

EFEITO DA DIETA LÁCTEA NA SUPRESSÃO DA PARASITEMIA E NO DESENVOLVIMENTO DA IMUNIDADE HUMORAL DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO MALÁRICA EM CAMUNDONGOS

JOSÉ J. FERRARONI

Estudou-se o efeito da dieta láctea, por um período de 150 dias em camundongos infectados com diferentes números das formas sanguíneas de Plasmodium berghei, e observou-se o desenvolvimento da imunidade humoral nestes animais pela dosagem das imunoglobulinas das classes IgG e IgM no soro, usando o teste de imunofluorescência indireta. Os resultados indicam que a administração do leite, como único alimento em camundongos, protege-os contra infecção malárica fatal, independentemente do número de parasitas inoculados. Os animais desenvolveram altos níveis de anticorpos IgG, os quais persistiram no soro por longo período de tempo. Contudo, os anticorpos IgM somente foram detectáveis no soro durante as primeiras duas semanas de infecção. O P. berghei continua presente na circulação periférica, após dois meses de infecção, uma vez que o sangue destes animais inoculados em camundongos mantidos em dieta normal, produziu infecção fatal nos recipientes. No entanto, ao exame microscópico não foi possível detectar o parasita da malária no sangue periférico destes animais. O protozoário esteve presente no baço e fígado dos camundongos durante todo o tempo de duração da pesquisa. A presença contínua do P. berghei nestes animais, em nível de infecção subclínica, ofereceu ao hospedeiro o desenvolvimento de uma imunidade sólida contra subsequente infecção. Esta imunidade adquirida esteve presente, nestes animais, até cinco meses após a infecção.

Desde épocas remotas sabe-se que é credence popular nos países árabes a dieta láctea proteger indivíduos contra a malária humana (Hawking, 1954). Assumindo que esta dieta não seja suplementada por outros alimentos, esta crença poderia ser justificada.

Na década de 1950, com a introdução do DDT na erradicação da malária, os indivíduos envolvidos nas campanhas de borrifação eram encorajados a ingerir bastante leite como prevenção de alguns dos efeitos tóxicos deste inseticida; o que favorecia mais ainda a idéia do efeito profilático do leite na aquisição da malária humana. Desde longo tempo é sabido que os recém-natos, do oeste africano e de outras áreas onde a malária humana apresenta-se sob a forma hiperendêmica, não adquirem a infecção tão frequentemente quanto crianças e adultos, ainda que tenham o mesmo grau de exposição ao vetor

Pesquisa patrocinada e realizada no Departamento de Microbiologia da Universidade de Montana, Missoula, Montana 59812, EUA, Universidade do Amazonas e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA - Caixa Postal 498 - 69000 Manaus-AM.

Recebido para publicação em 3 de maio e aceito em 20 de outubro de 1982.

(Bruce-Chawatti, 1952). Este grau de proteção tem sido atribuído à imunidade passiva, adquirida da mãe via placenta (Cohen, McGregor & Currington, 1961; McGregor, 1974), uma vez que as imunoglobulinas da classe IgG atravessarem a barreira placentária (Benacerraf & Ananue, 1980). Contudo, este não parece ser o único motivo da proteção, pois altos níveis de anticorpos da classe IgG nos hospedeiros não os protegem contra malária de roedores; *P. berghei*, e/ou malária humana causada por *P. falciparum*, especialmente em áreas endêmicas (Cohen & Mitchell, 1978). Apesar de que a infecção malárica em recém-nascidos ocorre predominantemente em habitantes das regiões não malarígenas (Rindi & Azimi, 1980).

Com a descoberta de que o leite não contém, ou apresenta um nível baixíssimo de ácido para-aminobenzóico (PABA) e que a inibição do desenvolvimento dos parasitas da malária pelas sulfonamidas era antagonizada pelo PABA (Maier & Rilley, 1947), uma grande atenção foi dirigida ao estudo do PABA em infecções por plasmódios de roedores e símios (Jacobs, 1964; Hawking, 1953; Rindi & Azimi, 1980). Principalmente porque: a) em 1953, foi descoberto que hospedeiros mantidos em dieta láctea apresentavam modificações no curso normal da infecção malárica e que os fatores dietéticos contidos no leite podem suprimir, estimular e/ou não afetar o curso da parasitemia periférica (Bray & Garnham, 1953); e b) que ratos alimentados com dieta rica em PABA desenvolvem parasitemia periférica mais rápida e severa quando infectados com *P. berghei* (Hawking, 1954).

