

A IMUNOFLUORESCÊNCIA E SUA APLICAÇÃO NA PESQUISA E NA ROTINA

Homero Só Jobim*

SINOPSE: Analisa a imunofluorescência, apresentando os métodos utilizados e os resultados obtidos.

A imunologia tem, desde o início de seu estudo, fornecido inúmeras técnicas para a pesquisa científica e para a rotina do diagnóstico clínico. Assim foi a reação de aglutinação, aplicada por Widal no diagnóstico da febre tifóide, as reações de precipitação utilizadas em medicina legal para identificação das manchas de sangue, as reações de fixação do complemento, como a reação de Wassermann, usadas no diagnóstico da sífilis e outras doenças, e outras aplicações de técnica imunológica que poderiam ser citadas.

Contribuiu, mais recentemente, a imunologia, com mais uma técnica: a imunofluorescência.

O que é a imunofluorescência?

Por imunofluorescência é entendida a ligação de um antígeno ou de um anticorpo a um composto fluorescente

que, reunindo-se ao respectivo anticorpo ou antígeno, torna fluorescente o complexo formado. O exame, em microscópio especial, em campo escuro, mostra a fluorescência, evidenciando a união do antígeno ao respectivo anticorpo.

É desta maneira que, modernamente, se identifica a presença de antígenos ou anticorpos nos diversos tecidos do organismo ou a sua presença em células, bactérias ou vírus.

A publicação, em 1941, por Coons, Creech e Jones, intitulada "Immunological properties of antibody containing a fluorescent group" deu início à investigação com a imunofluorescência.

Coons e seus auxiliares estavam interessados em trabalhar com anticorpos marcados a fim de poder revelar os respectivos antígenos. Os corantes não fluorescentes utilizados no passado, para o estudo dos complexos antígeno-anticorpo, não os satisfiziam. Utilizando os corantes fluorescentes na marcação dos anticorpos, por um exame em fundo escuro, puderam revelar, com facilidade e precisão, a pre-

* Professor Titular do Departamento de Microbiologia do Instituto de Biociências da UFRGS.
Diretor do Instituto de Biociências da UFRGS

sença dos respectivos antígenos no material examinado.

A primeira marcação foi praticada ligando beta antraceno com soro antipneumococo III. O congregado aglutina o pneumococo III e torna, individualmente, as bactérias fluorescentes e facilmente visíveis em campo escuro. Por outro lado, o pneumococo II, tratado nas mesmas condições, permanece não fluorescente.

Nova publicação, em 1942, de Coons, Creech, Jones e Berliner, descreve a preparação de conjugado com fluoresceína e, em 1950, divulgam a técnica com o isotiocianato de fluoresceína.

Em 1958, Chadwick, Mac Entegart e Nair apresentam um novo congregado de fluorescência alaranjada com rodamina B.

O terceiro conjugado, o de fluorescência amarelada, foi descrito, em 1958, por Mayersbach pela síntese e uso do ácido 1-dimethylaminonaphleno-5-sulfônico.

As aplicações da imunofluorescência

provocaram inúmeras publicações e novas técnicas foram descritas. Ao mesmo tempo, o progresso fez com que se aperfeiçoasse o microscópio fluorescente tornando-o de fácil acesso e vulgarizando a sua utilização.

O MÉTODO

A imunofluorescência, como toda a técnica imunológica, permite a pesquisa de anticorpo com antígeno conhecido e a identificação de um antígeno por intermédio de um anticorpo também conhecido.

Estas reações podem ser executadas por métodos diversos: a imunofluorescência direta, a imunofluorescência indireta e o do complemento fixado.

Na imunofluorescência direta, figura 1, marca-se um anticorpo e se faz agir contra o antígeno que se quer evidenciar. É empregado, principalmente, em rotina para pesquisa de bactérias, como a da *Escherichia coli* enteropatogênica nas fezes.

