

OSCAR BELMIRO MANOEL MAY PEREIRA

Diagnóstico Laboratorial da Leishmaniose Tegumentar

TESE DE CONCURSO

apresentada à

**FACULDADE DE MEDICINA DE PÓRTO ALEGRE
PARA DOCÊNCIA DE MICROBIOLOGIA**

TRABALHO REALIZADO NO INSTITUTO PEREIRA FILHO



1957

OF. GRÁF. DA LIVRARIA DO GLOBO S. A.
PÓRTO ALEGRE

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA DE PÓRTO ALEGRE

Reitor: Prof. Dr. Elyseu Paglioli
Diretor: José Carlos Fonseca Milano

PROFESSORES CATEDRÁTICOS

José Carlos Fonseca Milano	Anatomia
Francisco de Castilhos Marques Pereira	Histologia e Embriologia Geral
Ney da Costa Cabral	Física Biológica
Atayde Simões Pereira (int. subst.)	Química Fisiológica
Raul Pilla	Fisiologia
Pery Riet Corrêa (int. subst.)	Fisiologia
Manoel José Pereira Filho	Microbiologia
Manoel Loforte Gonçalves	Farmacologia
Raul Franco Di Primio	Parasitologia
Walter Hugo Castilhos	Patologia Geral
Paulo de Queiroz Telles Tibiriçá	Anatômica e Fisiologia Patológicas
Mário Degni	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
José Eboli (int. subst.)	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
Rubens Mário Garcia Maciel	Clínica Propedêutica Médica
Elyseu Paglioli	Clínica Propedêutica Cirúrgica
Arthur Mickelberg (int. subst.)	Clínica Propedêutica Cirúrgica
Antônio de Souza (int. subst.)	Clínica Otorrinolaringológica
Darci Rocha (int. subst.)	Clínica Dermatológica e Sifiligráfica
Paulo Maurell Moreira	Higiene
Celestino Moura Prunes	Medicina Legal
Eduardo Zácara Faraco	Terapêutica Clínica
Luiz Soares Sarmento Barata (int. subst.) ..	Clínica Urológica
Antônio Louzada	Clínica de Moléstias Tropicais e Infecciosas
Antônio Saint Pastous de Freitas	3. ^a Clínica Médica
Mário Rangel Ballvé (int. subst.)	3. ^a Clínica Médica
Eduardo Sarmento Leite da Fonseca F. ^o ..	4. ^a Clínica Médica
Anthero do Prado Lisboa (int. subst.)	4. ^a Clínica Médica
Jacy Carneiro Monteiro	1. ^a Clínica Cirúrgica
Luiz Francisco Guerra Blessmann	2. ^a Clínica Cirúrgica
Duílio Perrone (int. subst.)	2. ^a Clínica Médica
Othon Soares de Freitas	Clínica Obstétrica
Thomaz Laranjeira Mariante	1. ^a Clínica Médica
Alvaro Barcelos Ferreira	2. ^a Clínica Médica
Fradique Correa Gomes	Clínica Ginecológica
Celso Aquino (int. subst.)	Clínica Neurológica
Ari Borges Fortes	Clínica Neurológica
Ivo Correa Mayer	Clínica Oftalmológica
Décio Soares de Souza	Clínica Psiquiátrica
Paulo Vianna Guedes (int. subst.)	Clínica Psiquiátrica
Raul Moreira da Silva	Clínica Pediátrica e Higiene Infantil
César Augusto da Costa Avila	Clínica Cirúrgica Infantil e Ortopédia
José Fernando Domingues Carneiro (cont.) ..	Tisiologia



DOCENTES LIVRES

Adayr Eiras de Araújo	Clínica Urológica
Alberto Viana Rosa	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
Almir Alves	Clínica Urológica
Alvaro Murillo da Silveira	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
	Clínica Neurológica

Anthero do Prado Lisboa	Clínica Médica
Antônio Alves de Paula Azambuja	Clínica Propedêutica Azambuja
Antônio de Souza	Clínica Otorrinolaringológica
Apolo Corrêa Gomes	Clínica Médica
Arthur Coelho Borges	Clínica de Moléstias Tropicais e Infectuosas
Arthur Mickelberg	Clínica Propedêutica Cirúrgica
Arthur S. Mascarenhas	Clínica Otorrinolaringológica
Ary Barcellos Ferreira	Clínica Propedêutica Médica
Athayde de Simões Pereira	Química Fisiológica
Ayres Maciel	Higiene
Bruno Marsiaj	Anatomia
Carlos Machado Carrion	Física Biológica
Carlos Candal dos Santos	Patologia Geral
Carlos de Britto Velho	Clínica Médica
Cássio Annes Dias	Clínica Médica
Celso César Papaleo	Medicina Legal
César José dos Santos	Clínica de Moléstias Tropicais e Infectuosas
Clóvis Bopp	Clínica Dermatológica e Sifiligráfica
Coradino Lupi Duarte	Clínica Obstétrica
Custódio Vieira da Cunha	Histologia e Embriologia Geral
Darcy Farias Lima	Parasitologia
Darcy José da Rocha	Clínica Dermatológica e Sifiligráfica
Décio de Almeida Martins Costa	Clínica Pediátrica Médica e Higiene Infantil
Duílio Perrone	Clínica Cirúrgica
Eduardo Assis Brasil	Clínica Oftalmológica
Elias Kanan	Clínica Cirúrgica Infantil e Ortopédica
Enio Marsiaj	Clínica Obstétrica
Ervino João Carlos Presser	Técnica Operatória e Cirurgica Experimental
Erwino Jacob Diefenthaler	Clínica Obstétrica
Estela Budianski	Clínica Pediátrica Médica e Higiene Infantil
Felissíssimo Difini	Química Fisiológica
Gert Eduardo Secco Eichenberg	Clínica Cirúrgica
Gorki Mecking de Lima	Anatomia e Fisiologia Patológicas
Heitor Masson Cirne Lima	Clínica Propedêutica Cirúrgica
	Anatomia e Fisiologia Patológicas
Hélio Lopes Medeiros	Física Biológica
Helmuth Fischer Weinmann	Histologia e Embriologia Geral
Hermes Rodrigues	Higiene
Ivo Barbedo	Clínica Oftalmológica
Jaimes Guimarães Domingues	Fisiologia
Jaime Vignoli	Fisiologia
Jandyr Maia Faillace	Higiene
João de Almeida Antunes	Clínica Cirúrgica
João Cahen Fischer	Clínica Ginecológica
João Carlos Gomes da Silveira	Clínica Ginecológica
Jorge Mazeron Fonyat	Clínica Propedêutica Cirúrgica
Jorge Escobar Pereira Lima	Terapêutica Clínica
José Eboli	Técnica Operatória e Cirurgia Experimental
José Martins Job	Clínica Médica
José dos Anjos Vasconcelos	Clínica Cirúrgica Infantil e Ortopédica
José Maria Santiago Wagner	Medicina Legal
Leônidas Soares Machado	Higiene
Luiz Soares Sarmento Barata	Clínica Urológica
Luiz Assumpção Osório	Clínica Oftalmológica
Luiz Germano Rothfuchs	Clínica Psiquiátrica
Manoel Júlio Gonzales	Terapêutica Clínica e Clínica Médica
Manoel Madeira da Rosa	Clínica Médica
Maria Clara Mariano da Rocha	Clínica Pediátrica Médica e Higiene Infantil
Mário Araújo Azambuja	Clínica Oftalmológica
Mário Rangel Ballvé	Clínica Médica
Mário Corrêa Staedter	Farmacologia
Newton Adherbal Prates de Lima	Clínica Ginecológica
Nilo Pereira da Luz	Clínica Ginecológica
Nino Marsiaj	Clínica Médica
Norman Sefton	Medicina Legal
Oddone Marsiaj	Clínica Obstétrica
Osmar Pilla	Farmacologia
Paulo Frederico Ludwig Becker	Anatomia e Fisiologia Patológicas
Paulo Luiz Vianna Guedes	Clínica Psiquiátrica

Pedro Alvaro José Sirângelo	Farmacologia
Pedro Luiz Costa	Clínica Obstétrica
Pery Riet Corrêa	Fisiologia
Raul Jobim Bittencourt	Medicina Legal e Clínica Psiquiátrica
Ramiro Frotta Barcellos	Química Fisiológica
Roberto Pinto Ribeiro	Medicina Legal
Ruy Lauer Simões	Histologia e Embriologia Geral
Tauphick Saadi	Anatomia
Telêmaco Estivalet Pires	Clínica de Moléstias Tropicais e Infecciosas
Tenack Wilson de Souza	Clínica Propedéutica Médica
Thirso Monteiro	Clínica Urológica
Victor Rabello Miranda	Clínica Neurológica
Victor Salazar Rangel	Microbiologia
Waldemar de Avila Castro	Anatomia e Fisiologia Patológicas
Waldemar da Silva Job	Terapêutica Clínica
Waldemar Niemayer	Clínica Oftalmológica
Walter Ghezzi	Anatomia





DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

FORMAS CLÍNICAS

As leishmanioses, produzidas por protozoários do gênero *Leishmania* Ross, 1903, podem se apresentar com um caráter de infecção geral ou localizada, sendo divididas, sob o aspecto clínico, da seguinte maneira:

Leishmaniose (*)	{	tegumentar	cutânea — L. tropica Wright, 1903
			cutâneo-mucosa — L. brasiliensis G. Vianna, 1911
		visceral — L. donovani Laveran e Mesnil, 1903	

LAVERAN, em 1917, dividiu as leishmanioses tegumentares em duas formas clínicas: cutânea e mucosa. Na forma cutânea, ESCOMEL estudou as variedades ulcerosa, pápulo-tuberculosa, atrófica, linfangítica, crostosa e circinada. Ainda o mesmo autor descreveu, para a forma mucosa, duas variedades: variedade sem solução de continuidade e variedade com solução de continuidade.

Preferentemente nas zonas descobertas da face, membros superiores e inferiores, surge, a princípio, uma mancha eritematosa, que se transforma em lesão pápulo-pustulosa ou nodular, denominando-se êste período como “fase de botão”. A lesão inicial mostra-se pruriginosa ou não, assim como pode ser dolorosa ou silenciosa. Posteriormente, ulcera-se esta lesão inicial, aparecendo uma reação linfática, com adenite regional discreta e linfangite funicular ou nodosa, nem sempre aparente. Constitui-se, dessa maneira, o chamado “complexo primário da leishmaniose”.

As lesões, primeiramente cutâneas, evoluindo a partir do cancro de inoculação, estendem-se em direção às mucosas, assinalando-se com maior freqüência o comprometimento da mucosa nasobucofaringea e mesmo laríngea, caso em que se pode constatar lesões das cordas vocais através da disfonia manifestada pelo paciente.

Na seqüência do processo leishmaniótico, as cartilagens nasais podem ser parcial ou totalmente destruídas: verifica-se, como conseqüência, a queda do nariz (nariz de camelo ou tapiróide) e, em casos de extensa destruição, a formação de uma verdadeira cavidade única oronasal.

(*) Esta é a classificação adotada no Curso de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade do Rio Grande do Sul, pelo Prof. Paulo Tibiriçá, que aconselha a pronúncia “lichmânia”, em face da origem do termo (Leishman — pesquisador inglês)

ESCOMEL, observando as lesões do véu do paladar, constatou a freqüência de uma formação especial, denominada de “cruz espúndica”, resultante da retração dos tecidos entre lesões vegetantes. Os sulcos formadores da cruz espúndica se orientam de trás para diante (direção ântero-posterior) e desde a região molar de um lado à região molar de outro.

Em síntese, as lesões da face, cutâneo-mucosas, permitem a configuração de uma verdadeira “facies leishmaniótica”, com nariz infiltrado, ectasias capilares, coloração vermelho-violácea e destruição variável do arcabouço cartilaginoso do nariz, sendo também possível a verificação de lesões ao nível das regiões malares e no lábio superior.

No intuito de sistematizar o estudo das lesões cutâneas e mucosas, o Prof. JORGE LÔBO, de Recife, apresentou, em 1947, uma classificação dermatológica, bastante didática:

1) Lesão inicial, que posteriormente se ulcera com reação linfática.

2) Leishmânides	}	cutâneas	}	impetigóide
				ectimatóide
				ulcerada
				lupóide
				framboesóide
				verrucóide
				sarcóide
		mucosas	}	ulcerosas
				úlcerovegetantes
		cutâneo-mucosas — formas associadas		

Para ESCOMEL, as formas puramente cutâneas (UTA) são mais encontradas nas regiões elevadas: daí o nome de “leishmaniose da serra”; ao passo que a forma cutâneo-mucosa, “espúndia”, é mais freqüente nas regiões quentes, baixas e úmidas. Entretanto, autores há, como FLOCH e SUREAU que verificaram, nas regiões baixas da Guiana Francesa, predominância do tipo cutâneo. Também SANCHEZ COVIZA e GUERRA, na Venezuela, encontraram, de oito formas cutâneo-mucosas, quatro nas regiões montanhosas.

