

Infecções experimentaes na Leishmaniose visceral americana *

pelo

Dr. Aristides Marques da Cunha

(Com 9 estampas)

No estudo da Leishmaniose visceral americana, as infecções experimentaes constituem por certo capitulo de grande importancia, não só por fornecerem dados valiosos para a identificação do parasita, como pela contribuição que pódem trazer ao conhecimento da pathologia da doença. Além disso, a infecção experimental do cão, poderia trazer esclarecimentos sobre o papel que desempenha esse animal na epidemiologia da infecção, como possivel depositario do virus, visto ser elle encontrado naturalmente infectado nas regiões em que grassa a doença.

* Tambem as experiencias de infecção de animaes sylvestres apresentam grande interesse quer pelo facto de poderem revelar a existencia entre nós de algum animal sensivel a infecção que se prestasse como animal de laboratorio, quer pelas indicações que poderiam fornecer sobre a existencia de um possivel depositario sylvestre da infecção. Infelizmente as nossas experiencias nesse sentido foram muito limitadas.

No estudo das infecções experimentaes empregamos as seguintes amostras: amostra Luis Ferreira, isolada de um caso humano proveniente do Estado de Sergipe em 4-936; amostras Florisvaldo, Pantoja isolados em 2-937, Miguelino, isolado em 5-937, Braulino, em 7-937, Benedicta e Isaias, em 9-937, de casos humanos, no municipio de Abaeté, Estado do Pará; amostra Teves, isolada em 9-936 de um caso humano no Chaco argentino; amostra Amado, tambem isolado em 1-38 de homem infectado em Bôa Vista, Estado de Matto Grosso; amostras Cão 1 isolado em 2-937, Jolim em 7-937 e Mangerona em 9-934, provenientes de casos de leishmaniose visceral canina no municipio de Abaeté, Estado do Pará. Todas essas amostras foram isoladas pelo Dr. Evandro Chagas e seus collaboradores, com excepção da amostra Jolim, isolada por nós de um cão naturalmente infectado que nos foi enviado pelo Dr. Evandro Chagas.

Os animaes com que experimentamos foram o cão, o macaco rhe-

* Recebido para publicação a 23 de Agosto de 1938 e dado á publicidade em Dezembro de 1938. Alguns dados contidos neste trabalho foram introduzidos durante a revisão.

sus (*Macaca mulatta*), o hamster europeu (*Cricetus cricetus*) e o camondongo branco. Dos animaes sylvestres, nossas tentativas se limitaram á cotia (*Dasyprocta agouti*) e ao rato sauiá (*Proechymis oris*). O material empregado para as inoculações éra quasi sempre constituido por culturas e só algumas vezes utilisamos triturados de baço e de fígado de animaes infectados.

As culturas empregadas provinham de tubos com meio de Nöller, N. N. N., ou meio de Noguchi para *Leptospira*, sendo porém que na maior parte dos casos, lançamos mão para inoculação de suspensões em agua physiologica de Leishmanias, cultivadas em placa segundo a technica de Mayer e Ray.

A via de inoculação foi quasi sempre a intra-peritoneal e só excepcionalmente e para fins determinados, utilisamos a via sub-cutanea.

As doses utilizadas eram as vezes relativamente pequenas e constituidas por um ou dois tubos de cultura, muitas vezes, porém, empregamos grandes doses representadas por suspensões espessas de flagelados cultivados em placa.

As vezes procediamos a uma unica injeccção, outras porém, praticavamos injeccções repetidas, de ordinario em numero de 4 a 6 e com intervallos variaveis, geralmente de 4 a 10 dias.

Infecção de hamster (*Cricetus cricetus*). — As primeiras tentativas que fizemos para infectar esses animaes tiveram resultados negativos. Cinco hamsters (hamsters 1 a 5), inoculados por via intra-peritoneal com culturas em meio de Noguchi da amostra Luiz Ferreira e reinoculados 10 dias depois com a mesma amostra, examinados repetidas vezes durante 9 mezes, não se mostraram infectados. Esse facto nos levou a admittir a possibilidade de não serem esses roedores sensiveis á Leishmania em questão, tanto mais que essa hypothese éra corroborada pela asserção de Mayer que diz conservarem as culturas a virulencia por espaço de mais de um anno. Tornavam-se pois necessarias novas experiencias que, conforme veremos adiante, vieram demonstrar serem os hamsters sensiveis á Leishmania visceral americana do mesmo modo que aos outros flagelados do mesmo genero (hamsters 6, 8, 12, 13, 16 e 17).

Os primeiros resultados negativos podem, a nosso ver, serem explicados pela perda da virulencia das culturas durante o prazo de 7 mezes que medeou entre seu isolamento e a data da inoculação. O desaccordo entre nossos resultados e os obtidos por Mayer provem, ao que pensamos, do facto de ter esse autor utilizado em suas experiencias, culturas provenientes de casos de Kala-Azar indiano, capazes de conserva-

rem por mais tempo a virulencia como provo o facto de termos obtido infecção e morte de hamster com uma amostra de *L. donovani* (amostra 45 de Adler) isolada ha 10 mezes (hamster 19).

Quando utilizamos culturas recentemente isoladas, obtivemos a infecção de hamsters em 100 % dos casos, tanto com amostras isoladas do homem como do cão. As inoculações eram feitas por via intra-peritoneal empregando as vezes culturas em tubo com meio de Nöller, originaes ou de primeiras passagens e fazendo nesse caso uma unica injeccão. Nos casos de culturas mais antigas, utilizamos para inoculação suspensões em agua physiologica de Leishmanias cultivadas em placa segundo a technica de Mayer e Ray, praticando então 3 injeccões com intervallos de 8 a 10 dias. Finalmente em um caso, utilizamos triturado de baço e de figado de hamster infectado que inoculamos de uma só vez, tambem por via intra-peritoneal.

A sensibilidade do hamster á infecção pela Leishmania, apresenta variações individuaes como demonstra a seguinte experiencia.

Trez desses roedores (hamsters 9 a 11) foram inoculados com doses iguaes do mesmo triturado de baço e de figado de hamster infectado (hamster 6). Apresentando um delles 68 dias após a inoculação tumefacção das patas, foi feita puncção de figado com resultado positivo que foi confirmado pela autopsia effectuada 4 dias depois. Outro animal desse lote, morreu de doença intercurrente, 86 dias após a inoculação sendo a pesquisa de parasitos em esfregaços de baço e de figado negativa. O terceiro hamster dessa experiencia, foi sacrificado 6 mezes depois da inoculação sem apresentar signal algum externo da doença e embora se mostrasse infectado apresentava menor numero de parasitos do que o primeiro animal, sacrificado 4 mezes antes.

Sobre a duração da infecção poucas indicações podemos fornecer pois sómente um animal (hamster 8) morreu de Leishmaniose e esse 7 mezes após a inoculação. Todos os demais foram sacrificados ou morreram de outras causas dado o pequeno gráo de infecção observada. Quanto ao prazo durante o qual as culturas se conservaram virulentas após o isolamento, podemos adiantar que um hamster (hamster 16) inoculado com cultura isolada ha 4 mezes (amostra Teves) se mostrou infectado, ao passo que outros (hamsters 14 e 15) inoculados nas mesmas condições com culturas de 8 mezes (amostra Florivaldo e cão 1), não se mostraram infectados no mesmo prazo, sem que se possa comtudo excluir a hypothese de infecção posterior, por terem os animaes morrido de doença intercurrente.

Já em vida do animal manifesta-se a infecção por symptomas externos representados por lesões cutaneas e tumefacção das patas. As

lesões cutaneas localisam-se na face ventral e consistem em perda de pello, erythrema e exsudação (Est. 1, fig. 6). A pelle assim lesada se torna extremamente friavel rompendo-se aos movimentos do animal no acto da contenção. A tumefacção das patas apresenta-se ora nas 4 patas, ora sómente nas patas anteriores (Est. 1, figs. 1 e 2).

A autopsia desses animaes revelou como principal alteração o augmento de volume do baço. Os esfregaços de orgãos, mostram que os parasitos são particularmente abundantes no baço, figado e medulla ossea. Em córtes histologicos podemos verificar ainda a presença de numerosos parasitos na pelle e no intestino e em pequeno numero nas capsulas suprarenaes.

Na pelle lesada observa-se grande hypertrophia do epithelio com degeneração das cellulas das camadas superficiaes, no derma, enorme infiltração de cellulas mononucleares repletas de parasitas e intensa congestão (Est. 2, fig. 2). Quando a pelle conserva aspecto macroscopico normal, ou ella não se mostra parasitada ou se encontram sómente alguns macrophagos com Leishmanias em redor dos folliculos pillo-sebaeos, conservando o resto da pelle aspecto normal (Est. 2, fig. 1).

No intestino, os parasitos são encontrados na mucosa, entre as glandulas de Lieberkühn, sendo que tambem na submucosa se podem observar alguns macrophagos parasitados.

Transcrevemos em seguida o protocollo das experiencias.

- 7-11-1937 — 5 hamsters (n.^{os} 1 a 5) inoculados por via intra-peritoneal com cultura em meio de Noguchi da amostra Luiz Ferreira.
- 17-11-1936 — Reinoculados nas mesmas condições.
- 16-12-1936 — Um hamster foi sacrificado e autopsiado com resultado negativo.
- 31-12-1936 — Morreu um hamster que foi autopsiado com resultado negativo.
- 11- 1-1937 — Um hamster foi sacrificado e autopsiado com exame negativo.
- 7- 5-1937 — Puncção de figado dos dois hamsters restantes, com resultados negativos.
- 12- 8-1937 — Morreu um hamster no momento da puncção de figado sendo examinado com resultado negativo. O animal restante foi despresado.
-
- 27- 2-1937 — 1 hamster (n.^o 6) foi inoculado por via intra-peritoneal com 2 cc. de cultura primaria da amostra Florisvaldo.
- 20- 4-1937 — Puncção de figado, negativo.
- 27- 5-1937 — Puncção de figado. — Presença de raras Leishmanias.
- 2-10-1937 — O animal foi sacrificado. Apresentava então a pelle do ventre avermelhada, humida e com grande perda de pello. No momento da contenção, a pelle, devido aos movimentos do animal, rompeu-se em diversos pontos. Foi autopsiado com resultado positivo.
-
- 7- 5-1937 — 2 hamsters (n.^{os} 7 e 8) foram inoculados por via intra-peritoneal com cultura primaria da amostra Miguelino.

12- 8-1937 — Morreu um dos hamsters durante a punção de fígado sendo examinado com resultado negativo.

18-10-1937 — Punção de fígado do hamster restante (8) com resultado positivo.

12-11-1937 — Foi observado tumefacção e erythema do labio inferior. A partir dessa data, o erythema foi se estendendo, acabando por tomar toda a face ventral, sendo acompanhado por exsudação e queda de pelo.

6-12-1937 — Morreu e foi autopsiado com resultado positivo.

2-10-1937 — 3 hamsters (n.ºs 9 a 11) foram inoculados por via intra-peritoneal com 2 cc. de triturado de baço e fígado do hamster n.º 6.

10-12-1937 — O hamster n.º 9 apresentou tumefacção das patas sendo feita punção de fígado com resultado positivo.

16-12-1937 — Esse hamster (n.º 9) foi sacrificado e autopsiado com resultado positivo.

28-12-1937 — Morreu o hamster (n.º 10) e a autopsia deu resultado negativo.

8- 4-1938 — Foi sacrificado o ultimo hamster (n.º 11). A autopsia deu resultado positivo.

6-10-1937 — 1 hamster (n.º 12) foi inoculado por via intra-peritoneal com cultura da amostra Jolim.

14-10-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.

21-10-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.

28- 1-1938 — Morreu e foi autopsado com resultado positivo.

16-10-1937 — 1 hamster (n.º 13) foi inoculado por via intra-peritoneal com cultura da amostra Isaias.

26-10-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.

1-11-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.

14- 2-1938 — Morreu e foi autopsiado com resultado positivo.

18-10-1937 — 1 hamster (n.º 14) foi inoculado por via intra-peritoneal com cultura da amostra Cão 1.

28-10-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.

5-11-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.

14- 1-1938 — Morreu e foi autopsiado com resultado negativo.

18-10-1937 — 1 hamster (n.º 15) foi inoculado por via intra-peritoneal com cultura da amostra Florisvaldo.

28-10-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.

5-11-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.

18- 1-1938 — Morreu e foi autopsiado com resultado negativo.

18-10-1937 — 1 hamster (n.º 16) foi inoculado por via intra-peritoneal com cultura da amostra Teves.

- 28-10-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.
19- 1-1938 — Sacrificado e autopsiado com resultado positivo.

-
- 27-12-1937 — 1 hamster (n.º 17) foi inoculado por via intra-peritoneal com culutra da amostra Mangerona.
10- 3-1938 — Apresenta tumefacção das patas dianteiras.
19- 3-1938 — Sacrificado e autopsiado com resultado positivo.

-
- 4-10-1937 — 2 hamsters (n.ºs 18 e 19) foram inoculados por via intra-peritoneal com *L. donovani* amostra 45 de Adler. (Isolada em 11-1937).
25-10-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.
1-11-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.
5-11-1937 — Reinoculado nas mesmas condições.
12-11-1937 — Morreu 1 hamster (n.º 18). Autopsia, negativa.
9-12-1937 — Morreu 1 hamster (n.º 19). Autopsia, positiva.

Infecção do rhesus. — Até agora apenas conseguimos infectar um unico animal dessa especie. Culturas obtidas pela punção de baço do doente Teves, no Chaco argentino e trazidas pelo Dr. E. Chagas, mostraram-se nos primeiros transplantes, contaminadas apesar de conter grande numero de flagellados. Prevendo a impossibilidade de manter as culturas nessas condições, fizemos com ellas inoculação por via intra-peritoneal em um rhesus. Esse animal examinado em vida por punção de figado não se mostrou infectado fazendo provêr um resultado negativo. Entretanto, apresentando-se agonizante, foi sacrificado e autopsiado com resultado positivo, permittindo ainda recuperar a amostra Teves que ainda conservamos no laboratorio.

