Revista Ibérica de Parasitología

TOMO XXII | ENERO a JUNIO 1962 | NÚMS. 1-2

BIOLOGIA DA *LEISHMANIA DONOVANI* EM RELAÇÃO COM A SUA ACÇÃO PATOGENICA E A EPIDEMIOLOGIA DO KALA-AZAR*

POR

*J. Fraga de Azevedo***

Sinto sobre mim a grande responsabilidade de vir ocupar-me de um assunto que tão bem trabalhado tem sido neste grande País que me acolhe e de me encontrar diante de cientistas de escol perante quem será difícil trazer qualquer informação que possa ter méritos de novidade.

Realmente, nomes como Pittaluga, Sadi de Buen, Gil Collado, Nájera Angulo, Castellar, Perianes, Sabater, Montin, Ahuir, Bayarri, Miranda e tantos outros teem contribuído notàvelmente, por diversos trabalhos originais, para o conhecimento de numerosos aspectos respeitantes à matéria de que me irei ocupar.

Por outro lado, adentro dos organismos científicos especializados, o Instituto López-Neyra de Parasitologia cuja generosa hospitalidade recebo neste momento, ocupa no Mundo um lugar sem rival, dada a sua unidade e originalidade de acção na ciência que cultiva, dada a profundidade com que actua e a especialização de que é dotado, pelo que tão requintado ambiente faz aumentar o encargo que ora sobrecarrega os meus ombros.

A par, no entanto, da grande responsabilidade que impera sobre mim, honra-me particularmente a distinção que orna o lu-

* Conferência realizada no Instituto López-Neyra de Parasitología (Universidade de Granada) em 31 de Outubro de 1961.

** Profesor del Instituto de Medicina Tropical de Lisboa.

gar que ocupo neste momento e obrigando-me à generosidade de V. Ex^as, o grande atributo dos homens superiores, permitir-me-ei abordar alguns aspectos da biologia da *Leishmania donovani* em relação com a su acção patogénica e a epidemiologia do Kala-azar.

1. *Introdução* :

Apesar de se verificar de alguns anos a esta parte uma redução apreciável na incidência das leishmanioses em certas zonas da área mediterrânica, área em que se incluem Portugal e Espanha, têm-se referido, por outro lado ai novos focos de doença, sobretudo após a última Grande Guerra, ou aumento dos casos nos focos antigos, o que prova que os assuntos respeitantes a essa endemia estão longe de se encontrar resolvidos. Pensei, por isso, de interesse vir aqui abordar alguns aspectos do problema, para que assim se pudessem discutir com a grande elevação que lhe garante a tão categorizada autoridade de V. Ex^as.

Não é. porém, apenas, na área mediterrânica que o assunto das leishmanioses apresenta ainda numerosas incógnitas, suscita dúvidas e reclama soluções.

Pode dizer-se, que a mesma situação se nos depara em todas as áreas de endemia, como aliás bem o deixa transparecer o oportuno relatório que sobre o assunto foi elaborado recentemente pelo Prof. Garnham a pedido da O.M.S. (Junho de 1960).

Ali é afirmado, na verdade, quanto à forma visceral, que «foi considerada como uma das doenças principais da India, já que a incidência em 1937 foi de 1 por 1.000 habitantes» e que «em qualquer local onde a doença exista, ela é potencialmente perigosa». Assim o prova realmente a recente epidemia do Sudão em 1959, com o registo de 10.000 casos. A grande epidemia ocorrida na India em 1946 é prova também do seu significado potencial.

Vindo aqui ocupar-me do problema da biologia da *L. donovani* terei ensejo de abordar alguns aspectos sob que há a encarar as leishmanioses viscerais, já que todos eles dependem do comportamento biológico do agente causal.

Desde o início, porém, uma dúvida se apresenta ao meu espirito: Há várias espécies de leishmanias patogénicas para o Homem, ocasionando neste manifestações variadas, ou há uma

só espécie capaz de se traduzir sobre o organismo humano por uma acção multiforme?

É inegável que a morfologia das leishmanias pelo menos apreciada, como tem sido feito sobretudo até aqui, pelo microscópio óptico, não permite qualquer diferenciação específica. O tipo *major* e o tipo *minor* descritos pelos autores russos para a *L. tropica* parece não ter consistência e a presença de 2 rizoblastos e dum citoplasma granuloso na *L. enrietti*, como se refere, exige novos trabalhos de confirmação. Esperamos que o microscópio electrónico, pelos detalhes com que permite o estudo dos microorganismos venha a contribuir para se definir a sua diferenciação específica.

Por analogia também com outros agentes patogénicos, a morfologia das leishmanias apreciada pelos meios ópticos correntes não basta para fazer a sua diferenciação específica.

Sem deixar de citar os agentes bacterianos, onde adentro dos vários géneros as espécies só podem distinguir-se por reacções biológicas, esse aspecto é mesmo mais evidente nos metazoários onde são numerosos os parasitas morfològicamente indistinguíveis más com comportamento biológico suficientemente marcado para justificar a sua classificação como espécies distintas. É o caso, por ex., do *Ascaris suum* do porco e do *Ascaris lumbricoides* do Homen, da *H. nana* do Homen e da *H. fraterna*, do rato, etc.

Se, porém, morfològicamente as leishmanias são indistinguíveis entre si, vejamos se há razões biológicas que justifiquem a sua distinção, através dos meios de estudo a que para isso se pode recorrer.

2. *Ciclo das leishmanias na Natureza e bases da sua classicação* :

Comecemos por recordar o ciclo das leishmanias na Natureza e que esquematizamos na fig. 1.

Pertencem estes protozoários ao grupo dos parasitas reticuloendoteliais, quanto à sua localização nos mamíferos que constituem os seus hospedeiros, admitindo-se que uma vez atingida uma célula endotelial aí se multiplicam por cissiparidade, resultando, numa fase final, a rutura da célula e libertação das leishmanias que irão invadir novas células por fagocitose destas, como foi verificado através da sua cultura em tecidos. Demais,

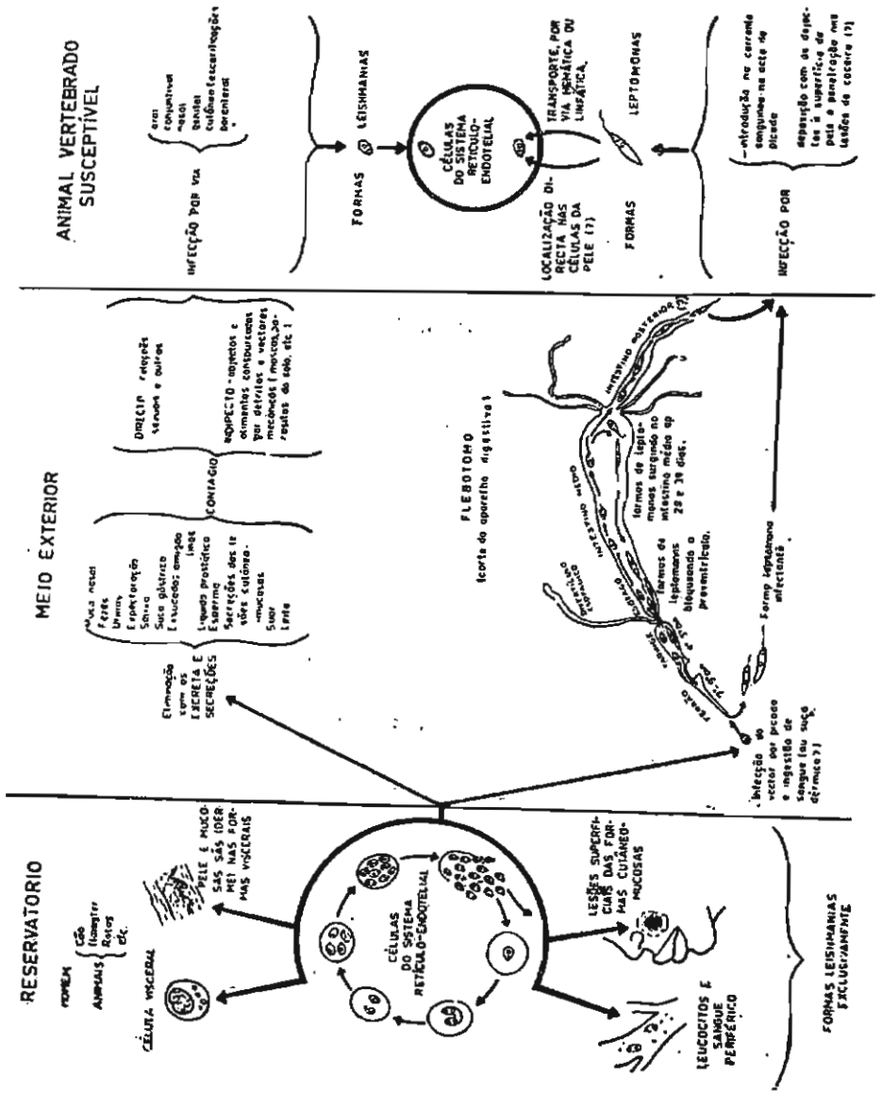


Fig. 1

Ciclo das leishmanias na Natureza (Orig.).

tratando-se de organismos imoveis, de parede rígida, não é de presumir que invadam activamente as células, como é admitido por alguns autores.

O ciclo continuará a repetir-se indefenidamente. O conceito de que poderiam multiplicar-se por esquizogonia não tem adiquirido adeptos.

Considerando sob o aspecto referido os reservatórios das leishmanias, sabemos bem que são diversos os mamíferos que desempenham esse papel e que é a partir deles que em circunstancias especiais podem atingir o Homem.

E, ao falar do problema da infecção humana pelas leishmanias, levanto evidentemente o problema da sua disseminação.

Por analogia com o que se passa com outros flagelados que podem encontrar-se no sangue é de presumir a intervenção dum artropodo hematofago que assegure a transmissão do parasita e que este sofra aí determinada evolução.

En tal sentido, e de acordo com alguns estudos experimentais e certos dados epidemiológicos, é bem sabido que são os flebotomos os artropodos incriminados nesse papel.

Em face do ciclo exposto podemos então colher dados para o estudo da biologia das leishmanias e consequentemente para a sua perfeita caracterização dos seguintes aspectos : a) Localização no organismo parasitado e manifestações ligadas a esta localização, considerando a natureza das lesões, a sua exteriorização e a imunidades causada ; b) distribuição geográfica ; c) comportamento fora do vertebrado, incluindo aqui o mecanismo da transmissão e a cultura.

Apreciemos cada um destes aspectos da vida do parasita, cujo resumo apresentamos no quadro I.