Convém ainda mencionar a observação valiosa de ORTIZ e PRADO que estudaram um caso com lesões nodulares disseminadas, de aspecto lepromatoso, com numerosas leishmânias e exame negativo para o *Mycobacterium leprae*.

Não será necessário recordar que, para estudarmos a obtenção de material destinado ao exame laboratorial, torna-se dispensável a consideração demorada das classificações de A. DA MATTA (1915), de ALMENARA (1916), as de EDUARDO RABELLO (1913, 1914 e 1925), de RABELLO, PORTUGAL SERRA e ROCHA (1944), de AGUIAR PUPO (1946).

Em algumas regiões sul-americanas é possível verificar, no mesmo doente, a leishmaniose cutâneo-mucosa e a blastomicose bucofaringea; por isso, mister se faz lembrar os sinais cardeais da leishmaniose, tão bem estudados por ESCOMEL: ausência de cancro inicial, lesões cutânea, mucosa e mista, invasão das mucosas por continuidade, imunidade conferida, ausência de quadro histopatológico típico, presença de leishmânias nos tecidos, curável sobretudo pelos arsenicais e antimoniais.

A blastomicose, no primeiro período, quase sempre é cutânea, seguida de lesões secundárias e terciárias, geralmente com um cancro inicial, de evolução longa; a invasão das mucosas faz-se, em regra geral, por continuidade; ausência de imunidade, presença de *Blastomyces* nos tecidos, sensibilidade às sulfas.

Embora não seja possível estabelecer diferenças morfológicas entre a *L. tropica* (agente do botão do Oriente) e a *L. brasiliensis* (leishmaniose cutâneo-mucosa sul-americana), a ação patogênica das duas espécies é perfeitamente distinta: a primeira determina lesão cutânea, benigna, que pode, em determinados casos, evoluir para a cura, enquanto a *L. brasiliensis* produz doença de evolução lenta e progressiva, sem tendência à cicatrização espontânea. Verifica-se, pois, que existe uma diferença lógica entre os dois protozoários e deve-se salientar o que foi dito acima, levando-se em conta que a reação de sôro-aglutinação também não se presta para a separação das espécies do gênero *Leishmania*, como demonstrou ARISTIDES MARQUES DA CUNHA em trabalho documentado e publicado nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1942. Existe um antígeno comum para tôdas as leishmânias, ou antes, idêntica constituição antigênica. Amostras de *L. infantum* e *L. tropica*, conservadas em cultura por longo tempo, possuíam o mesmo antígeno comum.

MAYER e PIFANO demonstraram ainda, que as reações sorológicas com o antígeno de MACHADO para a doença de Chagas e com o antígeno preparado a partir de culturas de leishmânias constituem reações de grupo.





PESQUISA DIRETA DAS LEISHMÂNIAS NAS LESÕES, NÓS GÂNGLIOS E NAS SEROSIDADES PRODUZIDAS POR VESICATÓRIO

COLHEITA DO MATERIAL

De preferência, a colheita de material para esfregaços deve ser realizada nas lesões recentes não ulceradas. Se houver ulceração, o material será colhido na borda da lesão, fazendo-se nesse local, após antissepsia, escarificações ou raspagens com bisturi, o que permite a obtenção de pequenos fragmentos; êstes poderão ser utilizados para a realização de preparados por impressão.

Considerando-se que a presença do sangue dificulta a pesquisa das leishmânias, autores há que aconselham o pinçamento prévio da região, com a intenção de provocar uma isquemia.

Colhido o material, basta distendê-lo sôbre uma lâmina rigorosamente limpa.

Da mucosa nasal ou pituitária, o material destinado aos diversos exames pode ser retirado com facilidade pela curetagem. Nos gânglios e nódulos linfáticos ou em tórno de lesões abertas, a colheita é realizada pela punção com agulha grossa (10 - 12). Por vêzes, de lesões fechadas, a serosidade produzida por um vesicatório pode se prestar para a feitura de preparados.

Esta pesquisa direta é 100 % positiva em casos de lesões recentes. Não se deve esquecer, entretanto, que, com a intervenção terapêutica específica, diminui-se, habitualmente, a positividade dos exames.

Nas úlceras antigas os resultados positivos atingem apenas a 85 %. Ainda mais, nas formas verrucosas, framboesóides e lupóides obtém-se sômente cêrca de 15 % de resultados positivos.

Mais difícil, contudo, se torna a pesquisa do parasito nas formas mucosas, onde a positividade é muito baixa: daí a conveniência da seriação de exames, realizada com intervalos variados, sem nenhum tratamento específico.

MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Os processos mais recomendáveis para a obtenção de bons preparados corados são os métodos panóptico, de GIEMSA e de LEISHMAN.

1) *Método panóptico*: O melhor método de coloração é o chamado método panóptico baseado no emprêgo sucessivo dos corantes de MAY-GRÜNWALD e de GIEMSA.

A fixação é feita derramando-se sôbre a lâmina 10 gotas de MAY-GRÜNWALD, que deve agir durante 3 minutos, com a proteção da tam-

pa de uma caixa de PETRI. Cabe acentuar que não deve haver secagem dêste líquido. Em seguida, deita-se sôbre o MAY-GRÜNWARD uma quantidade igual de água neutralizada (10 gotas).

Por inclinação da lâmina em todos os sentidos, obtém-se a homogeneidade da mistura, que deve atuar durante 1 minuto. Rejeitado o corante, sem lavar o esfregaço, verte-se sôbre a lâmina o líquido de GIEMSA diluído, na proporção de 3 gotas para 2 cc de água destilada, com pH levemente alcalino.

À temperatura ambiente, 15 a 20 minutos são suficientes para corar os preparados recentes, que podem ser lavados em água ordinária.

Finalmente, seca-se o preparado em papel de filtro ou se efetua a secagem pela exposição da lâmina a uma corrente de ar, graças ao emprêgo de um aparelho de ventilação.

Convém lembrar que o contrôle do pH pode ser feito utilizando-se o indicador vermelho neutro a 1 % em soluto aquoso ou melhor, o indicador de azul de bromo-timol.

2) *Método de GIEMSA*: A fixação é feita pelo álcool metílico ou metanol, durante 10 minutos e a coloração se efetua com o emprêgo do soluto de GIEMSA, na proporção de 1 gôta de GIEMSA para 19 gotas de água destilada. O soluto corante deve agir durante 20 a 30 minutos.

Em alguns esfregaços, o método utilizado foi o de GIEMSA-ácido acético, que consiste em fazer atuar o GIEMSA na diluição clássica, fazendo-se, em seguida, a lavagem em água destilada. Depois, submete-se o preparado ao tratamento pela água acetificada, na proporção de 5 gotas por 100.

3) *Método de LEISHMAN*: Método prático muito usado pelos protozoologistas ingleses, é o de LEISHMAN com modificação de SHUTE, que se distingue do processo clássico quer pelas precauções adotadas, quer ainda pela preparação pròpriamente dita.

O soluto de pó de LEISHMAN é preparado dissolvendo-se 15 centigramas do corante em 100 cc de álcool metílico rigorosamente puro. Filtração depois de 24 horas.

As lâminas devem ser novas, desengorduradas pelo ácido nítrico a 30%, depois lavadas e conservadas em álcool absoluto.

Coloca-se sôbre o esfregaço 4 gotas do corante, balançando-se as lâminas durante alguns segundos. Adiciona-se, a seguir, 12 gotas de água destilada com pH 7.2, realizando-se cuidadosamente a mistura.

No fim de 30 a 40 minutos obtém-se uma coloração conveniente. O corante é retirado por meio de um jato de água destilada, obtido com o auxílio de uma pipeta.

MORFOLOGIA DAS LEISHMÂNIAS

A morfologia das leishmânias no organismo humano é característica: corpos ovóides, de 2 a 6 μ . de comprimento, cujo citoplasma contém um

núcleo esférico e um blefaroplasto em forma de bastonete, donde parte o rizoplasto.

Vivem elas nas células endoteliais dos tecidos e, com mais raridade, no interior de leucócitos do sangue periférico.

A multiplicação das leishmânias no organismo humano faz-se por cissiparidade.

INVESTIGAÇÕES PROTO-HISTOLÓGICAS

O material que é retirado de lesões fechadas, das bordas de úlceras ou dos gânglios é fixado pelo líquido de BOUIN, no formol a 10 %, no líquido de HELLY, no de ZENCKLER ou no sublimado alcoólico de SCHAUDINN, para depois ser incluído em parafina e servir para a obtenção de cortes delgados (5μ no máximo).

De preferência, os cortes devem ser corados pelo MAY-GRÜN-WALD — GIEMSA e pelo hemalúmen-eosina, sendo este último processo inferior, no que diz respeito à evidenciação das leishmânias.

Coloração dos cortes pelo processo de GIEMSA: Os fragmentos são desidratados pelo álcool, impregnados pelo tolueno e depois incluídos em parafina para a obtenção de cortes finos.

Desparafinar os cortes, tratando-os, depois, pelo líquido de Lugol fraco (álcool a 70° adicionado de 3 % de Lugol ordinário). Este tratamento, agindo durante 20 a 30 minutos, favorece a obtenção de coloração protoplasmática intensa.

Elimina-se o iôdo pela lavagem rápida em água destilada e pelo soluto de hipossulfito de sódio a 0.5 % (10 minutos). Lava-se em água comum durante 5 minutos, tempo este que é seguido, imediatamente, pela lavagem rápida em água destilada.

Se o fixador utilizado for o líquido de BOUIN, basta unicamente eliminar o ácido pícrico, dispensando-se, pois, o tratamento dos cortes pelo Lugol.

A coloração pelo GIEMSA é realizada tomando-se 1 gôta do corante para 19 gotas de água destilada. O tempo de coloração vai de 2 a 12 horas, sendo prudente renovar o corante no fim dos primeiros 30 minutos.

Finalmente, os cortes são lavados em água destilada, submetendo-se, em seguida, as preparações ao tratamento comum a todos os cortes histológicos (desidratação pela série crescente de alcoois e passagem no xilol).

A leishmaniose tegumentária caracteriza-se, sob o ponto de vista histopatológico, por um granuloma de células linfo-plasmo-histiocitárias. Pode haver acantose, que é mais acentuada nas úlceras maiores; cordões epiteliais finos invadem o derma, notando-se, por vêzes, nas bordas ulceradas, papilomatose moderada.

As infiltrações intensas nas porções subjacentes do derma apresentam número variável de linfócitos, de plasmócitos e de histiócitos. Células gigantes e estrutura tuberculóide bem definida, nas úlceras crônicas.

Nas vizinhanças das úlceras é peculiar o achado de numerosos eosinófilos.

Nas ulcerações antigas, em período de cicatrização, aparecem eosinófilos em número crescente.

O quadro histopatológico se enriquece com o aparecimento de parasitos nas lesões iniciais, papulosas ou nodulares dérmicas. O que se nota com freqüência é que, nas bordas das lesões ulcerosas recentes, é habitual o exame microscópico revelar a presença de numerosas leishmânias.

Pelos trabalhos de KLOTZ e LINDEMBERG (1923), ficou saliente a presença de nódulos circunscritos de células histiocitárias nas lesões mucosas: isto como peculiar à fase de ulceração.

O achado de um granuloma crônico ulceroso, sem a verificação de células histiocitárias com leishmânias, não permite o diagnóstico etiológico.

MÉTODOS CULTURAIS — LEPTÓMONAS



É a ROGERS (The Lancet — 23-7-1904) que se deve o mérito da obtenção do desenvolvimento da *Leishmania donovani* em meio artificial. Suas primeiras culturas foram feitas pelo produto de punção esplênica em sangue citratado a 10 %, em tubos levados à temperatura de 22° C.

Em comunicações posteriores (1905), ROGERS aconselha a adição de uma pequena quantidade de ácido cítrico ao sangue citratado. Os resultados obtidos foram, no entanto, inconstantes.

O valor atribuído pelos autores à cultura das leishmânias pode ser aferido pelos vários métodos propostos depois dos estudos de ROGERS. A obtenção do desenvolvimento do protozoário em meios artificiais obedece, como é natural, a determinadas exigências, que não poderão ser descuidadas. Assim, é necessário lembrar que as leishmânias não crescem em presença de qualquer elemento bacteriano. Dêste conhecimento derivam os cuidados especiais que deve ter o pesquisador, não só no preparo dos meios culturais (verificação rigorosa da esterilidade), como também na colheita do material a ser semeado. Recomenda-se a adição de penicilina ao material colhido, principalmente nos casos de leishmaniose cutânea, cujas lesões são freqüentemente contaminadas (N. ANSARI — 1945).

Os meios semeados são mantidos a uma temperatura de 22° C ou mesmo à temperatura ambiente do laboratório (16-28° C), em condições de aerobiose.

