após o tratamento da L. V. No presente trabalho, títulos específicos de anticorpos, reação de Montenegro e resposta blastogênica a antígeno de leishmânia foram determinados em indivíduos com história pregressa de L. V., com a finalidade de determinar a frequência com que as alterações da resposta imune se reverterem após tratamento. Além disto, alguns pacientes com L. V. foram avaliados imunologicamente durante a fase ativa da doença e depois da cura da enfermidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo de pessoas com história pregressa de leishmaniose visceral - Quarenta e oito indivíduos que tiveram, entre os anos de 1970 e 1983, o diagnóstico de leishmaniose visceral americana baseado no quadro clínico e demonstração de leishmânia através da punção medular, foram submetidos a uma avaliação clínica e imunológica no período entre seis meses e 13 anos após o tratamento. Todos eles tinham sido tratados com antimonial pentavalente, tendo sido considerados curados e por ocasião da avaliação não apresentavam sintomas. A avaliação imunológica constou do teste sorológico para antígeno de leishmânia, reação de Montenegro e teste de transformação linfoblástica com antígeno de leishmânia, que foi

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia do Hospital Prof. Edgard Santos com o apoio do CNPq (n^os 40.3685/82, 40.3695/82) e do National Institute of Health (n^o AI 16282).

Endereço para correspondência: Hospital Prof. Edgard Santos, Laboratório de Imunologia - 40.000 Salvador - Bahia - Brasil.

Recebido para publicação em 24/10/84.

realizado em seis pessoas. Todos estes casos foram procedentes da região de Jacobina-Bahia, uma área reconhecidamente endêmica de leishmaniose visceral²⁹ onde as cepas isoladas têm sido caracterizadas como leishmânia do complexo *L. donovani*¹⁷.

Grupo com leishmaniose visceral ativa – Seis pacientes com quadro clínico e laboratorial de leishmaniose visceral e com leishmânia demonstrada em esfregaço de material obtido de punção de medula óssea foram avaliados antes e após o tratamento, quando parasitas não mais puderam ser demonstrados na punção medular. Esta avaliação compreendeu teste sorológico e teste de transformação linfoblástica com antígeno de leishmânia.

Antígenos – Promastigotas de *L. donovani chagasi* cepa MHOM/BR/80/BA1 isolada de um paciente portador de leishmaniose visceral atendido no Hospital Prof. Edgard Santos, foram utilizadas como fonte de parasitas. Sumariamente, promastigotas na concentração de 5×10^7 parasitas/ml foram lavadas em solução tampão fosfato (PBS) pH 7.2 por três vezes, e submetidas à centrifugação (600g 4°C, 30').

Para o teste de imunofluorescência (IFA) os parasitas lavados e intactos foram ressuspensos em PBS formalina 1% e depositados em lâminas para IFA, de modo a conter 50 parasitas por campo. As lâminas foram enroladas em papel alumínio e colocadas em dessecador a -20°C até o uso.

Para o teste de ELISA, os parasitas lavados foram ressuspensos em água destilada estéril e processados através de sonicacão (5 vezes durante 30 segundos com intervalo de 1 minuto) utilizando a frequência de 80 HTZ e em banho de gelo. Após verificação dos detritos celulares, a suspensão foi centrifugada a 20.000g por 30 minutos e 4°C. O sobrenadante foi separado e aliquoteado em volumes de 1 ml e estocado a -70°C após determinação da proteína pelo método de Lowry²⁰. Este mesmo preparado antigênico foi utilizado para a estimulação "in vitro" no teste de transformação linfoblástica.

A reação de Montenegro foi realizada utilizando o antígeno padronizado contendo 5×10^7 parasitas/ml.

Técnica sorológica – O teste de imunofluorescência foi realizado com base em técnica já anteriormente descrita⁷. Para o teste de micro-ELISA, foram utilizadas placas plásticas apropriadas para sensibili-

zação com antígeno solúvel (Linbro EIA Plastelot). As placas foram sensibilizadas com o antígeno solúvel de *L. donovani* em concentração de 10 µg/ml (100/ml orifício). Após 5 lavagens com PBS, Tween -20°C 0,05%, as placas foram secadas a temperatura ambiente e guardadas a -20°C até uso. Para o teste, os soros dos pacientes foram diluídos 1/100 em PBS Tween 0,05% pH 7.2 e incubados na placa previamente sensibilizada pelo antígeno por 45 min a 37°C. Após lavagens das placas com PBS Tween foi adicionado o conjugado de anti-IgG humano (cadeia γ específica) – fosfatase alcalina (Sigma St. Louis, Mo, USA) diluído 1/1000 em PBS Tween. Após nova lavagem das placas, o substrato enzimático (p. nitrophenil-phosphato Sigma – 104), diluído em carbonato 0.05M em 1mM MgCl₂, foi adicionado. Após 30 min em temperatura ambiente a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de Na OH 3M. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com filtro 405nm² 14.