2.1. *Localização no organismo vertebrado.*—Referimos que é nas células reticulo-endoteliais que vivem as leishmanias. Diversos são os animais que podem parasitar (quadro I) e considerando aí sua localização topográfica podem-se descrever os seguintes tipos :

A) *Tipos de localização superficial,* onde se podem definir as quatro seguintes formas : a) *cutânea,* com localização em qualquer ponto da pele, representada pelo «Botão do Oriente» no Próximo Oriente e outros países, *Uta,* no Perú e diversos países da America Tropical, e *Pian das florestas* nas Guianas, Venezuela e Panamá ; b) com localização especialmente na orelha, pró-

pria de Guatemeala, Honduras Britânicas, Yucatan e Mexico, onde constitui a entidade mórbida designada por *Úlcera dos Chicleros;* c) *cutâneo-mucosa,* representada pela entidade conhecida por «Espundia» no Brasil e referida também no Perú, Equador e Chile ; d) *Formas atípicas* descritas na Etiópia, Venezuela e outros países.

B) *Tipos de localização profunda ou visceral,* onde se podem definir as três formas seguintes : a) *mediterrânea,* abrangendo a chamada área mediterrânica e Próximo Oriente, certos territórios da Africa do Sul do Saharâ, China do Noroeste e certos países da America Central e do Sul ; b) *sudanêsa,* abrangendo o Sudão e Africa Oriental (Kénia) ; c) *indiana,* abrangendo a India e China Oriental.

* * *

Ao abordarmos este importante aspecto da biologia geral das leishmanias importa esclarecer em que medida uma tal especificidade de localização e de manifestações é própria a uma determinada estirpe ; por outras palavras há formas sempre de localização cutânea ou há formas sempre de localização visceral ou pode a mesma estirpe dar manifestações dum e doutro tipo?

Para respondermos a estas dúvidas podemos basear-nos em dados epidemiológicos, em dados de observação clínica e em dados experimentais.

Os dados epidemiológicos não são a favor da perfeita identidade das espécies de localização superficial e de localização profunda, pois não há sobreposição geográfica das duas formas. Assim é que há áreas onde a forma cutânea é conhecida desde há muitos anos, como seja, por ex., o Iraque e onde o Kala-azar foi descrito apenas recentemente. Noutros países como, por ex., Portugal o Kala-azar é conhecido desde 1910 e sómente em 1943 se identificou o 1.° doente de leishmaniose cutânea de que se totalizam actualmente 11 casos. A sua distribuição faz-se por todo o território (fig. 2) sem coincidir com as áreas de maior incidencia do Kala-azar.

Mesmo nos países da área mediterrânica, como a Itália, as zonas de distribuição das duas formas não se sobrepõem, pois a forma visceral regista-se em todo o país, enquanto a cutânea se encontra sobretudo junto do Adriático. Assim, em certas áreas,

QUADRO I

Tipos de Leishmanioses (a)

Características principais	SUPERFICIAIS			PROFUNDAS		
	Cutânea ou clássica	Cutânea-mucosa	Formas aberrantes	Forma Mediterrânica	Forma indiana	Forma sudaneza
Agente causal	*L. tropica*	*L. brasiliensis*	Estirpes diversas	*L. infantum*	*L. donavani* típica	L. dermo-viscero-tropica
Distribuição geográfica e nome local	Área mediterrânica e Próximo Oriente (Botão do Oriente (c); Sudão, Etiópia, antiga Africa Ocidental Francesa, Republica do Chad, Nigéria do Norte, e Gana, e Gambia	Brasil (d) (Espundia) Perú, Equador, Chile, Panamá, Paraguai, Argentina, Bolivia	Vertentes ocidentais dos Andes no Perú, Guianas (Uta); Guiana, Venezuela e Panamá (Pian das florestas); Úlcera dos Chicleros (Guatemala, Mexico, Honduras Britânicas e Yucatan), forma leproide (Bolívia, Venezuela); forma etiópica (Etiópia)	Zona mediterrânica, Proximo Oriente, China (e), Nigéria do Norte, República do Chad, Africa Occidental Francesa e América Central e do Sul (Mexico, Guatemala, El Salvador, Venezuela, Colombia, Equador, Bolívia, Paraguai, Perú, Argentina, Brasil (g) e talvez Guiana Holandesa).	India Paquistão	Sudão e Africa Oriental (Kénia)
Tipo evolutivo	Carácter esporádico	Carácter esporádico	Carácter esporádico	Carácter esporádico	Carácter epidémico	Carácter epidémico
Principais manifestações clínicas	Lesões cutáneas	Lesões oro - nasais	Lesões cutâneas generalizadas (Uta e Pian das florestas) frequentemente localizadas na orelha (Úlcera dos Chicleros) ou cutâneo-mucosas, influencia dos insecticidas residuais (espurgo das casas)	Viscerais (frequentemente intestinais) e cutâneas	Viscerais (raramente intestinais) e frequentemente cutâneas	Viscerais (frequentemente intestinais) e frequentemente cutâneas
Profissão mais atingida	Populações rurais, estepes e desertos (forma húmida) e meios urbanos (f. s)	Populações selvaticas	Populações selvaticas	Populações rurais	Populações rurais	Populações rurais
Reservatório (b)	Homem, roedores diversos (gerbilos, merions e espermofilos), cão, urso cavalo, gato, raposa e chacal	Animais diversos (cão, paca, aguti)	Cão (uta); rato espinhoso (*Proechimys semispinosus*), cão e outros animais (Pian das florestas e Espundia)	Cão, chacal (área mediterrânica, China, Brasil), raposa (Brasil), gato	Homem	Desconhecido no Sudão. Talvez esquilos ou gerbilos no Kénia
Idade mais atingida	Todas as idades	Todas as idades	Todas as idades	Crianças de 1 a 4 anos (90 %) ou de idade mais elevada (China). Na America 85 % teem menos de 10 anos	Jovens adultos (60 %) e adultos	Adultos (66 %)
Sensibilidade às drogas	Sensível aos antimoniais	Relativamente resistente aos antimoniais, sobretudo as formas antigas; sensível a certos antibióticos (fumagilina, fungizona, Amphotericin B) e à pirime tamina e diamidinas	Como a forma cutâneo-mucosa, algunas estirpes são muito resitentes, à terapeutica habitual	Sensível aos antimoniais pentavalentes, diamidinas e antibióticos (fumagilina, fungizona e outros)	Sensível äos antimoniais pentavalentes (Por vezes resistentes)	Resistente aos antimoniais; sensível às diamidinas
Letalidade (f)	Não letal	De evolução lenta podendo ser letal	Como a forma cutâneo-mucosa	10 - 20 %	2 - 9 %	Cerca de 25 %
Influencia dos insecticidas	Eficiente nas áreas onde os flebotomos são domèsticos	Eficiente nalgumas áreas	Ineficiente	Eficiente em muitas áreas	Ineficiente	Ineficiente

(a) Esta diferenciação è apenas esquemática pois há todas as transições entre tipos considerados; (b) Citam-se apenas os mais importantes na epidemiologia das leishmanioses, (c) No Turquestão (Russia) descrevem-se dois tipos clínicos, a forma húmida (rural) e a forma seca (urbana), a 1ª seria da responsabilidade da *L. tropica major* e a 2ª seria causada pela *L. tropica minor;* (d) Formas exclusivamente cutâneas teem sido descritas no Brasil; (e) Recentemente foram referidos dois tipos de Kala-azar chinez· um na China Oriental, idêntico ao tipo indiano e outro na China do Noroeste, idêntico ao tipo mediterrânico; (f) Variável com o estado da doença; os n.ºs indicados são apenas orientadores e representam a letalidade média sob a acção da terapêutica corrente; (g) Há autores que consideram o Kala-azar do Brasil como intermediário entre o mediterrâneo e o indiano.

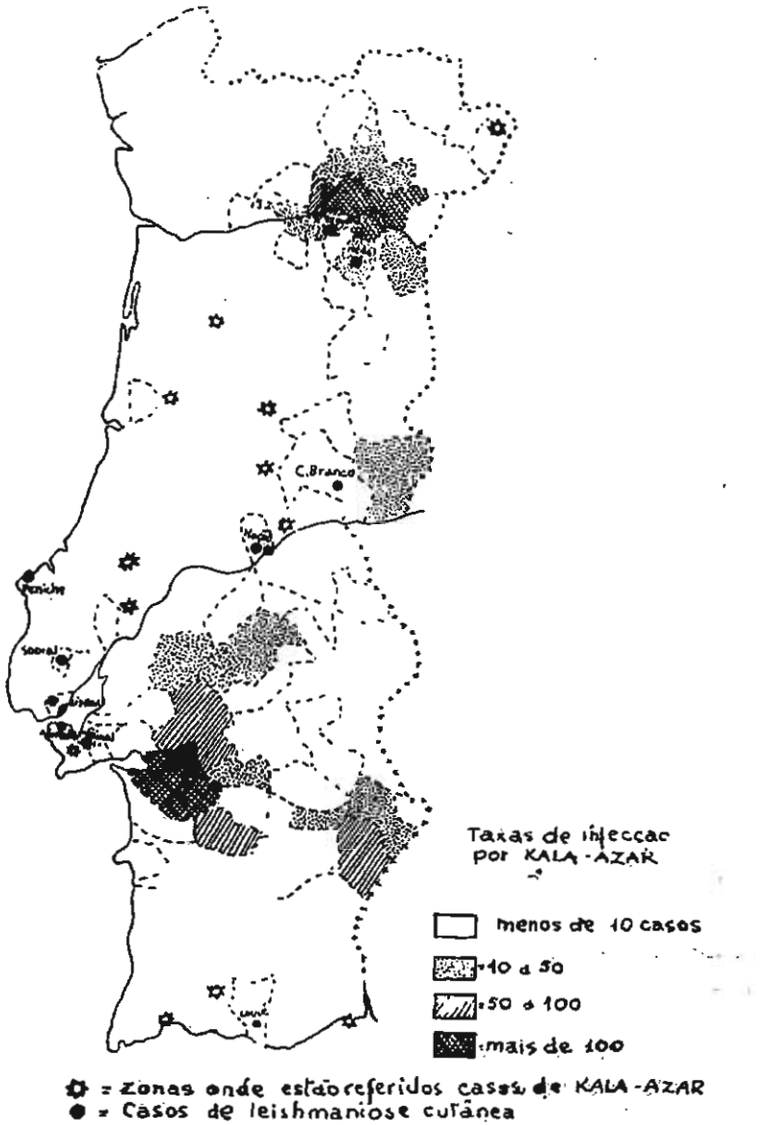


Fig. 2

Distribuição da leishmaniose visceral e cutânea (botão do Oriente) em Portugal.

como, por ex., a província de Abruzzi, onde de 1947 a 1956 se registaram 7.209 casos de botão do Oriente, houve apenas 11 casos de Kala-azar. Também na Índia a forma cutânea predomina na parte occidental, enquanto a visceral é mais frequente na zona oriental.

Para alguns autores (Garnham, 1960) esta diferenciação estará relacionada com as espécies de flebotomos que interveem na disseminação das leishmanias e ainda com as espécies de animais reservatórios.