A ausência de premunicação, em animais mantidos em dieta láctea e inoculados com *P. cynomolgi* (Bray & Garnham, 1953) e paradoxalmente, o desenvolvimento de um alto grau de resistência ao *P. berghei* em camundongos mantidos em dieta láctea (Gilbertson, Maegraith & Fletcher, 1970), indicam a existência de certa controvérsia relativa ao desenvolvimento do estado imunitário em animais mantidos exclusivamente em alimentação láctea e infectados com os parasitas da malária. Assim sendo, este estudo foi idealizado para verificar: a) o grau de supressão da parasitemia periférica; b) a susceptibilidade do parasita às diferentes idades das hemácias; c) o desenvolvimento e duração de anticorpos das classes IgG e IgM; e d) o grau de resistência adquirida à infecção e a duração da mesma em animais infectados com *P. berghei* e mantidos exclusivamente em dieta láctea.

MATERIAIS E MÉTODOS

Parasita: A cepa NK65 de *Plasmodium berghei* foi obtida originalmente da Universidade do Novo México, Albuquerque, NM., e mantida em camundongos por inoculações semanais das formas sangüíneas do parasita. O *P. berghei* foi mantido em camundongos por 5 anos antes do início deste estudo. O sangue infectado de camundongos Swiss-Webster foi lavado 3 vezes em solução salina heparinizada (SSH), mantida em temperatura de 4°C e os animais foram inoculados pela via intraperitoneal (IP) com diferentes números de parasitas. O intervalo entre a retirada do sangue dos animais doadores e a inoculação nos recipientes foi de menos de 40 minutos, e a solução sangüínea foi mantida constantemente em gelo. A parasitemia periférica foi determinada para cada animal por exame microscópico com objetiva de imersão em esfregaços de sangue em lâminas corados pelo método de Giemsa.

Animais: Camundongos brancos (cepa CFW) do sexo masculino foram obtidos da colônia de criação específica (livres de hematozoários) do National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Rocky Mountain Laboratory, Hamilton, MT. Todos os animais tinham sete semanas de idade e pesavam 20-25 g no início do experimento. O *P. berghei* causa 100% de letalidade nestes animais se a infecção não for tratada (Ferraroni, Douglass & Spear, 1982).

Dieta Láctea: Leite em pó foi adquirido da Carnation Company, Los Angeles, CA., contendo 8 g de proteínas, 12 g de carboidratos e 80 calorias/100 ml. O leite continha ainda os seguintes ingredientes padronizados internacionalmente: ácido ascórbico,

ácido pantotênico, cálcio, cianocobalamina, ergosterol, fósforo, magnésio, niacina, piridoxina, riboflavina e tiamina. Adicionou-se água destilada ao leite em pó, até formar uma massa pastosa consistente, da qual foram confeccionadas esferas de aproximadamente 2 cm de diâmetro que foram secadas ao ar livre em temperatura ambiente, e dadas *ad libitum* como único alimento aos animais. Leite em solução aquosa foi também oferecido aos camundongos, assim com água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em gaiolas preparadas com uma rede de arame fino na base inferior; desta maneira, as excretas passavam através da rede e não entravam em contato com os animais posteriormente, evitando, deste modo, que os camundongos obtivessem PABA o qual poderia, eventualmente ser sintetizado pela flora intestinal.

Teste de Imunofluorescência Indireta (TIF) – Sangue de camundongos infectados com *P. berghei* foi lavado 4 vezes em SSH, pH 7,2 e utilizado no preparo dos antígenos a serem usados no TIF. Uma suspensão de 20% de hemácias parasitadas foi preparada e uma pequena alíquota foi colocada em cada orifício das lâminas próprias para fluorescência (Belco Glass, Inc., Vineland, NJ.) e deixadas secarem em temperatura ambiente ao ar livre. Depois de secas as lâminas foram envoltas em papel comum e depositadas em -70°C até serem utilizadas. No momento do teste, as lâminas foram removidas do freezer (-70°C) e deixadas ao ar livre até atingir temperatura ambiente (aproximadamente 23°C) e em seguida foram lavadas por 5-8 minutos em água destilada com movimentos brandos contínuos e postas a secarem novamente em temperatura ambiente. O procedimento do teste seguiu o mesmo descrito anteriormente por Sulzer, Wilson & Hall (1969). Os soros e os conjugados foram diluídos em solução salina tamponada, pH 7,2. Os conjugados de fluorescência foram obtidos do United States Biochemical Corporation, Cleveland, OH. Os resultados do TIF foram observados no microscópio de fluorescência (American Optical Fluorescent Microscope, Scientific Instrument Division, Buffalo, NY.).