Teste de transformação linfoblástica (TTL) – Células mononucleares foram obtidas de sangue periférico através da separação por gradiente de densidade usando meio de separação de linfócitos (Bionetics Laboratory, Kensington, M. D. USA), como anteriormente descrito¹⁵. Após a separação as células foram lavadas três vezes em RPMI (Gibco Laboratories, Grand Island, N. Y. USA) e ressuspensas na concentração de 1×10^6 por ml em meio suplementado com 15% de soro AB positivo. Aliquotas contendo 2×10^5 células em 0,2ml de meio foram então cultivadas em triplicatas em placas de microtitulação e estimuladas com antígeno de *L. donovani chagasi* na concentração de 5 µg de antígeno por orifício. Ao fim de seis dias de incubação, 1 µCi de timidina (³H) foi então adicionado (atividade específica 6.7 CimM, New England Nuclear, Boston, Ms., USA) e 4 horas e meia mais tarde as células foram colhidas e determinada a incorporação de timidina ³H em um contador de cintilação. Os resultados do TTL estão expressos em média e erro padrão das contagens por minuto (cpm) das triplicatas das culturas contendo ou não antígeno.

RESULTADOS

Das quarenta e oito pessoas com história progressiva de LV, 21 eram do sexo masculino e 27 do sexo feminino. A idade variava de um a 15 anos, com média e desvio padrão de $6 \pm 4,2$ e todos se apresentavam sem queixas por ocasião da realização deste estudo. Em 40 destes casos foi constatado através do exame físico que 27 (67,5%) apresentavam hepato-

megalia e 9 (22,5%) apresentavam hepatoesplenomegalia. Sendo todos estes indivíduos domiciliados em Jacobina, área reconhecidamente endêmica de esquistossomose mansônica⁵, foi realizado exame parasitológico de fezes o qual revelou que 17 (63%) dos 27 indivíduos com hepatomegalia tinham ovos de *S. mansoni* nas fezes. Dos nove que tinham hepatoesplenomegalia seis realizaram exame parasitológico de fezes, e destes, quatro tinham esquistossomose. Títulos de anticorpos foram considerados significativos quando eram igual ou superior a 1:32 pela técnica de imunofluorescência⁹ e quando a densidade ótica era igual ou superior a 0,050 pela técnica de ELISA (dados não publicados).

O intervalo de tempo após a cura da doença, bem como a frequência com que a reação sorológica de

IFA ou ELISA foram positivas, acham-se na Tabela 1. Em 32 (67%) de 48 soros avaliados, títulos significativos de anticorpos foram observados. Títulos elevados foram encontrados com maior frequência em indivíduos que tinham sido tratados há menos de três anos, tendendo a diminuir quando aumentava o período entre a cura da doença e avaliação. Nos indivíduos com menos de um ano de cura 90% continuavam apresentando sorologia positiva com títulos variando entre 1:32 e 1:512. O teste sorológico persistiu positivo mesmo em 33% dos casos com mais de nove anos de cura da enfermidade. Observamos ainda que dos 32 soros positivos, 19 (59%) o foram por ambas as técnicas, 9 (29%) soros só foram positivos pela técnica de ELISA e 4 (12%) somente pela imunofluorescência. A técnica de ELISA detectou anticorpos em 28 (87%) dos 32 soros positivos.

Tabela 1 – Anticorpos anti-leishmânia em indivíduos com história pregressa de leishmaniose visceral.

| Intervalo de tempo entre a doença e o teste sorológico | Número de casos positivos nos testes sorológicos | | | Porcentagem |
|--|--|---------|-------|-------------|
| | IFA* | ELISA** | Total | |
| 1 ano | 17/19 | 17/19 | 17/19 | 89,5% |
| 1 a 3 anos | 5/ 9 | 3/ 9 | 5/ 9 | 55% |
| 3 a 5 anos | 2/ 7 | 3/ 7 | 4/ 7 | 57% |
| 6 a 8 anos | 2/ 7 | 3/ 7 | 4/ 7 | 57% |
| 9 a 13 anos | 1/ 6 | 2/ 6 | 2/ 6 | 33% |
| Total | 27/48 | 28/48 | 32/48 | 67% |

* Técnica de imunofluorescência. Dados representam números de indivíduos com títulos iguais ou maiores que 1:32.