Os dados de observação clínica de que podemos dispôr, posto que escassos, são a favor de que, pelo menos em certos casos, determinadas estirpes podem dar lugar, quer a formas viscerais quer a formas cutâneas. Assim é que ainda recentemente em Paris a transfusão de sangue proveniente dum doente com leishmaniose cutâneo-ganglionar deu lugar a uma forma visceral no receptor.

Diversos trabalhos experimentais são também a favor de que as formas viscerais se podem verificar em animais a partir de estirpes cutâneas do Homem e que com a mesma estirpe se podem obter experimentalmente, quer formas viscerais, quer formas cutâneas, o que depende de vários factores que nos escapam, mas me particular da via de inoculação.

Assim é que sabendo-se que a *L. tropica* pode ser viscerotropa se inoculada por via intraperitoneal, pretendem-se estabelecer as seguintes gradações das leishmanias, considerando o seu viscerotropismo: típica viscerotropa - *L. donovani;* menos viscerotropa - *L. infantum;* viscerotropa dermente - *L. tropica* e sem viscerotropismo - *L. braziliensis*.

Não deve esquecer-se, porém, que mesmo a *L. braziliensis* é capaz de se comportar como viscerotropa se inoculada intraperitonealmente no hamster e no rato e que a *L. donovani* é capaz de originar apenas formas cutâneas e cutâneo-mucosas nos macacos *Cercopithecus*.

Portanto, os dados obtidos do estudo da acção patogénica experimental das leishmanias que tão dicisiva contribuição têm trazido á diferenciação bacteriana não têm conduzido aqui a quaisquer resultados, antes tem lançado mais confusão, se considerarmos que a mesma estirpe pode ter comportamento diferente nos animais conforme a via de inoculação utilizada.

Parece, pois, que baseados sobretudo nos dados clínicos, epidemiológicos e ecológicos antes que em dados experimentais é justificável aceitar a diferenciação específica das leishmanias e não um conceito umicista como por vezes se vê referido.

É que considerando a falta de concordancia entre os dados que nos oferece o desenrolar natural da endemia e o seu estudo experimental, penso que devem ser os primeiros a marcar a posição a tomar, já que os 2°s. se processam em condições artificiais. Demais, em muitas situações semelhantes referentes a outras doenças parasitárias, tem-se dito que os resultados dos estudos experimentais devem ser transportados ao terreno sempre com a maior reserva e prudencia.

2.2. *Imunidade.*—Há imunidade perante uma determinada doença infecciosa quando o respectivo agente causal não pode desenvolver-se num dado organismo em virtude de este dispôr de anticorpos impeditivos da infecção. Ao lado da imunidade pode definir-se a resistencia natural ou intolerância, quando o organismo não oferece condições para o desenvolvimento do respectivo agente causal, certamente como resultado de lhe ser desfavorável a sua constituição bio-química.

No caso das leishmanias, embora se tenha tentado fazer a diferenciação das espécies pelas provas serológicas de aglutinação e outras (R.F.C., Rickenberg, inibição do desenvolvimento cultural, etc.), os resultados, embora auspiciosamente apresentados por Noguchi não têm sido por qualquer forma concludentes em face de trabalhos ulteriores de autores diversos.

No entanto, tem-se provado que tanto naturalmente como experimentalmente ocorre o desenvolvimento de anticorpos imunizantes nas formas cutâneas, tipo botão do Oriente e que não há imunidade cruzada viscero-cutânea.

Trabalhos experimentais recentes, demonstraram também que reacções cruzadas se verifican no Homem com estirpes de *L. donovani,* como pode ser apreciado pela intradermo-reacção. Também a prova de Montenegro se mostrou positiva em doentes do Kénia, onde o Kala-azar semelha o sudanez e negativa nos casos de Kala-azar brasileiro e indiano, o que prova o parentesco, pelo menos antigénico, existente entre a *L. braziliensis* e a leishmania do Kala-azar do Kénia e a ausência de parentesco entre essa forma e a leishmania visceral da Índia e do Brasil. Neste último país, a R.F.C. practicada com antigénios de bacilos ácido-resistentes foi positiva em todos os casos de

Kala-azar e negativa nas formas cutâneas o que confirma a diferente estrutura antigénica dos respectivos agentes causais. A positividade da mesma reacção practicada con qualquer antigéneo de *L. braziliensis*, de *L. tropica*, de *L. donovani* e de *Schizotrypanum* na Úlcera dos Chicleros prova, no entanto, a identidade antigénica das leishmanias desta doença e dos referidas. A mesma reacção foi negativa nos casos de leishmaniose leproide da Venezuela, o que demonstra ainda a diferente constituição antigénica entre a respectiva estirpe causal e a *L. braziliensis*.

Experimentalmente verificou-se também que as provas de imunidade cruzada entre estirpes de *L. donovani* e dum roedor (esquilo) do Kénia não se verificaram com a *L. tropica*, o que prova a sua diferente constituição antigénica. Sabe-se ainda que a *L. braziliensis* tem um comportamento perante os medicamentos, de entre os quais certos antibióticos, diferente da *Leishmania donovani*, o que é também prova de particularidades biológicas próprias a cada uma delas. Ainda a vacina preparada com estirpes locais revela-se eficiente na prevenção do botão do Orient e ineficiente no caso da leishmaniose braziliense, o que confirma a diferença nas particularidades biológicas dos respectivos agentes causais.

Adentro da *L. tropica* foi também verificado que a estirpe de Jerichó imuniza contra a estirpe homologa e não contra a de outras áreas, particularmente do Turquestão e que a estirpe da leishmaniose cutânea humida infecta por inoculação 100 % dos gerbilos, enquanto a da forma seca infecta apenas 1 %. Além disso a inoculação experimental ao Homem da estirpe da forma seca ou humida reproduz sempre a forma do dador.

Na Natureza foi verificado também que as estirpes do botão do Oriente são imunizantes, pelo menos para as estirpes homologas, mas não deve esquecer-se, porém, que é apontada no Turquestão a recidiva da leishmaniose cutânea em 21 % dos casos. Provas de imunidade praticadas com a *L. tropica* e a *L. gymnodactyli* dum lacertideo (Gecko) demonstram também o parentesco antigénico entre as referidas leishmanias.

2.3. *Distribuição geográfica.*—Se considerarmos a distribuição geográfica das leishmanias, podemos dizer que 3 regiões bio-gráficas há que considerar (fig. 3) : a região paleartica, onde existem 2 tipos dominantes da forma visceral, o tipo mediterrânico e o tipo indiano, além do tipo cutâneo clássico limitado à

zona occidental ; a região etiópica, com o tipo visceral próprio do Sudão e Kénia, o tipo visceral clássico mediterrânico e o tipo de botão do Oriente circunscrito a certas áreas ; e a região neotropical com vários tipos cutâneos ou cutâneo-mucosos e o tipo visceral mediterrânico.

Há, pois, uma evidente diferenciação geográfica das leishmanias que não podemos compreender com base nos conhecimentos actuais. Trata-se de espécies biológicas ou há factores locais, quer ligados à população, quer às condições de disseminação ou ao clima que condicionan tão diferente comportamento?

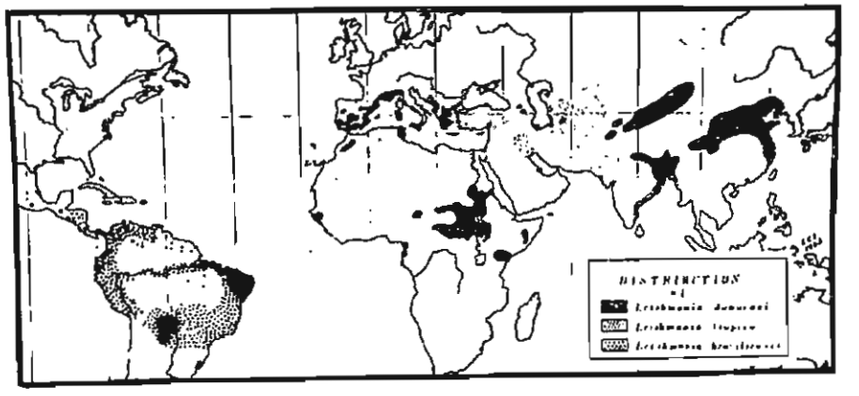


Fig. 3
Distribuição das leishmanioses no Globo (Faust, 1957).

A este propósito deve referir-se que há autores que atribuem a factores climáticos e populacionais as manifestações nas mucosas da *L. braziliensis*.

Por outro lado não deve esquecer-se o significado epidemiológico que importa atribuír ao facto de as leishmanias se terem difundido largamente em certos países depois da II Grande Guerra e de formas cutâneas se descreverem também com mais frequência nos últimos anos em países onde ainda há pouco eram totalmente ignorados, como já referimos. Além disso não podemos deixar de referir como estranho que as leishmanioses não tenham ainda sido introduzidas em numerosos territórios visinhos de outros infectados.

Em relação ainda com a distribuição geográfica não deve esquecer-se também que, ao contrário do que estava clássicamente

admitido de que as leishmanias não ocorriam acima de 600 metros de altitude, se sabe hoje que podem encontrar-se a 800 metros (Brasil), 1.240 metros (Georgia, U.R.S.S.) e 1.350 metros (Iraque). Um tal facto reveste-se também da maior importancia para o conhecimento da epidemiologia da doença.

2.4. *Comportamento das leishmanias fora do vertebrado.*— Fora do vertebrado as leishmanias só são conhecidas no estado de leptomonas, quer essa fase se passe nos meios de cultura, quer nos artropodos onde se teem identificado.

Seja como fôr, dado que é fácil dispor de culturas de leishmanias, pareceria que, anàlogamente ao que se passa com outros microorganismos cultiváveis, teriamos assim um processo de fazer a diferenciação através das variações no seu comportamento cultural e particularmeste pelas provas de fermentação que tão largo contributo dão para se identificarem as bactérias. As diferenças que se tem apontado quanto às exigências da temperatura para um bom desenvolvimento, tamanho, possibilidade de desenvolvimento no leite e resistência à bílis não teem sido aceites como base de caracterização. Parece dever concluir-se portanto, que este meio de estudo, a cultura, não tem sido devidamente aprofundado, pelo que os resultados obtidos até à data não teem permitido basear nele qualquer diferenciação específica dos parasitas. Deve dizer-se, entretanto que recentemente Grossovicz e Citri referem exigências culturais que seriam próprias à *L. tropica*, o que permitiria fazer a sua diferenciação biológica específica.

Também os elementos obtidos do seu comportamento nos flebotomos, não tem fornecido dados de base para sua diferenciação, embora se admita que cada espécie tem flebotomos que lhe são próprios ou pelo menos mais convenientes para a sua evolução. Assim na área mediterrânica, o *P. perniciosus* seria o grande responsável pela transmissão da *Leishmania* visceral enquanto o *P. papatasi* seria o disseminador da *Leishmania* cutânea. Também é dito que as estirpes de *L. tropica* de Bagdad e de Jericho se podem distinguir porque as 1"s. infectam o *P. papatasi* numa taxa menor que as 2"s., o mesmo acontecendo com a estirpe de *L. tropica* da Tunisia.