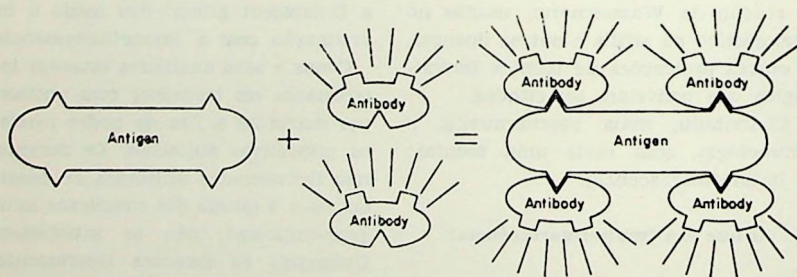


Fig. 1

A sua técnica é muito fácil e consiste em fixar, primeiramente, o material numa lâmina de vidro, por intermédio de solventes orgânicos miscíveis em água, como o ethanol e a acetona, e à baixa temperatura. Faz-se, depois, agir o anticorpo fluorescente durante algum tempo. Lava-se muito bem, seca-se e examina-se ao microscópio fluorescente. Quando o antígeno está presente na preparação, o anticorpo fixa-se a ele e o torna fluorescente.

Na imunofluorescência indireta, fig. 2, também chamada método de "sandwich", a presença de anticorpos não marcados e fixados em um primeiro tempo sobre o antígeno respectivo, é evidenciada, num segundo tempo, pela antigamaglobulina específica fluorescente.

É utilizado para evidenciar, por exemplo, a presença de um complexo antígeno-anticorpo nos tecidos atingidos pela autoagressão, como nos músculos estriados na "myasthenia gravis", ou na tireóide, na doença de Hashimoto.

Fixa-se, primeiro, o material nas lâminas pela mesma técnica anterior. Depois, conforme o caso, ou faz-se agir, previamente, o anticorpo correspondente a ser pesquisado, ou, quando este já estiver fixado, faz-se, após várias lavagens da preparação, agir anti-gamaglobulina específica. Lava-se novamente várias vezes e monta-se a preparação em glicerina a 50% com citrato de sódio a 3,8%. Examina-se ao microscópio e, se houver complexo antígeno-anticorpo, a fluorescência vai indicá-lo.