A adição de extrato de batata favorece o desenvolvimento da *L. brasiliensis*, a ponto de ser esta técnica utilizada para preparo de antígenos e vacinas (meio de RUGAI).

Seguidas as recomendações tendentes a evitar a inquinação por bactérias, é possível observar leptómonas ativas, dentro de 4 a 5 dias, alcançando-se o enriquecimento máximo em 15 dias.

As formas em leptómonas, que aparecem nas culturas, são organismos flagelados, muito móveis, com a extremidade posterior mais delgada que a anterior, donde sai o flagelo, sendo êste desprovido de membrana ondulante.

As fórmulas propostas pelos diversos autores colocam a reação do meio em tôrno da neutralidade, com discreto desvio para o lado alcalino, reservando-se especial cuidado na conservação da água de condensação, ambiente que se mostra propício para o desenvolvimento das leishmânias, não viáveis em profundidade.

Convém mencionar que a membrana corioalantóide de ovo de galinha embrionado pode servir de substrato ao desenvolvimento das leishmânias.

A quantidade total do líquido não deve ser superior a 1/10 do volume total do recipiente, porque as leishmânias não se desenvolvem em profundidade. Os recipientes mais apropriados são as garrafas de ROUX, mantidas deitadas. Desenvolvida a cultura, notam-se, no meio líquido, numerosas partículas brancas, perfeitamente visíveis, que são aglomerados de leishmânias.

MEIO DE NOGUCHI

NOGUCHI, em 1895, idealizou o seguinte meio de cultura:

Solução de cloreto de sódio a 0,9 %	80 cc
Sêro fresco de coelho	10 cc
Solução de hemoglobina de coelho (1 parte de sangue defibrinado de coelho em 3 partes de água destilada estéril)	1-2 cc
Gelose nutritiva a 2 % (pH 7,2)	10 cc.

- 1) Fundir a gelose com a solução de cloreto de sódio, em banho-maria, utilizando-se como recipiente um balão de vidro estéril.
- 2) Adicionar sêro de coelho e a solução de hemoglobina, mantidos a 45 °C, imediatamente após ter a temperatura da mistura baixado a 50 °C.
- 3) Distribuir, assêpticamente, o líquido obtido, na razão de 7 cc por tubo (tubos especiais de NOGUCHI), assegurada a perfeita homogeneidade da mistura.
- 4) Colocar o meio cultural, durante 48 horas, na estufa a 37 °C, a fim de verificar a esterilidade do mesmo.

TÉCNICA DE CULTURA DAS LEISHMÂNIAS PELO MÉTODO DE MANCEAUX:

O meio adotado é o de Novy-Neal-Nicolle, cuja composição é a seguinte:

Água destilada	900,0
Gelose	14,0
Cloreto de sódio	6,0.

Preparação:

- 1) Maceração de 14,0 de gelose num cristalizador, contendo água destilada.
- 2) Depois de 5 a 6 horas renovar a água destilada e após 24 horas de maceração, retirar finalmente tôda a água.

- 3) A esta gelose adicionar água destilada até fazer um pêso de 914,0; depois adicionar 6,0 de cloreto de sódio.
- 4) Fundir a gelose, filtrar e repartir em tubos de ensaio com 15 cc de comprimento por 16 mm de diâmetro e na razão de 4 a 5 cc por tubo.
- 5) Esterilizar.

NOTA: Esta maceração prévia da gelose na água destilada visa retirar do agar substâncias estranhas solúveis, que dificultam as culturas das leishmânias.

- 6) Adicionar ao meio sangue de coelho, retirado por punção asséptica do coração, na proporção de uma parte de sangue para 3 de gelose. A gelose fundida ao banho-maria deve ser resfriada entre 53 - 55 °C antes da adição do sangue ao meio.
- 7) Os tubos de gelose-sangue ficam na estufa a 37 °C para verificar a sua esterilidade, somente durante 24 horas, para evitar que um tempo mais demorado possa produzir uma dissecação muito intensa, capaz de concentrar demasiado a água de condensação, o que é causa de insucesso.
- 8) Outra condição indispensável é conservar o meio em lugares frescos ao abrigo das poeiras, colocando cada tubo em outro tubo de diâmetro imediatamente superior e um pouco mais longo.
- 9) O tubo contendo o meio é mantido com a abertura bem aplicada sobre o fundo.
- 10) Para as sementeiras é preciso semear pelo menos uma gôta da cultura-mãe, fazendo as passagens de 10 a 15 dias. A vitalidade destes flagelados pode atingir 60 dias, quando os tubos são bem fechados e mantidos em armários escuros.

MEIO DE NOELLER: (Usado no Instituto Oswaldo Cruz)

- 1) Pesar 500 gr de carne, isenta de tendões, aponevroses e gorduras.
- 2) Deixar 12 horas em maceração num litro d'água, na geladeira.
- 3) Ferver durante 15 minutos e filtrar em papel.
- 4) Adicionar

Peptona	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Glicose	20,0

- 5) Acrescentar 20,0 de gelose, fervendo a mistura para dissolver o agar.
- 6) Repartir em pequenos frascos de Erlenmeyer, na razão de 5 cc por frasco.
- 7) Esterilizar no autoclave a 120 °C, durante 20 minutos.
- 8) Adicionar, assépticamente, sangue de carneiro, na proporção de 10 a 20 %, na temperatura de 45 - 50 °C.

MEIO DE WENYON

WENYON, em 1921, propôs um meio semi-sólido, cujo preparo seguinte:

Cloreto de sódio a 0.85 % (pH 7.6)	270 cc
Gelose ordinária a 2 % (pH 7.6)	30 cc

- 1) Colocar, em cada tubo, 10 cc desta mistura e esterilizar a 120 °C.
- 2) Aquecer os tubos em banho-maria, até a fusão da gelose, deixando depois, que a temperatura caia a 50 °C.
- 3) Adicionar, a cada tubo, 20 gotas de sangue de coelho, colhido assêpticamente.
- 4) Tornar esta mistura homogênea, rolando os tubos entre as mãos e incliná-los para a obtenção da gelose em bisel.
- 5) Comprovar a esterilidade do material pela permanência na estufa a 37 °C, durante 24 horas.

MEIO DE ZOTTA

Outro meio de cultura, preconizado, em 1924, por ZOTTA, é o meio gelose-baço. Consiste êsse material num caldo de baço de vitela, obtido a partir de 250 gramas dêste órgão, reduzido a fragmentos e misturado com 500 cc de água. Leva-se o todo, em seguida, à fervura durante 20 minutos, com agitação contínua.

Adicionam-se 3 gramas de cloreto de sódio e 2 gramas de gelose, aquecendo-se a mistura à ebulição, durante 30 minutos. Manter o pH entre 6.9 e 7.1.

Repartir o material em tubos que devem ser esterilizados durante 20 minutos, a 120 °C.

Alguns acreditam que o meio fornece bastante água de condensação, apresentando, sôbre a clássica gelose de NOELLER, a vantagem de não conter sangue fresco, muitas vêzes de ação nociva sôbre os protozoários.

GALLIARD encarece o papel da hipotonia do meio e a presença da glicose para a riqueza cultural e a vitalidade das culturas. A hematina do sôro sanguíneo, que age por seu teor em colesterol, e a vitamina C, são fatores de crescimento. O azoto, necessário para o crescimento do germe, é assegurado pela peptona. Esta é a base do meio de LWOFF.

Com referência à obtenção do sangue de coelho, deve-se preferir a punção cardíaca dêste animal, com a finalidade de conseguir material mais abundante, em condições de segura assepsia.

O ponto de eleição para ser feita a punção, que visa atingir o ventrículo direito, é o ângulo formado pela 7.^a costela esquerda com o apêndice xifóide, onde os batimentos são bem sensíveis.

A semeadura do material em exame é feita na água de condensação, que deve ser abundante. Nos casos em que o meio não fornecer êsse



líquido em quantidade suficiente, pode-se ajuntar 1 cc de soluto fisiológico ou água destilada estéreis.

É aconselhável fazer sementeiras numerosas: pelo menos em 10 a 15 tubos, sob condições assépticas.

A manutenção do parasito é conseguida pelo transplante de 15 em 15 dias, realizável com pipetas de PASTEUR esterilizadas.

É afirmativa de todos os pesquisadores que os métodos culturais são superiores às pesquisas diretas feitas em exames sucessivos de esfregaços, conseguidos pelas raspagem ou punção das lesões.

INOCULAÇÕES EXPERIMENTAIS

A transmissibilidade das leishmânias pelos flebótomos foi aventada, em 1904, pelos irmãos SERGENT.

HENRIQUE DE BEAUREPAIRE ARAGÃO, emulsionando um certo número de fragmentos de flebótomos, inoculou o material assim obtido nas orelhas e focinhos de cães novos. Num dos cães inoculados, notou pequeno nódulo no focinho do animal, isto é, no ponto de inoculação. Cêrca de 5 meses após, a incisão dêste nódulo permitiu colhêr material para esfregaços, que foram corados pelo método de GIEMSA. Os parasitos mantinham-se isolados em exames sucessivos.

Em 1947, FELIPE NERY GUIMARÃES divulgou a visceralização da *Leishmania brasiliensis* em hamsters inoculados, concluindo que estas condições experimentais confirmam as idéias de HOARE, na conceituação das espécies do gênero *Leishmania*, separadas unicamente com bases clínica e epidemiológica.

Em camundongos, surgiu o aspecto tumoral com proliferação histiocitária e riqueza de leishmânias: histiocitoma leishmaniótico. PARROT e DONATIEN (1916) conservam amostras de leishmânias pela inoculação de algumas gotas de culturas, no derma da cauda de camundongos, em pontos diversos. Nos casos de inoculação positiva, aparece lesão bosselada, moniliforme, que evolui, por vêzes, para o processo ulceroso.

Nos macacos e nos cães, LAVERAN inoculou a *Leishmania tropica*, na face externa das coxas, prèviamente raspadas e desinfetadas com água oxigenada.

MARQUES DA CUNHA (1938) e AMARAL (1941) conseguiram inoculações positivas no *M. rhesus*, obtendo êste último investigador uma positividade de 100 %.

FULLER e GEIMAN (1942) inocularam, com proveito, a *Leishmania brasiliensis* no *Citellus tridecemlineatus* (esquilo do Texas). PEDROSO (1923) diagnosticou 4 casos de leishmaniose espontânea no cão. Também MAZZA, pesquisador argentino, encontrou leishmânias em processos ulcerativos localizados nas orelhas de cães e, ainda, numa úlcera do ângulo interno do ôlho de um cavalo.

MELLO (1940) identificou leishmânias em ulcerações de um gato, localizadas no nariz e na orelha.

O achado, mais importante é, incontestavelmente, o diagnóstico da infecção leishmaniótica canina, de tanta significação na disseminação da leishmaniose tegumentar: ROMANA e colaboradores, em 59 cães examinados na zona norte da Argentina, encontraram 3 animais infetados pela leishmânia.

Os Profs. RONNA e PEREIRA FILHO diagnosticaram a etiologia leishmaniótica de uma lesão ulcerada em um cão, na cidade de Pôrto Alegre (Ciência e Veterinária — 1956).

Das inoculações citadas, a que nos parece de maior importância é a realizada na cauda dos camundongos, quer pela conservação do parasito, quer ainda, pela possibilidade de isolamento de novas amostras, precisando o diagnóstico clínico.

AGUILA (1919), no Peru, conseguiu inoculações positivas em cobaios. Neste animal, HEITOR MEDINA, em 1946, no Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Paraná, observou, pela primeira vez, uma leishmaniose espontânea, com acentuado tropismo para a pele, produzindo lesões tumorais infiltrativas que chegam até a mucosa. As preparações a fresco do material colhido por punção dos tumores, permite, com facilidade, graças à mistura com uma gota da solução original de GIEMSA, a verificação dos corpúsculos de LEISHMAN, os quais se mostram ovóides ou redondos, correspondendo, em tamanho, a 1/4 de uma hemácia.

O isolamento foi realizado no meio N.N.N., conforme a técnica modificada de CULBERTSON (1942), que recomenda a adição de 1 cc de água destilada e esterilizada ao agar endurecido. As sementeiras são feitas com diluições do parasito em água destilada, depois de realizadas as provas de esterilidade do meio cultural.

Este protozoário foi inoculado em 260 cobaios, de ambos os sexos, pelas vias subcutânea, intraperitoneal, intravenosa, intraesplênica, intracerebral, intramedular e por instilação na conjuntiva. Somente neste último caso não houve resultados positivos. As inoculações foram feitas ora com material retirado das lesões puncionadas, ora com líquido de culturas com 10 dias de incubação.

No líquido obtido pela punção das lesões cutâneas do cobaio, JÚLIO MUNIZ e H. MEDINA, em 1948, pelo exame a fresco, observaram um parasito com 3 a 7 micra de comprimento, em forma de leishmânia.