Dada esta diferente especificidade de certos tipos de leishmanias por certas espécies de flebotomos, alguns autores admitem a creação de raças geográficas daqueles protozoários, conforme

as espécies de flebotomos a que estão fisiològicamente adaptados.

2.5. *Tipos de leishmanias.* — Pelo que vem de expor-se e considerando o ponto de vista prático penso que há razões justificativas para propor a contribuição dos seguintes complexos das leishmanias parasitas dos mamíferos :

Complexo donovani ou *visceral*, abrangendo as seguintes espécies :

L. donovani
L. infantum (=*L. chagasi*, *L. chinensis* e *L. canis*)
Leishmania visceral do Sudão e do Kénia.

Complexo tropica ou *tegumentar*, abrangendo as seguintes espécies :

L. tropica major
L. tropica minor
L. braziliensis * (=*L. tropica* var. *americana*, *L. peruviana*)
L. mexicana
L. guyanensis
L. enrietti

Leishmanias aberrantes, entre as quais se inclui a leishmania da forma leproide da Bolívia e da Venezuela (*L. braziliensis pifanoi*) e uma estirpe da Etiópia.

Os nomes propostos para os complexos foram escolhidos com base na prioridade das designações dadas às espécies em causa.

Esta divisão não pode ser senão esquemática, pois há todas as transições entre os tipos considerados, tanto no que respeita ao seu estudo experimental como ao clínico.

Sob o ponto de vista epidemiológico, não devem também esquecer-se as formas chamadas por alguns autores de metaleishmanioses, onde se não encontram leishmanias nas lesões em virtude de se tratar de casos já muito antigos.

Mesmo formas cutâneo-mucosas ocorrem no Sudão onde são consideradas como manifestações de Kala-azar, enquanto formas com invasão da mucosa nasal se podem verificar na área do botão do Oriente e formas exclusivamente cutâneas se descrevem no Brasil.

De entre as formas referidas revestem-se de importancia para

* Há quem admita para a *L. braziliensis* que esta espécie é um complexo de raças.

nós especialmente as leishmanias viscerais, a cujas características especiais me irei referir em parte com base nos estudos que tem sido possível fazer em Portugal.

3. *Biologia das leishmanias do complexo donovani*:

Vários tipos de leishmanias viscerotropas se descrevem, mas pensamos que em linhas gerais a sua biologia e semelhante, pelo que as iremos apreciar primeiramente em conjunto. Mais tarde discutiremos o confuso problema da sua identidade.

3.1. *Comportamento no organismo vertebrado.* — Quando nos propomos abordar o problema da biologia de qualquer agente patogénico é evidente que o 1°. aspecto a considerar é o respeitante ao habitat, considerando aqui o hospedeiro e a localização no seu organismo.

3.1.1. *Hospedeiros.*—As leishmanias do complexo donovani têm hospedeiros naturais variáveis com as regiões.

Assim é que na área mediterrânica, China do Noroeste e America são os cães os reservatórios naturais, figurando o Homem como ser esporàdicamente infectado, pelo que a doença apresenta assim os caractéres duma verdadeira antropozoonose.

Na India e China Oriental parece ser o Homem o reservatório natural não desempenhando o cão qualquer papel, enquanto no Sudão o reservatório não é conhecido. No Kénia o assunto não está resolvido, mas encontraram-se leishmanias avirulentas nos gerbilos, enquanto nos esquilos se encontrou uma Leishmania com os caractéres da *L. donovani*.

Apesar de se admitir que nas regiões referidas em que o cão se apresenta infectado, é a partir dêsse reservatório que o Homem contrai o Kala-azar deve dizer-se que não há um paralelismo estreito entre as taxas de infecção canina e as taxas de infecção humana.

Assim acontece, por ex., em Marselha onde os cães se apresentam muito infectados e onde os casos de Kala-azar são relativamente raros, enquanto, na Servia e Macedónia os cães não estão infectados e a doença é comum no Homem. No entanto, em Barcelona foi verificado que o aumento da taxa de infecção dos cães por leishmanias ia a par do aumento do número de casos de Kala-azar infantil. Poderá admitir-se como explicação, posto que pouco verossimil, que a leishmania dos cães apresenta aspectos

QUADRO II

Taxa de infecção por leishmanias dos cães de Lisboa

Autor e data	Número de cães pesquisados	Infectados °/₀
Álvares e Pereira da Silva, 1910/1911 (5)	416	3,1
Correia Mendes, 1936/1938 (6)	240	2,08
Fraga de Azevedo e Col., 1947 (7)	137	6,5
Silva Leitão,* 1935 (4)	50	10

(*) — O exame incidiu sobre cães doentes e com lesões de pele, dos Serviços de Salubridade da Câmara Municipal de Lisboa.

QUADRO III

Resultados das pesquisas de leishmanias efectuadas em esfregaços do baço de gatos de Lisboa e de animais abatidos no matadouro da mesma cidade (1948)

Espécies de animais	Número	Resultados
Gatos	133	-
Bois	84	Todas as pesquisas foram negativas
Cavalos	33	
Porcos	76	
Carneiros	200	
Cabras	26	

biológicos diferentes conforme os países sob a influência de factores que nos escapam.

Pelos estudos feitos em Portugal a taxa de infecção dos cães de Lisboa por leishmanias tem apresentado apreciáveis variações no decurso dos anos (quadro II), ignorando-se, porém, como se apresenta actualmente a situação. Estudos estão em curso nesse sentido. Em alguns animais domésticos a pesquisa de leishmanias foi negativa (quadro III), embora noutros países se tenham apontado alguns deles (gato, cavalo e carneiro) como infectados.

Em face das incógnitas que assim nos apresenta a problema dos reservatórios das leishmanias e dado o seu enorme interesse epidemiológico seria da maior urgência que estudos fossem feitos nesse sentido, com o fim de precisar não sòmente as espécies que teem esse papel mas também a forma como o desempenham.

3.1.2. *Exigências vitais e repercussão sobre o organismo.*— En todos os vertebrados parasitados as leishmanias apresentan as mesmas características evolutivas adentro das celulas reticulo-endoteliais (S.R.E.) cujas complexas funções são assim naturalmente prejudicadas.

Para compreendermos agora o mecanismo da acção das leishmanias teremos de apreciar os seus actos vitais dentro daquelas celulas, sobretudo pelo estudo dos seus enzimas em relação com os fenómenos fisiológicos dominantes, a nutrição e a respiração e, ligados especialmentte com estes, a possibilidade da formação de substancias tóxicas para o organismo.

Infelizmente poucos estudos há feitos sobre o assunto mas trabalhos experimentais teem mostrado que a falta de proteínas e de certas vitaminas em ratinhos parasitados são favoráveis à sua multiplicação e que o aumento das proteínas nas dietas dos hamsters infectados experimentalmente aumenta a resistência à doença.

Seja como fôr é da presença do parasita nas celulas do S.R.E. que resulta a hipertrofia deste e todas as manifestações da doença que teem como substrato anatómico as alterações histológicas e mesenquimatosas a que dão lugar e que não cabe aquí descrever.

É claro que o mecanismo intimo destes fenómenos não se conhece, sabendo-se apenas que as células endoteliais parasitadas pelas leishmanias são destruídas pela invasão dos protozoários, mas ignora-se em que medida tal destruição é puramente mecânica ou é o resultado duma acção citolítica dos parasitas.

Parece, porém, que da parte das celulas do S.R.E. não se desencadeiam perante os parasitas os fenómenos químicos da fagocitose, já que as leishmanias se manteem aí inalterados na sua forma e estrutura.

Por outro lado nada se sabe também sobre a natureza das substancias que são regeitadas para a circulação por efeito da rutura dessas células.

Conhecem-se, no entanto, os resultados da acção parasitária que se traduzem fundamentalmente pela clássica tríade sintomática do Kala-azar: disproteinémia, anemia e leucopenia com linfocitose. Sob o ponto de vista anatómico a expressão correspondente é a hepato-esplenomegalia e hipertrofia ganglionar, esta última registada, porém, sómente em certas áreas.

Serão, porém, estas manifestações o resultado da hiperactividade do S.R.E., de entre as quais o hiperesplenismo é a mais evidente, ou provirão antes da libertação de elementos de degradação das células destruídas ou de produtos tóxicos devidos aos próprios parasitas?

De entre aquelas manifestações tem-se ligado maior importancia ao estudo da disproteinémia que, segundo certos autores, seria caracterizada por: hiperproteinémia* ; hipergamaglobulinémia ; aumento do quociente gama/serina (que pode ir do normal 0,30 até 2) ; faixas estreitas na base e de grande altura no proteinograma ; nítida separação das globulinas gama e beta. A juntar também a estas alterações deve mencionar-se a baixa da albumina.

Em face do exposto compreende-se que as técnicas de estudo da estrutura proteica do soro pela electroforese em papel, amido-gel e difusão em gelose tenham contribuído para um melhor conhecimento das alterações sericas verificadas no Kala-azar.

Através desses estudos, foi revelado por certos autores no soro dos doentes uma globulina que na electroforese se move mais lentamente do que a globulina gama e que parece ser muito heterogenea, ao contrário do que se passa com a globulina do mieloma, que seria muito homogénea e que teria uma base mais estreita. Tão profundas alterações do proteinograma ocorreriam para Perianes e col. apenas no Kala-azar.

---

* A hipertroteinémia nem sempre se manifesta, podendo até ocorrer hipoproteinémia que é interpretada então como indício de má nutrição.

Refere-se também a produção de uma proteina hialina entre as células, a qual seria o ponto de partida da formação de fibrilhas do colagéneo que podem levar à completa fibrose do orgão (Andrade, 1959). Sendo assim enquadrar-se-á o Kala-azar nas doenças do colagéneo cuja expressão disproteinica é sempre bem evidente (Perianes e cols., 1958).

A hiperglobulinémia nem sempre, porém, se verifica na globulina mas ocorre por vezes na γ e sobretudo na α_2, tendo-se verificado então, num caso, baixa das lipoproteinas e aumento das glicoproteinas (Miranda, 1956). Tal modificação da distribuição das fracções proteicas significaria para alguns autores um caractér maligno da doença. Também num caso de curso arrastado (10 anos) verificou-se baixa da globulina γ e amiloidose secundária (Wright, 1959).