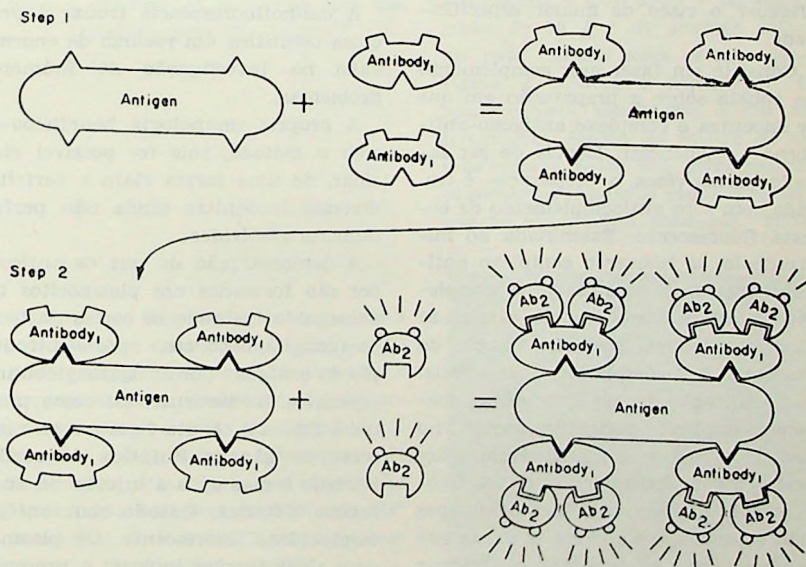


Fig. 2

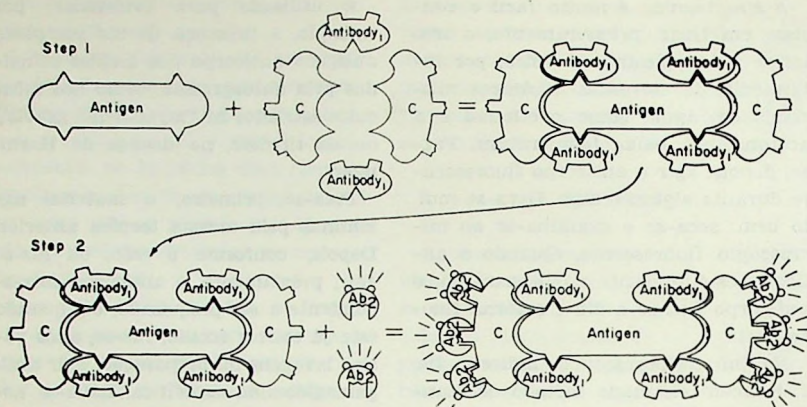


Fig. 3

O terceiro método, ou do complemento fixado, fig. 3, é pouco utilizado por ser de técnica mais delicada e oferecer o risco de menor especificidade.

Consiste em fazer agir complemento de cabaia sobre a preparação em que se encontra o complexo antígeno-anticorpo a evidenciar. Depois de ser lavada várias vezes, a preparação é tratada com soro anticomplemento de cabaia fluorescente. Examinada ao microscópio, se houver o complexo antígeno-anticorpo pesquisado, o complemento estará fixado a ele e torna-se fluorescente pela posterior fixação do anticorpo anticomplemento de cabaia.

A utilização de qualquer destes métodos implica, obrigatoriamente, no uso de testes de especificidade. Estes testes devem indicar que não há fluorescência quando se utiliza anticorpos não específicos, e que ela só existe nas lâminas onde se encontra o antígeno e o anticorpo respectivo.

A utilização da imunofluorescência na pesquisa científica

A imunofluorescência trouxe à pesquisa científica um recurso de enorme valia na investigação de inúmeros problemas.

A própria imunologia beneficiou-se com o método, pois foi possível elucidar, de uma forma clara e perfeita, diversas incógnitas ainda não perfeitamente resolvidas.

A demonstração de que os anticorpos são formados nos plasmócitos foi conseguida tratando os cortes de tecido (gânglio, baço, etc.) após a introdução do antígeno por antigamaglobulina específica fluorescente, tal como mostra a figura 4. Nesta figura vemos um corte de gânglio linfático de coelho retirado 6 dias após a injeção de anatoxina diftérica, tratado com antigamaglobulina fluorescente. Os plasmócitos fluorescentes indicam a presença do anticorpo em seu interior e essa

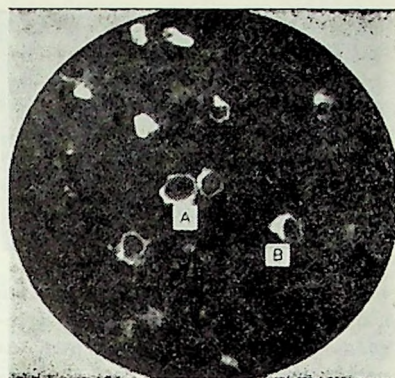


Figura 4 — Técnica de "sandwich" utilizada para demonstrar a antitoxina diftérica em linfonóides regionais de um coelho, 6 dias após a primeira injeção de 20 *Lf* de toxóide diftérico na pata. A. Hemocitoblasto. B. Plasmócito imaturo. O anticorpo está distribuído pelo citoplasma.

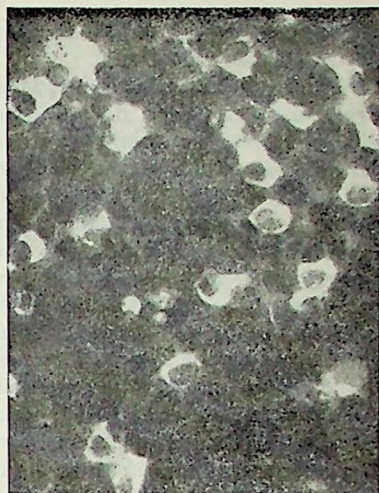


Figura 5 — Técnica de "sandwich" utilizada para demonstrar a antitoxina diftérica em um linfonóide regional de um coelho, 4 dias após a segunda injeção de 20 *Lf* de toxóide diftérico na pata. Muito mais células que na figura 4 contêm o anticorpo. Este, aparece pelo citoplasma e em áreas irregulares dentro do núcleo de algumas células. Estas são, principalmente, plasmócitos imaturos junto com alguns poucos plasmócitos maduros. (x 1050)

Figura 6 — Depuração de organismos pelo sistema reticulo-endotelial no fígado. Fígado de rato mostrando o englobamento e desintegração de organismos nas células de Kupffer, 15 minutos após a injeção intravenosa de *Proteus vulgaris*. Corte por congelação corado com anti-soro ao antígeno "O" (somático) do *P. vulgaris* marcado com fluoresceína. (x 800)



fluorescência aumenta à medida que o tempo passa (fig. 5).