Experimentos – Sete grupos de 25 animais cada um, foram preparados inicialmente. Grupo 1 recebeu 2×10^7 hemácias parasitadas com *P. berghei* (IP) (um eritrócito contendo mais de um parasita foi considerado como um único inóculo); grupo 2 recebeu 1×10^7 ; grupo 3, 1×10^5 ; grupo 4, 1×10^3 ; grupo 5 serviu como controle (não recebeu parasita); grupo 6 recebeu 5 ciclos de infecção com 1×10^7 *P. berghei* e tratamento com Fansidar^R (1 mg pirimetamina + 20 mg sulfadoxina/kg peso) dose única administrada após cada inoculação com *P. berghei*. Todos os tratamentos ocorreram nos dias 5-6 pós-inoculação e as reinoculações foram sempre 7 dias após a administração da droga, para evitar efeito residual de Fansidar^R; grupo 7 foi exatamente igual ao 6 com exceção de que os animais não receberam dieta láctea, mas sim “dieta normal” para camundongos.

A cada 10 dias, por 5 meses, sacrificou-se um animal em cada grupo, obtendo-se o soro para a dosagem das imunoglobulinas pelo TIF. Após 150 dias, os animais restantes de cada grupo foram inoculados novamente com 1×10^7 hemácias parasitadas com *P. berghei*.

A partir do vigésimo dia de infecção o sangue periférico de todos os animais dos 7 grupos foi examinado para hematozoários de 3 em 3 dias até o 150º dia. Nos dias 25, 60 e 90 após infecção, o sangue, baço e fígado foram removidos assepticamente de um animal em cada grupo. O fígado e baço foram macerados e homogeneizados em 5 ml de meio de cultura (MEM, Grand Island Biological Company, Grand Island, NY.) contendo $100 \mu\text{g/ml}$ de sulfato de estreptomicina e $100 \mu\text{g/ml}$ de penicilina G potássica. Cinco animais para cada grupo foram inoculados (IP) com 1 ml da suspensão celular. O sangue obtido de cada animal ($\sim 1,0$ ml) foi inoculado (IP) em dois camundongos.

Nas duas primeiras semanas de infecção, a parasitemia periférica foi cuidadosamente examinada, contando-se as hemácias parasitadas e separando-se os reticulócitos dos eritrócitos maduros, pela intensidade de captação do corante quando utilizado o método de Giemsa. Os reticulócitos apresentam uma coloração púrpura enquanto que as hemácias maduras apresentam-se sob uma coloração rósea clara.

Todos os animais inoculados com sangue e/ou suspensão de hemácias que não pertenciam aos seis primeiros grupos foram mantidos em "dieta normal" para camundongos e não receberam dieta láctea.

RESULTADOS

O resultado da parasitemia periférica dos 5 grupos está representado na Figura 1. A parasitemia periférica dos animais inoculados com *P. berghei* pela segunda vez (150 dias após a primeira inoculação) está indicado na Figura 2. O resultado da titulação das imunoglobulinas das classes IgG e IgM durante os 150 dias estão representados na Figura 3. Embora se tenham titulado estes anticorpos, de 10 em 10 dias, os resultados estão indicados mensalmente, a partir do 1º mês. Em alguns dos animais mantidos em dieta láctea desenvolveu-se infecção fatal durante o período da pesquisa (Fig. 1). Nenhum parasita foi detectado no sangue periférico dos animais de todos os grupos a partir de 20º dia de infecção. Não houve diferenças, estatisticamente, significativas nos níveis de IgG e IgM nos animais inoculados com diferentes doses do parasita (Fig.3) assim como não houve diferenças nos níveis de IgG nos grupos que receberam diversos ciclos de infecção e cura, embora