Paralelamente à evolução favorável do Kala-azar sob a influência do tratamento adequado (fig. 4) nota-se tendência para

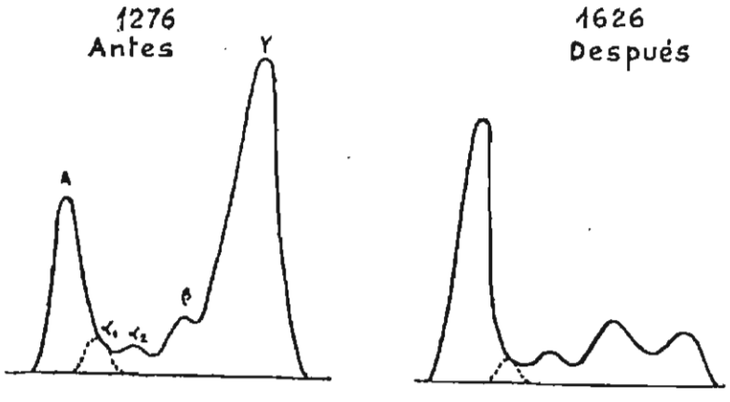


Fig. 4
Electroforetogramas dum caso de Kala-azar antes e depois do tratamento com Neostibosan (Perianes y col., 1958).

a normalização do proteinograma, ao mesmo tempo que a R.F.C. com antigénio metilico preparado a partir de bacilos ácido-resistentes, como é a reacção de Witebsky, Klingenstein e Kuhn (W.K.K.) tende para a negatividade antes mesmo de ter desaparecido totalmente a disproteinémia (figs. 5/6). Os estudos de tomoserologia electroforetica feitos por Ahuir e cols. revelaram

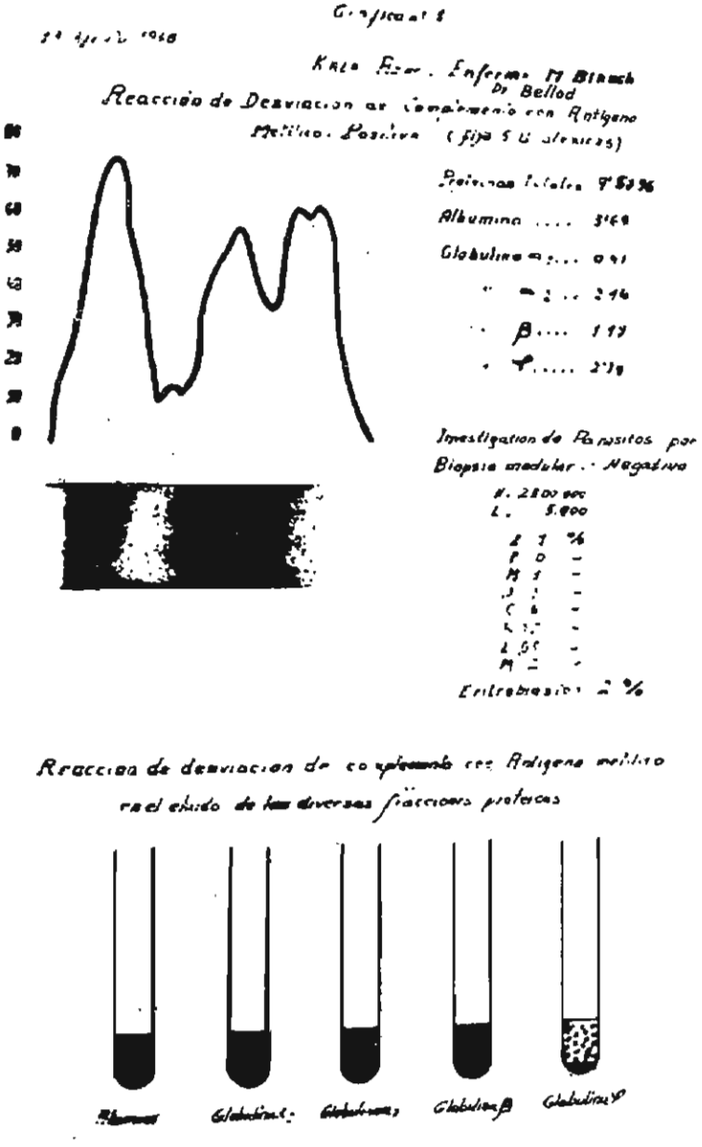


Fig. 5
Caso de Kala-azar com disproteinémia e reacção de fixação do complemento com antigénio metilico tuberculoso positiva (Ahuir y García, 1958).

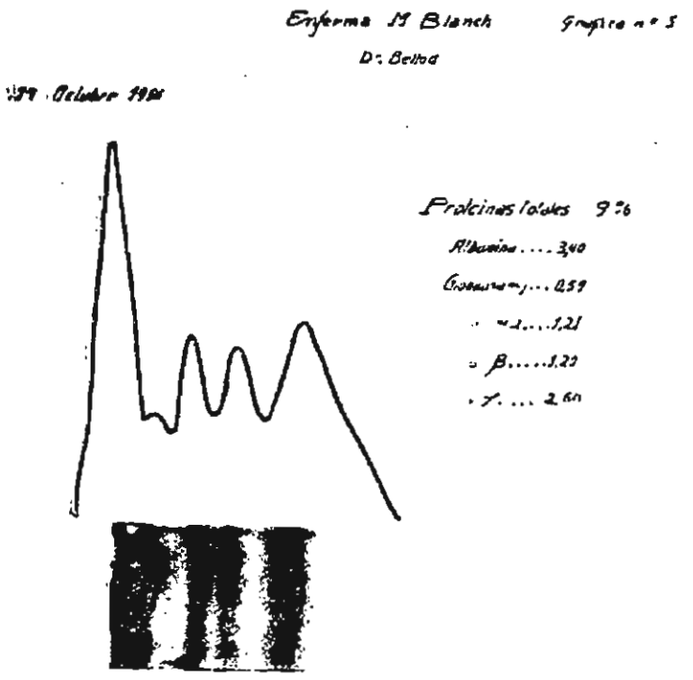


Fig. 6

Mesmo doente do caso da fig. 5 dois meses depois, após tratamento e já clinicamente curado. Há ainda disproteinémia mas a reacção de fixação do complemento com antigénio metilico tuberculoso foi negativa.

também que «o anticorpo para-específico da reacção do antigénio metilico se localiza na fracção gama».

Parece, porém, que a hipergamaglobulinémia, não está ligada a um estado de imunidade humoral, mas antes à reacção do S.R.E. perante o parasita (Cunha e cols., 1958) e que a infecção natural do S.R.E. pelas leishmanias «não estimula a função de anticorpos antes a dificulta, impede ou anula» (Castellá, 1946).

Aparte os dados referidos têm-se obtido elementos de interesse para o diagnóstico do Kala-azar através de grande número de reacções que evidenciam as modificações proteicas do soro, como sejam as do formol-gel, água destilada, ureiastibamina, neo-stibosan e outras.

Como reflexo do comprometimento hepatico no Kala-azar também as provas funcionais do fígado se revelam positivas na maioria dos casos, como ainda verificaram recentemente Tay-Eldin e Hassani (1961). Além disso não deve esquecer-se que o hamster infectado experimentalmente apresenta uma acumulação de lipidos e colesterol nas suprarrenais que lhe comprometem o seu funcionamento e agravam o prognóstico.

Quanto à anemia ela é geralmente do tipo normocromico e normocitico e evidencia-se, no estado da medula óssea, por uma hiperactividade do sistema eritropoietico.

A leucopenia, que é habitual, acompanha-se tipicamente de linfo-monocitose, registando-se uma nítida alteração da relação leucocitos/hematias que pode ir do normal, 1 :750 a 1 :2.000 e mais.

* * *

Mas, terminada a vida duma dada leishmania na celula reticulo-endotelial por rutura da mesma, terá, então, o parasita um certo período de liberdade antes de ser de novo fagocitado por outra célula e assim se compreende que possa encontrar-se no sangue circulante.

E, na verdade, há autores que referem 100 % de pesquisas positivas de leishmanias no exame directo do sangue, tanto no Kala-azar indiano, como no mediterrânico, mas aconselham para isso a fazer 20 a 30 esfregaços de sangue em gota espessa ou segundo a técnica de Shortt, antes de concluírem pela negatividade.

Procuramos também revelar a presença de leishmanias no sangue circulante mas por hemocultura feita com sangue obtido por punção venosa e segundo a técnica que descrevemos (1960).

Até à data fizemos a hemocultura em 47 casos, tendo obtido 21 ou seja 44,6 % positivos, como se expõe no quadro IV.

QUADRO IV

Resultados da pesquisa de leishmanias na mucosa nasal e por hemocultura em doentes de Kala-azar (desde 1950 a 15/X/961)

Data	Núm. total de casos de Kala-azar	Pesquisa positiva na mucosa nasal:		Hemoculturas positivas						Positiva na mucosa nasal e negativa na hemocultura		Positiva na hemocultura e negativa na mucosa nasal		Total das pesquisas positivas com a associação dos dois métodos	
				Directamente em NNN		Por passagem em soluto de citrato de sódio		Totais da directa e indirecta							
		Abs.	%	Abs.	%	Abs	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs	%
1950/60	38	6	16	4	10,5	13	34,2	13	34,2	3	7,8	10	26,3	16	42,1
1961	9	9	100	8	88,8	8	88,8	8	88,8	1	11,1	0	0	9	100,0
Total	47	15	32	12	25,5	22	46,8	21	44,6	4	8,5	10	20,7	25	53,6

O estudo deste quadro mostra também que a percentagem de positividades nos casos de 1961 foi apreciàvelmente mais elevado do que nos casos da serie anterior, o que pode atribuir-se a um maior cuidado na pesquisa, pois em 2 doentes ela foi positiva sòmente na 3ª. colheita. O número obtido é, no entanto, inferior ao de 90 % referido por outros autores na área mediterrânica. Estou certo de que a percentagem de positividades aumentará ainda se procedermos à colheita de maior quantidade de sangue enum maior número de vezes, se a colheita fôr feita em período febril e 1/2 a 1 hora após a esplenoconcentração adrenalinica ou 10 minutos após a injecção de neostibosan. Esperamos também que a aplicação dum método baseado no de Martin para a concentração dos tripanosomas e usando um anticoagulante adequado aumentará o número de casos positivos.

Aparte a passagem ao sangue das leishmanias seria de prever também que pudessem ser eliminadas com os excreta, pela posibilidade de serem arrastadas até aí pelas células reticulo-endoteliais que parasitam.

E que esta presunção era justificável confirma-o a pesquisa positiva de leishmanias nas secreções nasais, como já foi veri-

QUADRO V

Estudo comparativo da pesquisa de Leishmanias no muco nasal (as têS primeiras referências) e na mucosa nasal (a última referência) nalgumas áreas do globo

Autor, data e país	Pesquisas efectuadas		
	Total	Positivas	Positivas %
Forkner & Zia China, 1935	22	12	54,5
Shortt & Swaminath India, 1935	15	6	40
Henderson Sudão, 1937	120	9	7,5
Fraga de Azevedo Portugal, 1961	47	15	32

ficado por Forkner e Zia na China, Shortt e Swaminath na India e Henderson no Sudão (quadro V) e por mim confirmado.