A fagocitose e a desintegração de bactérias pelas células do retículoendotélio é outra demonstração que se faz facilmente pela imunofluorescência. A figura 6 mostra um corte de fígado de rato 15 minutos após a inoculação intravenosa de *proteus* vulgares e tratado com anticorpo antiproteus fluorescente. Na figura, vêem-se as bactérias fagocitadas e em fase de desintegração pelas células de Kupffer.

O destino dos antígenos e a demonstração de que a formação do anticorpo se faz por dois estágios foi, também, evidenciada por imunofluorescência. O tratamento dos cortes de tecido após a introdução do antígeno em momentos diferentes, pelo anti-soro fluorescente específico, permite evidenciar as células que estão encarregadas de utilizá-lo (histiócitos, imunoblastos).

É, entretanto, muito mais interessante a contribuição da imunofluorescência para esclarecer certos problemas da hipersensibilidade e da doença auto-imune.

Na reação de Arthus foi possível evidenciar que a formação de complexos antígeno-anticorpo, na parede vascular, provoca a infiltração de polinucleares, que vêm captar os aludidos complexos, determinando a obstrução dos vasos, o edema e a necrose. A figura 7 mostra uma arteríola da pele de uma cobaia, que havia sido injetada, 24 horas antes, com anticorpo na pele desta zona e, 30 minutos precedendo a coleta da amostra, com antígeno marcado com fluoresceína. A figura 8, mostra outra arteríola da mesma zona e da mesma co-

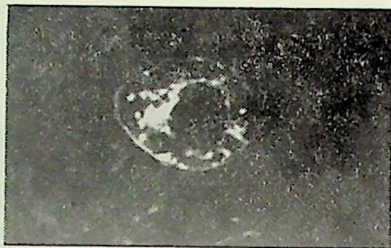


Figura 7 — Arteríola da pele de um cobaio mostrando a presença de agregados antígeno-anticorpo dentro da parede vascular. Nesse caso, o anticorpo foi injetado dentro da pele localmente, 24 horas antes e antígeno marcado com fluoresceína foi injetado endo-venosamente, 30 minutos antes da morte (de uma preparação pelo Dr. J. Oort). (x 750)

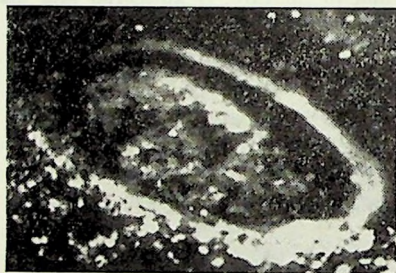


Fig. 8

baia 3 horas após a introdução do antígeno marcado. O exame das duas figuras mostra a primeira com complexo antígeno-anticorpo na parede vascular, mas com pequeno número de polinucleares, e a segunda com grande número destas células ocupando a periferia e a luz do vaso, tornando todos fluorescentes pela fagocitose do complexo antígeno-anticorpo.

Nas doenças auto-imunes é enorme a contribuição da imunofluorescência.

A doença de Hashimoto, a tireoidite auto-imune, foi perfeitamente esclarecida com o uso deste método.

A figura 9 mostra um corte, por congelamento, de uma tireóide normal, tratado com soro de um paciente com doença de Hashimoto.

O tratamento posterior com antigamaglobulina humana fluorescente mostra fluorescência no colóide do interior dos acini, assim como no núcleo das células dos mesmos, evidenciando a existência do complexo antígeno-anticorpo e, portanto, de anticorpos antitireoglobulina no soro do paciente.