** Enzyme linked immunosorbent assay. Dados representam o número de indivíduos com absorvância igual ou superior a 0,050.

A imunidade celular foi avaliada em 32 dos 48 indivíduos tratados, através da reação de Montenegro, e em seis pessoas foi realizado teste de transformação linfoblástica, através da estimulação "in vitro" dos linfócitos com antígeno de leishmânia. Somente cinco dos 32 (15,5%) indivíduos tratados responderam à reação de Montenegro. Entretanto, em todos os casos onde foi testada a resposta blastogênica, houve boa transformação linfoblástica ao antígeno de leishmânia (Tabela 2). Enquanto a média de captação de timidina ³H em culturas não estimuladas foi de 602 ± 168, a média e erro padrão das culturas estimuladas com antígeno de leishmânia foi de 10985 ± 3759 (p < 0.05 Student T Test). Tanto indivíduos com teste intradérmico positivo, como negativo, responderam "in vitro" à transformação linfoblástica.

Com a finalidade de avaliar melhor, cronologicamente, as mudanças que ocorrem nos títulos de anticorpos e na resposta linfoproliferativa "in vitro" a antígeno de leishmânia, seis pacientes tiveram estes estudos realizados durante a fase ativa da doença e também foram reavaliados com menos de três meses e mais de três meses após o tratamento. A idade e sexo destes seis pacientes, bem como os resultados destes testes, encontram-se na Tabela 3. Somente em três dos seis pacientes estudados foi observada uma queda significativa dos títulos de anticorpos quando comparadas as avaliações pré e pós-tratamento. Todavia, não houve diferença estatisticamente significante (p > 0.05) entre as médias dos títulos antes do tratamento (9536 ± 7169) quando comparadas com a média de títulos observadas com menos de três meses

Tabela 2 – Teste de transformação linfoblástica em indivíduos que tiveram leishmaniose visceral no passado.

| Casos | I/S* | Intervalo de tempo entre a doença e o teste | Reação de Montenegro | Incorporação de ^3H timidina** | |
|-------|------|---|----------------------|---|----------------------------|
| | | | | Meio cpm | Antígeno de Leishmânia cpm |
| 1 | 4/M | 2 anos | + | 590 ± 20 | 2167 ± 59 |
| 2 | 6/M | 4 anos | 0 | 237 ± 51 | 6150 ± 355 |
| 3 | 15/F | 6 anos | 0 | 284 ± 73 | 15450 ± 1084 |
| 4 | 8/F | 7 anos | 0 | 874 ± 112 | 12357 ± 1066 |
| 5 | 7/F | 8 anos | 0 | 1274 ± 276 | 25665 ± 1033 |
| 6 | 10/M | 9 anos | 0 | 355 ± 44 | 4123 ± 255 |

* I/S = Idade/Sexo

** Dados representam média e erro padrão das contagens por minuto de triplicatas de culturas não estimuladas (meio) ou estimuladas com antígeno de leishmânia (5 µg por orifício).

de cura (4704 ± 6221) e com a determinada com mais de seis meses de cura (4533 ± 6322). Contrastando com os achados da sorologia, uma mudança significativa foi observada com referência à imunidade celular,

onde a média e erro padrão das culturas estimuladas com antígeno de leishmânia após o tratamento foi de 11909 ± 5637, comparadas com 323 ± 24 quando os linfócitos eram provenientes de indivíduos na fase ativa da doença.