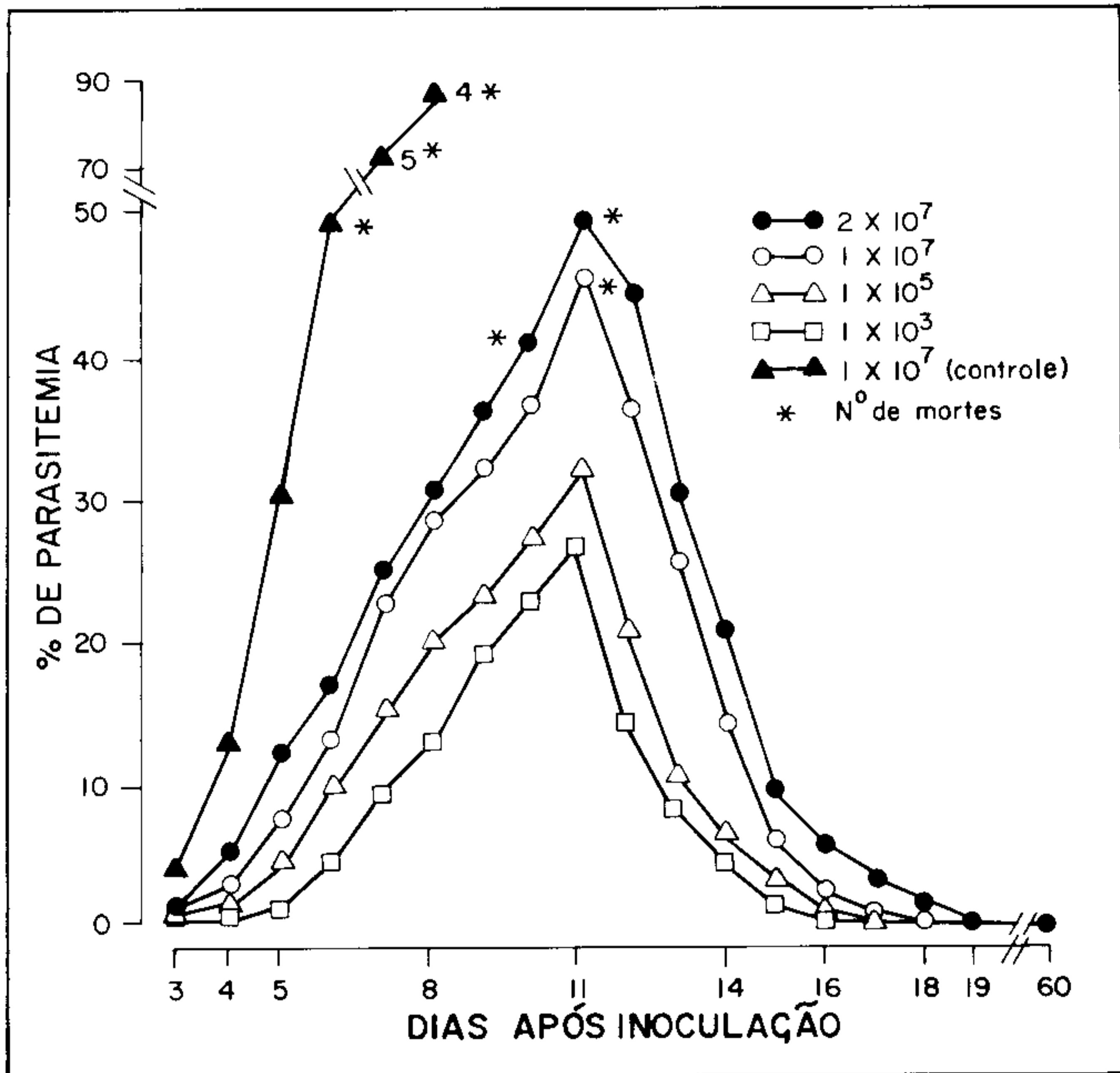


Fig. 1 - Curso da parasitemia periférica, durante 60 dias, em camundongos infectados com diferentes números de *P. berghei* e mantidos exclusivamente em dieta láctea. ▲ Grupo controle mantido em alimentação normal.