Esfregaços de baço e de figado mostraram numerosas *Leishmanias* que eram particularmente abundantes no ultimo desses órgãos (Est 4, figs. 1 e 2). Em córtes histologicos podemos verificar que as lesões do figado são mais intensas que as observadas no cão no mesmo órgão e são representadas por infiltração de cellulas mononucleares que ao contrario do que se dá nesse animal, se localisa exclusivamente nos espaços-porta. Outra particularidade que differe tambem do que se observa no cão é a ausencia de parasitos na pelle. Tambem no intestino não foi possivel encontrar *Leishmanias*.

Outros macacos foram inoculados com culturas Florisvaldo, Pantoja e Amado, bem como triturado de figado e baço do rhesus Teves, sem que nenhum delles se mostrasse infectado. Injecções repetidas de grandes doses de flagellados, á semelhança do que temos feito com o cão, foram applicadas em dois macacos, mas esses morreram de tuberculose em periodo demasiado curto para permittir qualquer conclusão.

Protocollo da experiencia:

- 23-9-1936 — Rhesus inoculado por via intra-peritoneal com 2 tubos de cultura da amostra Teves (2.^a passagem) contaminada.
- 19-3-1937 — Puncção de figado — negativa.
- 14-6-1937 — Morreu e foi autopsiado. Esfregaços de baço, figado, medulla ossea, etc., com numerosas Leishmanias. Cultura do figado, positiva.

Infecção do cão. — A infecção experimental de cães, ao contrario do que seria de esperar, dado o facto de serem esses animaes encontrados naturalmente infectados, não é facil de obter e as primeiras tentativas que fizemos com esse fim, tiveram resultados negativos. Variando porém as condições de inoculação, obtivemos o primeiro resultado positivo (Cão A) que foi seguido de outros com o emprego da technica que descrevemos em seguida. Os cães que utilizamos em nossas experiencias eram animaes novos, de cerca de 1 a 2 mezes de idade. As culturas empregadas eram sempre recentemente isoladas (cerca de 1 a 3 mezes) e provinham tanto de casos humanos como de cães naturalmente infectados. Para as inoculações empregamos suspensões espessas de flagellados cultivados em placas segundo a technica de Mayer e Ray. As inoculações eram feitas por via intra-peritoneal e repetidas 3 a 4 vezes com intervallos variaveis de 4 a 8 dias. Todos os animaes inoculados nessas condições e que não morreram de doenças intercurrentes durante o periodo de incubação, mostraram-se infectados tanto com culturas provenientes de cão como do homem.

Um cão que havia sido injectado por via intra-peritoneal com suspensão espessa de Leishmanias, tambem recentemente isoladas mas que recebeu uma unica injeccção, foi observado por mais de um anno sem se mostrar infectado.

O prazo de incubação observado variou entre 3 á 7 mezes sendo de 3 a 4 mezes quando utilizadas amostras de proveniencia canina e de 5 a 7 mezes nos casos em que utilizamos culturas isoladas de infecção humana.

A pesquisa da infecção nos animaes inoculados éra feita a principio pela puncção de figado, mais tarde porém, procediamos tambem ao exame da medulla ossea retirada da tibia por trepanação. Não podemos deixar de salientar as vantagens que apresenta o exame da medulla ossea para de'eterminar a infecção, pois, os parasitas são muito mais numerosos ahi do que no figado, o que facilita sobremodo o exame. É verdade que, quando pela puncção de figado, se retira um fragmento de tecido, quasi sempre se encontram parasitos, mas esses, nas phases iniciaes da doença, são tão raros que se torna preciso um exame exhaustivo

das preparações para achar muitas vezes um unico parasito, sendo em alguns casos, impossivel o seu encontro. Ao contrario, os preparados de medulla ossea, retirada do animal na mesma occasião, mostram numero regular de parasitos, que podem assim ser encontrados com a maior facilidade. A observação desses factos vem mostrar que, na pesquisa de cães naturalmente infectados a punção de figado não constitue o melhor processo, opinião aliás já expendida por Adler. Seria pois aconselhavel, para a pesquisa de cães naturalmente infectados, o exame da medulla ossea retirada da tibia por trepanação, methodo por certo de mais facil execução que a retirada de um fragmento de baço aconselhado por Adler.

Com o emprego da technica referida acima conseguimos até agora, infectar 9 cães. O primeiro (Cão A) inoculado com amostra isolada de cão, mostrou-se infectado 4 mezes após a inoculação morrendo mez e meio depois da infecção. Dois outros, (Cães B e C) tambem inoculados com amostra canina, apresentaram-se infectados pela punção de figado, 3 mezes após a inoculação. Permaneceram vivos e infectados mais de 5 mezes, morrendo de doença intercurrente não determinada. Um outro, (Cão D) foi inoculado com amostra humana e só 7 mezes depois, se poudo verificar a presença de parasitas no figado, vindo a morrer cerca de 2 1/2 mezes depois, de pneumonia. Os demais, apresentam infecção recente, estão vivos e em observação. Tres delles foram inoculados com culturas isoladas de um dos animaes referidos (Cão B) e se mostraram infectados 3 a 3 1/2 mezes depois. Os dois outros, inoculados com amostra humana (Florisvaldo) que havia soffrido 2 passagens pelo hamster, se mostraram infectados pelo exame da medulla ossea, 5 e 7 mezes após a inoculação. Queremos assignalar que todas as punções de figado feitas nesses animaes, deram até agora resultados negativos.

A infecção se manifesta em vida do animal por febre, anemia e emmagrecimento podendo chegar ás vezes a cachexia como no cão A. Além disso observa-se lesões cutaneas representadas por depilação, seborrhéa chegando mesmo á ulceração. No cão A observamos á formação de placas de keratite em ambos os olhos e no cão C, diminuição de visão attingindo quasi á cegueira completa.

Um ponto que mereceu particular atenção de nossa parte, foi a infecção da pelle. Ella é de grande importancia na transmissão da doença pois é dahi que provém os parasitas que no acto da picada, vão infectar os *Phlebotomus*, transmissores da doença. Além disso uma vez verificada a presença de cães naturalmente infectados nas regiões em que grassa a Leishmaniose visceral americana, éra de interesse a pesquisa do parasita na pelle desses animaes, com o

fim de determinar si poderiam elles ou não, desempenhar o papel de depositarios do virus.

Com excepção do cão A, em que a curta duração da infecção não permittiu um estudo systematico da infecção cutanea que ficou assim limitada á verificação do parasita na pelle (Est. 6, fig. 2), em todos os demais, foram feitas biopsias de pelle de 15 em 15 dias e desse modo podemos acompanhar a marcha da infecção cutanea bem como das lesões que elle provoca.

Nos 4 primeiros cães (cães A, B, C e D) já bem estudados, a infecção da pelle foi observada em todos elles. Nos outros 4, de infecção mais recente, em 3 já foi possível a verificação da presença do parasita na pelle e tudo leva a crêr que seja apenas uma questão de tempo o apparecimento de *Leishmanias* na pelle do restante. Essas observações mostram claramente a constancia dessa localisação parasitaria.

Um outro ponto para o qual queremos chamar a atenção é a persistencia da infecção cutanea na Leishmaniose visceral do cão. Assim, geralmente, após a primeira biopsia positiva todos os demais mostraram a presença de parasitos na pelle e isso até a morte dos animaes.

Outro facto ainda a considerar é a extensão da infecção da pelle pois, embora se possa observar pontos de eleição taes como as patas em que os parasitas se installam em primeiro logar e são geralmente mais numerosas do que em qualquer outro, cedo se estende a infecção a toda a pelle pois, *Leishmanias* são ahí encontradas seja qual fôr a região do corpo donde esta foi retirada.

Maior numero de parasitos e lesões mais pronunciadas foram encontradas nas patas dos cães B e C que se apresentavam com tumefacção, particularmente nitidas no Cão C (Est. 1, fig. 3). A presença de parasitos na pelle das patas antes de seu apparecimento em outras regiões do corpo, foi observada nos cães E, F e G nos quaes, apesar de se encontrarem parasitos relativamente numerosos na pelle das patas, não foi possível sua observação em fragmento da pelle retirada da região cervical.

É ainda interessante referir que, embora seja quasi sempre a infecção da pelle acompanhada de lesões macroscopicas, parasitos podem ahí ser encontrados na ausencia de qualquer signal externo, conforme podemos verificar no cão D em que a pelle, apesar da presença de *Leishmanias*, conservou aspecto macroscopico normal até a morte do animal.

Na phase inicial da infecção da pelle, encontramos no derma macrophagos contendo alguns parasitos, geralmente 3 a 4 e que se dispõem no trajecto dos vasos. Com excepção desses macrophagos, apresenta a pelle aspecto normal.

Mais tarde o numero dos macrophagos parasitados cresce pouco a pouco e apparecem então as lesões da pelle que referiremos em seguida.

A principal alteração observada é constituída pela infiltração do derma por cellulas mononucleares. Essa infiltração se localisa principalmente em redor dos folliculos pilo-sebaceos (Est. 5, fig. 2), sendo que as vezes se póde observar folliculos apresentando infiltração ao lado de outros de aspecto normal, enquanto outras vezes quasi todos os folliculos apresentam intensa infiltração. Em outros casos a infiltração se localisa no chorion (Est. 5, fig. 1), sendo que, frequentemente, macrophagos parasitados são vistos logo abaixo do epiderma o que facilita sobremaneira sua ingestão pelos *Phlebotomus* no acto da picada. Em fim, em certos casos de intensa infiltração, esta se estende uniformemente a todo o derma (Est. 6, fig. 1).

A infiltração é constituída as vezes principalmente por macrophagos parasitados e isto acontece sobretudo quando a infiltração não é muito intensa. Quando a infiltração se torna mais intensa, augmenta o numero de macrophagos não parasitados sendo que quando ha ulceração, os macrophagos parasitados são muito raros ou não são encontrados de todo.

As lesões macroscopicas observadas são depillação e seborrhéa e chegam em casos extremos á ulceração.

Os quatro cães experimentalmente infectados que morreram ou da infecção ou de doença intercurrente, foram todos autopsiados.

Na autopsia, as lesões macroscopicas observadas de maneira constante são de pouca monta e consistem apenas em augmento de volume do baço. No cão A, encontrava-se além disso, as placas de keratite (Est. 1, figs. 4 e 5), já observadas em vida do animal, o intestino fortemente congesto com conteúdo sanguinolento e os ganglios lymphaticos axillares e inguinaes augmentados de volume. Esfregaços dos órgãos mostraram parasitos muito numerosos principalmente no baço, fígado, medulla ossea e ganglios lymphaticos (Est. 7, fig. 1; Est. 9, fig. 1).

Em córtes de fígado podemos observar que a infiltração se localisa principalmente em redor ou ao lado da veia central do lobulo (Est. 9, fig. 2), aspecto já assignalado por Adler na infecção experimental do cão. Parasitos eram ainda encontrados nas cellulas de Kupffer e macrophagos parasitados podiam ser observados nos espaços-porta bem como na intimidade do tecido do lobulo.

O intestino apresentava-se no mesmo animal intensamente parasitado. As *Leishmanias* se localisavam principalmente na mucosa em cellulas de infiltração localisadas entre as glandulas de Lieberkühn (Est. 8, fig. 2), sendo que alguns macrophagos parasitados podiam ser observados tambem na sub-mucosa.

Dos outros animaes, os cães B e C, apresentavam raras parasitos no baço, fígado e medulla ossea enquanto que no cão D, as *Leishmanias*, raras no baço e no fígado, eram em grande numero na medulla ossea (Est. 7, fig. 2).

CÃO A

- 20- 5-1937 Inoculado por via intra-peritoneal com cultura em placa da amostra **Cão 1.**
 28- 5-1937 Reinoculado.
 6- 6-1937 Reinoculado.
 10- 6-1937 Reinoculado.
 28- 9-1937 Puncção de fígado — positiva.
 9-10-1937 Biopsia da pelle — positiva.
 Entre essas datas appareceram na cornea, a principio em um dos olhos e depois no outro. placas esbranquiçadas (placas de keratite), que cresceram pouco a pouco até a morte do animal.
 8-11-1937 Encontrado agonizante foi sacrificado e autopsiado. Na autopsia além das placas de keratite já observadas em vida, apresentava o intestino congesto com conteúdo sanguinolento, os ganglios lymphaticos axillares e inguinaes augmentados de volume sendo que um dos ganglios axillares mostrava hemorragia em um dos polos. Parasitas eram muito abundantes no baço, fígado, medulla ossea, ganglios lymphaticos e intestino.

CÃO B e C

- 26-11-1937 3 cães foram inoculados por via intra-peritoneal com culturas em placa da amostra Jolim.
 30-11-1937 Reinoculados nas mesmas condições.
 8-11-1937 Reinoculados com a amostra Mangerona.
 15-12-1937 Morreu um cão. Restam 2 (Cães B e C).
 7- 2-1938 Biopsia da pelle em ambos — negativo para *Leishmanias*.
 4- 3-1938 Puncção do fígado em ambos — positivas para *Leishmanias*.
 7- 3-1938 Biopsia da pelle em ambos — negativas.
 22- 3-1938 Biopsia da pelle em ambos — negativas.
 8- 4-1938 Biopsia da pelle em ambos — Cão B — positiva. Cão C — negativa.
 25- 4-1938 Biopsia da pelle em ambos — positiva em ambos.
 24- 5-1938 Puncção do fígado do cão B para cultura — positiva.
 Biopsia da pelle em ambos — positivas.
 10- 6-1938 Puncção do fígado do cão C para cultura — positiva.
 Biopsia da pelle em ambos — positivas. A pelle da pata do cão C, mostra a presença de numerosas *Leishmanias*.
 27- 6-1938 Biopsia da pelle do pescoço e da pata em ambas — positivas.
 15- 7-1938 Biopsia da pelle em ambos — positivas.
 26- 7-1938 Biopsia da pelle em ambos — positivas. O cão C apresenta tumefacção e ulcerações das patas tendo sido tirada photographia.
 4- 8-1938 Biopsia da pelle em ambos — positivas.
 19- 8-1938 Biopsia da pelle em ambos — positivas. As patas do cão C apre-

- sentam aspecto quasi normal tendo desaparecido as ulcerações.
- 6- 9-1938 Biopsia da pelle em ambos — positivas. O cão C apresenta perturbação da visão chegando quasi a cegueira completa.
- 12- 9-1938 Morreu o cão B, sendo autopsiado. Esfregaços do baço, fígado e medulla ossea — positivos.
- 19- 9-1938 Morreu o cão C, sendo autopsiado. Esfregaços do baço, fígado e medulla ossea — positivos.