Nos preparados por impressão de fragmentos de tecidos, fixados pelo álcool metílico e corados pelo GIEMSA, o parasito apresenta forma ora oval, ora redonda ou em lança. O citoplasma é de tonalidade azul e de aspecto homogêneo e o núcleo, de forma arredondada, apresenta-se corado em vermelho intenso, ao passo que o cinetoplasto é um pequeno bastonete, corado em roxo.

As formas nos tecidos são de multiplicação binária, sendo notada, primeiro, a divisão do núcleo e, depois, a do cinetoplasto. Retirando material de lesões fechadas, foi fácil o isolamento do protozoário, nos meios N.N.N., de NOELLER e NOGUCHI. O primeiro, feito com soro de cobaio ou com sangue de coelho hemolizado, presta-se, especialmente, para as culturas em massa. A temperatura ótima de crescimento é a de 22 °C, a mesma das espécies humanas. As formas desenvolvidas nas culturas são do tipo leptomonas e leishmânias. Nos esfregaços corados

pelo método de GIEMSA, as formas de leptómonas largas apresentam flagelo espêso. As formas do cultivo mostram divisão binária.

Quanto ao comportamento imunológico, revela acentuar que a reação de fixação do complemento com antígeno preparado a partir das formas de cultivo é negativa em presença de sôro com anticorpo homogêneo (sôro de cobaio infetado). É bastante curiosa a observação dêsses pesquisadores, ao demonstrarem que os soros de leishmanióticos dão reação de fixação do complemento francamente positiva com o antígeno da *L. brasiliensis* e, também, com o da *L. enrietti*.

O prazo de incubação vai de 10 a 15 dias, quando aparecem nódulos no ponto de inoculação. Preás inoculados, mostram, no fim de 45 dias, pequeno abscesso, que abriu espontâneamente, cicatrizando logo a seguir. O exame proto-histopatológico revelou processo inflamatório supurativo.

Tanto para o *M. rhesus*, como para o rato branco, cotia e camundongo, a *L. enrietti*, assim denominada pelos autores em homenagem ao Dr. MARCOS AUGUSTO ENRIETTI, não apresenta poder infetante. O mesmo resultado foi visto em dois voluntários inoculados.

MAGARINOS TORRES, JÚLIO MUNIZ, RITA A. DE ALMEIDA CARDOSO e EITEL DUARTE estudaram, magistralmente, os caracteres do granuloma histiocitário na leishmaniose espontânea do cobaio, que, freqüentemente, se transforma em granuloma fibrocitário, com caracteres pseudoneoplásicos: êste granuloma, com reduzido número de leishmânias, lembra uma neoplasia cutânea, em face desta evolução fibrocitária de seus elementos constitutivos.

REAÇÕES SOROLÓGICAS

As reações sorológicas, no diagnóstico laboratorial da leishmaniose, não apresentam a mesma importância que lhes é atribuída no reconhecimento da leishmaniose visceral, com alterações humorais acentuadas.

A sêro-aglutinação das leishmânias não se presta para a separação do gênero *Leishmania*: é o que resulta dos trabalhos de A. MARQUES DA CUNHA, em 1942, publicados nas Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, os quais contrariam as conclusões de NOGUCHI, divulgadas em 1924.

As reações de WITEBSKY, a enzimo-reação, a de BRAMACHARI ou de RAY (água destilada superposta ao sêro do doente), a formol-gel, tipo NAPIER, que consiste em verificar se o sêro dos doentes gelifica em presença de algumas gotas de formol, e a turvação do sêro pela adição do peptonato de ferro (AURICHIO e CHEFI) não deram resultados práticos no diagnóstico laboratorial da leishmaniose tegumentar.

ARTHUR MOSES (1919) preocupou-se com o diagnóstico da leishmaniose pela reação de fixação do complemento, utilizando como antígeno, seja a água de condensação das culturas, seja a emulsão de nódulos ricos em leishmânias. De 41 casos de leishmaniose tegumentar, a reação foi positiva em 33 soros sanguíneos, ou seja 80 %.

O sêro de doentes com eczema, psoríasis ou tuberculose forneceu resultados negativos, havendo, no sêro sanguíneo de um dos doentes, uma reação impedidora.

As premissas desses estudos pertencem ao Prof. GUERREIRO, do Instituto Oswaldo Cruz.

A. M. CUNHA e EZEQUIEL DIAS, utilizando um extrato alcoólico estável da *L. brasiliensis*, demonstraram uma reação de grupo: os soros de doentes de leishmaniose tegumentária ou de leishmaniose visceral reagem positivamente. Tudo faz crer que essa prova sorológica apresente vantagens na diagnose e também no controle terapêutico: esta opinião é aceita pelo Prof. RUBEM AZULAY.

O formol-gel se desenvolve de acordo com a técnica seguinte:

- 1) Em tubo de ensaio de 9 mm de diâmetro, adiciona-se 1 gota de formol a 40 % a 1 cc de sêro límpido.
- 2) A reação é considerada positiva quando, pela inversão do tubo, o sêro não é deslocado. Esta gelificação se observa durante 1 hora.

EVANDRO CHAGAS e colaboradores, em doentes de leishmaniose visceral americana, observaram que essa prova sorológica não é específica, apresentando eficiência diagnóstica somente nas fases adiantadas da leishmaniose visceral. É sem valor, entretanto, no diagnóstico precoce da infecção.

A prova de BRAMACHARI clássica ou de RAY é realizada pela adição de 2 cc de água destilada a 1 cc de sôro límpido. Nos casos positivos vê-se anel esbranquiçado na superfície de separação dos dois líquidos.

Embora haja uma certa concordância entre o formol-gel e a prova de BRAMACHARI, os estudos de E. CHAGAS e colaboradores na leishmaniose visceral apresentam conclusões insuficientes.

Conclui-se, pois, que essas provas diagnósticas indiretas, como ocorre em todos os casos, não têm um valor seguro na verificação etiológica da leishmaniose.

QUADRO HEMÁTICO. MIELOGRAMA.

PROVAS TERAPÊUTICAS

O trabalho de RAO, publicado em 1911, evidencia que há mononucleose mais apreciável no processo ulceroso do que no sangue periférico.

É evidente que há uma monocitose relativa na maioria dos casos. O leucograma indica leucocitose moderada, não superior a 15.000 leucócitos por milímetro cúbico.

Os glóbulos vermelhos mantêm-se nos limites normais.

Quanto à eosinofilia, parece ser de intensidade moderada, mantendo-se, muitas vezes, após a cura da leishmaniose, o que pode depender de uma verminose. No que diz respeito ao mielograma, tem êle importância no diagnóstico do calazar (Kala-azar).

A punção do esterno pode ser repetida, sem perigo, permitindo o achado de leishmânias em grande número.

Muitas vezes, há necessidade de recorrer às provas terapêuticas, sobretudo quando a clínica ainda permite pensar em leishmaniose tegumentar, malgrado a negatividade de todos êsses exames laboratoriais; nesses casos, a prova terapêutica poderá trazer valiosos esclarecimentos.

- 1) Tártaro emético, empregado pela primeira vez por GASPAR VIANA, em 1912.
- 2) Tartarato de sódio e de antimonila.
- 3) Fuadina (neo-antinosan).
- 4) Eparseno (amino-arseno-fenol), proposto por AGUIAR PUPPO em 1926.
- 5) Arsenito de sódio, introduzido na terapêutica tegumentar pelo Prof. AGUIAR PUPPO e empregado, em nosso meio, pelo Prof. OSCAR PEREIRA.
- 6) Cloroquina, usada por GARCIA, em 1949, com resultados apreciáveis (administração oral).
- 7) Antipalúdicos de síntese.
- 8) Glucantine.
- 9) Aureomicina, empregada por GLACCHO LEITE GOMES, do Hospital Evandro Chagas (1955).

PROVAS ALÉRGICAS. INTRADERMO — REAÇÃO DE MONTENEGRO

As leishmanioses humanas são enquadradas entre as doenças parasitárias com manifestações alérgicas bem estudadas.

É em forma de leishmânides dérmicas que se denunciam as manifestações alérgicas no Kala-azar. São manchas acrômicas ou uma erupção eritematosa nodular ou tuberosa, com localização na face, tronco ou nos membros. Tão persistente é essa erupção que, em alguns casos, sua duração é de 30 anos.

Na leishmaniose tegumentar, ARÊA LEÃO observou erupção papulosa persistente na face e no tronco, com a presença de parasitos.

WAGENER, em 1923, foi o pioneiro na verificação das reações cutâneas, aplicáveis ao diagnóstico das leishmanioses.

Em 1926, MONTENEGRO conseguiu provas alérgicas específicas na leishmaniose tegumentar americana.

Introduzido o antígeno de WATSON, que se prepara com *Trypanosoma equiperdum* obtido de sangue de ratos infetados experimentalmente, ARISTIDES MARQUES DA CUNHA empregou-o em reações alérgicas, provocadas em doentes portadores de leishmaniose tegumentar americana.

A injeção intradérmica de 0.2 cc desse antígeno, provocou reações positivas, evidenciadas pela formação de placas eritematosas, cujas dimensões atingiram vários centímetros de diâmetro.

Esta reação deve ser considerada como *reação de grupo*.

A reação de MONTENEGRO foi bem estudada por BUSS, SALES GOMES, PESSOA e PESTANA. O antígeno atualmente preparado é uma suspensão de 2 a 5 milhões de leptomonas por centímetro cúbico em soluto salino fenicado. A dose a injetar, intradèrmicamente, é de 0.2 cc de antígeno. Uma pápula específica denuncia, dentro de 45 horas, as reações positivas, que persistem durante 5 dias. Esta prova é de alta especificidade, pois é positiva em cerca de 95 % dos casos.

Nos casos recentes, a reação pode ser negativa, mas, nêles, a presença do parasito evidencia a etiologia da doença.

ROTBERG faz a leitura da prova de MONTENEGRO em dois tempos: a primeira leitura, precoce, é feita entre 2 e 3 dias, e a de permanência ou residual, no fim de uma quinzena.

Recorde-se que JOÃO MONTENEGRO, em seus trabalhos iniciais, preparou extratos alcalinos de leishmânias com a finalidade de praticar injeções intradérmicas e assim, provocar uma reação alérgica reveladora da leishmaniose.

O extrato alcalino foi preparado da seguinte maneira:

- 1) Cultivo abundante de leishmânias em meio de NICOLLE, durante 15 a 20 dias.
- 2) Lavagem da superfície do meio com água fisiológica.
- 3) Centrifugação e lavagem do centrifugado, repetindo-se 2 vêzes esta operação.
- 4) Ao sedimento da terceira centrifugação, adiciona-se líquido de COCA estéril, constituído pelo soluto fisiológico, contendo 0.5 % de cloreto de sódio e 0.4 % de bicarbonato de sódio.
- 5) O material permanece durante 56 horas à temperatura ambiente, tendo-se o cuidado de agitar o líquido todos os dias.
- 6) Depois, centrifuga-se o líquido, obtendo-o o extrato límpido na parte superior.
- 7) Resta provar que houve asepsia rigorosa: para isso, semeia-se o extrato em gelose mantida a 37 °C e, também, no meio de NICOLLE, que permanecerá na temperatura ambiente, durante 12 dias.

Inicialmente, MONTENEGRO utilizou duas raças de leishmânias: uma isolada por êle e a outra, remetida por WAGENER. O citado autor salienta que os extratos de cada raça foram obtidos separadamente.

A dose a injetar é de 0.2 cc de extrato, podendo-se observar, nos casos positivos, uma área vermelha congestionada, no fim de 24 horas. A reação dura vários dias, desaparecendo com lentidão. No entanto, MONTENEGRO notou que a leitura em 24 horas era mais propícia.

Nas reações positivas, o paciente queixa-se de calor, dor e prurido. Calefrios, febre e outras manifestações gerais não foram observadas.

Quanto ao local da reação, o autor preferiu as regiões deltóideas, injetando, comparativamente, em um lado o extrato alcalino e, no outro, igual quantidade de líquido de COCA, lavando a pele, antes da injeção, com álcool a 70°.

Conclui, dizendo que a reação da leishmaniose é específica quando tipicamente positiva.

Já nesta época, em 1928, falava-se em favor da unidade de espécies de leishmânias, pelo fato de o extrato preparado com uma raça de leishmânia agente do botão do Oriente produzir reação específica nos nossos leishmanióticos.

Com referência à interpretação da reação, devemos salientar que um resultado intensamente positivo denuncia que o homem foi ou é ainda parasitado pelas leishmânias.

Assim sendo, essa prova tem um valor de atualidade, mas também pode ser usada para um diagnóstico retrospectivo.

CORREIA, em casos de adenites tuberculosas, observou que a reação de MONTENEGRO se manifestou positiva, enquanto que, em casos de tuberculose pulmonar, essa reação manteve-se negativa. Contatos fortuitos podem explicar suficientemente as reações positivas, em indivíduos que não forem infetados por leishmânias.

Os resultados obtidos nas leituras precoce e tardia são perfeitamente concordantes. Precoce, a reação é de natureza alérgica; tardia, denuncia natureza imunitária.