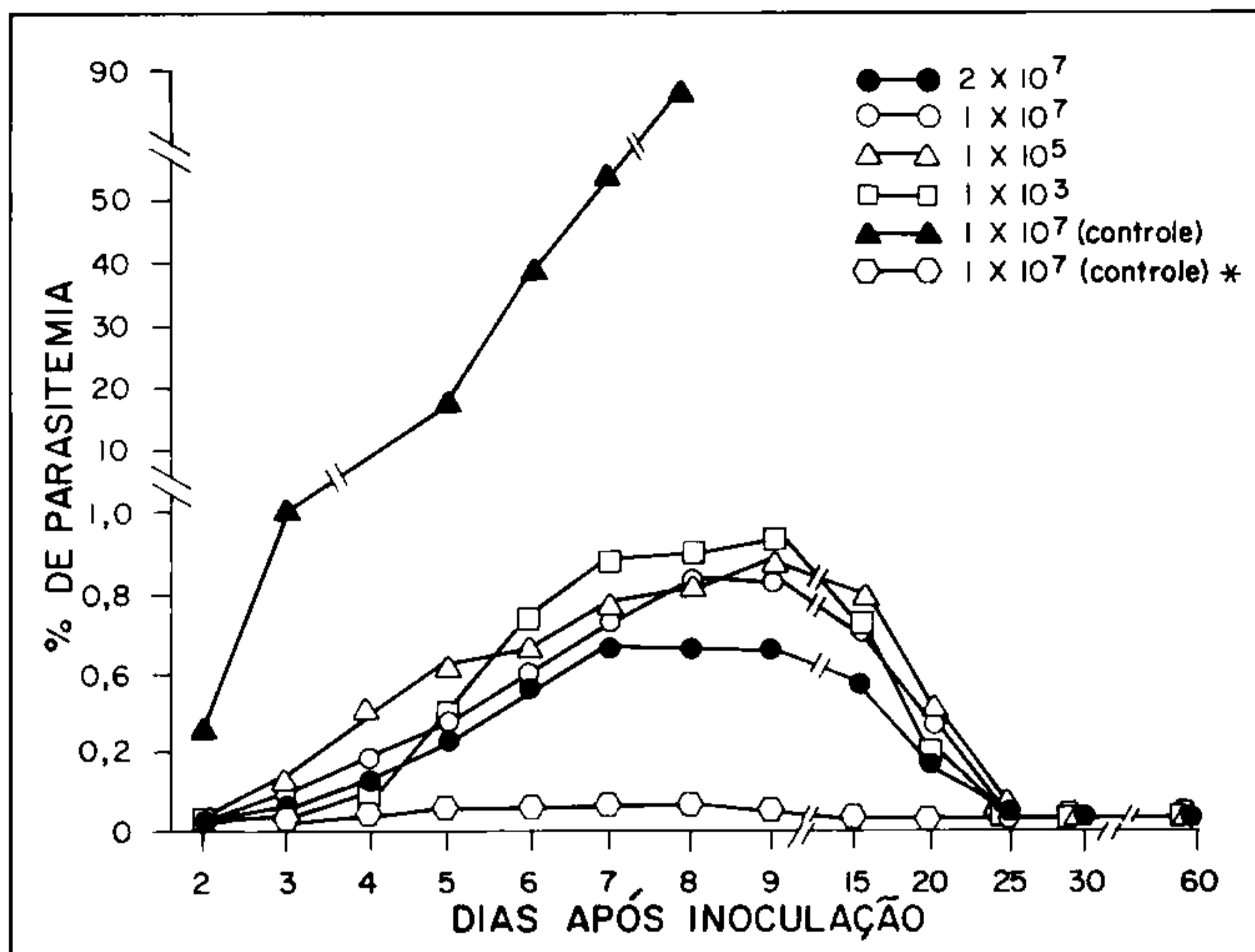


Fig. 2 - Média diária da parasitemia periférica, em camundongos mantidos em dieta láctea e inoculados pela segunda vez com *P. berghei*, 150 dias após a primeira inoculação do parasita. ▲ Grupo controle mantido em dieta normal. ● Grupo mantido em dieta láctea e que recebeu vários ciclos de infecção e cura.