CÃO D

- 5-11-1937 5 cães foram inoculados por via intra-peritoneal com culturas em placa da amostra Braulino.
- 10-11-1937 Morreram 2 cães.
- 12-11-1937 Reinoculados os 3 cães restantes.
- 17-11-1937 Morreram 2 cães.
- 22-11-1937 Reinoculado o cão restante (Cão D).
- 26-11-1937 Reinoculado.
- 7- 2-1938 Biopsia da pelle — negativa.
- 7- 3-1938 Biopsia da pelle — negativa.
- 22- 3-1938 Biopsia da pelle e punção do fígado — negativas.
- 28- 3-1938 Punção de fígado — negativa.
- 30- 5-1938 Punção de fígado — positiva.
- 3- 6-1938 Biopsia da pelle — negativa.
- 22- 6-1938 Punção do fígado para cultura — positiva.
Biopsia da pelle do pescoço e pata — negativa.
- 8- 7-1938 Biopsia da pelle — positiva. (Raros parasitos).
- 25- 7-1938 Biopsia da pelle — negativa.
- 9- 8-1938 Biopsia da pelle — negativa.
- 22- 8-1938 Morreu sendo autopsiado. Esfregaço, do baço e do fígado, raros parasitos e da medulla ossea, numerosos parasitos. Córtes da pelle das patas mostraram raros parasitos.

CÃO E, F e G

- 6- 6-1938 3 cães foram inoculados por via intra-peritoneal com cultura em tubo de Nöller (original e 1.^a passagem) da amostra isolada do cão B.
- 13- 6-1938 Reinoculados (culturas em tubo — 2.^a passagem).
- 20- 6-1938 Reinoculados (culturas em tubo — 3.^a passagem).
- 24- 6-1938 Reinoculados (cultura de placa).
- 29- 6-1938 Reinoculados (cultura de placa).
- 4- 7-1938 Reinoculados (cultura de placa).
- 8- 7-1938 Reinoculados (cultura de placa).
- 5- 9-1938 Punção do fígado: Cão E — positiva. Cão F — negativa. Cão G — negativa.
Biopsia de pelle: Cão E — negativa. Cão F — negativa. Cão G — negativa.
- 20- 9-1938 Punção do fígado: Cão E — negativa, Cão F — negativa. Cão G — **positiva**.
Medulla ossea: Cão E — positiva. Cão F — positiva. Cão G — **positiva**.

- Biopsia da pelle do pescoço: Cão E — negativa. Cão F — negativa. Cão G — negativa.
- 5-10-1938 Puncção do figado para cultura: Cão E — contaminada. Cão F — positiva. Cão G — positiva.
Biopsia da pelle da pata: Cão E — positiva. Cão F — negativa. Cão G — positiva.
Biopsia da pelle do pescoço: Cão E — negativa. Cão F — negativa. Cão G — negativa.
- 20-10-1938 Puncção do figado: Cão E — positiva. Cão F — positiva. Cão G — positiva.
Biopsia da pelle do pescoço: Cão E — negativa. Cão F — negativa. Cão G — negativa.
Biopsia da pelle da pata anterior: Cão E — positiva. Cão F — negativa. Cão G — positiva.
- 8-11-1938 Biopsia da pelle do pescoço: Cão E — positiva. Cão F — negativa. Cão G — negativa.
Biopsia da pelle da pata anterior: Cão E — positiva. Cão F — positiva. Cão G — positiva.

CÃO H e I

- 2- 5-1938 2 cães inoculados por via intra-peritoneal com cultura de 1.^a passagem da amostra Florisvaldo com 2 passagens pelo hamster.
- 9- 5-1938 Reinoculados com culturas de 2.^a e 3.^a passagens. (tubos).
- 16- 5-1938 Reinoculados com culturas de 4.^a passagem. (tubos).
- 30- 5-1938 Reinoculados com culturas de 6.^a passagem. (tubos).
- 4- 6-1938 Reinoculados com culturas de placa.
- 9- 6-1938 Reinoculados com culturas de 7.^a passagem. (tubos).
- 13- 6-1938 Reinoculados com culturas de placa.
- 17- 6-1938 Reinoculados com culturas de placa.
- 15- 8-1938 Puncção de figado: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Biopsia da pelle: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
- 31- 8-1938 Puncção de figado: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Biopsia da pelle do pescoço: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
- 13- 9-1938 Puncção de figado: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Medulla ossea: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Biopsia da pelle do pescoço: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
- 28- 9-1938 Puncção de figado: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Medulla ossea: Cão H — positiva. Cão I — negativa.
Biopsia da pelle do pescoço: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
- 13-10-1938 Puncção do figado: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Medulla ossea: Cão H — positiva. Cão I — negativa.
Biopsia da pelle do pescoço: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Biopsia da pelle da pata do cão H — negativa.
- 27-10-1938 Puncção do figado: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Medulla ossea: Cão H — positiva. Cão I — negativa.
Biopsia da pelle do pescoço: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Biopsia da pelle da pata do cão H — negativa.

- 14-11-1938 Medulla ossea: Cão H -- positiva. Cão I — negativa.
Biosia da pelle do pescoço: Cão H — negativa. Cão I — negativa.
Biosia da pelle da pata: Cão H — negativa.
- 5-12-1938 Medulla ossea: — Cão I — positiva.

Experiencias com camondongos. - Todas as tentativas que fizemos para infectar esses animaes tiveram resultados negativos. Pondo de lado as primeiras inoculações feitas com a amostra Luiz Ferreira, isolada já ha algum tempo e que se mostrou incapaz de infectar o hamster, fizemos ultimamente inoculações com amostra humana e *recentemente isolada*, que havia soffrido duas passagens successivas pelo hamster. Os camondongos foram inoculados 6 vezes com 0,5 cc. de cada vez de uma suspensão espessa de *Leishmanias* cultivadas em placa o que constitue uma dóse enorme para um animal tão pequeno levando em conta que, para a inoculação de cães, empregamos 2 cc. de uma suspensão semelhante. Esses animaes examinados durante mais de 5 mezes não se mostraram infectados o que indica ser esse roedor pelo menos, muito pouco sensivel ao flagellado em questão.

Animaes sylvestres. — Nossas experiencias com esses animaes são muito limitadas e se resumem a colia (*Dasyprocta aguli*) e ao rato sauiá (*Proechimys oris*). As experiencias com esse ultimo roedor apresentam particular interesse por ser elle muito abundante no municipio de Abaeté, onde grassa a Leishmaniose visceral americana e poder assim ser suspeitado de depositario de virus. Um exemplar desse roedor, inoculado repetidas vezes com suspensão de *Leishmanias* cultivadas em placa da amostra Braulino, (as mesmas suspensões com que foi inoculado no cão D e que infectaram o animal) e que recebeu ainda uma inoculação de triturado de baço e figado de um hamster infectado, examinado durante mais de 6 mezes por puncções de figado, repetidas, e emfim sacrificado e examinado não se mostrou infectado. Esse resultado si não exclue de todo a hypothese de ser esse roedor depositario da doença, torna muito pouco provavel essa hypothese.

RESUMO E CONCLUSÕES

Passando em revista as experiencias de infecção que effectuamos e que acabamos de relatar, vemos que, as culturas isoladas de casos de Leishmaniose visceral americana quer do homem quer do cão, são capazes de infectar hamsters, rhesus e cães de maneira identica ao que acontece com as outras formas de Kala-Azar. Notamos ainda que a evolução da doença e as lesões observadas nos animaes assim infectados, se assemelham ao que tem sido observado nessa enfermidade aproximando-a de maneira singular do Kala-Azar mediterraneo.

É sobretudo no cão que a semelhança se torna mais patente. A infecção da pelle e as lesões por ella provocadas que observamos, não differem em nada das que tem sido descriptas na infecção natural do cão e já assignaladas tambem na infecção experimental desse animal, embora de maneira menos completa do que fazemos agora aqui.

As lesões oculares com formação de placas de keratite, a infecção massiça do intestino nos casos fataes de infecção e até mesmo as lesões do figado descriptas por Adler como peculiares á infecção experimental, (infiltração em torno da veia central do lobulo) constituem outros tantos caracteres que mostram a completa analogia entre as infecções do cão que obtivemos e as já observadas no Kala-Azar mediterraneo.

Além disso, a presença de *Leishmanias* na pelle, as vezes em grande numero e a constancia dessa localisação parasitaria, vem mostrar que o cão apresenta as condições necessarias para desempenhar o papel de depositario de virus tal como acontece no Kala-Azar mediterraneo, tanto mais que é elle encontrado naturalmente infectado, nas regiões em que grassa a doença.

Mas não é só a infecção do cão que mostra essa semelhança; nos outros animaes tambem se verifica o mesmo facto e até pequenos signaes, taes como a tumefacção das palas assignalada nos hamsters infectados com *Leishmania infantum*, foram tambem observados aqui.

Por outro lado, a reacção de sôro-agglutinação, conforme mostramos em trabalho anterior, não permite a separação das especies do genero *Leishmania*, pois todas ellas, quando recentemente isoladas, possuem identica constituição antigenica, que se modifica depois, pela conservação longo tempo em cultura. É esse facto, que deu logar ás conclusões contradictorias a que chegaram os autores que se occuparam do assumpto bem como aos primeiros resultados que obtivemos.

Deante de todos esses factos, nos julgamos autorizados a concluir como já fizemos anteriormente, que o agente da Leishmaniose visceral americana é identico á *Leishmania infantum*.

Ao terminar, queremos deixar consignados nossos agradecimentos ao Dr. E. Chagas, por ter posto a nossa disposição as culturas de *Leishmania* por elle isoladas, tornando possivel deste modo, a execução do presente trabalho.

Experimental infections in american visceral leishmaniasis.

With cultures isolated from cases of american visceral leishmaniasis we succeeded in obtaining experimental infections in hamsters (*Cricetus cricetus*), rhesus monkeys (*Macaca mullata*) and dogs.

Hamsters were infected with strains obtained from man and dogs, the intraperitoneal way having been always employed. When cultures recently isolated are used, infection is obtained practically in 100 % of the animals inoculated. The first negative results obtained by us may be explained by the use of cultures isolated some time before (about 7 months) and which had lost already their virulence. In some cases external lesions are observed represented by alterations of the skin and swelling of the paws. The skin lesions are observed on the ventral surface and consist in depilation, erythema and exudation. The skin thus affected shows to be extremely friable, rupturing at the movements of the animal when hold.

On post-mortem examination, besides the lesions pointed out, the animals present enlargement of the spleen. The parasites are very numerous in the spleen, liver, bone marrow, etc. The changed skin shows considerable hypertrophy of the epithelium with degeneration of the cells of the superficial layers, intensive infiltration of the derm by mononucleate cells full of parasites, and strong hyperemia.

In rhesus monkey, we obtained until now, only one case of infection. The inoculation was made by the intraperitoneal way with cultures in Noeller's medium, isolated from a human case of visceral leishmaniasis, found in Chaco Argentino. About 8 months after the inoculation, the monkey was found in agony and was sacrificed; the post-mortem examination showed that it was intensely infected.

For infecting dogs, we employed young animals, 1 to 2 months old. The cultures were recently isolated (1 to 3 months) from man or dog. For the inoculation we used thick suspensions of flagellates from plate cultures by Mayer and Ray's method. The inoculations were carried out through the intraperitoneal way and renewed 3 to 4 times with intervals from 4 to 8 days.

We observed an incubation period of 3 to 4 months when we used cultures obtained from dogs, and a period of 5 to 7 months, when employed human strains.

Formerly, in order to verify the infection it, was used the liver puncture; later on we also examined the bone marrow removed by trepanation. We wish to emphasize the advantages derived from the

examination of the bone marrow, as there the parasites are much more numerous than in the liver, thus making the examination easier.

The infection shows itself in the animal by fever, anemia and emaciation at times attaining cachexia. Apart from this, skin lesions are observed represented by depilation, seborrhea, and even ulceration. In the dog A, we observed keratitis on both eyes, and in the dog C, diminution of vision nearly attaining complete blindness.

What called our particular attention, was the infection of the skin. In this, parasites are always found in any region of the body, although presenting some elective sites such as the paws where the parasites first appear and where they generally are more numerous.

At the beginning of the skin infection we see in the derm macrophages, containing parasites, generally 3 to 4, and arranged along the vascular tracts. With the exception of these macrophages, the skin looks normal. The number of parasited macrophages increases gradually and then appear the changes of the skin here described. The main change observed is represented by infiltration of the derm by mononucleate cells. Such infiltration is mainly located around the pilo-sebaceous follicles. In other cases, the infiltration is located in the chorion. Finally, in certain cases of intense infiltration, it extends uniformly over the whole derm.

The infiltration is sometimes constituted chiefly by parasited macrophages and this occurs mainly when the infiltration is not very intensive. When the infiltration becomes more intensive, the number of not parasited macrophages increases, and in cases of ulceration the parasited macrophages become very rare or entirely disappear.

The four dogs experimentally infected which died either from the infection or from an intercurrent disease were all examined post-mortem.

On the post-mortem examination, the macroscopical changes observed in a constant manner are not important and only consist in an enlargement of the spleen. In the dog A, we found keratitis already observed in the same living animal, and the intestine intensely congested with sanguinolent contents and the axillary and inguinal lymphatic glands enlarged and congested. Smears from the organs showed very numerous parasites, chiefly in the spleen, liver, bone marrow and lymphatic glands.

In liver sections we observed the infiltration mainly located around or near by the intralobar vein a feature which already has been pointed out by Adler in the experimental infection of dog. Parasites were

also found in Kupffer's cells, and a few parasited macrophages were observed in the porta-spaces as well as in the tissue of the lobule.

The intestine of the same animal was intensely parasited, the *Leishmaniae* being located mainly in the mucous membrane, in infiltration cells located amongst Lieberkuehn's glands and some parasited macrophages could also be observed in the sub-mucosa.

Mice as well as the rodents *Dasyprocta agouti* and *Proechymis oris* when inoculated, did not become infected.