O estudo histopatológico, realizado por PORTUGAL e GUIMENEZ, revela, a partir do 8.^o dia, estrutura tuberculóide: é a demonstração segura de aspectos imunitários em ação. As falsas reações surgem, habitualmente, nas primeiras 24 horas.

A hemorreção, proposta pelo Prof. RUBEM AZULAY em 1952, consiste na injeção intravenosa de 5 centigramas de antígeno diluído em 1 cc de sôro fisiológico. Sete a dez horas depois, observa-se calafrio, seguido de febre (38° — 40° C), durante 1 a 2 dias. Em doentes portadores de outras dermatoses, esta reação é, freqüentemente, negativa.

CONTRIBUIÇÃO PESSOAL DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE CASOS LEISHMANIOSE

Os métodos laboratoriais, quer diretos, quer culturais, assim como as provas alérgicas e inoculações experimentais, foram utilizados para o diagnóstico de casos clínicos recolhidos à 6.^a Enfermaria e de um doente, drenado do Serviço de Otorinolaringologia da Santa Casa de Misericórdia de Pôrto Alegre.

CASO 1:

O primeiro doente observado, foi o agricultor P. X. D., natural de Pôrto Xavier, município de Cêrro Largo, branco, casado, 52 anos de idade.

O exame inicial dêsse paciente revelou, no lábio superior, ulceração extensa, com bordos salientes e fundo granuloso, sem repercussão ganglionar satélite. A mucosa da abóbada palatina, edemaciada e vermelha, apresentava sulcos profundos, lembrando a "cruz espúndica" de ESCOMEL.

Nesse doente, o exame direto do material, retirado das bordas da lesão ulcerosa, permitiu o diagnóstico acertado: os esfregaços, corados pelo método de GIEMSA, possibilitaram a identificação de leishmânias no interior de mononucleares grandes, com ausência de elementos em blastomices. As culturas da serosidade, colhidas nas bordas da citada lesão, com antisepsia rigorosa por meio da tintura de iôdo a 1 %, praticadas em 12 tubos do clássico meio de N.N.N., revelaram a presença de elementos flagelados típicos: leptômonas. Houve, pois, no caso estudado, concordância entre os dois exames, direto e cultural.

O tratamento pela Fuadina e Eparseno, em séries alternadas, provocou a regressão do processo ulceroso, com retração dos tecidos, restando unicamente uma úlcera na narina esquerda e o edema da abóbada palatina, de matiz vermelho pálido e aspecto granuloso.

A continuação do tratamento, com mais uma série de Fuadina e outra de Eparseno, conduziu à cicatrização tôdas as lesões ulcerosas apresentadas pelo doente, na cavidade bucal e mucosa da narina esquerda. Isto se verificou no ano de 1951.

O paciente abandona o tratamento específico, voltando a Pôrto Alegre, em 1956, com destruição do septo cartilaginoso do nariz e com o aparecimento de novas lesões leishmanióticas, agora mais profundas, atingindo a faringe e a laringe, o que determinava acentuada disфонia, A

pesquisa de bacilos álcool-ácido resistentes, praticada nesta ocasião, resultou negativa. Pratica-se a reação de Montenegro, por via intradérmica e pela cuti-reação, com resultados francamente positivos em 3 dias. Recomeça-se o tratamento específico pela Fuadina e pelo Eparseno, ficando cicatrizadas as lesões ulcerosas do nariz, restando apenas a destruição do septo cartilaginoso. O estado geral do doente é bom, o que permitiu licença para voltar à sua residência em Pôrto Xavier, com a recomendação expressa de fazer nova série de Eparseno, no fim de 2 meses.

Dêste doente, cujas fotografias apresentamos, tira-se a conclusão segura que a ausência de dor em lesões tão extensas provocara o des-caso do enfêrmo, deixando que as mutilações viessem deformando sua face.

Como o tratamento da leishmaniose deve ser tão precoce quanto possível, é de extrema necessidade sempre investigar leishmânias em doentes que apresentam destruição do septo nasal e úlceras quase indolores. Neste caso, o diagnóstico foi facilmente precisado pelo laboratório, porque o paciente não se submetera a nenhuma medicação específica, o que viria dificultar a pesquisa inicial.

CASO 2:

Em um segundo caso, C. B., natural de Garibaldi, residente há 21 anos em Santa Rosa, branco, 63 anos, agricultor, casado, a história, clínica data de 8 anos. Ulcera-se o septo cartilaginoso do nariz, que dentro de pouco tempo, é completamente destruído. Estende-se o processo ulceroso ao lábio superior, onde evoluiu uma úlcera granulosa, de côr avermelhada, com bordos salientes, quase indolores. Na abóbada palatina vê-se edema intenso, acompanhado de granulações esbranquiçadas. Há dificuldade na deglutição. Como consequência das lesões septais, houve a queda do nariz e a formação do chamado "nariz tapiróide".

Foi fácil verificar a presença de leishmânias, empregando o método clássico dos esfregaços do material retirado da úlcera do lábio superior e também das ulcerações da mucosa da narina esquerda e direita.

Utilizamos fita celulose (Durex) para a obtenção de preparados por impressão, que foram fixados pelo álcool metílico e corados a seguir, pelo GIEMSA. Neste doente, vimos pela primeira vez, que êste processo da fita celulose dá resultados de importância diagnóstica, sem es-carificação prévia dos bordos da úlcera. Êste processo foi muitas vêzes repetido, tanto neste paciente como nos casos 1 e 3, com resultados sempre concordantes: as leishmânias são evidenciadas com nitidez e facilidade.

O método citado, foi desenvolvido nos seguintes tempos:

- a) lavagem das lesões ulcerosas (preferentemente não submetidas a tratamento específico) com sôro fisiológico;

- b) algumas horas após a lavagem das lesões, coloca-se sôbre a úlcera, com cuidados especiais por parte do investigador, uma tira de fita celulose (largura menor que a de uma lâmina e comprimento 1-2 cm maior que o das lâminas empregadas);
- c) faz-se ligeira pressão a fim de possibilitar a perfeita aderência da fita à superfície ulcerosa, deixando-se que a mesma permaneça no local cêrca de 5 minutos;
- d) no fim dêste tempo, retira-se cuidadosamente a fita celulose, colocando-a sôbre uma lâmina, perfeitamente limpa, com a face adesiva voltada para cima. Dobram-se as extremidades, prendendo-as na face inferior da lâmina;
- e) fixa-se o preparado, submetendo-o à ação do álcool metílico, tal como ocorre no método cláássico de GIEMSA;
- f) cora-se segundo o processo rápido de GIEMSA (20-30');
- g) por último, desidrata-se rapidamente, pela acetona e pelo benzol, obtendo-se, ao mesmo tempo, a clarificação do preparado.

Também neste doente, conseguimos observar a utilidade da Reação de Montenegro praticada simultâneamente pelo método cláássico da intradermoreação e pela cuti-reação por picada ou pela escarificação. Os resultados foram comparáveis; dentro de 72 horas os resultados positivos foram verificados: concordância então do exame direto com as provas alérgicas de MONTENEGRO.

É interessante assinalar que a ulceração nasal, iniciada há 8 anos, não sugeriu o tratamento pelos antimoniais ou arsenicais, tão preconizados no tratamento da leishmaniose. Por isso, o achado das leishmânias foi fácil, ficando o doente então em tratamento pelo Eparseno, em séries alternadas com a Fuadina.

Atualmente nota-se que a ulceração do lábio apresenta um contôrno de cicatrização esbranquiçado, formado com rapidez.

Dêsse doente, verifica-se a possibilidade de existirem outros doentes abandonados nas localidades da margem do Uruguay, sem a terapêutica adequada, pois sabemos que nestas localidades a leishmaniose tem sido mais freqüentemente diagnosticada, onde os flebôtomos são abundantes.

CASO 3:

O terceiro caso, por nós verificado, refere-se a L. K., 35 anos, branco, casado, natural de Iraí, comerciante. Em Montenegro, após uma semana de sua saída de Iraí, notou o aparecimento de lesões ulcerosas no dorso do pé esquerdo, atingindo 4 dedos, com exclusão do grande artelho; no pé direito, ulcerações semelhantes foram também observados, localizadas unicamente em 3 dedos. Essas ulcerações cresceram em profundidade, a ponto de o doente estar ameaçado de sofrer mutilações de 4 dedos no pé E e 3 dedos no pé D.

A pesquisa direta com o material retirado destas ulcerações resultou positiva para as leishmânias: esfregaços corados pelo método de GIEMSA permitiram apreciar a citologia do protozoário.

Resultados positivos da reação de MONTENEGRO, quer pela intradermoreação quer ainda pela cuti-reação em picada ou escarificação, duplicaram a afirmativa do diagnóstico.

Uma terceira verificação foi feita pelo processo cultural; semeadura do material retirado da borda da ulceração do pé E, após desinfecção da pele com a tintura de iodo a 1%, utilizando-se na colheita deste material uma agulha calibrosa, montada numa seringa de Lyer, esterilizada, no meio de Noeller, preparado com caldo de baço, sem adição de sangue.

O preparo deste meio cultural obedeceu às seguintes etapas:

- 1) Toma-se 500 g de baço de vitela, e depois de cortá-lo em fragmentos, deixa-se macerar em 1 litro d'água, durante 10 horas, na geladeira.
- 2) Ferver o macerado durante 15', filtrando em seguida através de algodão de vidro.
- 3) Acrescentar

Peptona	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Glicose	20,0

- 4) O acréscimo da gelose (20%) deve ser feito, mantendo a mistura em ebulição, para dissolução completa da gelose.
- 5) Repartir em pequenos frascos de Erlenmeyer, na razão de 5 cc por frasco.
- 6) Esterilizar no autoclave a 120° C durante 20'.
- 7) Adicionar assépticamente, sangue de coelho, na proporção de 10 a 20%, na temperatura de 45 a 50° C.

NOTA: Êste último tempo pode ser dispensado.

O resultado positivo evidenciou-se no fim de 6 dias.

Empregamos uma série de 12 tubos: 6 com o clássico meio de Noeller e 6 com caldo de baço. O desenvolvimento do protozoário no meio contendo baço foi mais precoce, uma vez que, utilizando o meio de Noeller, conseguimos evidenciar leptómonas ativas somente a partir do 9.º dia. Êste resultado confirmou as duas séries anteriores de cultivo, realizadas nos dois casos precedentes.

Com o propósito de completar o diagnóstico laboratorial dos casos 1, 2 e 3, foram inoculados camundongos brancos WISTER. A inoculação do material obtido nas lesões e de amostras dos meios de cultura foi feita na cauda desses animais, o que nos permitiu estudar as características do parasito, ao mesmo tempo que nos proporcionou a possibilidade de conservá-los no laboratório.

CASO 4:

Este foi gentilmente cedido pelo interno do Serviço de Otorinolarin-gologia da Santa Casa de Misericórdia, RUDOLPH LANG.

Trata-se do paciente A. K., com 23 anos de idade, solteiro, de profis-são agricultor e natural de S. Ângelo. Examinado no Serviço acima cita-tado, foi constatada uma perfuração do septo cartilaginoso nasal, já existi-ndo, como se pode verificar pelas fotografias do doente, uma discreta queda do nariz. Feita a biopsia, o exame histopatológico revelou a exist-ência de um granuloma verrucoso ulcerado. Na suposição de se tratar de um caso de blastomicose, foi imediatamente instituído o tratamento pelas sulfas. Entretanto, a evolução posterior não demonstrou melhora.

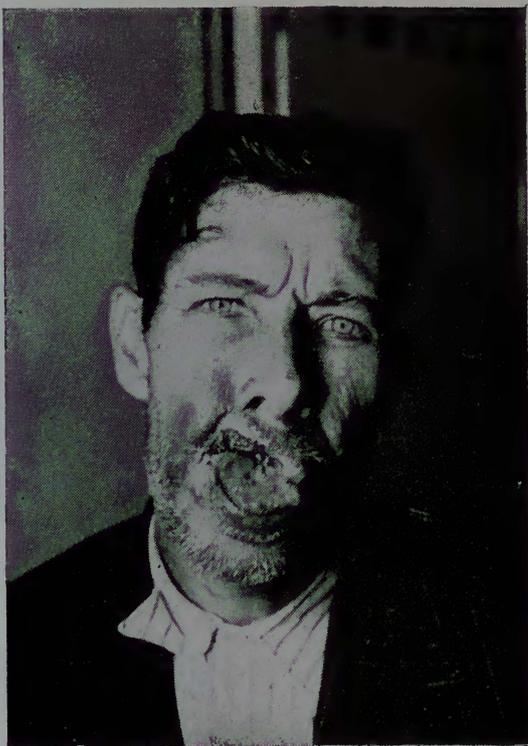
Novamente em exame, foi feita a colheita de material nas bordas da úlcera utilizando-se um pequeno estilete: praticado o esfregaço e corado pelo método de GIEMSA, tornou-se possível a evidenciação de leishmâ-nias.