Nos meus exames o número de casos positivos foi de 15 em 47 casos estudados, ou seja na taxa de 32 %.

Anàlogamente ao que se notou com a hemocultura também aqui a percentagem de positividades na 2ª. serie de casos (1961) foi superior à da 1ª. serie (1950-1960), o que se pode atribuir ao maior cuidado na pesquisa.

Aparte o interesse científico destas observações são deve deixar de omitir-se uma referência ao seu interesse prático, tanto para o diagnóstico como para a epidemiologia. Para o diagnóstico porque pela hemocultura e pela pesquisa de leishmanias na mucosa nasal, tivemos a possibilidade de fazer o diagnóstico em 53,6 % dos casos, percentagem que se elevará possìvelmente a 100 % com o aperfeiçoamento gradual da técnica como preconizamos e como o deixam prever os melhores resultados já obtidos na 2ª. serie de observações; para a epidemiologia porque tanto pelo conhecimento gradual de que as leishmanias circulam no sangue como pelo facto de serem eliminadas com os excreta se poderá contribuir para explicar o seu modo de transmissão, como veremos.

3.1.3. *Estrutura antigénica e imunidade.*—A estrutura antigénica das leishmanias tem sido feita através de reacções serológicas intradermo-reacções e provas de imunidade cruzada. As provas culturais não têm fornecido até à data quaisquer dados de interesse. Tamém de entre as reacções serológicas poucos ou nenhuns elementos precisos têm sido fornecidos pela prática da formação experimental de anticorpos a partir das estirpes a considerar, método que tão auspiciosos resultados tem dado em bacteriologia.

A R.F.C. praticada com um antigénio metilico obtido de bacilos ácido-resistentes (reacção do tipo paraespecífico), como o de Kedrowski, de Phley ou outros, prova pelos seus resultados positivos em 97 % dos casos a identidade entre alguns elementos antigénicos desses microrganismos e das leishmanias viscerais mas não tem permitido ir mais além. Na verdade, embora se verifique nos casos de Kala-azar uma elevada percentagem de positividades desta reacção, próxima dos 100 % pode verificar-se, posto que a titulos mais baixos, noutras doenças, como a Leishmaniose cutâneo-mucosa, a tuberculose, a lepra e a doença de Chagas, o que lhe tira muito do seu valor específico.

De entre as intradermo-reacções é sobretudo a reacção de Montenegro que se tem generalizado e a cujos resultados principais já fizemos referência atráz.

No que respeita aos resultados das observações sobre a imunidade na leishmania visceral os dados colhidos na Natureza não são concludentes para se tomar posições, admitindo, porém, como conclusão alguns autores que não há nesta doença uma verdadeira imunidade nem sequer premunição, enquanto outros referem que são as recidivas. No entanto no Kala-azar do Kénia foi provado que a imunidade pode ser obtida pela inoculação cutânea de leptomonas obtidas de cultura das estirpes locais.

Em relação ainda com a imunidade penso que alguns dados se poderão tirar da incidência do Kala-azar conforme a idade.

Assim, sabe-se que há uma importante diferença entre o comportamento dos tipos de Leishmanias do complexo *donovani* segundo os grupos etários, pois é bem sabido que, por ex., na área mediterrânica as crianças até ao ano concorrem em média com 3 % para atingirem cerca de 90 % de infectados aos 3 anos, enquanto no Kala-azar indiano e no sudanez são antes os jovens adultos os que pagam maior tributo à doença. Entretanto, nalgumas localidades da área mediterrânica a taxa de adultos é elevada, como acontece em Montenegro na Jugoslávia onde chega a atingir 42 %, enquanto na Argélia se verificou recentemente a ocorrência de casos diversos em adultos (Pernot e cols., 1960).

A que atribuir esta diferença de situações? As exigências bio-químicas próprias das leishmanias do tipo mediterrânico são diferentes das requeridas pelas leishmanias indiana e sudaneza? Haverá na 1ª. forma o desenvolvimento com a idade de um certo grau de imunidade natural? Dar-se-ão circunstâncias próprias à idade infantil na área mediterrânica, que favoreçam a su maior infecção?

Seja como fôr, o que é certo é que há situações diferentes a considerar no que respeita ao comportamento das leishmanias viscerais em relação à idade, para as quais não encontramos ainda explicação.

3.1.4. *Comportamento perante os medicamentos.*—O diferente comportamento das estirpes de leishmanias às drogas usadas leva-nos a concluir pela variação da sua sensibilidade a esses

produtos, o que é também a favor da sua diferenciação biológica.

Assim é que enquanto a *L. infantum* é muito sensível aos antimoniais pentavalentes e diamidinas, o mesmo não acontece com a *Leishmania* do Sudão e do Kénia.

Quanto ao Kala-azar indiano, embora sensível aos antimoniais, teem-se registado casos de antimonio-resistencia, referindo Sen Gupta (1961) que isso pode ser explicado pelas seguintes razões: a) relativa resistencia da estirpe causal; b) incapacidade do S.R.E. para utilizar as drogas, não transformando o antimónio pentavalente em antimónio trivalente ou não deixando penetrar a droga até ao parasita, quanto metido num granuloma nos casos crónicos; c) depressão geral das actividades vitais do organismo devido ao hiperesplenismo. É possível também que esta resistencia aos medicamentos se traduza por carencia de formação da globulina γ desviando-se as globulinas para as fracções α, como se verificou recentemente num caso.

3.2. *Comportamento das leishmanias fora do organismo vertebrado.*—É evidente que as leishmanias do complexo *donovani* para sobreviverem na Natureza precisam de ser disseminadas entre os seus reservatórios como acontece com todos os microorganismos patogénicos.

Têm, como vimos, a característica da sua localização nc orgãos profundos mas podem encontra-se em qualquer parte d organismo, circulam pelo sangue e foi provado que podem elimi nar-se para o exterior com os excreta.

Para se dar a sua disseminação há, portanto, que considerar a possibilidade da intervenção dum artropodo hematofago que as iria buscar ao sangue no decurso duma refeição e a possibilidade de serem disseminadas pelos excreta, tais como as secreções nasais, a saliva, a expectoração, as fezes, a urina e possìvelmente o suor. Também já foram reveladas no suco gástrico, esperma e liquido prostático.

Apreciemos, portanto, o destino natural que podem ter as leishmanias a partir do seu hospedeiro e depois a utilização que artificialmente lhes pode ser dada, ou seja a sua cultura no Laboratório e a importancia dos elementos daí obtidos.

3.2.1. *Destino e disseminação.*—As formas de leishmanias podem considerar-se formas de resistencia do parasita, talvez como defesa contra a hostilidade do meio que lhe oferece o verte-

QUADRO VI

Resumo dos elementos a favor e contra as hipóteses da transmissão do Kala-azar pelos flebótomo se por contacto com os reservatórios (homem ou cães parasitados)

Hipótese da transmissão por flebótomos		Hipótese da transmissão por contacto	
A favor	*Contra*	*A favor*	*Contra*
1. Têm sido encontrados flebótomos infectados na Natureza e è fácil infectá-los experimentalmente em animais ou doentes, invadindo as leptomonas o intestino anterior.	1. Dificuldade em fechar o ciclo Homem doente - flebotomos - Homem são, apenas por picada de flebótomos, apesar das condições algum tanto artificiais usadas	1. Contágio de animais quando na mesma gaiola protegida contra a entrada de flebotomos e outros artropodos.	1. Pouca resistencia do parasita à desecação (apenas contra o contacto indirecto).
2. Foi já possível, embora apenas uma vez para a forma cutânea e uma para a forma visceral, fechar o ciclo Homem doente-flebotomos - Homem são, intervindo os flebotomos por picada	2. Grande demora do ciclo evolutivo nos flebotomos em relação à sua relativamente curta longevidade.	2. Transmisão da doença a animais por ingestão de produtos com parasitas (excreta e vísceras).	2. E de prever no ciclo natural do parasita uma fase flagelada (definição do género *Leishmania*).
3. Maior frequência da doença nos meios rurais.	3. Falta de flebotomos em áreas de endemia e casos ocorrendo em indivíduos que, segúndo todas as probabilidades, não tiveram contacto com flebotomos (meios citadinos).	3. Grande resistência da leishmania em certos produtos como o leite e em presença de bactérias (muco nasal).	3. Raridade relativa da doença nas zonas de altitude superior a 600 m.
4. Ausência da doença em geral acima de 600 m. de altitude, onde faltam os flebotomos.	4. Raridade c/ que os flebotomos se alimentam no homem e com que se encontram infectados em casas de doentes em áreas de endemia.	4. Eliminação de parasitas virulentos com o muco nasal e outras secreções.	4. Não foi ainda observado que a promiscuidade favoreça a frequencia da doença, embora ocorram, como vimos, com certa frequência casos familiares.
5. Redução notável do número de casos após a aplição dos insecticidas pelo método de espurgo das casas.	5. Ocorrência relativamente frequente dos casos familiares.	5. Ocorrência relativamente frequente dos casos familiares e outras caracteristicas epidemiológicas próprias da transmissão por contacto directo ou indirecto.	5. Distribuição limitada da doença a certas zonas tropicais e subtropicais, não obstante as facilidades concedidas à sua dispersão por contacto, pelas multiplas relações entre os povos.
	6. Não há necessidade de as leishmanias passarem pelo estado de leptomonas para serem infectantes.	6. Não há necessidade de as leishmanias passarem pelo estado de leptomonas para serem infectantes.	6. Apesar da incidência em jovens crianças não se registam habitualmente casos nas mães.
	7. Curta longevidade das fêmeas dos flebotomos que parece não precisarem de se alimentar mais que uma vez		7. Maior frequência nos meios rurais.
	8. Maior frequência da doença nas crianças, nos Homens e em certas raças de determinadas áreas, ao contrário do que se passa noutras		
	9 Localização electiva dos parasitas no S.R.E. do hospedeiro.		
	10. Raridade com que se encontram flebotomos infectados na Natureza.		
	11. Maior frequência em certas zonas de endemia no Homen que na Mulher.		

brado, devendo as formas de leptomonas constituir verdadeiramente o seu estado vegetativo e normal.

Na verdade, os estados de leishmania pela sua pequenez, simplicidade de estrutura, imobilidade e resistencia da sua parede em oposição ao que se passa com as leptomonas, podem comparar-se com os quistos de outros protozoários, embora sejam quistos especiais, dado o seu poder de multiplicação e de sobrevivencia nas células que parasitam.

A favor de que o estado de leishmania corresponde a um estado de enquistamento fala também a sua resistência.

Realmente, enquanto no estado de leptomonas sucumbem ràpidamente, quando tiradas do meio onde artificialmente se podem desenvolver, está provado que no estado de leishmania podem resistir durante quatro horas à dessicação e conservar-se 24 horas no solo húmido e alguns dias, sem perda da sua vitalidade em soro fisiológico, em leite e até em água destilada.