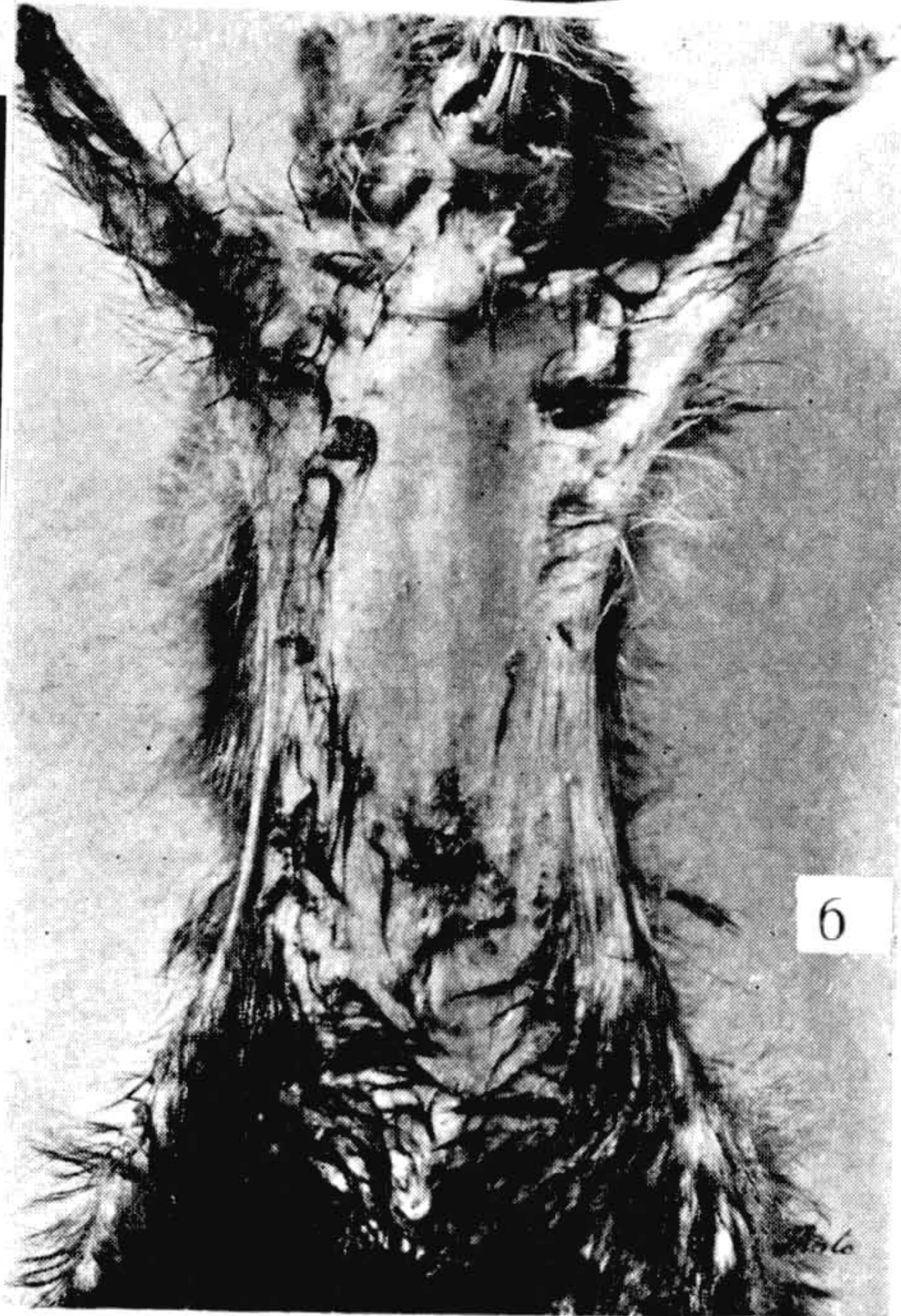
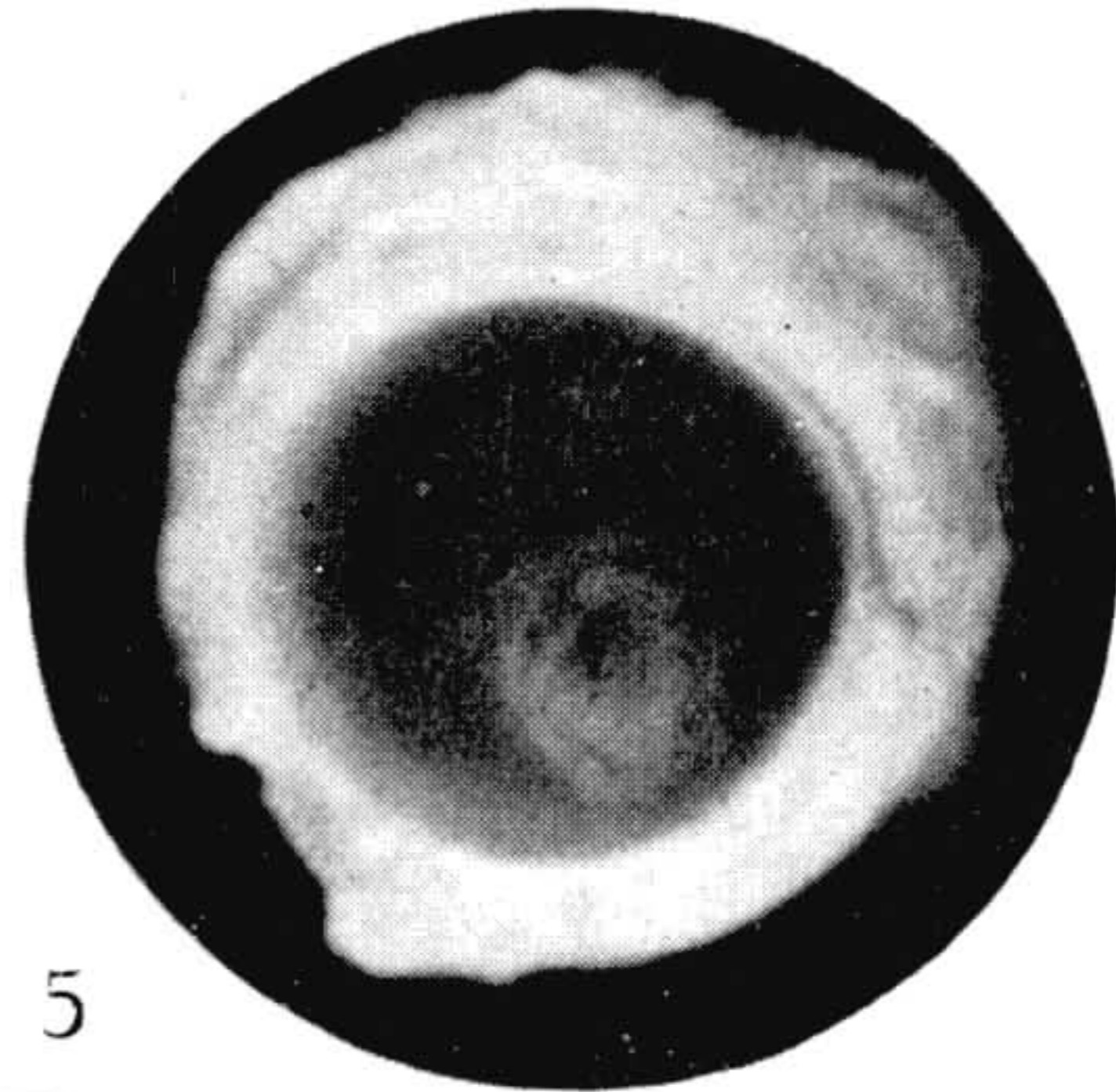
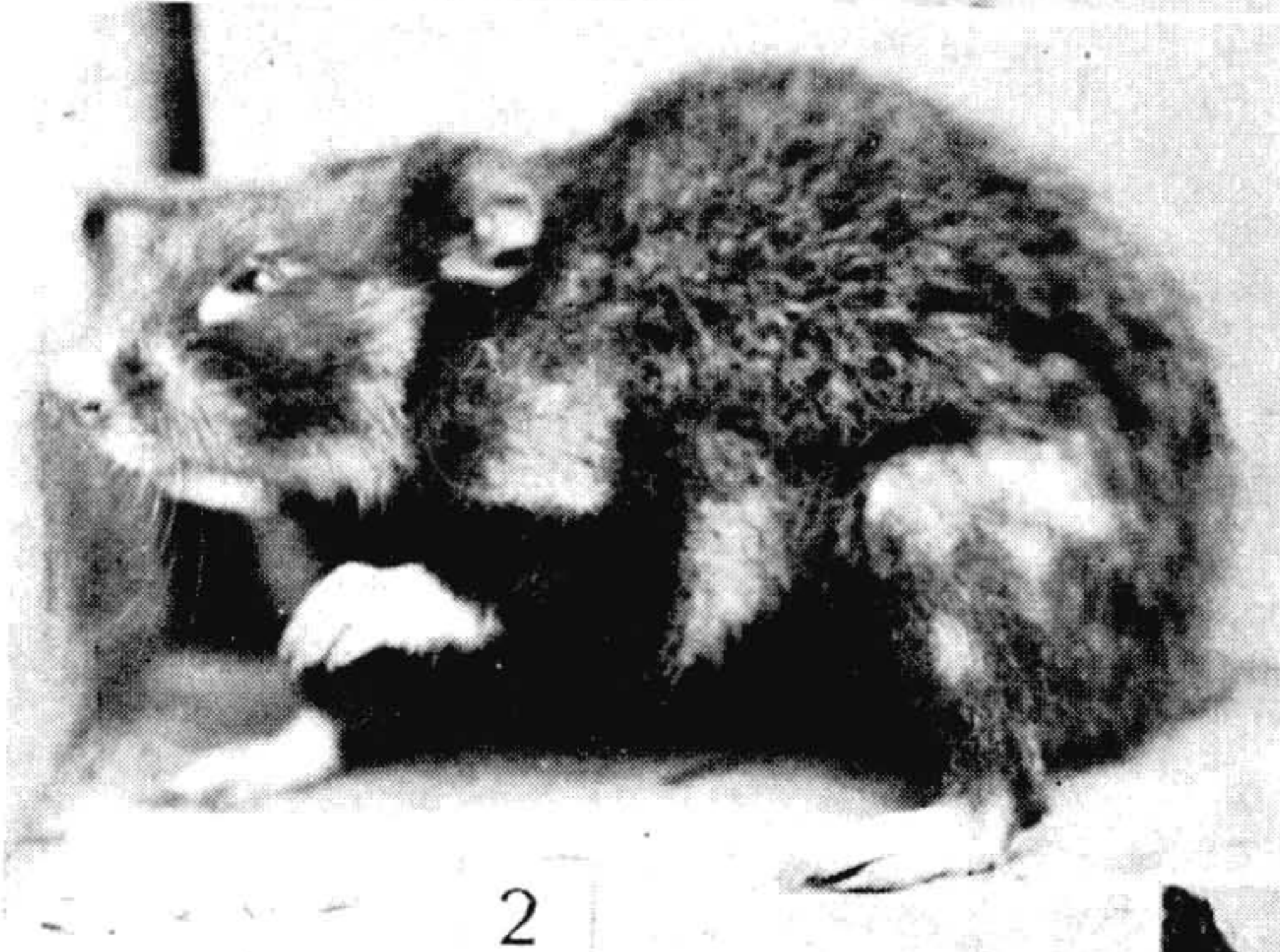
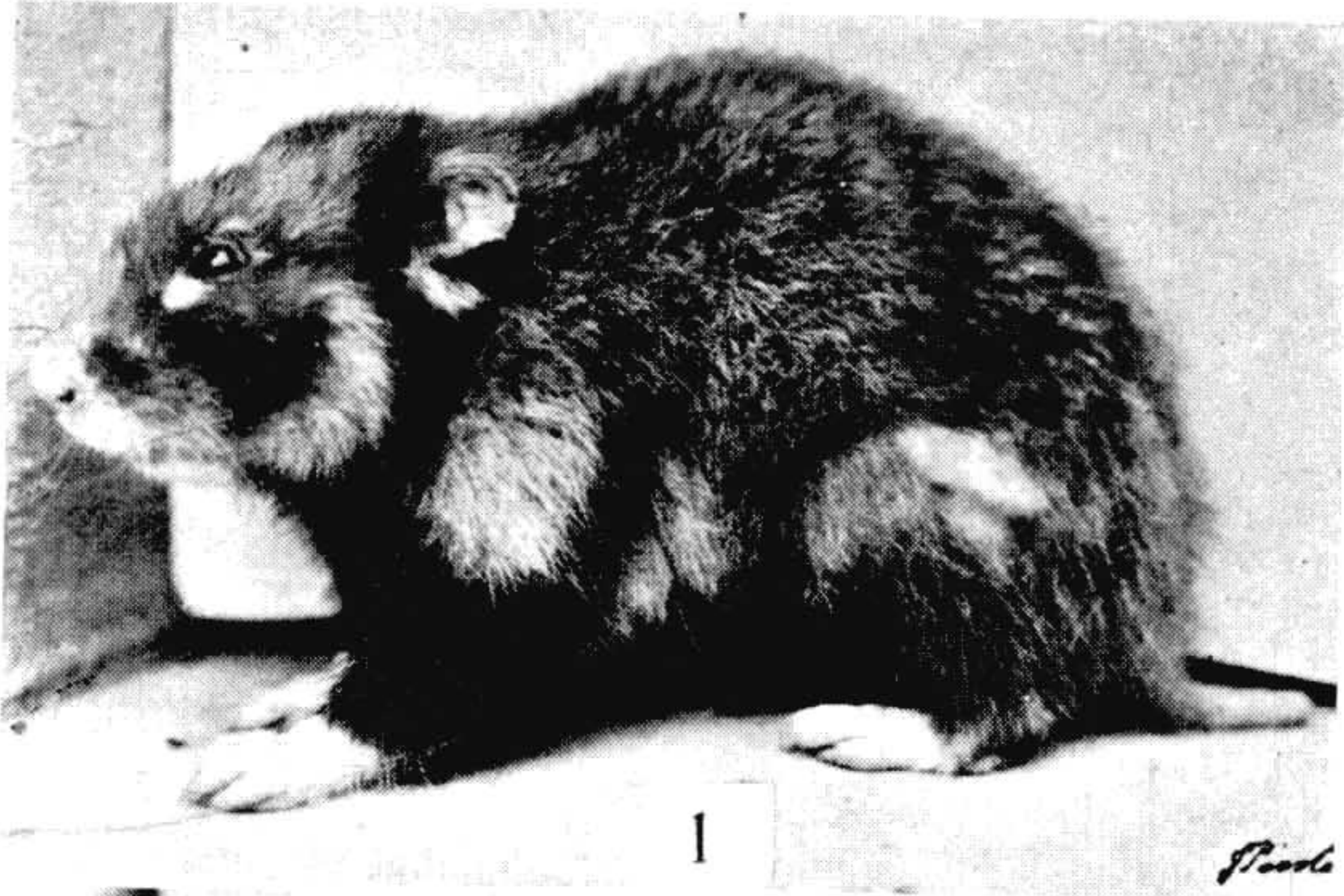
From the exposed we may conclude that the experimental infections obtained, present a complete analogy with those described in the Mediterrean Kala-azar.