Com a intenção de confirmar o achado protozoológico, fêz-se a prova intradérmica de MONTENEGRO, com positividade forte no fim de 72 horas. Diagnosticava-se, dêste modo, a etiologia leishmaniótica da lesão localizada no septo cartilaginoso do nariz e concluíu-se pela necessidade de aprofundar o exame histopatológico, no sentido de uma pesquisa con-comitantemente protozoológica.

Antes de concluirmos as observações clínicas que acima descreve-mos, mister se faz salientar um ponto de grande importância: todos os pacientes acusaram, em sua história, a presença do popularmente deno-minado “mosquito pólvora”, na zona em que viviam. Esta denominação diz respeito, como se sabe, ao flebótomo. Acentuamos o valor dêste de-talhe, uma vez que, embora não haja uma conclusão final sôbre a trans-missibilidade da leishmaniose pelo flebótomo, todos os casos descritos apresentam a mesma verificação. Se, no entanto, estabelecermos a rela-ção entre o díptero e a doença, e recordarmos que o Prof. OSCAR BER-NARDO PEREIRA identificou, nas proximidades de Pôrto Alegre — Glória —, o *Phlebotomus fischeri* que é talvez, o responsável por casos esporádicos de leishmaniose, teríamos a explicação dos diagnósticos fei-tos por BASSEWITZ e outros em locais afastados de matas virgens. Cresce de importância esta consideração, ao tomarmos conhecimento da leishma-niose do cão, diagnosticada pelos Dr. ANTÔNIO RONNA e Prof MA-NUEL JOSÉ PEREIRA FILHO (1950) em Pôrto Alegre. Indica-se a utilidade de um amplo estudo dos flebótomos da região, visto que êsses dípteros parecem transmitir tanto as leishmanioses cutâneas humanas quan-to a leishmaniose canina.

Não podemos, portanto, deixar de reconhecer a significação desta doença em nosso meio. Mencionamos os diagnósticos de BASSEWITZ, em 1916 e a esta identificação seguiram-se outras (H. S. TOURINHO, GUERRA BLESSMANN, PEREIRA FILHO, OSCAR B. PEREIRA, NIEMEYER e NEVES DA SILVA), declarando NEWTON NEVES

DA SILVA, em novembro de 1948, que nos arquivos do Laboratório de Higiene do Estado já haviam sido catalogados 18 casos. Repetimos a afirmação de PEREIRA FILHO, feita em 1946 (1.º Congresso Médico Sul-Rio-Grandense — Sta. Maria), que não há dúvidas sobre a autenticação microscópica de leishmaniose em diversos municípios do Estado: Erechim, Encantado, Guaporé, Caxias do Sul, arredores de P. Alegre, aos quais acrescentamos os casos por nós descritos.

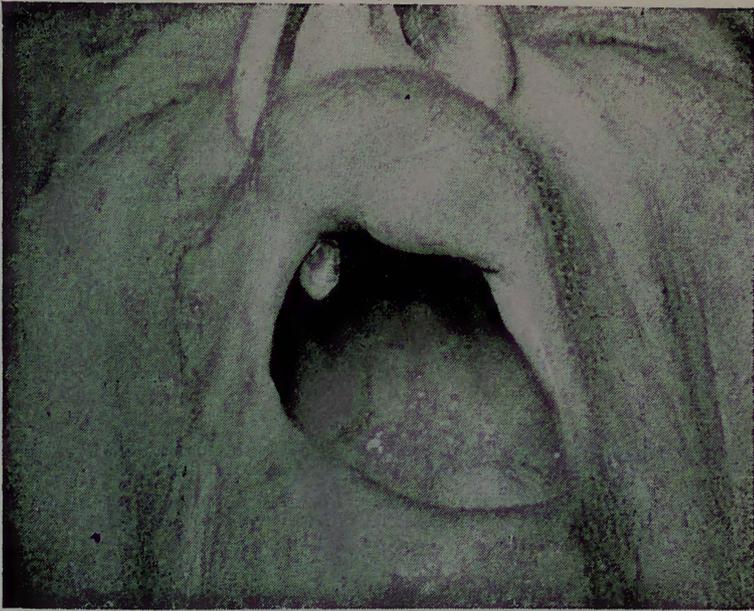


CASO 1: P. X. D.
Leishmaniose tegumentar. Antes de iniciar tratamento



CASO 1: P. X. D.
Leishmaniose tegumentar. Após tratamento com séries alternadas de
Fuadina e Eparseno.

T E S E
OSCAR MAY PEREIRA



CASO 1: P. X. D.
Leishmaniose tegumentar. Cruz espúndica, de ESCOMEL.



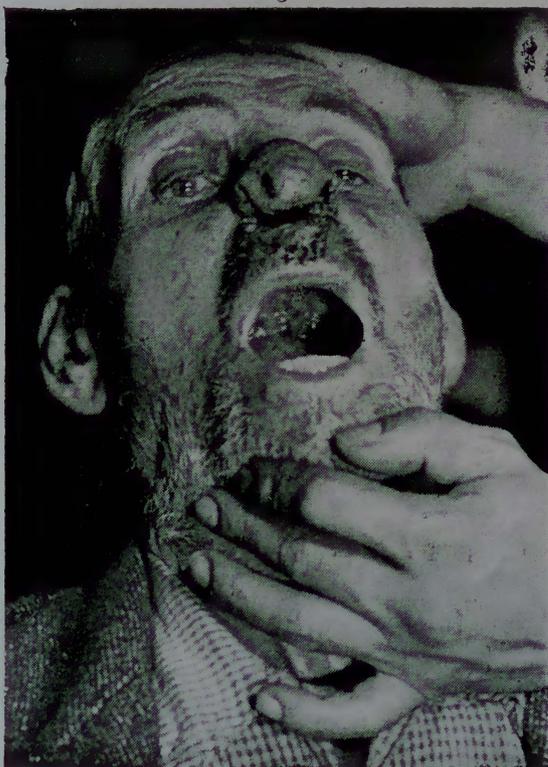
a



b

CASO 1: P. X. D.
Reação de Montenegro

- a — intradermo-reação
- b — cuti-reação (escarificação)



CASO 2: C. B.
Leishmaniose tegumentar. Destruição septo cartilagi-
noso do nariz. Cruz espúndica.



CASO 2: C. B.
Leishmaniose tegumentar. Nariz tapiroide — Úlcera lábio superior.



CASO 2: C. B.
Leishmaniose tegumentar. Destruição completa do septo cartilaginoso do nariz.

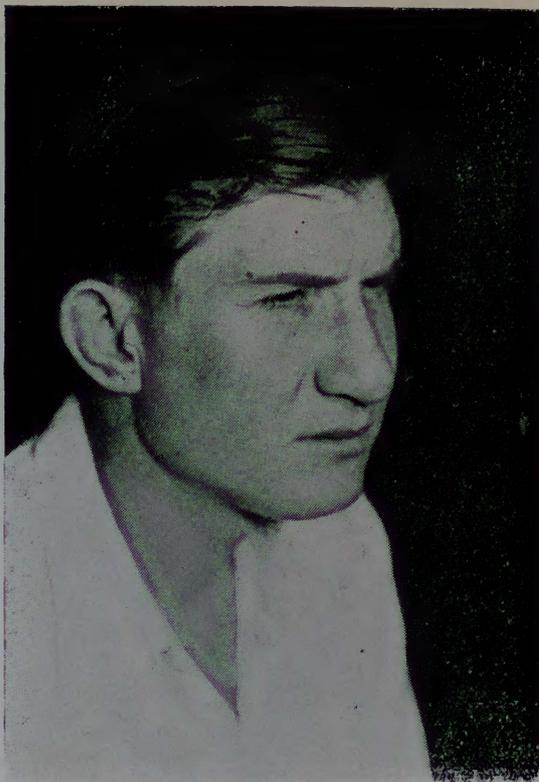
T E S E
OSCAR MAY PEREIRA



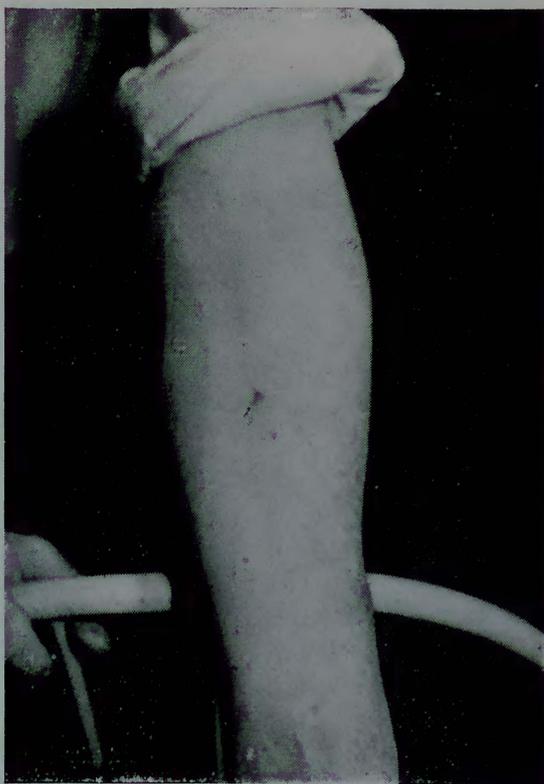
CASO 3: L. K.
Leishmaniose tegumentar. Início de tratamento.



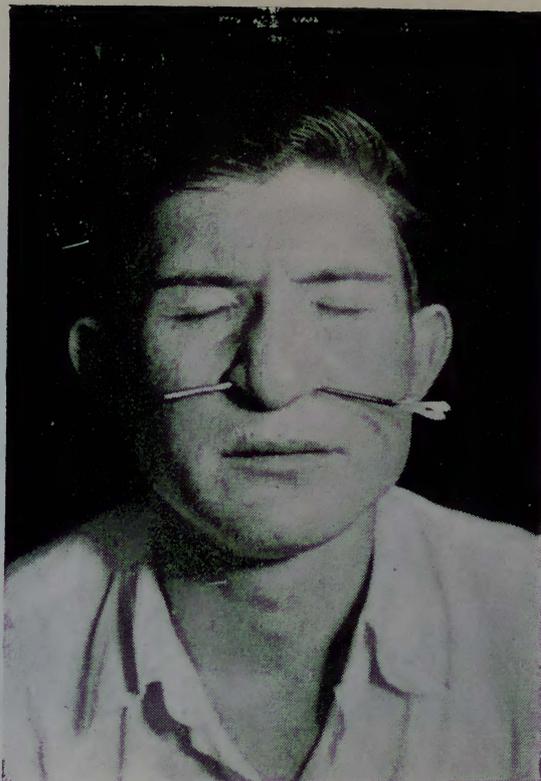
CASO 3: L. K.
Após tratamento por séries de Fuadina e Eparseto.



CASO 4: A. K.
Leishmaniose tegmentar. Esboço de nariz tapiroide.



CASO 4: A. K.
Leishmaniose tegmentar. Intradermo-reação de
MONTENEGRO — 56 horas.



CASO 4: A. K.

Leishmaniose tegumentar. Perfuração do septo cartilaginoso do nariz, permitindo passagem de uma tentacânula.

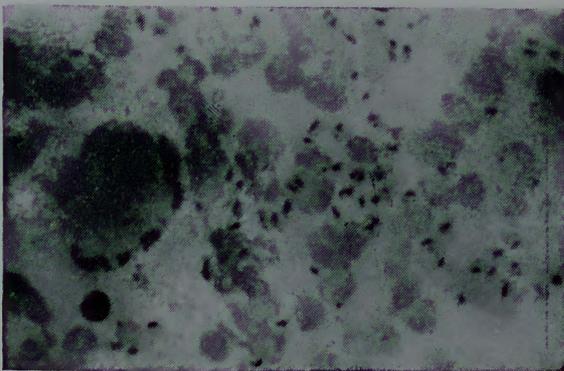


CASO 4: A. K.

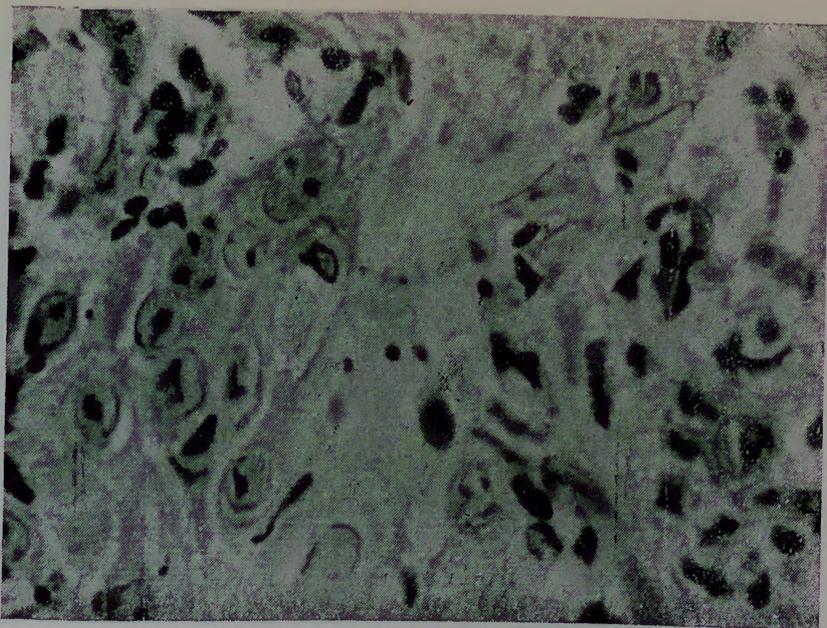
Leishmaniose tegumentar. Perfil.