Não repugna, pois, a crer que as leishmanias eliminadas pelos excreta possam atingir um organismo receptivo e aí instalar-se, tanto mais que são directamente infectantes sem passarem pelo estado de leptomonas. Compreende-se assim que possam ser disseminadas por contágio directo ou indirecto pelas moscas e alimentos contaminados, como acontece con certos agentes bacterianos, intestinais e outros.

Está, na verdade, provado experimentalmente que hamsters infectados podem contaminar hamsters não infectados quando instalados em conjunto numa gaiola à prova de insectos hematofagos.

Por contacto directo citam-se também casos esporádicos de transmissão por aspiração no laboratório de material infectado e no que respeita à possibilidade de contágio, o recente caso de trausmissão do Homem à Mulher pelas relações sexuais, descrito por Symmers (1960) é bem demonstrativo de que isso possa acontecer. Tratava-se de um Homem que se considerava curado do Kala-azar, contraído no Sudão ou Africa Oriental em 1941, e que apresentara leishmaniose dermica em 1945. A sua mulher, com quem casara em 1953, revelou em 1955 uma úlcera vulvar que foi interpretada como sendo de natureza sifílitica. A biopsia permitiu fazer, no entanto, o diagnóstico etiológico, tendo-se então averiguado que o Homem apresentava ainda lesões cutâneas e manifestações viscerais leishmanicas. Aliás, há quem admita

(Deane, 1958) a possibilidade da transmissão frequente da doença pelo coito entre os caninos.

Também a ocorrência de leishmaniose com localização vulvar e perineal em duas crianças de 20 meses e 5 anos recentemente descritos (1955) são contra a intervenção dum insecto hematofago. Demais, há autores (Lamborn, 1956), que justificam bem a possibilidade da disseminação das leishmanias por intermédio das moscas.

Além disso, no Ceilão, apesar de aí terem entrado com frequência indianos infectados e não obstante aí haver os possíveis flebotomos vectores *(P. argentipes)* nunca a doença se instalou, certamente porque os nativos daquela Ilha se não misturam com os indianos.

Quanto às leishmanias que se encontram no organismo é evidente que só podem ser disseminadas a partir do sangue, com intervenção dum artropodo hematofago, admitindo-se por dados epidemiológicos e experimentais, que se devem incriminar os flebotomos, salvo, evidentemente a transmissão casual por transfusão de sangue, de que há casos registados.

Admite-se clàssicamente que naqueles insectos, as leishmanias aspiradas no decurso duma refeição, seguiriam determinado ciclo evolutivo durante e qual passariam pelo estado de leptomonas que, emigrando para o intestino anterior, bloquearían o proventriculo e tornariam assim os flebotomos infectantes (fig. 1).

Alguns autores (Soshina, 1953) admitem, porém, que aparte este modo de transmissão inoculativo também as leptomonas podiam passar ao intestino posterior, pelo menos nos tipos das formas cutâneas, e ser eliminadas com as fezes, através das quais iriam assim contaminar a ferida da picada ou de coceira e infectar por essa forma o indivíduo.

No que respeita, porém, à maneira como as leishmanias atingem o tubo digestivo dos flebotomos penso que é de admitir que apenas as do sangue ou da linfa aí chegarão, pois, tratando-se de insectos hematofagos é natural que só no decurso duma refeição se poderão infectar.

Não creio ser de admitir a possibilidade de obterem as leishmanias por picadas nas lesões cutâneas ou na própria pele quando o ferrão a atravessa.

Por razões análogas também é de presumir que as leishmanias de que o flebotomo é portador sejam inoculadas no sangue ou linfa no acto da picada e não na pele, como é por vezes admitido. Então tropismo especiais das leishmanias assin inoculados levá-las-ão, por razões que ignoramos, para as visceras ou para diferentes zonas cutâneas. Nestas condições não é portanto, de admitir que a localização numa ou noutra zona da pele seja o resultado de aí terem sido inoculadas pelos flebotomos, tanto mais que se referem muitos casos de manifestações cutâneas em zonas cobertas pelo vestuário e portanto inacessiveis à picada daqueles insectos.

Seja como fôr, penso que importaria ainda esclarecer se a passagem das leishmanias pelos flebotomos constitui uma verdadeira e indispensável fase dum ciclo natural e portanto necessário a salvaguardar as suas características biológicas, pois não sendo necessária a realização de tal passagem teriamos assim mais um argumento contra a hipotese da transmissão natural pelos flebotomos. Parece, no entanto, que a passagem directa do roedor a roedor da *L. tropica* faz baixar a sua virulencia e que a passagem de culturas de *L. tropica* pelo *P. papatasi* lhe aumenta a acção patogénica (Adler & Theodor, 1927).

Também não se conhece com precísão qual a influência da temperatura e outras particularidades climáticas na evolução das leishmanias nesses insectos, cuja distribuição é vasta, pois se estendem no norte até Paris, Mandchuria e Washington e até 2.500 metros de altitude (Garnham, 1960), mas estão ainda bastante mal estudados particularmente quanto à sua ecologia. Sabe-se, no entanto que o Kala-azar, doença própria dos climas quentes e temperados e que pode ocorrer em áreas como no Chaco argentino onde a temperatura desce abaixo de 0° no inverno (citado por Deane, 1958).

Acerca do papel dos flebotomos há porém, diversos aspectos da epidemiologia do Kala-azar que não podem ser explicados sòmente pela sua intevenção, como se resume no quadro VI onde se apresentam os dados a favor e contra o seu papel.

Por estudos feitos na minha cadeira no Instituto de Medicina Tropical, também alguns dados conseguimos colher sobre o assunto, como iremos referir.

Das 4 espécies que encontramos na área de Lisboa e em áreas do sul do país onde os casos de Kala-azar eram mais numerosos, o *P. perniciosus*, o *P. minutus*, o *P. sergenti* e o *P. ariasi*, aquele a que se poderá atribuir algum papel é o *P. perniciosus*, por ser

omais frequente e o que con mais persistencia invade a habitação (quadro VII). Resultados análogos foram verificados noutras áreas do País e aqui em Espanha, sobretudo quanto à pouca tendência dos flebotomos para invadirem a habitação humana. No entanto, numa prospecção em Lisboa e arrededores feito por Rés (1957) os flebotomos foram encontrados sobretudo na habitação

QUADRO VII

Proveniência e proporção de 4.010 exemplares de *Phlebotomus* capturados na área de Lisboa (1948)

Espécies de *Phlebotomus*	Total	%	Vacaria	Habitação	Pocilga	Estábulo	Galinheiro	Coelheira e galinheiro	Canil	Vacaria e cavalariça	Coelheira
perniciosus	3.606	90,0	2,617	344	148	230	137	59	58	9	4
minutus	290	7,2	16	12	259	1	1		1		
sergenti	74	1,8	18	42		4	4	3	2		1
ariasi	40	1,0	21	10	1	3	1	4			
Total	4.010		2.672	408	498	238	143	66	61	9	5

humana, o que se pode explicar pela diferença dos métodos de prospecção: sistemática em todas as habitações humanas e instalações de animais feita por Rés e quase exclusivamente nas últimas feitas por nós.

Além das espécies referidas o *P. papatasi* foi também encontrado em 1957, mas apenas na bacia do Guadiana, ao sul do País. Entretanto, Carlos França (1913) já o havia registado em Portugal, próximo de Lisboa.

Pelo estudo das preferências hemáticas dos flebotomos em Portugal, o Homem vem em 5.° lugar como animal preferido (quadro VIII) o que demonstra a sua pouca antropofilia, pelo menos entre nós.

Tivemos também ensejo de dissecar 2.064 espécies e apenas um foi encontrado infectado com leptomonas.

Pelo estudo das probabilidades que tem o Homem de ser atingido por um flebotomo infectado concluímos que, pelo menos na área estudada ou seja em Lisboa, precisa de ser picado por 170.000 para que um seja portador de leishmanias, circunstancia que, em face da biologia dos flebotomos, tem poucas possibilidades de ocorrer, pois não deve esquecer-se a sua relativa escassez, a sua fraca domesticidade e a sua fraca antropofilia.

QUADRO VIII

Resultados das reacções das precipitinas aplicadas ao estudo das preferências hemáticas dos flebótomos de Lisboa e arredores (Cruz Ferreira & Tiago Ferreira, Cruz Ferreira e Fraga de Azevedo & Gomes Teixeira)

1945 - 1946

Autores	Reacções positivas						Numero de reacções executadas		
	Anti-boi	Anti-cão	Anti-cavalo	Anti-ave	Anti-homem	Anti-porco	Positivas	Negativas	Total
Cruz Ferreira & Tiago Ferreira	137	67	7	12	1	0	194	406	600
Cruz Ferreira	76	31	0	7	7	6	108	392	500
Fraga de Azevedo & Gomes Teixeira	146	8	25	18	13	3	200	402	603
Total	359	106	32	37	21	9	502	1201	1703
%	21,0	6,2	1,9	2,2	1,2	0,5	29,48	70,52	

Animais preferidos:
1.°—Boi
2.°—Cão
3.°—Ave
4.°—Cavalo
5.°—Homem
6.°—Porco

Averiguamos também que os flebotomos portugueses se devem infectar no cão, pois a probibilidade que têm de se infectar no Homem é de 1:3.000.000, número muito afastado do real, enquanto sobre o cão é de 1:1.000, número muito mais próximo do encontrado na Natureza (1:2.064).

Ainda contra o papel dos flebotomos fala o facto de as fêmeas

terem uma longevidade curta, pois foi verificado por um dos meus colaboradores, o Dr. Henrique Ribeiro, que no Laboratório a fêmea do *P. perniciosus* local vive em média 12 dias (mx.-31, min.-5), enquanto o macho vive em média 7 dias, com um máximo de 40 dias.

Demais, está provado que, por ex., no *P. argentipes* a longevidade da fêmea na Natureza não vai geralmente além de 6 dias (Malone, 1947, Brocks, 1950) o que é também um forte argumento contra o seu papel de vector, pois, para que se dê nele a evolução das leishmanias de modo a tornarem-se infectantes são necessários 10 dias (fig. 1).

Foi também observado pelo Dr. Henrique Ribeiro que no Laboratório as fêmeas de *P. perniciosus,* a espécie mais incriminada entre nós se recusa a fazer mais que uma refeição de sangue, a qual basta para assegurar a maturidade dos ovários até à postura, depois do que morrem. Crendo que o mesmo se passa na Natureza, aliás já verificado, ao que parece, na India (Malone, 1947) para o *P. argentipes,* temos neste facto o argumento mais decisivo contra o papel vector dos *Phlebotomus*.