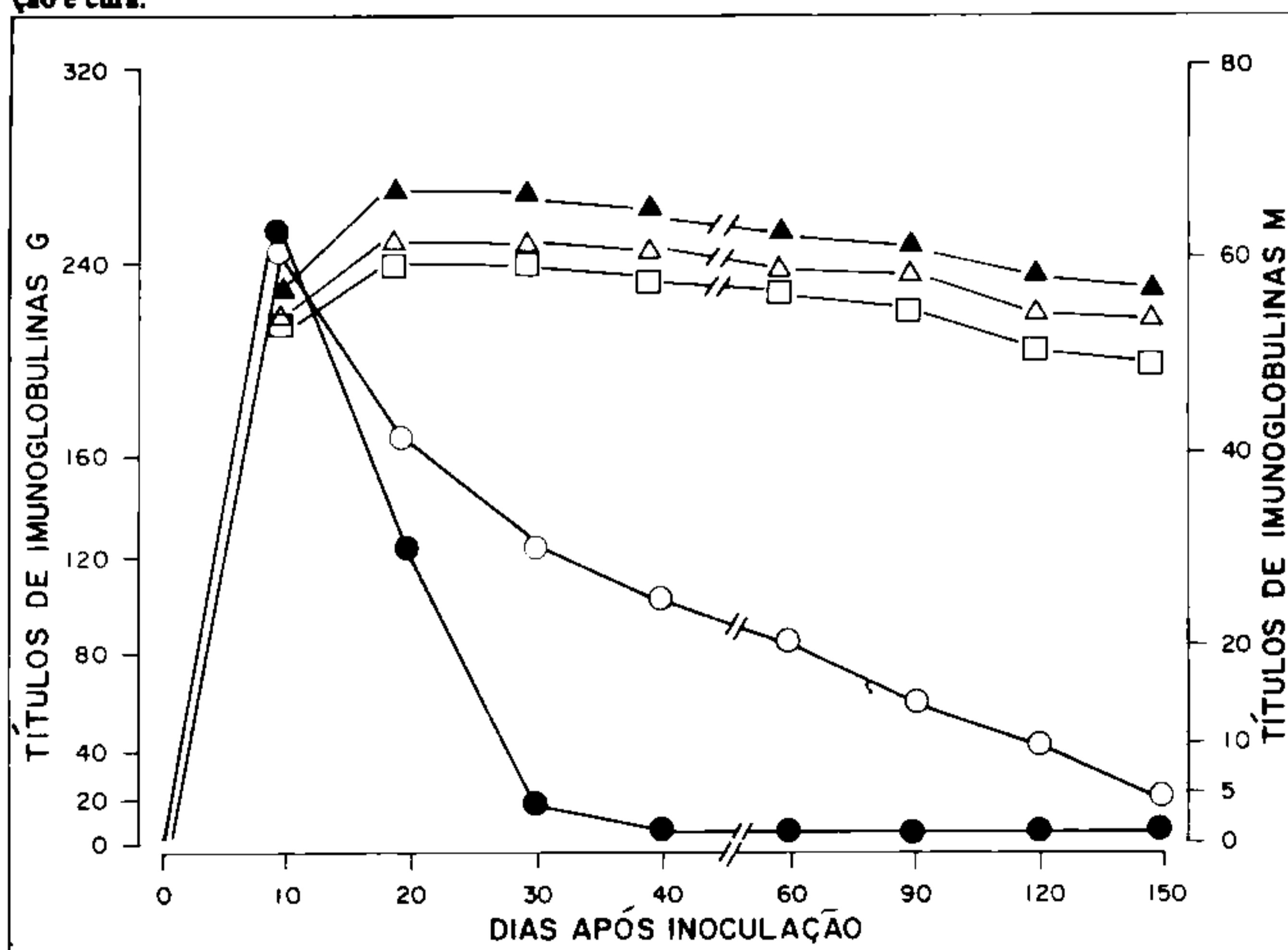


Fig. 3 - Comportamento das imunoglobulinas G e M detectadas pelo TIF durante 150 dias em animais mantidos em dieta láctea e infectados com *P. berghei*. ● IgM (comportamento) (similar em todos os grupos); ○ IgG grupo controle (animais infectados e tratados, mantidos em dieta normal); △ IgG grupo 1; ▲ IgG grupo 2; □ IgG grupo 4.

um grupo tenha sido mantido em dieta láctea e o outro em "dieta normal" para camundongos. Contudo, os animais mantidos em dieta láctea recebendo vários ciclos de infecção e cura foram os que apresentaram um maior nível de proteção (baixa parasitemia) quando infectados pela última vez 150 dias após a primeira inoculação. Observou-se ainda que existe certa preferência do parasita para infectar reticulócitos.

Em todos os animais inoculados (IP) com suspensões celulares, obtidas do baço e fígado macerados de um camundongo de cada grupo, nos dias 25^o, 60^o e 90^o a partir da primeira inoculação do parasita, desenvolveu-se infecção malárica fatal. Nos animais inoculados (IP) com sangue de um animal de cada grupo nos dias 25^o e 60^o a partir da infecção, desenvolveu-se também infecção malárica fatal. Contudo, os animais inoculados com sangue no 90^o dia de infecção não desenvolveram parasitemia periférica detectável à microscopia óptica. Todavia o sangue destes animais, inoculados em recipientes mantidos em dieta normal produziu parasitemia periférica e infecção fatal.

DISCUSSÃO

O leite é deficiente ou apresenta níveis bem baixos de PABA. O PABA é essencial para o desenvolvimento do parasita da malária, uma vez que os produtos de seu metabolismo são utilizados para a formação das bases purínicas e pirimidínicas dos ácidos nucleicos. A ausência do PABA impede o desenvolvimento genético e a formação hereditária do parasita e, conseqüentemente, bloqueia a reprodução, funcionando farmacologicamente como um protozoostático.

Bruce-Chawatt (1952) verificou que de 551 parturientes vivendo numa área endêmica de malária, 28% apresentavam parasitemia periférica e 24% acusavam o parasita na placenta. Examinando os 543 recém-nascidos (8 foram a óbitos durante o parto) 24 horas após o parto, somente um caso de infecção malárica foi detectado. No final do primeiro mês, dois casos de infecção foram observados: do segundo ao oitavo mês encontraram-se 2, 4, 21, 29, 45, 54 e 64% daqueles recém-nascidos infectados, respectivamente. Mesmo sabendo que com o aumento da idade, há maior exposição ao vetor (o que, talvez, não se aplica a áreas holoendêmicas) esses resultados sugerem que as imunoglobulinas, independentemente, não apresentam grande efeito protetor contra a infecção malárica, uma vez que, desde o nascimento os indivíduos já têm o sistema imune praticamente maduro para a produção de anticorpos (Stites, Cadwell & Pavia, 1980) e, apesar disto, o número de infecções aumentam paralelamente à idade do lactente. É notória a observação de que a infecção malárica em recém-nascidos, nas áreas endêmicas, é muito rara (1 caso em 123 placentas infectadas). Embora não haja menção da alimentação destas crianças, esse trabalho foi realizado numa clínica de orientação familiar e assistência pré e pós-natal mantida pelo governo. Assim sendo, é de se esperar que o leite foi oferecido durante o primeiro ano de vida. Deste modo, a hipótese de que a alimentação láctea oferece proteção contra a malária recebe um significativo apoio, uma vez que, com o aumento da idade, as crianças tendem, automaticamente, a alimentar-se de outros produtos afora o leite, o que paralelamente aumentou o índice de infecção. Poderia pensar-se que os anticorpos maternos tenham exercido significativo papel no bloqueio da parasitemia nessas crianças. Contudo, neste caso, haveria um grande aumento de infecção por volta do terceiro mês, quando os anticorpos maternos apresentam níveis bem baixos nos lactentes e não paralelamente como ocorreu.