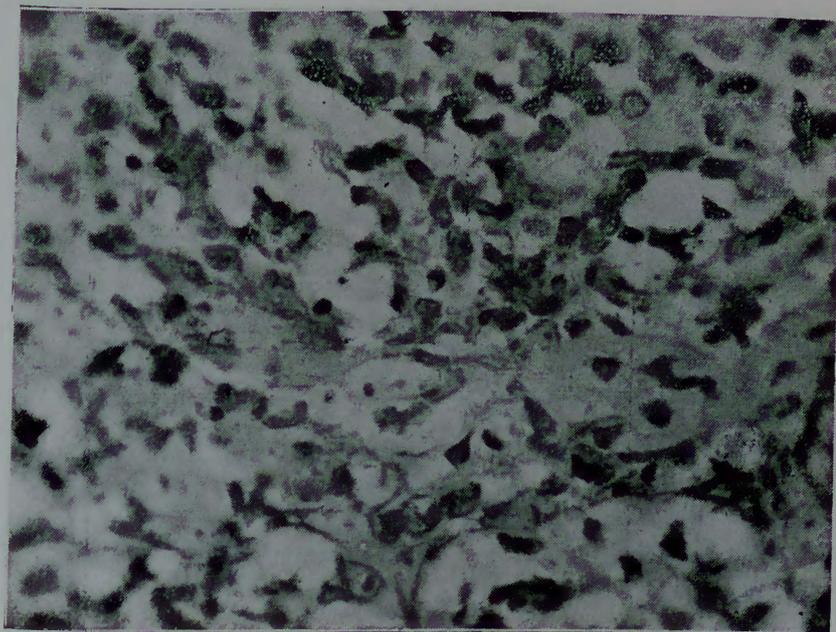
Leishmaniose do cobaio



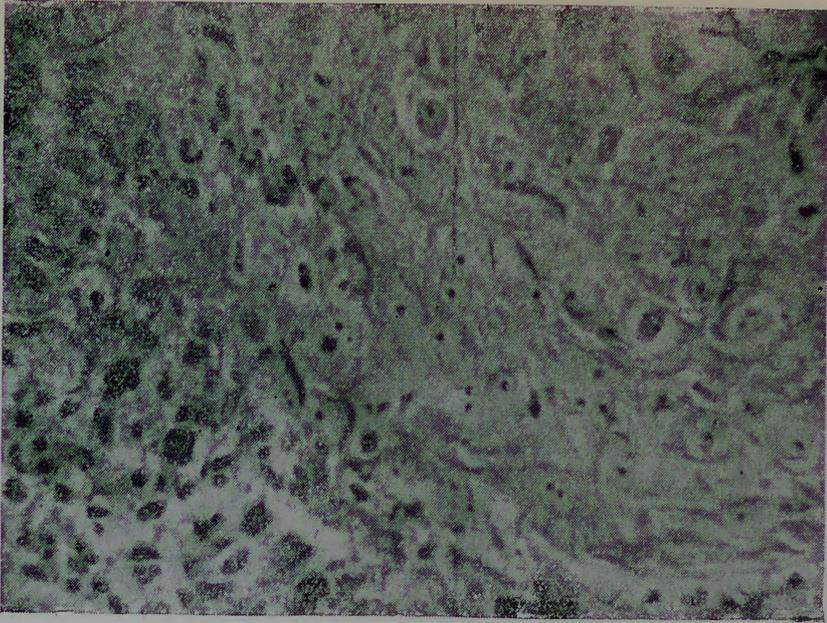
Leishmania enrietti — Método de GIEMSA.



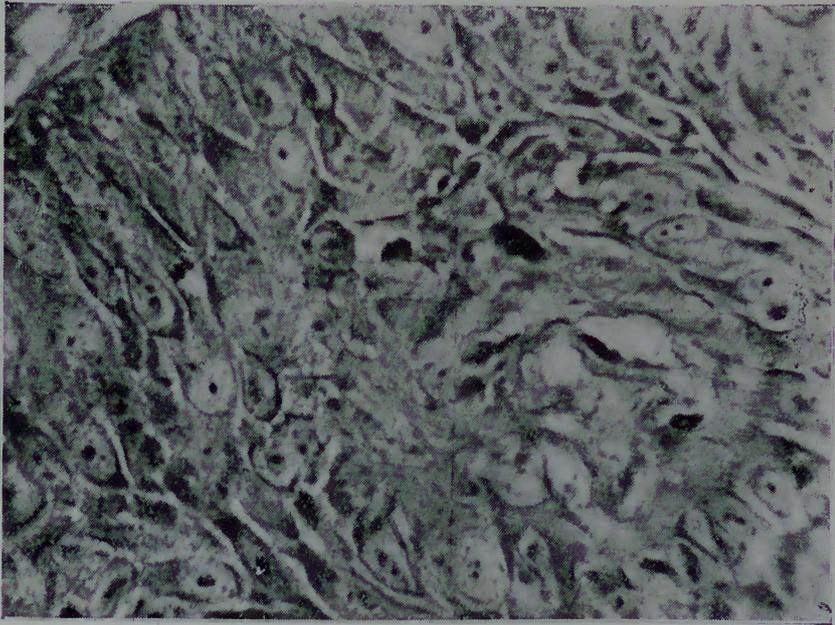
Leishmaniose tegumentar — Córte de úlcera cutânea.
(hematoxilina-eosina).



Leishmaniose tegumentar — Córte de úlcera cutânea.
(hematoxilina-eosina).



Leishmaniose tegumentar — Córte de úlcera cutânea.
(hematoxilina-eosina).



Leishmaniose tegumentar — Córte de úlcera cutânea.
(hematoxilina-eosina).

CONCLUSÕES

I

Os estudos histopatológicos dos granulomas crônicos infecciosos devem sempre ser completados pela pesquisa sistemática do parasito, através de técnicas que permitam a sua visualização mais fácil e mais nítida (GIEMSA e modificações). Disto depende a indicação terapêutica.

II

O método de impressão com fita celulose (Durex) das lesões ulcerosas, mantidas sem tratamento e lavadas, algumas horas antes, com sôro fisiológico, fornece dados morfológicos do parasito, quando submetidas as preparações à fixação pelo álcool metílico e coloração pelo GIEMSA rápido, seguida de desidratação, também rápida, pela acetona e pelo benzol.

III

Essa técnica deve ser acompanhada de esfregaços do mesmo material por impressão em lâminas bem desengorduradas: fixação pelo álcool metílico e coloração pelo processo clássico de GIEMSA.

IV

As pesquisas das leishmânias pelo método direto, quando negativas, devem ser seguidas pelas investigações culturais, nos meios mais favoráveis ao desenvolvimento do protozoário.

V

O método cultural exige que as manipulações sejam feitas em câmaras assépticas, com cuidados técnicos rigorosos, para que se evitem as inquinações bacterianas dos cultivos, sempre impedidoras do crescimento das leishmânias.

VI

A substituição do caldo de carne comum, no preparo do meio de NOELLER, pelo caldo de baço, é vantajosa: há maior crescimento cultural, podendo-se mesmo dispensar a presença de sangue que, por vezes, dificulta as culturas iniciais do protozoário.

pg. 29

pg. 13

no
} onde
} texto?

VII

No preparo do meio clássico de NOVY — NEAL — NICOLLE, julgamos inconveniente a substituição do sangue de coelho pelo do homem residente em zonas de endemias leishmanióticas: evita-se, assim, a possibilidade impeditora de anticorpos específicos.

VIII

Julgamos de toda conveniência, inocular, na cauda de camundongos ou ratos brancos WISTER, a serosidade retirada dos bordos das úlceras ou a suspensão de fragmentos de lesões fechadas, com finalidade diagnóstica e, também, visando a manutenção fácil das estirpes leishmanióticas.

IX

Aconselhamos que a reação de MONTENEGRO, praticada habitualmente pela via intradérmica, seja realizada ao lado da cuti-punctura ou sob a forma de cuti-reação, com incisões superficiais da epiderme.

X

Nos levantamentos ou indagações epidemiológicas, estas duas últimas reações são de execução mais prática e apresentam resultados de fácil leitura.

XI

A existência da leishmaniose do cobaio, em animal autóctone existente no Jardim Zoológico de Pôrto Alegre, permite estudos fáceis da morfologia do gênero *Leishmânia*: as suas dimensões, maiores do que as das leishmânias humanas, possibilitam demonstrar, com clareza, a citologia desse protozoário. Este estudo prévio facilita, em extremo, as futuras leituras dos esfregaços e dos cortes, procedentes de doentes de leishmaniose tegumentar.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

- ADLER, S. and THEODOR, O. — *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 1927, **12**, 111 - 130.
- ADLER, S. and THEODOR, O. — *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 1926, **20**, 109 - 142.
- ADLER, S. and THEODOR, O. — *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 1927, **21**, 89 - 104.
- ADLER, S. and THEODOR, O. — *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 1929, **23**, 1 - 8.
- ALBERNAZ, P. M. — *O polipo da leishmaniose*, Sodré, Rio de Janeiro, 1928 (publicações do Brasil-Médico).
- ALBERNAZ, P. M. — *An. bras. Dermat. Sif.*, 1947, **22**, 209.
- ALBERNAZ, P. M. — *Sc. Med.*, 1925, **3**, 113 - 125.
- ALBERNAZ, P. M. — *Acerca do Polipo da Leishmaniose. Resposta ao Dr. Mario Ottoni, de Rezende, Besnard Frères*, Rio de Janeiro, 1928 (separata "Jornal dos Clínicos", 22).
- ALEIXO, J. — *An. bras. dermat. e sif.*, 1945, **20**, 69 - 71.
- ALEIXO, J. — *Leishmaniose tegumentar americana linfangítica*. An. I Reunião Anual dos Dermatologistas Brasileiros (26 - 28 set. 1944), 1944, 115 - 120.
- ALLEN, A. — *The Skin*, St. Louis, 1954, 496 - 498.
- ALMEIDA, F. e LACAZ, C. S. — *Fôlha Clin. & Biol.*, 1941, **13**, 177 - 182.
- ALMENARA, G. — *Anatomia patológica de las leishmaniosis dérmicas*. Tese. Lima, Perú, 1916.
- ALVARADO, E. R. G. e WERNGREEN, E. T. — *Rev. Arg. Dermatosisifilologia*, 1932, **16**, 437 - 446.
- AMARAL, A. D. F. — *An. Fac. Med. Univ. S. Paulo*, 1941, **17**, 303 - 355.
- AMARAL, A. D. F. — *Rev. Med. & Cir. S. Paulo*, 1941, **1**, 322.
- ANDRADE, C. — *Rev. Ophthalmol. S. Paulo*, 1932, **1**, 217 - 222.
- ARAGÃO, H. B. — *Fôlha Med.*, 1928, **9**, 13 - 15.
- ARAGÃO, H. B. — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1927, **20**, 177 - 195.
- ARAGÃO, H. B. — *Brasil Med.*, 1922, **36**, 129 - 130.
- ARANTES, S. — *Fôlha Med.*, 1941, **22**, 62 - 66.
- ARCHIBALD, R. G. and MANSUR — *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1937, **30**, 395.
- AREA LEÃO — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1922, **15** (fasc. 1).
- ARIAS ARANDA, C. — *Bol. Inst. Clin. Quir. B. Aires*, 1926, **2**, 322 - 326.
- ARRUDA, W., COSTA, S. C., NAHAS, S. e ROSENFELD — *Brasil Med.*, 1949, **63**, 64-65.
- AZEVEDO, S. E. de — *Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 1954, **32**, (3), 234 - 254.
- AZULAY, R. D. — *Leishmaniose tegumentar*. Tese., Rio de Janeiro., 1952.
- AZULAY, R. D. — *An. bras. Dermat. & Sif.*, 1947, **22**, 58.
- AZULAY, R. D. — *An. bras. Dermat. & Sif.*, 1949, **24**, 184.
- AZULAY, R. D. — *A intradermorreação de Montenegro nas cicatrizes leishmanióticas*, Comunicação feita à Soc. Bras. Dermat. e Sif., 1952.
- AZULAY, R. D., VIVAS, A. e AZULAY, E. — *An. bras. de Dermat. e Sif.*, 1953, **28**, 265 - 269.
- BAND, Z. — *Handbuch der Pathogenen Protozoen*, 1920.
- BARBOSA, J. E. R. — *Rev. Otolaring. S. Paulo*, 1936, **4**, 697 - 714.
- BARRETO, M. — *Rev. Otolaring. S. Paulo*, 1935, **3**, 446 - 461.
- BARRIENTOS, L. P. — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1948, **46**, (fasc. 2), 415.
- BARROS BARRETO, J. — *Tratado de Higiene*, II. vol., III. ed., 1956, 830.
- BARROS, O. M. e MACIEL, P. — *Rev. Clin. S. Paulo*, 1951, **27**, 55 - 66.
- BARROS, R. P. de, LIMA, M. L. M. T. e CORRÊA, A. — *Rev. Hosp. das Clin. S. Paulo*, 1952, **7**, 145 - 150.
- BRAGA, A. — *An. Med. Sta. Maria*, 1947, **1**, 21.
- BRUMPT, E. — *Précis de Parasitologia*, Masson & Cie., Paris, 1949, **1**, 235 - 277.
- BRUMPT et PEDROSO — *Bull. de la Soc. de Path. Exot.*, 1918, 752 - 762.
- CARINI et PARANHOS, U. — *Bull. de la Soc. de Path. Exot.*, 1909, **2**, 255 - 257.