On the other hand, the sero-agglutination test, as shown by us in a previous paper, allows no distinction of the species of *Leishmania*, as all the strains when recently isolated, have the same antigenic constitution which later on undergoes modifications when the *Leishmaniae* are preserved in culture for a long time.

Thus, we feel authorized to conclude that the agent of the visceral american leishmaniasis is identical with *L. infantum*.

Estampa 1

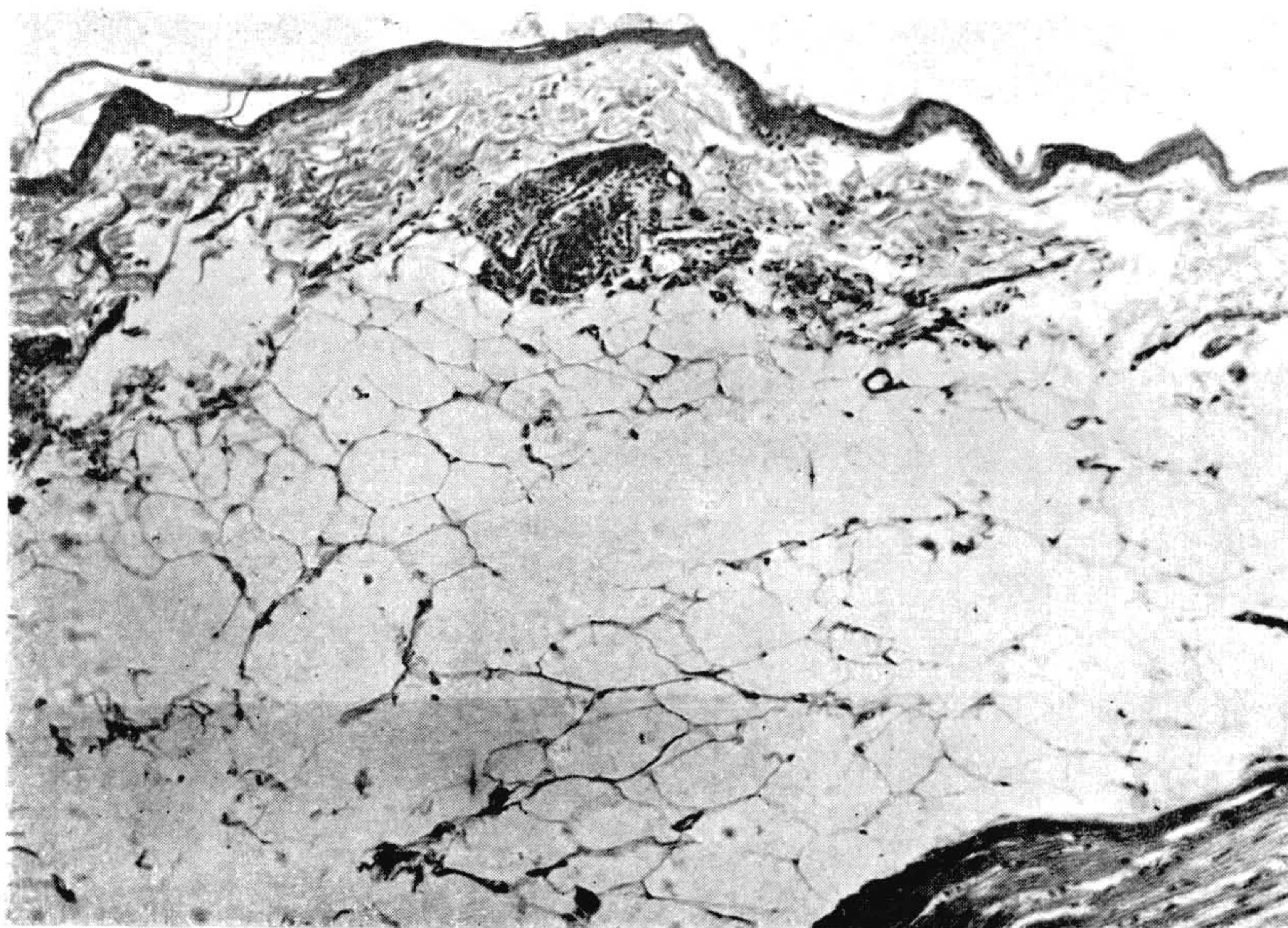
- Fig. 1 — Hamster n.º 17 — Tumefacção das patas.
Fig. 2 — Hamster n.º 17 — Tumefacção das patas.
Fig. 3 — Cão C — Tumefacção das patas (em 27-7-1938).
Fig. 4 — Globo ocular esquerdo do cão A (placa de keratite).
Fig. 5 — Globo ocular direito do cão A (placa de keratite).
Fig. 6 — Hamster n.º 8 — lesão cutanea da face ventral.



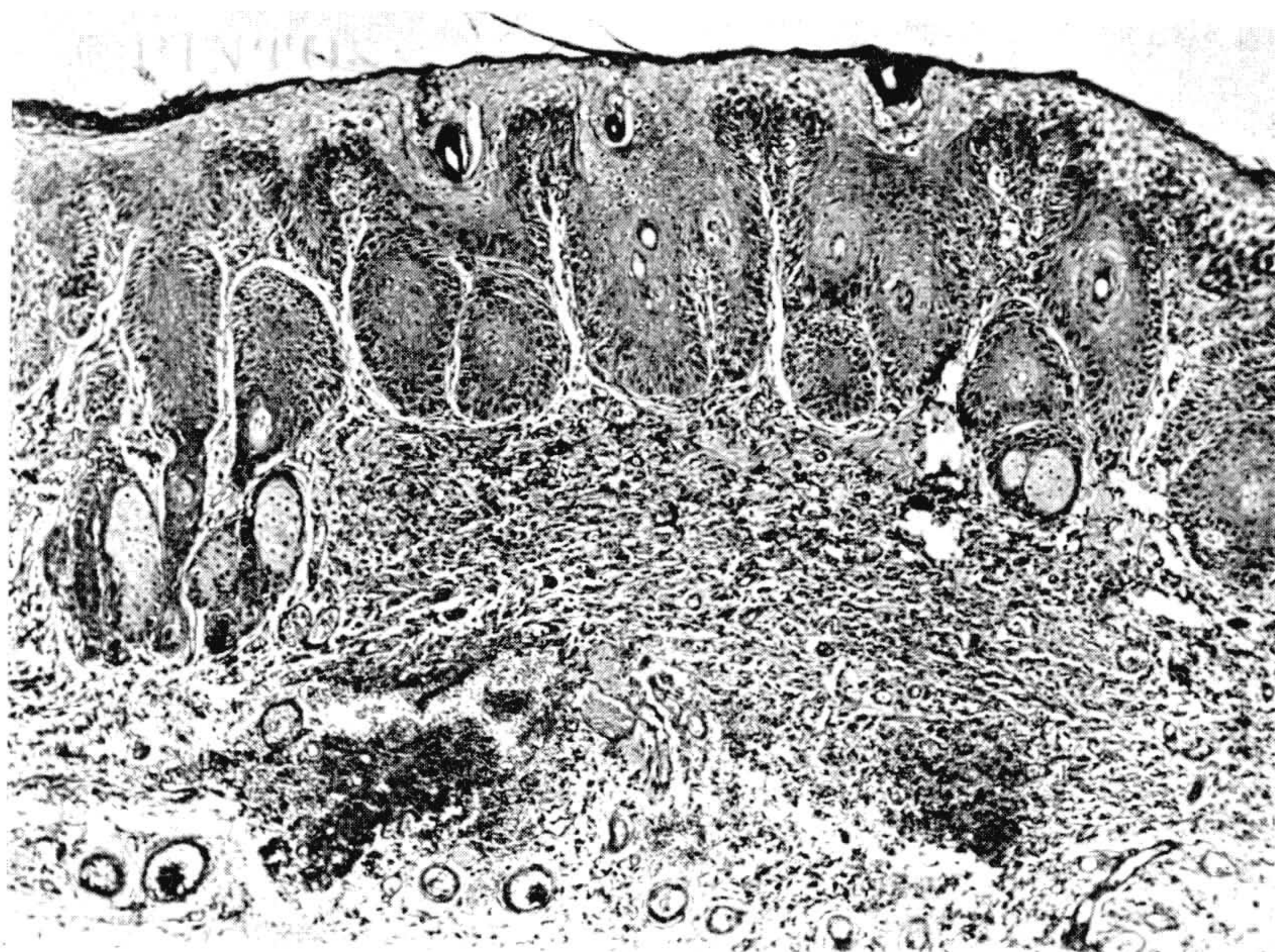
Cunha : Leishmaniose visceral americana.

Estampa 2

- Fig. 1 — Córte histológico da pelle do dorso do hamster n.º 6.
Fig. 2 — Córte histológico da pelle do ventre do mesmo hamster.