Figura 9 — Demonstração de fator antinuclear no soro de paciente com doença de Hashimoto. Corte por congelamento da tireóide com cito-arquitetura normal, tratado, sucessivamente, com soro do paciente e com um conjugado fluoresceínico de anti-gamaglobulina humana. Note-se que além da localização típica da fluorescência no colóide intra-acinar há localização no núcleo das células acinares. (x130) Estes anticorpos são os responsáveis pela patogenia da doença de Hashimoto.

Na artrite reumatóide é também possível demonstrar a formação de complexos antígeno-anticorpo (uma imunoglobulina M, anti-imunoglobulina G e a respectiva imunoglobulina G) na membrana sinoval e conseqüente invasão de células. Assim se explica toda a patogenia da afecção.

Na "myasthenia gravis" o uso do método indireto ou do "sandwich" revelou a patogenia por auto-agressão. O tratamento de um corte de músculo de um indivíduo normal, pelo soro de um paciente com "myasthenia gravis", provoca a fixação do anticorpo antímúsculo estriado, existente naquele soro, nas fibras musculares do corte. Faz-se, após lavagens repetidas, o tratamento com antigamaglobulina fluorescente. A existência de complexo antígeno-anticorpo e, portanto, presença de auto-anticorpo no sangue do paciente, é revelada ao microscópio pela fluorescência das fibras musculares, como se pode ver na figura 10.

Na patologia renal, a presença de complexos antígeno-anticorpo da membrana basal do glomérulo é explicada, segundo Kabat, por duas hipóteses. A primeira, que se refere à presença de auto-anticorpos contra a própria membrana basal, é a auto-agressão. A segunda apresenta os depósitos de complexos antígeno-anticorpos estranhos ao glomérulo como responsáveis pelas lesões do mesmo. Em ambos os casos, os depósitos dos complexos são demonstrados pela imunofluorescência como se verifica na figura 11.

Outros exemplos da contribuição da imunofluorescência para elucidar problemas científicos poderiam ser apresentados, mas seria prolongar em demasia estes comentários.

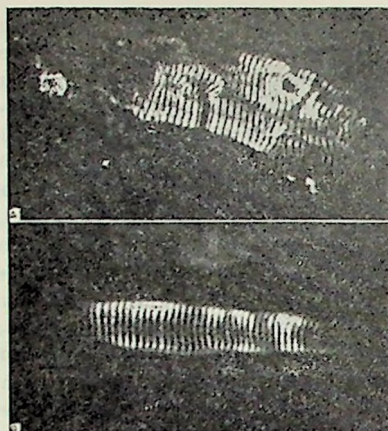


Fig. 10 — A. Secção de um músculo esquelético humano tratado primeiro, com soro de paciente com miastenia grave e, segundo, com anticorpo à gamaglobulina humana marcado com fluoresceína. Distó resulta duplas bandas de fluorescência, o que corresponde às faixas A com uma linha escura não fluorescente no centro de cada (banda H). B. Secção de músculo esquelético tratado, primeiro, com soro de um indivíduo normal e, segundo, anticorpo à gamaglobulina humana, marcado com fluoresceína. Note-se bandas de fluorescência, as quais são únicas e mais estreitas que as duplas bandas em A e que correspondem às bandas I. Um resultado positivo como em (A) é encarado como típico do soro de pacientes com miastenia grave. O tipo de resultados como o mostrado em (B) é conseguido com soro normal e não tem significado diagnóstico. (Dr. John Vettters).

Na rotina, colaborando no diagnóstico clínico:

Utilizando, na maioria dos casos, o método direto é possível, possuindo os R. Med. atm., Pôrto Alegre

anticorpos, identificar as bactérias pelos antígenos que elas possuem.

A pesquisa por imunofluorescência está hoje vulgarizada na identificação de inúmeras bactérias patogênicas, ensejando um diagnóstico mais rápido e, muitas vezes, tão eficiente quanto um exame bacteriológico.

Vejam, em síntese, o valor e o resultado da fluorescência na pesquisa de algumas bactérias patogênicas.