Tabela 3 – Títulos de anticorpos através da técnica de imunofluorescência e a resposta linfoproliferativa "in vitro" a antígeno de leishmânia antes e após o tratamento da leishmaniose visceral.

| Número de casos realizados | I/S | Títulos de anticorpos | | | Resposta linfoproliferativa* | |
|----------------------------|------|-----------------------|-----------|-----------|------------------------------|--------------|
| | | Antes | Após | | Antes cpm | Após cpm |
| | | | < 3 meses | > 3 meses | | |
| 1 | 4/M | 1024** | 1024** | 1024** | — | — |
| 2 | 24/M | 4096 | 8000 | 8000 | 374 ± 77 | 2060 ± 2657 |
| 3 | 20/M | 4096 | 128 | 128 | 277 ± 51 | 12323 ± 55 |
| 4 | 17/M | 16000 | 2048 | 1024 | 355 ± 56 | 5680 ± 1191 |
| 5 | 19/M | 16000 | 1024 | 1024 | 288 ± 25 | 27574 ± 2219 |
| 6 | 6/M | 16000 | 16000 | 16000 | — | — |

* Dados representam a média e erro padrão da captação de ^3H timidina em triplicatas de culturas estimuladas com antígeno de leishmânia (5 µg por orifício).

** p > 0,05 pelo *Serum Rank Test*.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados no presente trabalho documentam que títulos significativos de anticorpos anti-leishmânia podem ser detectados por um longo período de tempo após a cura da leishmaniose

visceral, e que a resposta imunocelular específica, ausente durante a fase ativa da doença pode ser demonstrada. A capacidade de linfócitos de responder "in vitro" a antígeno de leishmânia foi também observada em indivíduos que foram avaliados somente após a cura da doença. Estes dados indicam que o

indivíduo que adquire leishmaniose visceral não é geneticamente incapacitado de responder ao estímulo induzido por antígenos de leishmânia, sendo incapaz apenas durante, ou previamente à fase ativa da doença. Este dado abre uma nova perspectiva no entendimento da patogênese da leishmaniose visceral, desde que estudos em modelos experimentais que habitualmente servem de base para o entendimento da patogênese das doenças, sugerem que a aquisição de leishmaniose está ligada à incapacidade de determinadas cepas de camundongos de gerar uma resposta imune celular quando infectados pela leishmânia^{16 22}. Estes dados não são transponíveis para o que aparentemente ocorre na leishmaniose visceral humana, desde que mesmo os indivíduos geneticamente competentes para responder imunologicamente tanto do ponto de vista celular como humoral ao antígeno de leishmânia desenvolvem a doença. Fica, portanto, configurado que a depressão da resposta celular observada durante a fase ativa da leishmaniose visceral é adquirida. Este fenômeno pode representar um estado de tolerância do sistema imune devido a presença maciça de leishmânia no organismo, ou pode estar relacionado com outros fatores envolvidos na regulação da resposta imunológica como a presença de anticorpos ou complexos imunes.

A observação de que somente um número pequeno de indivíduos no pós-tratamento respondem ao teste intradérmico com antígeno de leishmânia é discordante dos achados da transformação linfoblástica, onde todos os pacientes avaliados tiveram uma boa resposta linfoproliferativa "in vitro" a antígeno de leishmânia. Embora ambos os testes estejam avaliando a imunidade celular, pelo menos duas possibilidades podem ser consideradas para explicar estes dados: 1) a população de células participantes da hipersensibilidade de tipo retardado é diferente das células envolvidas na transformação linfoblástica; 2) os antígenos utilizados nos dois testes foram diferentes, pois a transformação linfoblástica foi realizada com o antígeno solúvel proveniente de formas promastigotas de *L. donovani*, enquanto o antígeno utilizado na reação de Montenegro foi um antígeno particulado de *L. mexicana*. Suportando a segunda hipótese, existe o dado recente de que, utilizando um antígeno solúvel de *L. donovani* para realização do teste intradérmico, 20 de 21 indivíduos com história progressiva de leishmaniose visceral apresentaram reação positiva (dados não publicados).

Apesar da imunidade celular desempenhar um papel mais relevante que os anticorpos na proteção da

infecção mediada por leishmânia^{6 27-30}, estes anticorpos são específicos para antígenos do parasita e têm sido utilizados, com sucesso, no diagnóstico da leishmaniose visceral^{13 25}. A documentação, no presente trabalho, de títulos bastante elevados de anticorpos anti-leishmânia durante a fase ativa da doença, respalda as observações prévias do valor da determinação dos títulos de anticorpos no diagnóstico da L. V. Por outro lado, a persistência de títulos elevados, a despeito da ocorrência de cura clínica e parasitológica durante pelo menos os seis primeiros meses após a terapêutica, leva-nos a concluir que os títulos de anticorpos não podem ser utilizados como critério de cura da L. V.