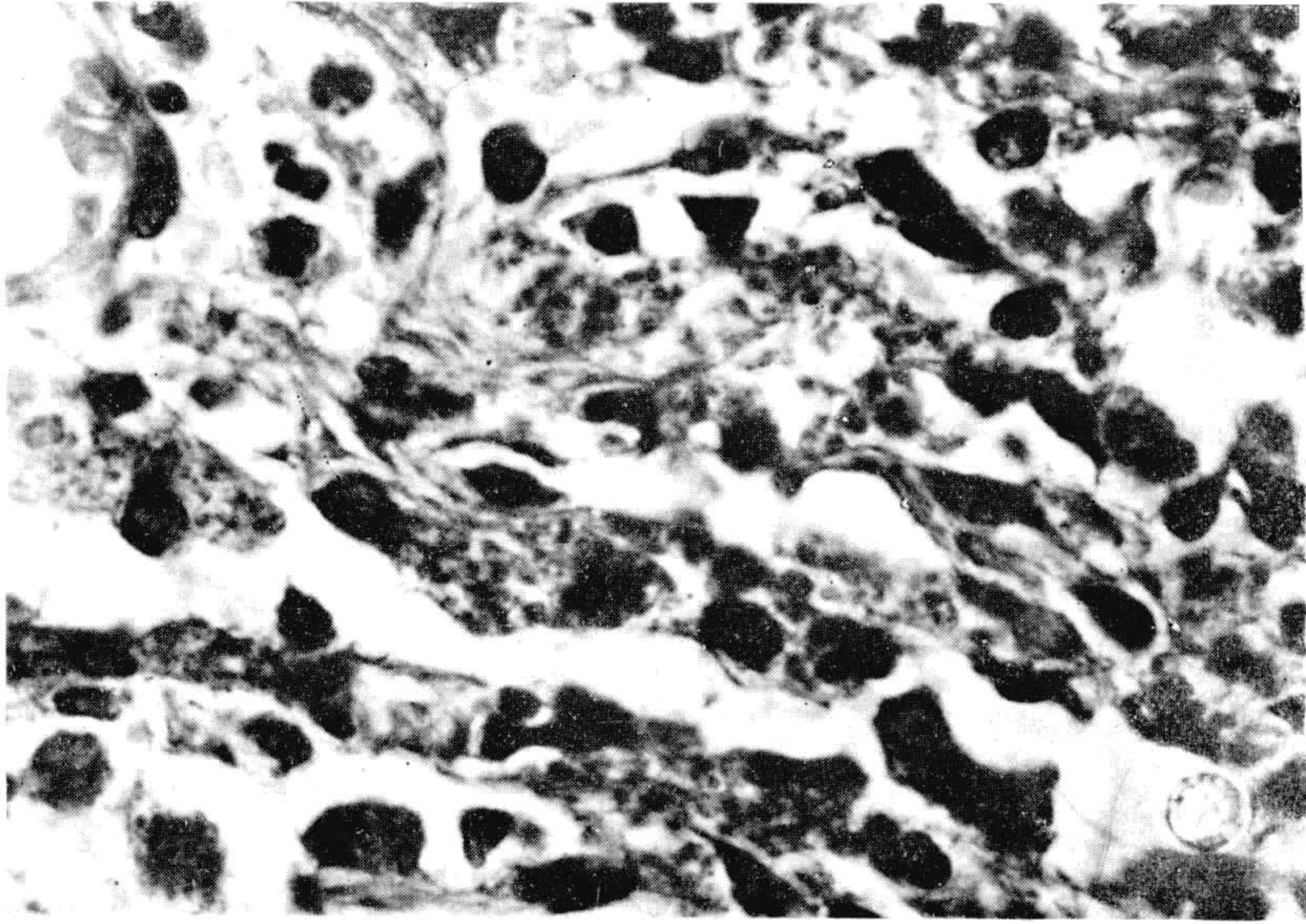
1



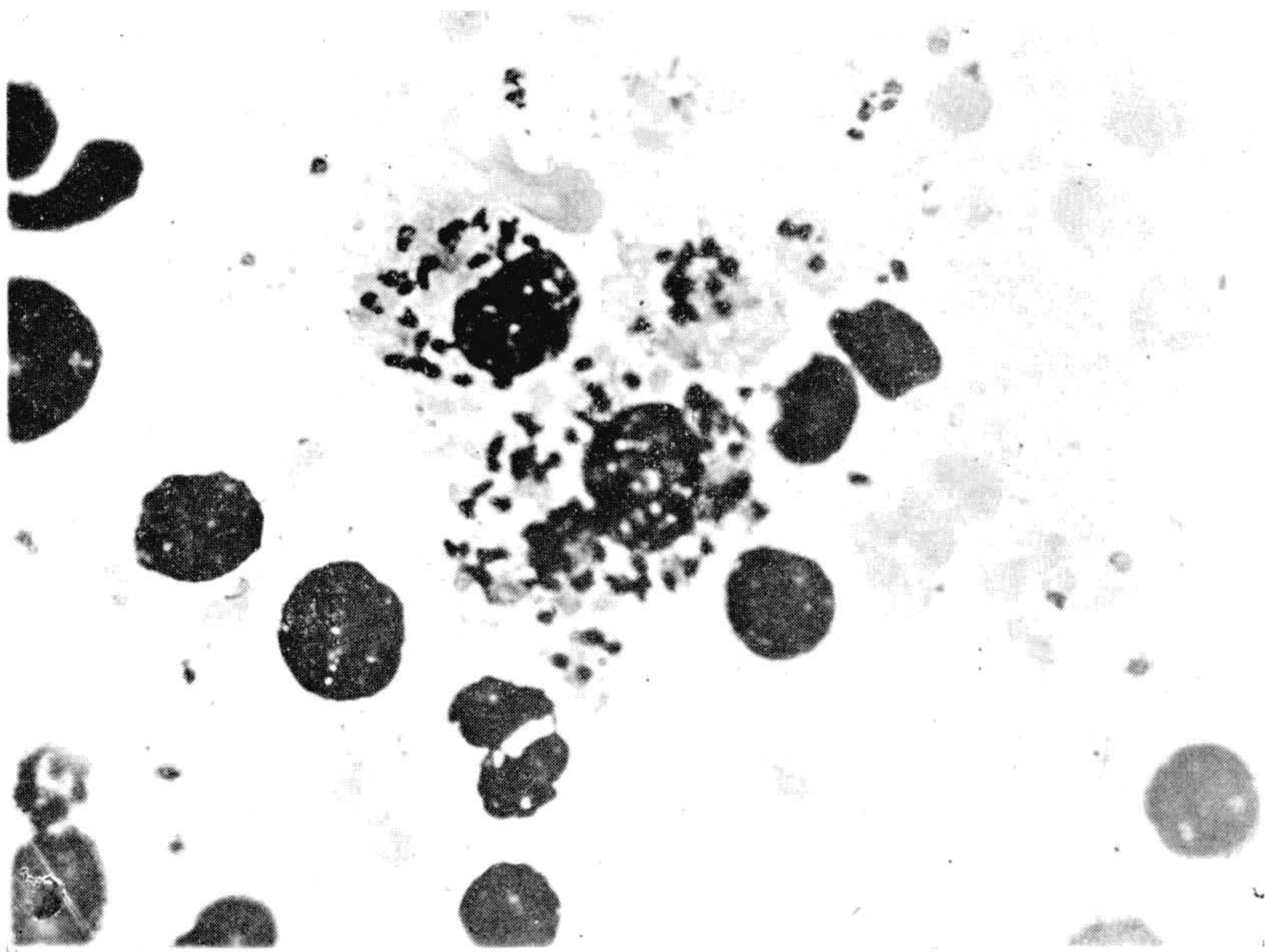
2

Estampa 3

Fig. 1 — Córte histológico da pelle do ventre do hamster n.º 6 (grande aumento).
Fig. 2 — Esfregaço de figado do hamster n.º 6.



1

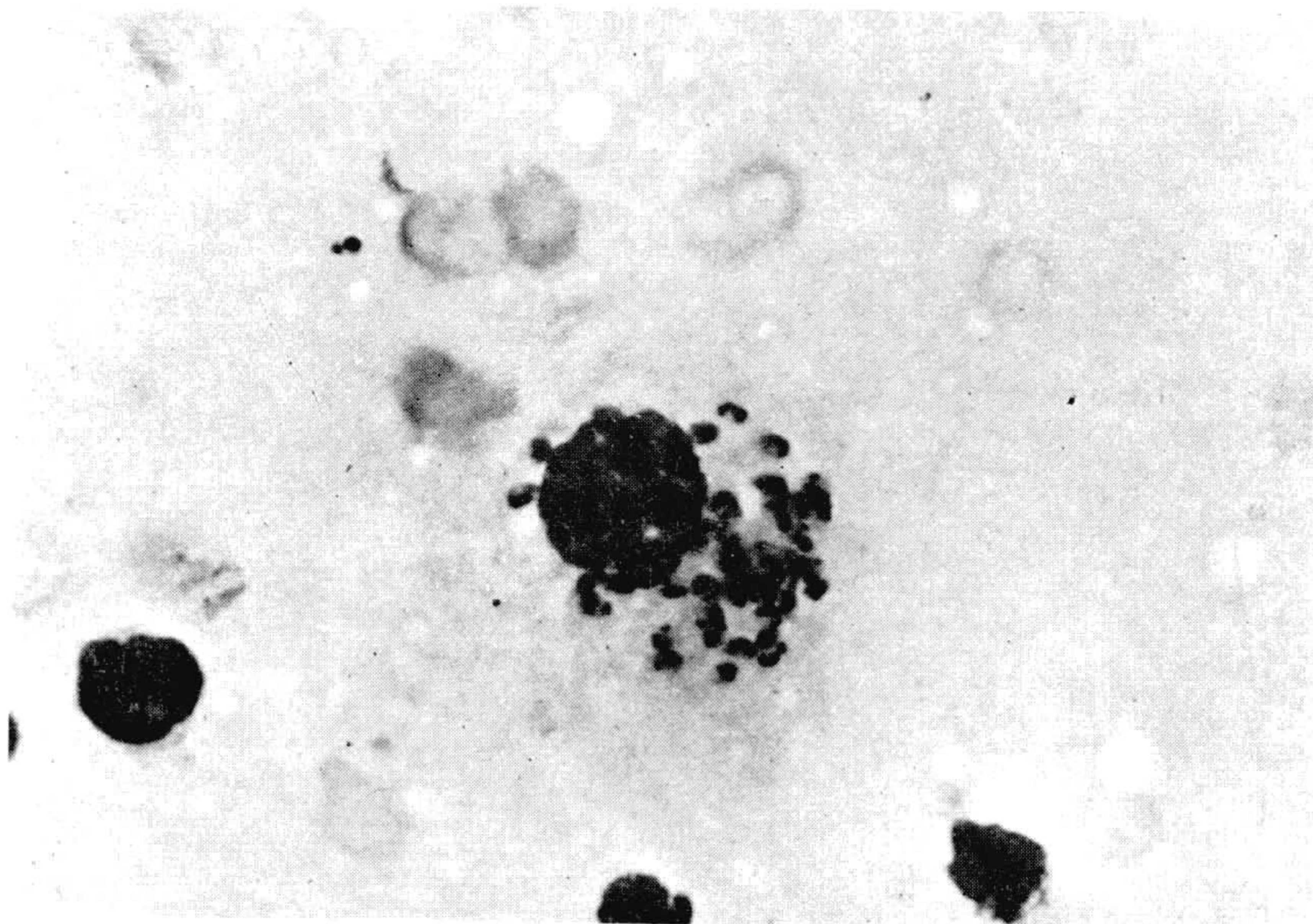


2

Estampa 4

Fig. 1 – *Leishmanias* no interior de um macrophago em esfregaço de figado do rhesus Teves.

Fig. 2 – Macrophagos contendo *Leishmanias* em esfregaço de baço do rhesus Teves.



1

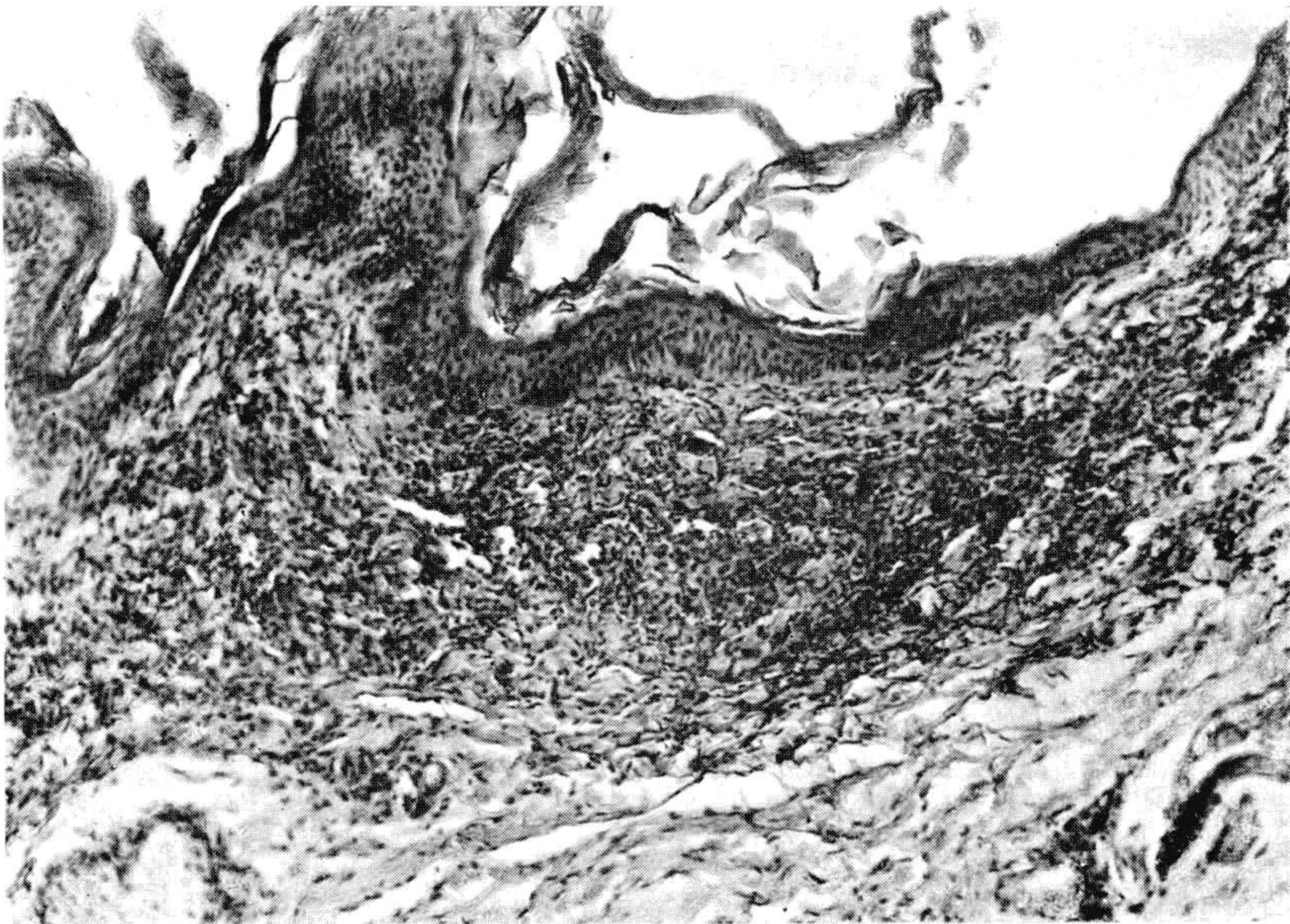


2

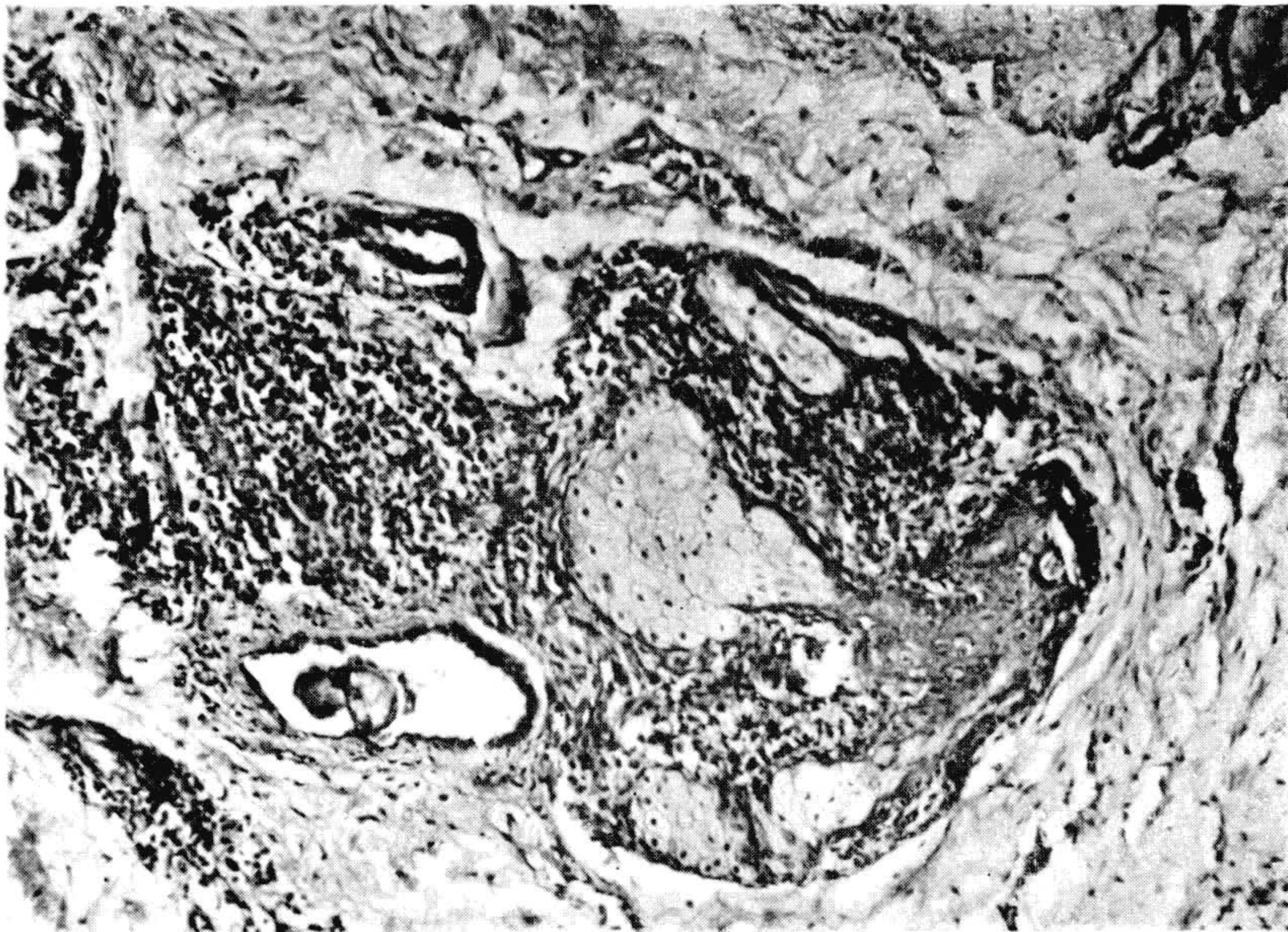
Estampa 5

Fig. 1--Córte de pelle da pata do cão C. Infiltração do chorion.