Pesquisa de *Escherichia coli* enteropatogênica

Esta pesquisa é feita, essencialmente, nas fezes. A utilização de um soro anticolienteropatogênico fluorescente permite identificar bactérias, vivas ou mortas, em esfregaços das fezes.

A especificidade e a sensibilidade são idênticas às encontradas nos métodos bacteriológicos, entretanto, a rapidez e a simplicidade da técnica fazem com que a imunofluorescência seja o método de escolha para os casos urgentes.

Divergências podem, às vezes, ser encontradas, apresentando a vantagem de um dos métodos sobre o outro. A pesquisa por imunofluorescência pode ser positiva enquanto a cultura é negativa, quando o número de colienteropatogênicos é reduzido, como nos portadores de germe ou, quando estão mortos, não viáveis nas culturas, pelo uso de antibióticos. Outras vezes, a fluorescência é negativa e a cultura é positiva, o que acontece, facilmente, quando existem, nas fezes, detritos vegetais fluorescentes, que impedem a perfeita visibilidade das bactérias.

A imunofluorescência tem a sua maior indicação na pesquisa rápida de portadores, tanto para evitar a di-



Figs. 11 e 12

fusão da infecção no meio hospitalar, por ocasião do ingresso, quanto para permitir a volta do paciente ao ambiente familiar.

Pesquisa de *Bordetella pertussis*

A pesquisa de *Bordetella* por imunofluorescência permite estabelecer o diagnóstico da coqueluche, na fase catarral, com rapidez e eficiência, quan-

do o diagnóstico clínico é praticamente impossível e o contágio é máximo.

A pesquisa é feita em esfregaço do muco do nasofaríngeo tratado com soro antipertussis fluorescente.

No período catarral da doença, a proporção de resultados positivos é muito elevada. Quando o caso já evoluiu algum tempo e as quintas são bem evidentes e, também, quando a utilização do antibiótico já é feita há algum tempo, os resultados não são tão brilhantes, mostrando-se, entretanto, mais sensíveis que a cultura do germe.

Pode-se, ainda, utilizar a imunofluorescência no diagnóstico da coqueluche fazendo a pesquisa de anticorpos no soro dos pacientes, pelo método indireto.

A pesquisa é feita tratando, pelo soro do paciente, diluído desde 1/10 até 1/320, esfregaços de bordetella. Estas lâminas assim tratadas são lavadas várias vezes e, depois, submetidas à ação da antigamaglobulina humana fluorescente. A presença de bactérias fluorescentes no esfregaço indica, na maior diluição ainda positiva o título de anticorpos do soro.

Estes anticorpos são ausentes na fase catarral e aparecem no período das quintas, elevando-se o título à medida que a infecção progride e o tempo passa.

Pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis*

A pesquisa de *Mycobacterium tuberculosis* e sua diferenciação de algumas bactérias do mesmo gênero *M. avium* e micobactérias atípicas, é feita pela imunofluorescência.

As duas técnicas, direta e indireta, podem ser utilizadas. É, entretanto, a

primeira, a direta, a que mais tem sido usada. A técnica é simples e consiste, como nos casos anteriores, em fazer esfregaços com o material a pesquisar e tratá-los com imuno-séros antituberculosos fluorescentes. A pesquisa posterior em campo escuro indicará a positividade ou não do resultado.

Pesquisas de anticorpos na sífilis

Tem sido muito utilizada e com bons resultados a imunofluorescência no diagnóstico da sífilis.

A utilização do método indireto, fixando o treponema na lâmina e tratando-o com o soro do paciente em diversas diluições, e posterior uso de antigamaglobulina humana fluorescente, permite fazer um diagnóstico seguro.

Para obter um resultado rigorosamente específico é necessário fazer, previamente, o tratamento do soro e examinar com treponema de Reiter. Desta maneira retiram-se os anticorpos inespecíficos para os treponemas saprófitos que o soro humano normalmente contém, tornando a fluorescência do *Treponema pallidum* mais específica.

A pesquisa de anticorpos para sífilis por imunofluorescência concorda, geralmente, com os outros métodos sorológicos.

Pesquisas de outras bactérias poderiam ser inúmeras, mas mostrariam, sempre, a utilização do método direto com o anticorpo específico fluorescente, ou o indireto, principalmente quando se procura anticorpos contra estas bactérias no soro dos pacientes.