A determinação dos títulos de anticorpos de 48 indivíduos com história progressiva de leishmaniose visceral revelou que em 32 (67%), títulos significativos persistem elevados por um longo período de tempo. É verdade que, quando comparados com os observados durante a fase ativa da doença, os títulos de anticorpos em indivíduos com mais de um ano de tratamento apresentam-se bem mais baixos, mas, seguramente, significativos com relação a controles negativos avaliados no nosso serviço³. A razão da persistência de anticorpos mesmo após muitos anos de cura clínica da enfermidade não tem uma explicação no momento, embora a persistência de títulos elevados de anticorpos seja encontrada em outras doenças causadas por protozoários como a doença de Chagas²¹ e a toxoplasmose^{8 23}. Sabe-se que nestas últimas condições os parasitas persistem no hospedeiro por período longo de tempo, o que levaria a uma constante estimulação do sistema imune^{18 21}. Na leishmaniose visceral do Oriente, alguns indivíduos desenvolvem uma forma cutânea de leishmaniose, após a cura clínica da doença, denominada de leishmaniose dérmica pós-calazar¹² e no Brasil, embora na ausência de manifestações cutâneas semelhantes às observadas no velho mundo, leishmânia já foi identificada na pele de alguns indivíduos após a cura aparente da enfermidade³¹. Estes dados, juntamente com a observação no presente estudo da persistência de títulos de anticorpos em indivíduos curados, reforça a idéia de que estudos devem ser desenvolvidos no sentido de melhor esclarecer a relação parasita-hospedeiro, na leishmaniose, principalmente no que concerne aos mecanismos de defesa do hospedeiro contra leishmânia, e no que se refere à capacidade da *L. donovani* de conviver, por períodos longo de tempo no hospedeiro, sem haver doença clínica.

SUMMARY

Immunological studies were done in 48 subjects with a past history of visceral leishmaniasis and in 6 patients during the active phase of the disease and shortly after treatment. Antibody titers determined by immunofluorescence antibody test (IFA) or ELISA were positive in 32 (67%) of the 48 persons that had visceral leishmaniasis in the past. The mean antibody titer by the IFA in the 6 patients with active visceral leishmaniasis was 9536 ± 7169 and ^3H thymidine uptake in the lymphocyte blastogenesis assay was 323 ± 24 . After treatment (3 and 6 months) antibody titers had fallen only in 3 of the 6 patients and a restoration of the lymphocyte proliferative response was observed (11909 ± 5637). These data demonstrated that there is no genetic inability of the host who acquire visceral leishmaniasis to develop a cellular immune response to leishmania antigen. Moreover, the longterm persistence of high antibody titers following therapy suggests that the parasite may stay in the host for long time even after apparent clinical cure of the infection.

Key words: Leishmaniasis. Visceral leishmaniasis. Kala-azar. Humoral immunity. Cellular immunity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade TM, Teixeira R, Andrade JAF, Pereira C, Carvalho EM. Hipersensibilidade de tipo retardado na leishmaniose visceral. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 24: 298-302, 1982.
2. Anthony R, Cristensen HA, Johnson CM. Micro enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for serodiagnosis of new world leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29: 190-194, 1980.
3. Badaró R, Orge MGO, Lorenço R, Teixeira R. ELISA na Leishmaniose Visceral Americana: Avaliação da sensibilidade e especificidade do teste. IX Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu p. 44, 1982.
4. Badaró R, Reed SG, Carvalho EM. Immunofluorescent antibody test in American Visceral Leishmaniasis: sensitivity and specificity of different morphological forms of two leishmania species. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 480-484, 1983.
5. Bina JC, Prata A. An attempt to control schistosomiasis in an endemic area by the use of hycanthone as a chemotherapeutic agent. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 8: 217-224, 1974.
6. Bryceson ADM, Turk JL. The effect of prolonged treatment with anti-lymphocyte serum on the course of infection with BCG and *Leishmania enrietti* in the guinea pig. *The Journal of Pathology* 104: 153-165, 1971.
7. Camargo ME, Rebonato C. Cross reactivity in immunofluorescence test for trypanosoma and leishmania antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18: 500-505, 1969.
8. Camargo ME, Ferreira AE, Mineo JR, Takigute CK, Nakahara OS. Immunoglobulin G and immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay and defined toxoplasmosis serologic patterns. *Infection and Immunity* 21: 55-58, 1978.
9. Carvalho EM, Teixeira RS, Johnson WD. Cell mediated immunity in American Visceral Leishmaniasis. Reversible immunosuppression during acute infection. *Infection and Immunity* 22: 649-656, 1981.
10. Carvalho EM, Andrews BS, Martinelli R, Dutra M, Rocha H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in visceral leishmaniasis and schistosomiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 61-68, 1983.
11. Duxbury RE, Sadun EH. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 13: 525-529, 1964.
12. Haldar JP, Ghose S, Saha KC, Ghose AC. Cell mediated immune response in Indian Kala-azar and Post Kala-azar dermal leishmaniasis. *Infection and Immunity* 42: 702-707, 1983.
13. Ho M, Leeuwenberg J, Mbugua G, Wamachi A, Voller A. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for field diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 943-946, 1983.
14. Hommel M, Peters W, Ranque J, Duilirci M, Lonatte G. The micro-ELISA technique in the serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 72: 213-218, 1978.
15. Horwitz DA, Garret MA. Distinctive functional properties of human blood L lymphocytes. A comparison with T lymphocytes, B lymphocytes and monocytes. *The Journal of Immunology* 118: 1712-1721, 1977.
16. Howard JG, Hale G, Liew FY. Genetically determined response mechanisms to cutaneous leishmaniasis. *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 152-154, 1982.