Fig. 2 - Córte de pelle da pata do cão C. Infiltração em redor do folliculo pillo-sebaceo.



1



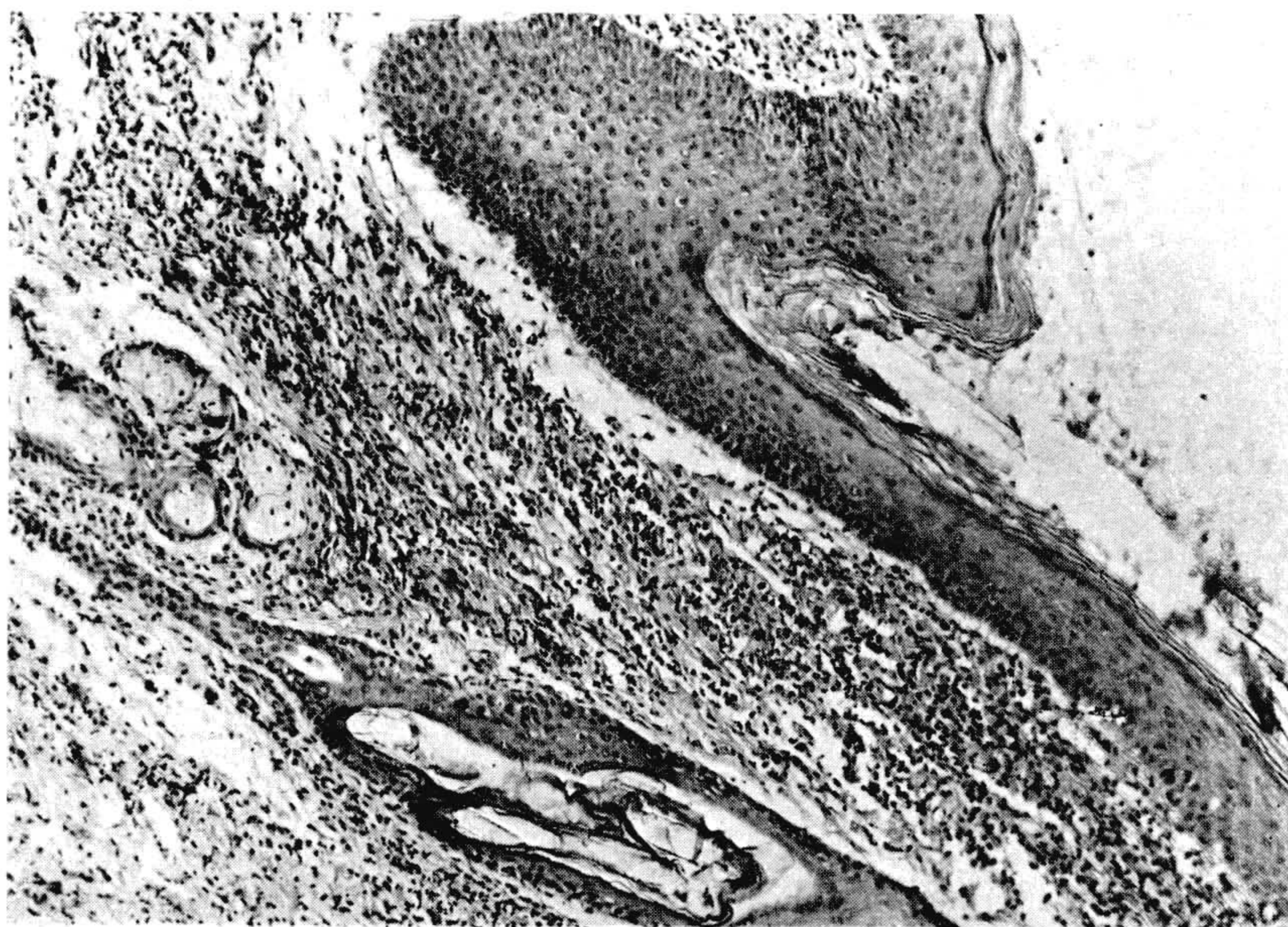
2

Cunha: Leishmaniose visceral americana.

Estampa 6

Fig. 1 -- Córte de pelle da pata do cão C. Infiltração uniforme do derma.

Fig. 2 -- Córte de pelle da região cervical do cão A, com grande augmento para mostrar os parasitas.



1

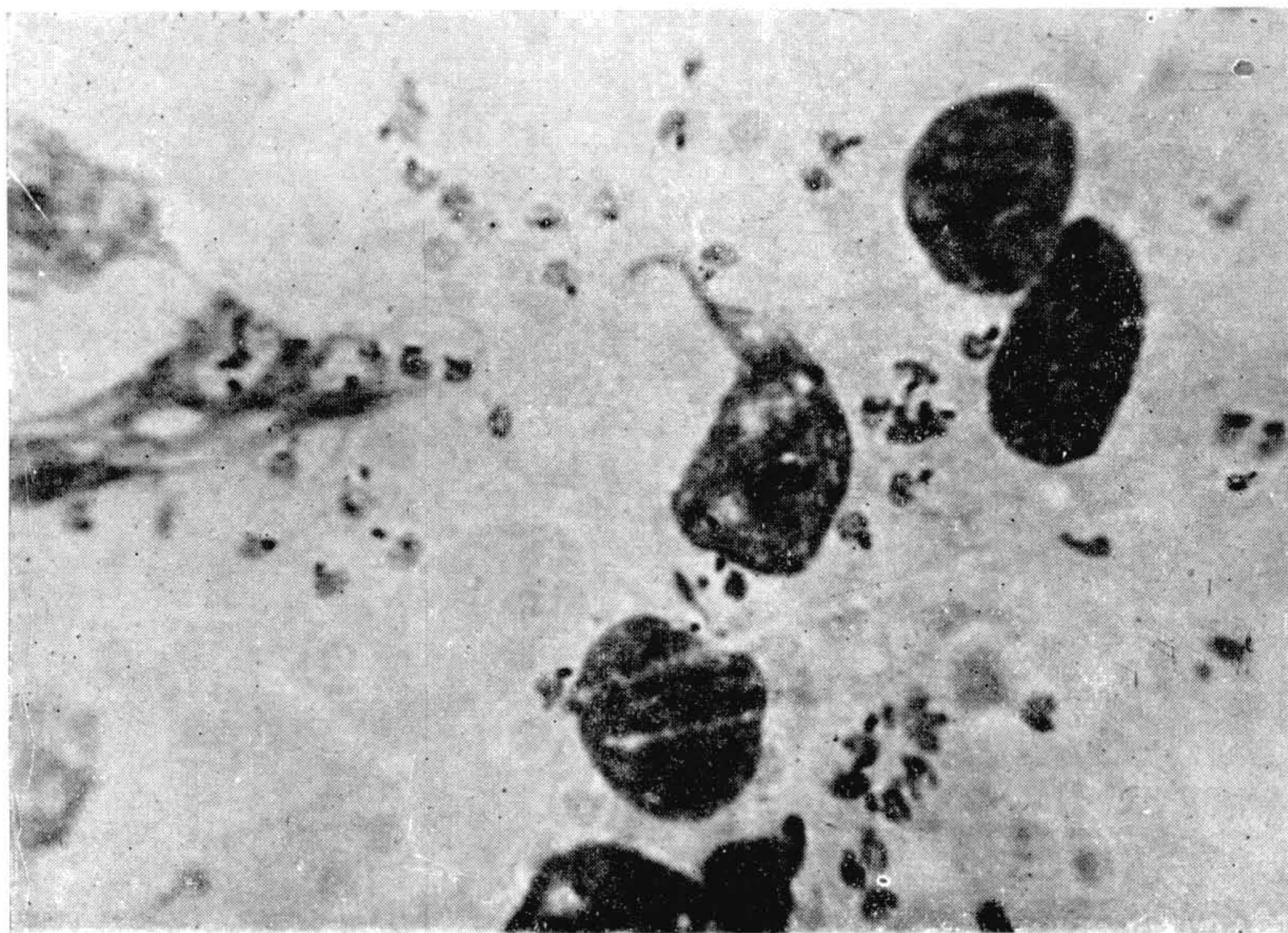


2

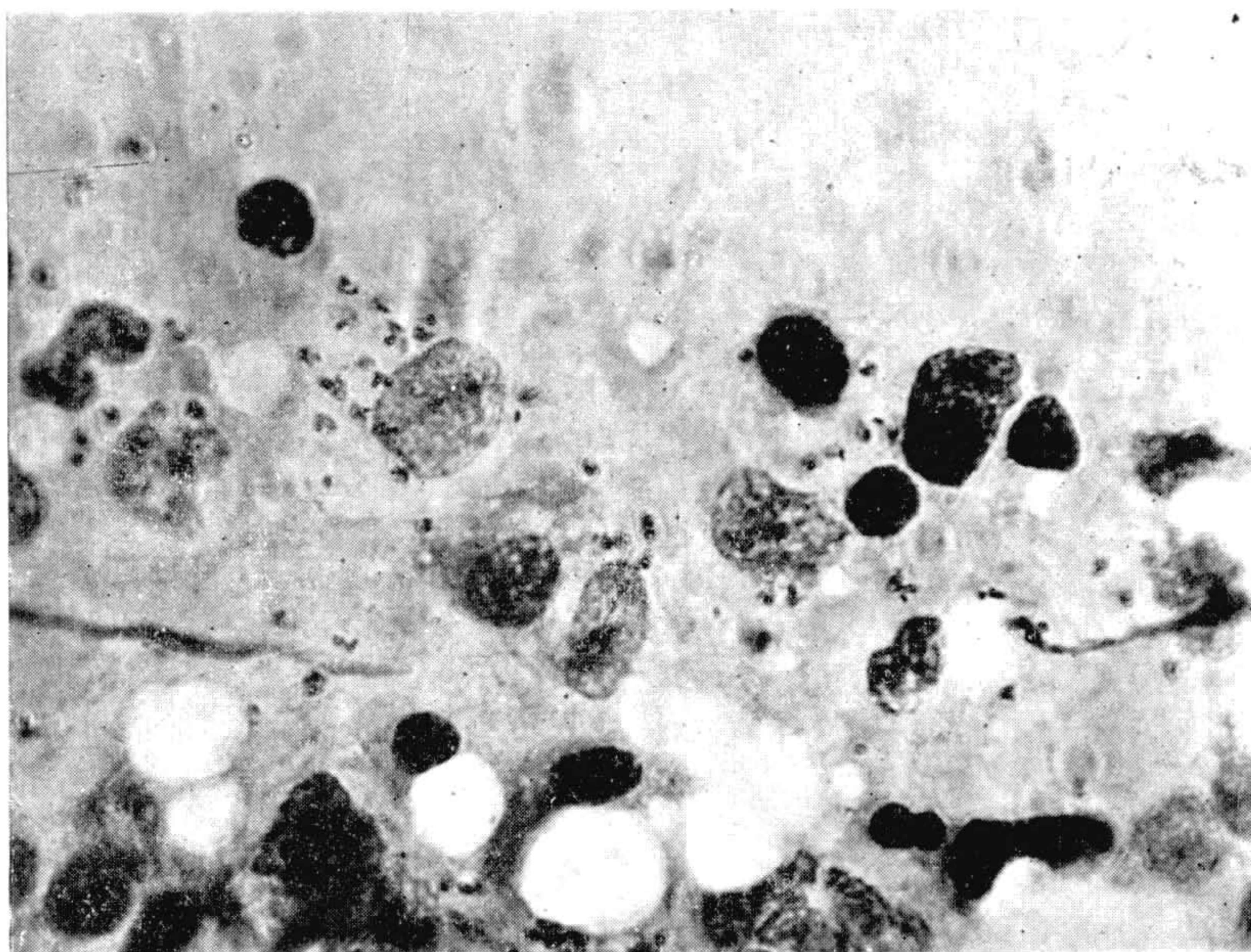
Estampa 7

Fig. 1 - *Leishmanias* em esfregaços do baço do cão A.

Fig. 2 - *Leishmanias* em esfregaço de medulla ossea do cão D.