Outras pesquisas

A imunofluorescência tem, igual-

mente, sido usada na pesquisa de parasitos ou de seus anticorpos, auxiliando, muito, o diagnóstico das parasitoses.

A pesquisa de toxoplasma, de histoplasma, de plasmódios e, mesmo, de nematelmintos pela imunofluorescência vem se constituindo, em alguns casos, como o método de escolha para o diagnóstico.

A procura de auto-anticorpos nas doenças auto-imunes é feita, com relativa facilidade, pela imunofluorescência, tratando cortes de órgãos normais pelo soro dos pacientes e pesquisando, posteriormente, a presença de complexos antígeno-anticorpo nestes cortes com antigamaglobulina fluorescente. Assim é feito na doença de Hashimoto, na "myasthenia gravis", na artrite reumatóide e em outros processos auto-imunes.

A utilização da imunofluorescência é cada vez maior e os resultados que se obtém são mais interessantes e cientificamente mais esclarecedores.

RESUMO: O autor faz uma análise da imunofluorescência como método de pesquisa científica e de rotina. Apresenta os processos utilizados para sua realização e evidencia os resultados que se observam na elucidação do diagnóstico e da patogenia de vários estados mórbidos.

SUMMARY: The author makes an analysis of the immunofluorescence as a method of scientific research and routine. He presents the processes used to its performance and evidence of result which are considered in the elucidation of the diagnosis and of pathology of many morbid states.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- 1 — AMBROISE-THOMAS, P. «Applications de l'immunofluorescence à l'étude serologique du paludisme.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.135.
- 2 — BURTIN, P. «Etude comparative des tissus normaux et des tissus cancéreux humains; Détection des antigènes d'organe par immunofluorescence.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.209-12.
- 3 — DUPOUEY, P. «L'immunofluorescence dans les leishmanioses.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.131-333.
- 4 — DUPOUEY, P. «Les principes de l'immunofluorescence; les modalités techniques. Les critères de spécificité.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.13-20.
- 5 — DUPOUEY, P. «Utilisation de l'immunofluorescence dans l'étude des trypanosomes et des trypanosomiasés.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE; Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.113-26.
- 6 — EYQUEM, A. «L'immunofluorescence en immunopathologie; affections thyroïdiennes, myasthénie, anémie pernicieuse.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.213-6.
- 7 — FAURE, M. «Immunofluorescence et tréponématoses.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.80-8.

- 8 — FAURE, M. «L'Immunofluorescence; Sa place parmi les diverses techniques immunologiques; importance de l'état de l'antigène utilisé.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.1-7.
- 9 — FAURE, M. «La préparation des sérums fluorescents.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.33-42.
- 10 — FROTTIER, J. «Identification par immunofluorescence des germes pathogènes des voies respiratoires.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les Techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.52-62.
- 11 — GOLDMAN, Morris — *Fluorescent antibody methods*. New York, Academic Press, 1968. 303p.
- 12 — HUMPHREY, J. H. & WHITE, R. G. *Immunology for students of medicine*. 3.ed. Oxford, Blackwell, 1970. 757p.
- 13 — MACKAY, Ian R. & BURNET, F. Macfarlane. *Autoimmune diseases; pathogenesis, chemistry and therapy*. 2.ed. Illinois, Charles C. Thomas, 1964. 323p.
- 14 — MANIGAULT, P. «Les principes de la fluorescence; l'appareillage d'observation microscopique; la photomicrographie en fluorescence.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.8-11.
- 15 — PAUTRIZEL, R. «Application de l'immunofluorescence au diagnostic et à l'étude des bilharzioses.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. p.151-7.
- 16 — SIZARET, P. «La production des immunosérums pour l'immunofluorescence.» In: ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. Cours Interregional sur les techniques d'Immunofluorescence; appliquées au diagnostic et à l'étude des maladies de l'homme; 30 juin — 13 juillet. Paris, Institut Pasteur, 1967. 71-9.

Hilário Ribeiro, 365 - apto. 1022 — 90000 — Pôrto Alegre — RS — Brasil.