17. Jaffe CL, Grimaldi GJr, Bennet E, McMahon-Pratt D. Characterization of the New Worlds leishmania stocks by means of monoclonal antibodies. IV *L. donovani* complex. X Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, Caxambu p. 16, 1983.
18. Jones TC, Yeh S, Hirsch JG. The interaction between *Toxoplasma gondii* and mammalian cells. I Mechanisms of entry and intracellular fate of the parasite. *The Journal of Experimental Medicine* 136: 1157-1172, 1972.
19. Kharazmi A, Rezai HR, Fani M, Behforrouz CC. Evidence for the presence of circulating immune complexes in serum and C3b and C3d on red cells of Kala-azar patients. *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 76: 793-796, 1982.
20. Lowry DH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265-275, 1951.
21. Maguire JH, Mott KF, Hoff R, Guimarães A, Franca JT, Almeida de Souza JA, Ramos NB, Sherlock IA. A three year follow-up study of infection with *Trypanosoma cruzi* and eletrocardiografic abnormalities in a rural community in northeast Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 31: 42-47, 1982.
22. Murray HW, Masur H, Keithly JS. Cell mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. I. Correlation between resistance to *Leishmania donovani* and lymphokine generating capacity. *The Journal of Immunology* 129: 344-350, 1982.
23. Naot Y, Remington JS. An Enzyme linked immunosorbent assay for detection of IgM antibodies to *Toxoplasma gondii*: Use for diagnosis of acute acquired toxoplasmosis. *The Journal of Infectious Diseases* 142: 757-766, 1980.
24. Preston PM, Carter RL, Leuchars E, Davies AJS, Dumonde DC. Experimental cutaneous leishmaniasis. III. Effects of thymectomy on the course of infection of CBA mice with *Leishmania tropica*. *Clinical and Experimental Immunology* 10: 337-357, 1972.
25. Rezai HR, Behjorouz N, Amirhakimi G, Kohanteh J. Immunofluorescence and counter immuno eletrophoresis in the diagnosis of Kala-azar. *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71: 149-151, 1977.
26. Rezai HR, Ardehali SM, Amirhakimi G, Kharazmi A. Immunological features of Kala-azar. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 27: 1079-1083, 1978.
27. Rezai HR, Farrel J, Solsby EL. Immunological response of *L. donovani* infection in mice and significance of the T cell in resistance to experimental leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* 40: 508-514, 1980.
28. Shaw JJ, Voller A. The detection of circulating antibody to Kala-azar by means of immunofluorescent techniques. *The Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 342-352, 1964.
29. Sherlock IA, Almeida SP. Observações sobre calazar em Jacobina - I. Histórico e dados preliminares. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais* 21: 523-534, 1969.
30. Skow CB, Towhy DW. Cellular immunity to *Leishmania donovani*. II. Evidence for synergism between thymocytes and lymphocyte cells in reconstitution of acquired resistance to *L. donovani* in mice. *The Journal of Immunology* 113: 2012-2019, 1974.
31. Teixeira R. Experiências vividas com a leishmaniose visceral 1954-1980 (Aspectos epidemiológicos, sorológicos e evolutivos). Tese para Professor Titular, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1980.