Em estudos recentes Edrissinghe, Fern & Targett (1981) verificaram que animais, mantidos em dietas com diferentes quantidades de proteínas (caseína), apresentaram diferentes graus de susceptibilidade ao *P. berghei*. Porém, em 1953 Refaat & Bray, descreveram que a caseína somente não tem tanta ação supressiva nos parasitas da malária quando comparada com o leite completo. Os resultados deste estudo são similares àqueles descritos anteriormente por McGregor (1974), principalmente no tocante ao nível de parasitemia (Fig. 1). Aqueles autores concluíram que animais em deficiência proteica são mais re-

sistentes à infecção malárica. Embora o nível da parasitemia periférica, nos dois estudos sejam bem próximos, torna-se difícil uma analogia nutricional, dados os vários componentes contidos no leite.

O fato de o número de parasitas inoculados influenciar significativamente no nível da parasitemia, assim como na mortalidade do hospedeiro (Fig. 1) poderia ser explicado pelo maior espaço de tempo dado ao hospedeiro para desenvolver o sistema imunológico contra o parasita. Em outras palavras, um baixo nível constante de parasitas no sangue periférico estimula o hospedeiro a produzir uma maior quantidade de anticorpos e outros fatores humorais de defesa contra a infecção.

Leites de diferentes origens produzem diferentes graus de proteção contra malária (Maier & Riley, 1942). Isto poderia ser explicado pelo estado nutricional do hospedeiro produtor de leite. Assim sendo a proteção de recém-nascidos amamentados com leite materno estaria na dependência do estado nutricional da mãe. Este fato explica também, pelo menos em parte, as conclusões apresentadas por Edrissinghe, Fern & Targett (1981), de que a deficiência proteica oferece proteção contra malária, uma vez que, as populações vivendo nas regiões endêmicas dos trópicos apresentam deficiência proteica (Giugliano et al, 1978) e por isso os recém-nascidos são protegidos contra a malária. É claro que, em se tratando do leite em pó, artificial, este aspecto estaria eliminado.

É interessante notar que o estado imunológico do hospedeiro influencia diretamente no curso da infecção malárica. No entanto, é nosso entender, baseados nestes resultados, que o estado nutricional, relacionado à dieta láctea, apresenta similar importância no curso da infecção malárica.

O fato de que os parasitas de malária estiveram presentes durante todo o tempo nestes animais, tanto no baço como no fígado, assim como no sangue periférico, oferecendo um estímulo constante ao hospedeiro e que os animais foram praticamente refratários à infecção, 150 dias após a primeira inoculação (Fig. 3), indica que a dieta láctea suprime a infecção, mantendo um baixo nível de parasitemia, possibilitando ao hospedeiro a chance de construir seu sistema defensivo contra a infecção.

Apesar de a parasitemia periférica ter sido negativa a partir do vigésimo dia de infecção, alguns parasitas permaneceram no sangue, uma vez que a inoculação de 0,5 ml de sangue periférico produziu infecção fatal nos recipientes.

O desenvolvimento e manutenção dos níveis de IgM nestes animais mantidos em dieta láctea estão de acordo com os resultados previamente descritos em animais em alimentação normal (Waki & Suzuki, 1974). Contudo, os níveis do IgG apresentam diferenças, não só com resultados descritos em animais por Waki & Suzuki (1974) mas também com estudos observados em seres humanos por Wilson, Sulzer & Runcik (1970). Não houve praticamente diferenças nos níveis de IgG e IgM entre os animais mantidos em dieta láctea infectados uma ou mais vezes (Fig. 3), assim como não houve diferenças, nos níveis destes anticorpos, nos animais mantidos ou não em dieta láctea e infectados mais de uma vez. Estes resultados indicam que a presença contínua ou alternada do *P. berghei* no hospedeiro estimula o mesmo grau de resposta imune humoral.

A sobrevivência do parasita por longo tempo no hospedeiro, mantido em dieta láctea, com ausência do PABA, sugere também que houve adaptação parasita/hospedeiro e o *P. berghei* desenvolveu algum mecanismo mutativo para sobreviver na ausência do PABA.