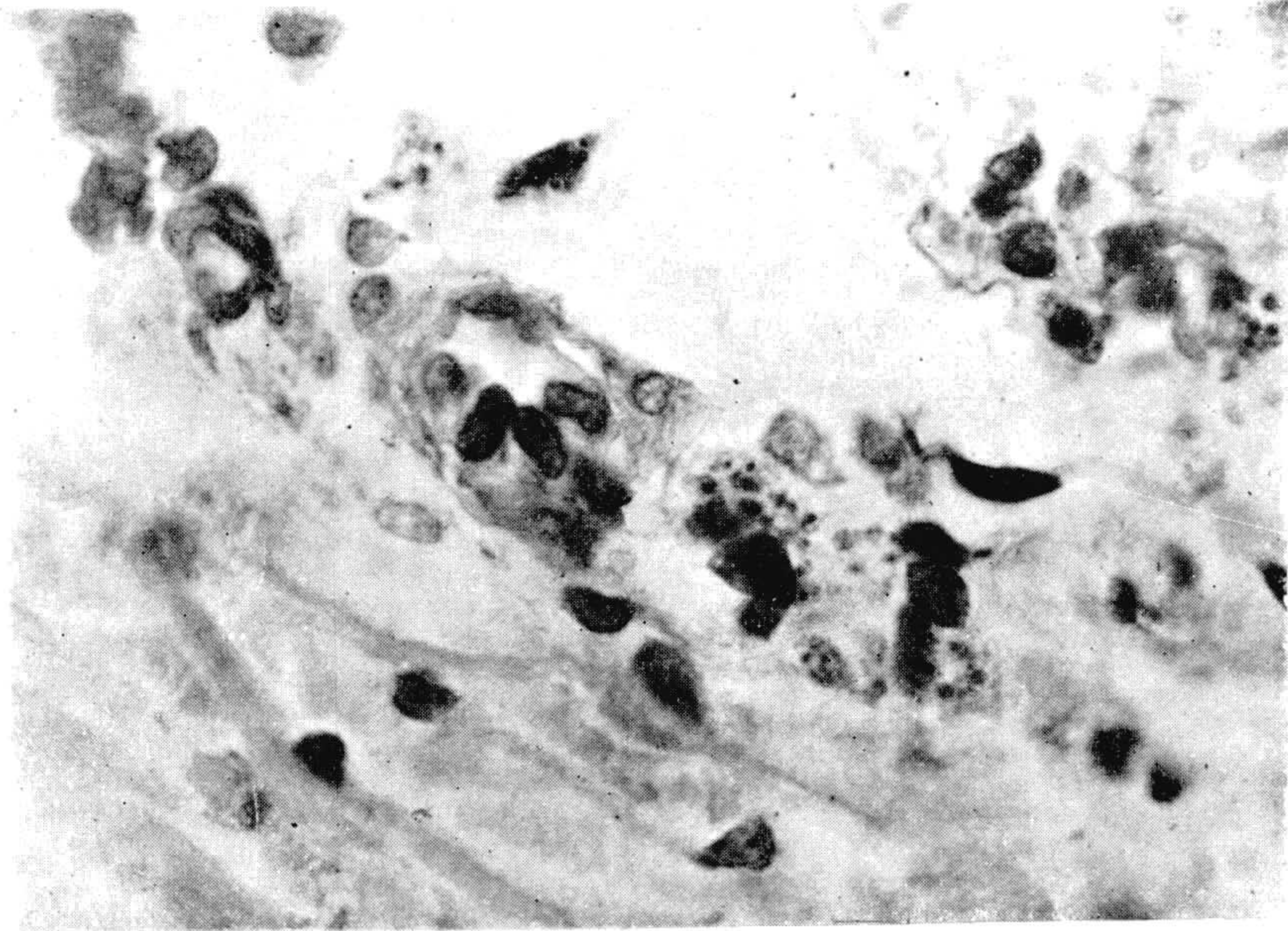
1



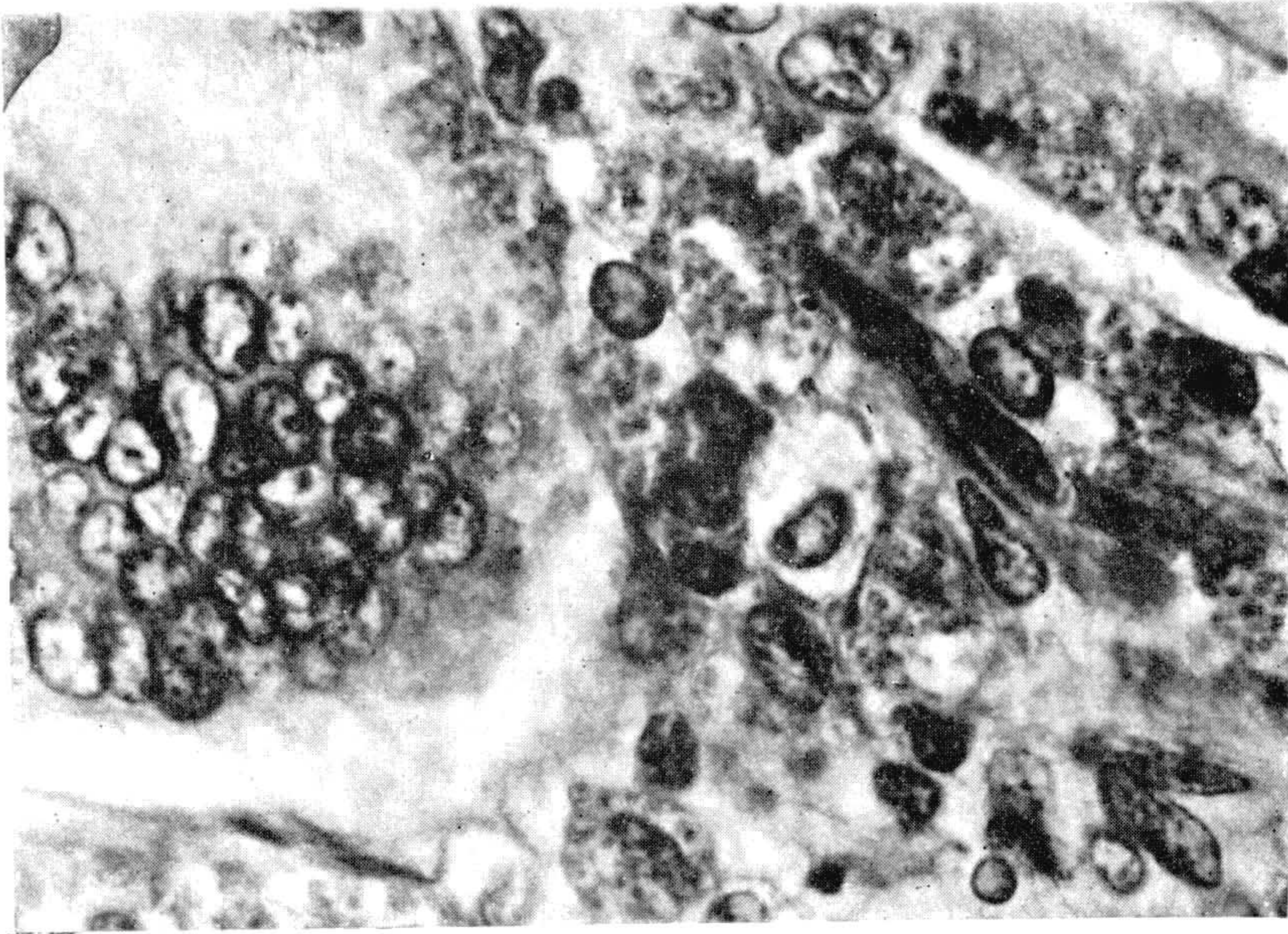
2

Estampa 8

- Fig. 1 - Córte mostrando *Leishmanias* na conjuntiva ocular do cão A
Fig. 2 — Córte de intestino do cão A mostrando *Leishmanias*.



1

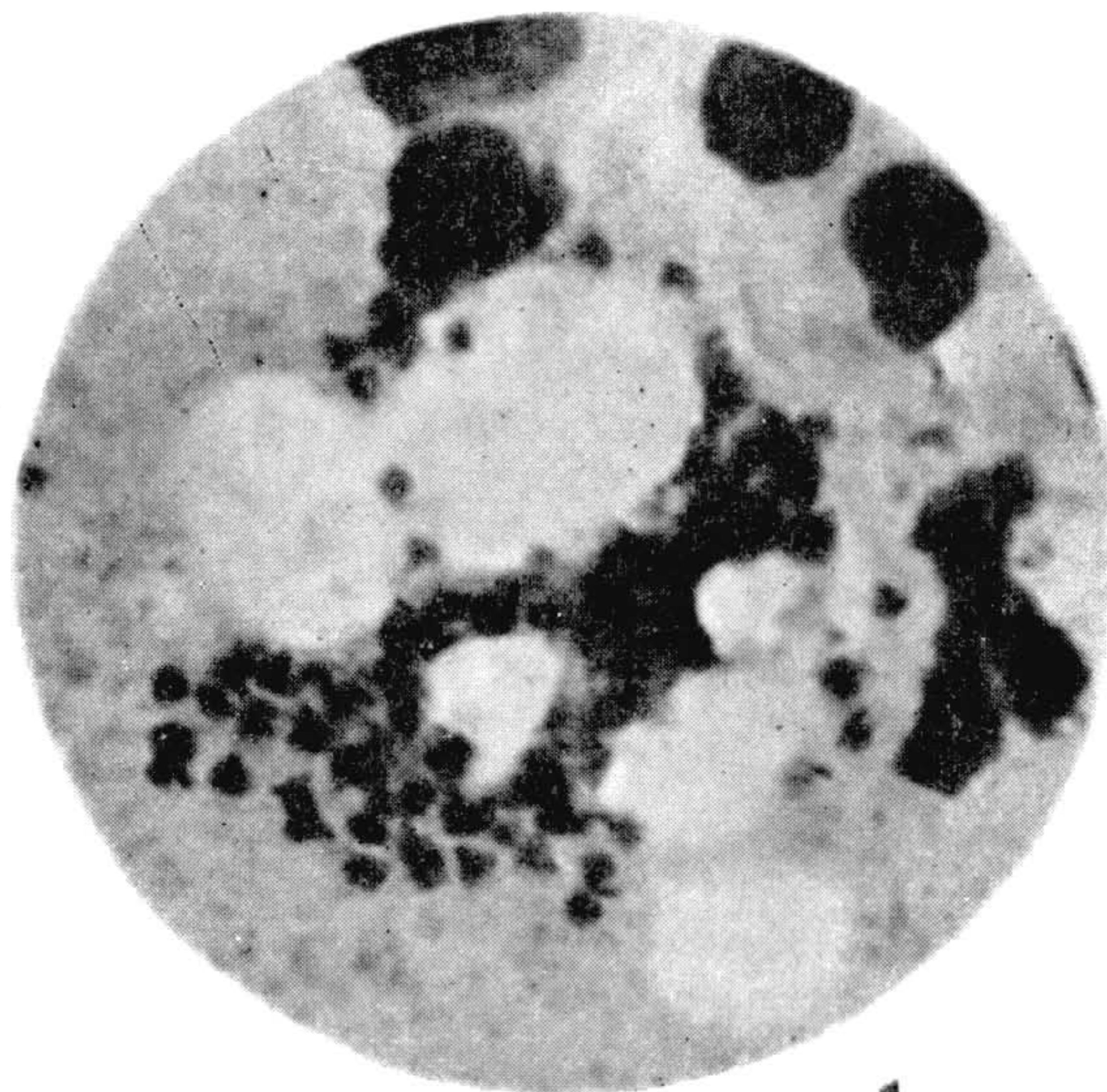


2

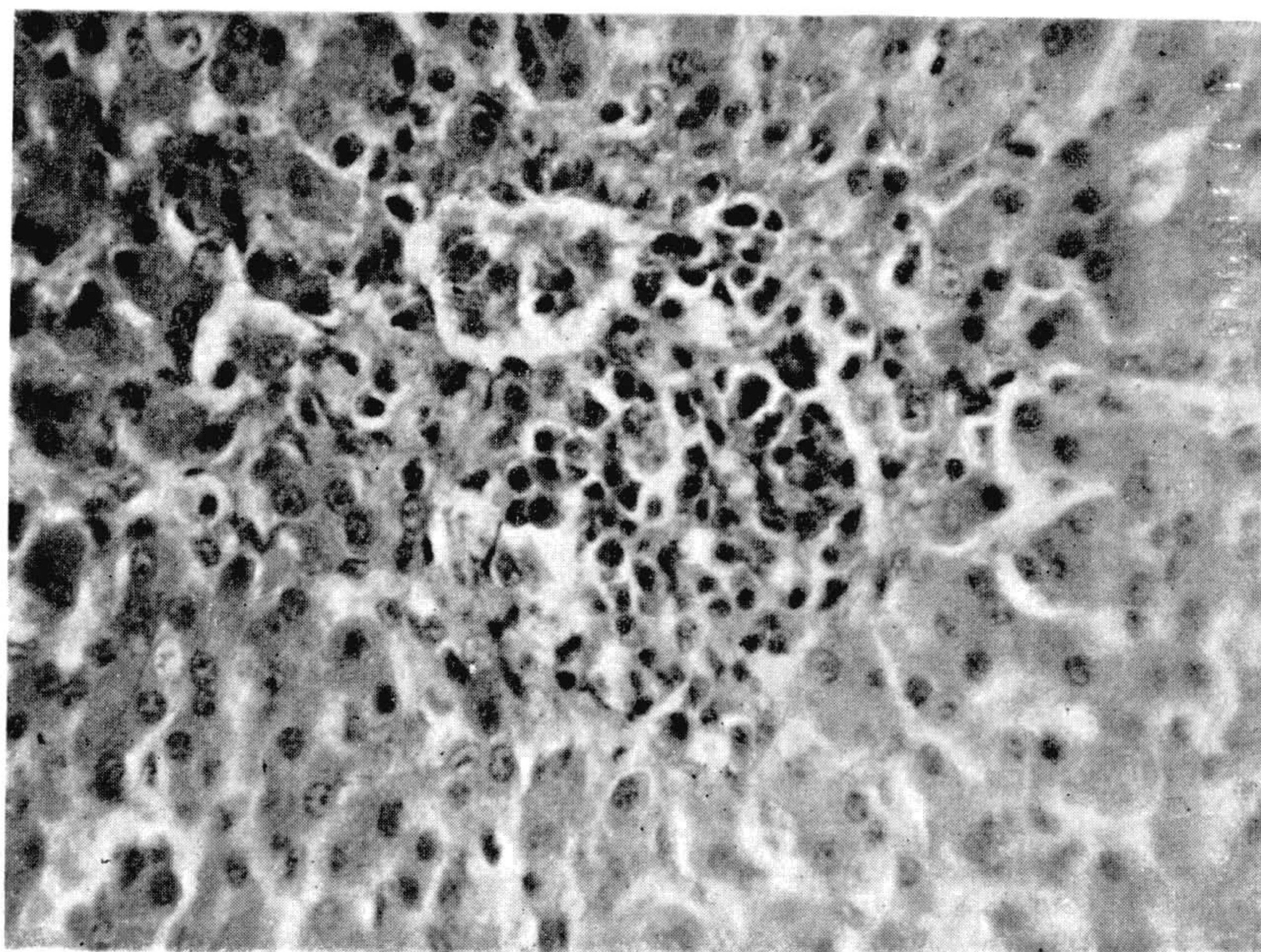
Cunha: Leishmaniose visceral americana.

Estampa 9

- Fig. 1 - *Leishmanias* em um ganglio lymphatico axillar do cão A.
Fig. 2 - Córte de figado do cão A mostrando a infiltração junto á veia central d olobulo.



1



2

Cunha : Leishmaniose visceral americana.