- CASTELLANI, A. e JACONO, I. — *Manuale di Clinica Tropicale*, 610 - 614.
- CERRUTI, H. — *Arq. de Dermat. e Sifil.* S. Paulo, 1945, 9, 71.
- CHAGAS, E. e cols. — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1938, 33 (fasc. 1).
- CHAGAS, C. e CHAGAS, E. — *Manual de Doenças Tropicais e Infecciosas*, Rio de Janeiro, 1935, 1, 147 - 157.
- CHAGAS, E., CUNHA, A. M. e cols. — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1938, 33, (fasc. 1), 89 - 229.
- COUTINHO, E. — *Tratado de Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Rio de Janeiro, 1947, 262 - 276.
- CRAIG, C. F. e FAUST, E. C. — *Parasitologia Clínica*, 144 - 173.
- CUNHA, A. e MARQUES E DIAS, E. — *Brasil Méd.*, 1939, 53, 89 - 92.
- CUNHA, A. M. — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1942, 37 (fasc. 1), 35.
- CURASSON, G. — *Traité de Protozoologie Vétérinaire et Comparée*, 1943, 2, 91 - 199.
- DAGUET, G. — *An. bras. Dermat. & Sifil.*, 1951, 26, 195 - 201.
- DARIER, J., CIVATTE, A. e TZANCK, A. — *Précis de Dermatologie*. 5.^a ed., 1947.
- DEANE, L. M. e DEANE, M. P. — *O Hospital*, 1954, 45, 419 - 421.
- DEANE, M. P. e DEANE, L. M. — *O Hospital*, 1954, 46, 487 - 489.
- DEANE, L. M., DEANE, M. P. e ALENCAR, J. F. — *Rev. Ass. Paulista de Med.*, 1955, 46, 130.
- DEANE, L. M. e DEANE, M. P. — *O Hospital*, 1954, 45, 703 - 707.
- DEANE, L. M. e DEANE, M. P. — *O Hospital*, 1955, 48, 347 - 364.
- DEANE, L. M. e DEANE, M. P. — *O Hospital*, 1955, 48, 61 - 76.
- DEL PONTE, E. — *An. de Med. Publica, Santa Fé*, 1950, 2, 431 - 472.
- ESCOMEL, Ed., — *Bull. de la Soc. de Path. Exot.*, 1911, 4, 489 - 492.
- FORATINI, O. P. — *Algumas observações sobre a Biologia de Flebótomos, em região da Bacia do Rio Paraná (Brasil)*. Tese., 1954.
- FORATINI, O. P. e SANTOS, M. R. — *Arq. Hig. e Saúde Pública*, 1952, 17, 171 - 174.
- GANDOLFO, C. F., HANSEN, R. e STEINBERG, I. R. — *Clínica de Enfermedades Infecciosas e su tratamiento*, 2.^a ed., 2, 759 - 809.
- GARZON, R. — *Tratado de Dermatologia y Sifilografía*, 1945, 1336 - 1347.
- GOMES, L. S. — *Brasil Méd.*, 1939, 53, 1079 - 1087.
- GOMES, G. L. — *Brasil Méd.*, 1955, 19 - 22, 15.
- GONZALEZ, H. D. e FLORIANI, C. — *Tratado de las Enfermedades Infecciosas*, 1945, 2, 609 - 637.
- GUERREIRO, C. — *Brasil Méd.*, 1914, 11 - 12.
- GUIMARÃES, F. N. — *Res. Trab. V. Congr. Internac. Microb.*, 1950, 151.
- GUIMARÃES, F. N. — *O Hospital*, 1951, 40, 25 - 46, 153 - 162, 665 - 676.
- GUIMARÃES, F. N. — *O Hospital*, 1951, 60, 919.
- GUIMARÃES, F. N. — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1955, 53, 1 - 11.
- GUIMARÃES, F. N. e BUSTAMANTE, F. M. — *Rev. Bras. de Malariol. e Doenças Trop.*, 1954, 6, 127 - 130.
- HERRER, A. — *Rev. Med. Experimental*, 1948, 7, (1 - 4), 62 - 66.
- HERRER, A. — *Rev. Med. Experimental*, 1951, 8, 45 - 88.
- HERRER, A., BATTISTINI, M. G. — *Rev. Med. Experimental*, 1951, 8, 9 - 119.
- HERTIG, M. e FAIRCHILD, G. B. — *Am. J. Trop. Med.*, 1948, 28, 207 - 230.
- HOARE, C. A. — *Trop. Dis. Bull.*, 1944, 41, 331 - 345.
- HOMEZ, J. — *Ann. de Derm. e Sifil.*, 1956, 83, 271.
- JOYEUX, Ch. et SICÉ, A. — *Précis de Médecine des Pays Chauds*. Paris, 1950, 413 - 423, 515 - 522.
- LAFFONT et DURIEUX — *Encyclopédie Médico-chirurgicale*, 8094.
- LANGERON — *Précis de Microscopie, Cultures des Trypanosomes et des Leishmanias*. 1949, 855 - 871.
- LAVERAN et NATTAN-LARRIER — *Bull. de la Soc. de Path. Exot.*, 1912, 5, 176 - 179. 2^{ème} note: 486 - 489.
- LAVERAN, A. et PETTIT, A. — *Bull. de la Soc. de Path. Exot.*, 1910, 216 - 217.
- LAVERAN, A. — *Leishmanioses*, 1, 1917.
- LEGER, M. — *Rev. Med.-Cir. do Brasil*, 1928, 195 - 204.

- LINDEMBERG, A. — *Bull. de la Soc. de Path. Exot.*, 1909, 2, 252 - 254.
- LINS, A. — *Noções de Protozoologia*.
- LOBO, J. — *An. Bras. de Dermat. e Sifil.*, 1947, 22, 91 - 105.
- MACKIE, HUNTER e WORTH — *Manual de Medicina Tropical*, 1946, 274 - 275.
- MANCEAUX, L. — *Bull. de la Soc. de Path. Exot.*, 1911, 287 - 288.
- MANGABEIRA, O. F. — *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1938, 33 (Fasc. 3), 349 - 356.
- MARTINS, A. F. — *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1941, 1, 15 - 69.
- MAYER, M. — *Res. Trab. do V. Congres. Internac. Microbiol.*, 1950, 150.
- MAZZA, S. — *Reunion Soc. Argent. Patol. — Reg. Norte*, 1932, 7, 513 - 526.
- MEDINA, H. — *Arq. de Biol. e Tecnologia*, 1946, 1, 39 - 74.
- MEIRA, J. A., JAMRA, M. e LIMA, M. L. T. — *Arq. Fac. Hig. e Saúde Publ. Univ. S. Paulo.*, 1948, 2, 253 - 300.
- MONTENEGRO, J. — *Arch. Dermat. and Syphil.*, 1926, 13, 187 - 194.
- MOSES, A. — *Brasil Méd.*, 1919, 107 - 108.
- MOTTA, L. C. — *An. Fac. Med. S. Paulo*, 1928, 3, 101 - 115.
- NAPIER, L. E. — *The Principles and Practice of Tropical Medicine.*, McMillan Co., New York, 1946.
- NEVEU-LEMAIRE — *Traité de Protozoologie Médicale et Vétérinaire.*, 1943, 149 - 174.
- NIEMEYER, A., NEVES DA SILVA, N. — *An. Bras. Dermat. e Sifil.*, 1948, 24, 250 - 251.
- NOGUCHI — *Amer. J. of Trop. Med.*, 1925, 5, 63 - 67.
- ORSINI, O. — *I. Reunião Anual dos Dermato-Sifilógrafos Brasileiros*, 1945, 11 - 26.
- PEREIRA FILHO, M. J. — *An. Fac. Med. Pôrto Alegre. Separata.*, 1950.
- PEREIRA, O. — *An. Fac. Med. Pôrto Alegre. Separata*, 1943.
- PESSOA, S. B. — *Parasitologia Médica.*, 1954, 163 - 217.
- PESSOA, S. B. — *Cl. Trop. Med.*, 1951.
- PESSOA, S. B. e PESTANA, B. R. — *São Paulo Med.*, 1940, 15, 133 - 157.
- PESSOA, S. B. e ROTBERG, A. — *O Hospital*, 1947, 32, 25 - 34.
- PIFANO, C. F. — *Arch. Venez. Patol. Trop. y Parasit. Med.*, 1949, 1, 170 - 182.
- PIFANO, C. F., MEDINA, R., FEBRES, M. M. e ROMER, M. — *Rev. de Sanidad y Assist. Soc. Caracas.*, 1954, 19, 403 - 423.
- PORTUGAL, H. — *Rev. Med.-Cir. do Brasil*, 1929, 403 - 412.
- PUPO, A. — *Sc. Méd.*, 1926, 5, 207 - 216.
- PUPO, A. — *Sc. Méd.*, 1926, 8, 387 - 409.
- PUPO, A. — *Contribuição para o estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana*. II. Congr. Lat.-Amer. de Otorrinolaring. e Broncoesof. e III. Congr. Bras. de Otorrinolaring. e Broncoesof., 1951, 478 - 500.
- PUPO, A. — *Rev. Hosp. Clín. São Paulo*, 1946, 1, 113 - 164.
- RABELLO, E. — *An. Bras. de Dermat. e Sifil.*, 1925, 2, 1 - 25.
- RABELLO, E., PORTUGAL, H., SERRA, O. e ROCHA, G. L. — *I. Reunião Anual do Dermato-Sifilógrafos Brasileiros*, 1945, 37 - 71.
- RAMOS E SILVA, J. — *An. Bras. Dermat. e Sifil.*, 1950, 25, 125.
- ROMAÑA, C., NAJERA, L. CONEJOS, M. y ABALOS, J. W. — *An. del Inst. Med. Reg.* 1949, 2, 283 - 292.
- RONNA, A. — *Rev. Criação e Veterinária*, 1956, 1, 9.
- ROTBERG, A. — *O Hospital*, 1951, 39, 263.
- ROTBERG, A. — *Contribuição para o estudo da alergia na leishmaniose tegumentar americana*. Tese., *Rev. Hosp. N. S. Aparecida*, 1952, 5, 3 - 83.
- SALLES, J. B. — *Rev. Bras. de Med.*, 1952, 9, 496 - 498.
- SCHAFFER, H. — *El Dia Médico*, 1949, 17, 702 - 709.
- SILVA, O. U. — *Tratamento da Leishmaniose tegumentar*. Tese., 1913.
- SOUZA, A. J. — *Considerações sobre o Botão endêmico dos países quentes, principalmente na Bahia*. Tese., 1895.
- THOMSON, J. G. and ROBERTSON, M. B. — *Protozoology*, 214 - 235.
- TORRES, M. e LEÃO, A. — *Sc. Méd.*, 1924, 1, 256 - 259.

- TORRES, O — *An. do VIII. Congr. Bras. de Medicina (13-30 de outubro de 1918)*., Rio de Janeiro, 1918, 487-491.
- TORRES, O. — *Sc. Méd.*, 1924, 396-398.
- VACCAREZA, R. — *El Dia Médico*, 1935, 751-755.
- VERONESI, R., JAMRA, M., SILVA, O. R. S., CRUZ, O. e FIORILLO, A. — *Rev. Hosp. Clín. São Paulo*, 1954, 9, 15-50.
- VERONESI, R., CASTRO, R. M., MARQUES, J. C., FIORILLO, A. M., ZUCOLATTO, M., CZAPSKI, J., SALLES, H. L. e AMATONETO, V. — *Rev. Hosp. Clín. São Paulo*, 1955, 10, 86-111.
- WENYON — *Protozoology*, 1.