SUMMARY

A five month study was performed to test the effect of a total milk diet on the susceptibility of mice to various doses of a rodent malaria *Plasmodium berghei*. The devel-

opment of humoral immunity was followed by quantitation of specific serum immunoglobulines (IgG and IgM) using the indirect fluorescent antibody method. High levels of IgG antibodies persisted for 150 days. IgM antibodies were observed only during the first two weeks of infection. It was not possible to detect parasites in peripheral blood smears of these animals throughout the experiment, except during the first two months. Peripheral blood of these mice produced fatal malaria infection when inoculated into recipient mice fed normal diets. The parasite was present in the liver and spleen of milk diet mice during the entire length of the study. The results indicate that a milk diet administered to mice as the only source of food protected them against fatal malaria infection regardless of the number of parasite inoculated. The continuous presence of the parasite in these animals, at subclinical levels, allow the host to develop specific IgG and subsequent resistance to malaria infection. This acquired immunity was still present in the mice at 150 days post inoculation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENACERRAF, B. & UNANUE, E.R., 1980. Antibodies and their functions. In: *Textbook of Immunology*. Williams & Silkins, Waverly Press, Inc., Baltimore/London, pp. 31-53.
- BRAY, R.S. & GARNHAM, P.C.C., 1953. Effect of milk diet on *Plasmodium cynomolgi* infections in monkeys. *B. Med. J.* 1 :1200-12001.
- BRUCE-CHAWATT, L.J., 1952. Malaria in African infants and children in southern Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 46 :173-199.
- COHEN, S. & MITCHELL, G.H., 1978. Prospects for immunization against malaria. *Current Topics in Microbiol. and Immunol.*, 80 :97-137.
- COHEN, S.; MCGREGOR, I.A. & CURRINGTON, S., 1961. Gamma globulin and acquired immunity to human malaria. *Nature (London)*, 192 :733-737.
- EDRISINGHE, J.S.; FERN, E.B. & TARGETT, G.A.T., 1981. Dietary suppression of rodent malaria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75 :591-593.
- FERRARONI, J.J.; DOUGLASS, G.T. & SPEER, C.A., 1982. Protection of athymic (N μ /n μ) BALB/c mice against *Plasmodium berghei* by splenocytes from normal (N μ /+) BALB/c mice. *Parasite Immunol.* (submitted).
- GILBERTSON, M.; MAEGRAITH, B.G. & FLETCHER, K.A., 1970. Resistance to superinfection with *Plasmodium berghei* in mice in which the original infection was suppressed by milk diet. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 64 :497-512.
- GIUGLIANO, R.; SHRIMPTON, R.; ARKCOLL, D.B.; GIUGLIANO, L.G. & PETRERE Jr., M., 1978. Diagnóstico da realidade alimentar e nutricional do Estado do Amazonas. *Acta Amazonica.*, 8 (2) suplemento número 2.
- HAWKING, R., 1953. Milk Diet, p-aminobenzoic acid, and malaria (*P. berghei*). *B. Med. J.*, 1 :1201-1202.
- HAWKING, R., 1954. Milk, p-aminobenzoate, and malaria of rats and monkeys. *B. Med. J.*, 1 :425-429.
- HINDI, R.D. & AZIMI, P.H., 1980. Congenital malaria due to *Plasmodium falciparum*. *Pediatrics*, 66 :977-979.
- JACOBS, R.L., 1964. Role of p-aminobenzoic acid in *Plasmodium berghei* infection in the mouse. *Exp. Parasitol.*, 15 :2113-2225.
- MAIER, J. & RILLEY, E., 1942. Inhibition of antimalarial action of sulfonamides by p-aminobenzoic acid. *Proc. Soc. Exp. Med.* 50 :152-154.

- McGREGOR, I.A., 1974. Mechanisms of acquired immunity and epidemiological patterns of antibody responses in malaria in man. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 50 :259-266.
- REFAAT, M.A. & BRAY, R.S., 1953. Milk and protozoal infections. *B. Med. J.*, 2 :1047.
- STITES, D.P.; CADWELL, J.L. & PAVIA, C.S., 1980. Phylogeny & Ontogeny & Reproductive Influences. Section II. Immunobiology. *Basic Clinical Immunologi*. H.H. Fudenberg (ed). 3rd. ed. Los Altos Lauge, Medical Publications, pp. 156-170.
- SULZER, A.J.; WILSON, M. & HALL, E.C., 1969. Indirect fluorescent tests for parasitic diseases. V. An evaluation of a thick-smear antigen in the IFA test for malarial antibodies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18 :199-205.
- WAKI, S. & SUZUKI, M., 1974. Development and decline of antiplasmodial indirect fluorescent antibodies in mice infected with *Plasmodium berghei* (NK65) and treated with drugs. *Bull. Wld. Hlth. Org.* 50 :521-526.
- WILSON, M.; SULZER, A.J. & RUNCIK, K., 1970. Malaria-antibody patterns as determined by IFA test in U.S. servicemen after chemotherapy *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19 :401-404.