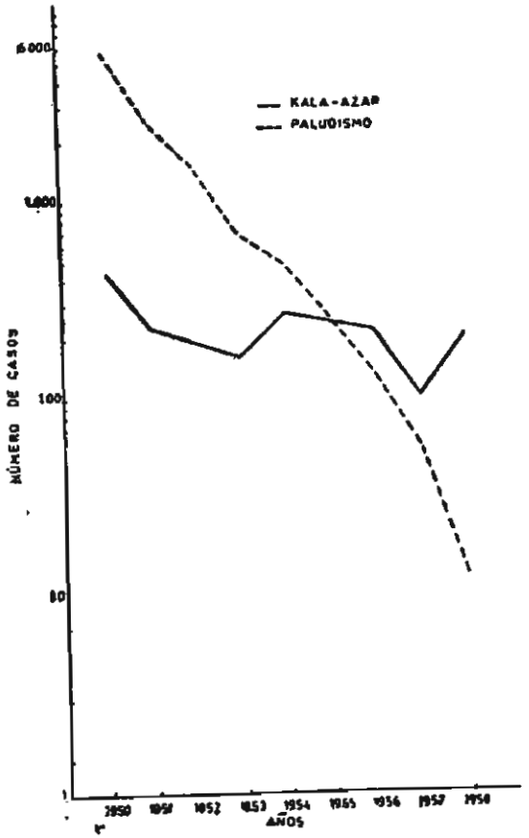
O facto de se terem encontrado flebotomos infectantes na Natureza não constitui prova bastante do seu papel disseminador, pois, situações análogas se teem verificado com diversos artropodos hematofagos para as leishmanias (como seja o piolho do cão) e para outros germes sem que isso faça prova do seu significado epidemiológico.

Aparte os dados contra a hipotese dos flebotomos colhidos das referidas observações verifica-se em Portugal que a baixa dos casos de Kala-azar não é tão espectacular como no paludismo (fig. 7) pela aplicação dos insecticidas no espurgo (*) das casas, podendo os resultados variar de região para região.

Assim na região do Douro a aplicação dos insecticidas foi ineficiente, nas da bacia do Guadiana foi benéfica. É claro que esta diferença se poderia explicar talvez pela diferença entre a biologia dos flebotomos regionais e a dos anofeles, os 2.'s. sofrendo mais a acção do D. D. T., por se abrigarem possìvelmente mais nas habitações onde é feita a aplicação do produto. Penso, porém, que os flebotomos terão aida mais necessidade dum abrigo conveniente do que os mosquitos, dada a su maior fragilidade, pelo que devem ser tanto ou mais atingidos pelos insecticidas que os últimos. Nestas condições aquela explicação não será de admitir.

* *Espurgo* é o termo usado no Brasil para traduzir o «House spraying» dos autores de língua inglesa.

No entanto, a redução notável de casos de Kala-azar que se tem verificado nalgumas áreas de endemia onde se têm utilizado



Fgi. 7
Gráfico logaritmo-aritmético da evolução do paludismo e do Kala-azar em Portugal, de 1950 a 1958.

os insecticidas de acção residual na luta contra os anofeles constitui um importante argumento a favor da intervenção na disseminação do Kala-azar dos artropodos hematofagos, que seriam, pelas razões expostas, os flebotomos. Assim é que, por ex., em certa zona da Itália depois da aplicação do D. D. T. em 1948 o número de casos baixou de 2,9 % a 0,04 % em 1953 enquanto

numa zona testemunha o número de casos foi de 3,5 % em 1948 e de 4 % em 1950. Também na Jugoslávia a doença desapareceu das áreas onde os insecticidas foram aplicados contra a malária. Em Portugal, porém, a redução não foi tão apreciável (fig. 8).

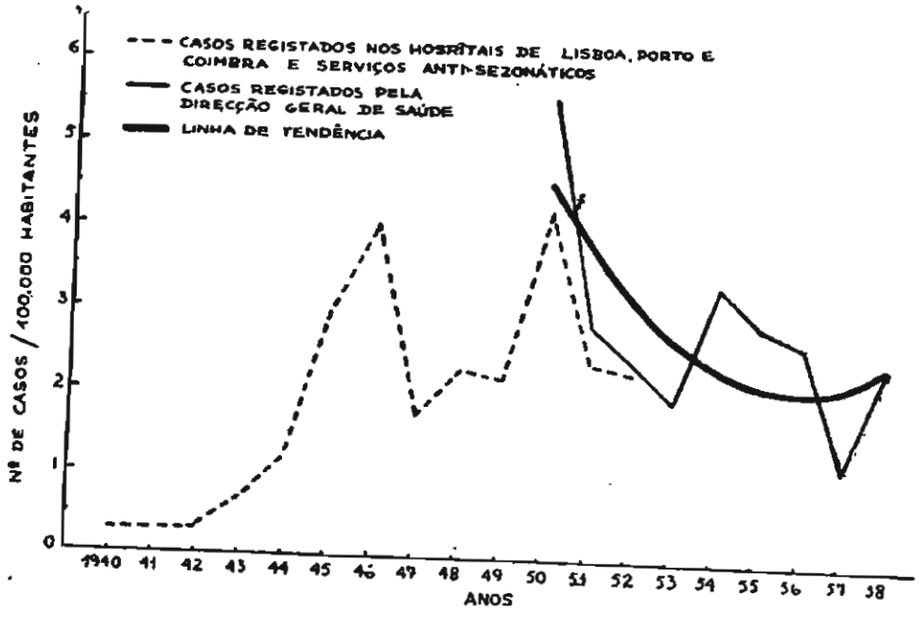


Fig. 8

Casos de Kala-azar registados em Portugal de 1940 a 1958. (Só a partir de 1950 a doença passou a ser de declaração obrigatória). A linha de tendência foi amàvelmente determinada pelo Dr. Santos Reis.

Mas a baixa de infecção que se tem verificado em diversos países paralelamente ao espurgo das casas pelos insecticidas aplicados na luta contra o palodismo, pode não ser o resultado da sua acção sobre os flebotomos. Na verdade, é bem sabido que as aplicações dos insecticidas naquelas condições provoca uma melhoria geral dos estados sanitários das papulações, pela sua acção sobre outros artropodos disseminadores de microorganismos, como sejam, por ex., as moscas domésticas. Aproveitará portanto, a luta contra o Kala-azar dessa acção benéfica geral e não duma acção especial sobre os flebotomos ? É uma pergunta que ocorre fazer e a que seria oportuno dar uma resposta breve.

Também não deve esquecer-se, ao apreciar-se a redução dos casos de Kala-azar, a influência que poderá ter nesse facto a disseminação do número de cães errantes e assim é que Papantonakis em Caneia (Creta) obteve uma redução notável dos casos de Kala-azar fazendo matar os cães doentes. Também há quem admita que a redução dos casos de Kala-azar em Marselha durante a última grande Guerra se deve atribuir ao abate dos cães devido às restrições económicas desse período, embora as condições tivessem sido mais favoráveis à multiplicação dos flebotomos.

Mas qualquer que seja a forma porque as leishmanias atingem o organismo humano, uma incógnito se levanta sempre, qual seja o seu desenvolvimento ali e os factores que a condicionam. Na verdade, sabe -se que a evolução do parásita até que se apresentem manifestações evidenttes é muito lenta e que sendo em média de 1 a 4 meses pode ir de dez dias a 10 anos, como foi referido recentemente num caso de forma visceral (Wright, 1959) e num caso de forma cutânea (Clay & Ross, 1956). Experimentalmente também o período de incubação nos animais pode ir de dias a meses.

3.2.2. *Culturas*.—A partir do sangue ou de orgãos parasitados e particularmente da medula e baço é fácil obter culturas de leishmanias.

Vários são os meios de cultura usados, mas é o meio de NNN o que tem sido utilizado mais largamente.

Infelizmente, apesar da prática de muitos anos da cultura de leishmanias não se tem aproveitado este meio de estudo para se fazer a sua diferenciação específica.

Entretanto, por este processo tem sido possível experimentar diversos produtos medicamentosos, de entre os quais recentemente os antibióticos, tendo-se obtido alguns resultados de interesse.

Também certos estudos sobre o metabolismo das leishmanias em cultura teem sido feitos, tendo-se já averiguado que são portadores duma transaminase activa e que têm um alto metabolismo endógeno, como o prova a sua actividade respiratória e mobilidade na ausência de substracto pelo período de 30 a 60 dias. Sabe-se também que a sua principal fonte de hidratos de carbono é a glicose e que o consumo de *O* e outras actividades metabólicas dependem da presença desse elemento no meio.

Foi ainda obtido a partir das leishmanias em cultura um po-

lisacarido e verificou-se que certos produtos, como o iodoacetato, o fluoracetato e outros elementos inibem a sua actividade respiratória. Verificou-se também que o gáz carbónico e os ácidos acético, piruvico e succínico são os principais produtos do catabolismo da glicose em condições de aerobiose e de anaerobiose. Além disso a *L. tropica* mostrou um aumento da respiração quando o meio continha os compostos intermediários do ciclo de Krebs e um forte consumo de piruvato, fumarato e α - Ketoglutarato.

O estudo citoquímico não tem sido muito explorado, sabendo-se apenas que o núcleo das leishmanias e leptomonas dá a reacção de Feulgen, o mesmo acontecendo com o corpo parabasal, o que prova a presença aí de ácido desoxiribonucleico. O protoplasma parece ser rico em ácido ribonucleico, como o demonstra o seu comportamento com a ribonuclease.

4. *Conclusões* :

Em face do exposto creio ter revelado o elevado número de incógnitas que nos oferece ainda hoje a biologia das leishmanias em geral e mais especialmente das que constituem o grupo com que formamos o *Complexo donovani,* pelo que se torna imperioso insistir nas investigações que tal situação reclama.

Como programa de estudos a realizar de grande interesse científico permito-me apontar os respeitantes aos seguintes assuntos : a) Estrutura antigénica dos vários tipos ; b) Exigências nutritivas e actos fisiológicos dominantes ; c) Mecanismo de acção patogénica ; d) Factores que condicionam as diferenças na acção das várias raças geográficas ; e) Razões porque certas espécies de leishmanias, embora encontrando-se na pele e mucosas, como a nasal, nem sempre aí ocasionam quaisquer lesões.

De interesse mais directamente prático penso também que os assuntos a seguir expostos exigem estudos urgentes e detalhados : a) Transmissão, incluindo aqui particularmente o papel e a biologia dos flebotomos ; b) Relação entre as leishmanias dos animais e do Homem e factores limitantes da sua distribuição ; c) Sensibilidade das várias espécies e raças aos diversos medicamentos ; d) Reacções serológicas e intradermo-reacções para o diagnóstico.

Dado a importancia de que ainda hoje se revestem as leishmanioses e o interesse que têm para Portugal e Espanha, formulo os melhores votos porque os nossos Países, trabalhando em conjunto, possam trazer uma contribuição importante para o esclarecimento das incógnitas que lhes respeitam como base para uma mais eficiente luta contra tais endemias.

5. *Resumo* :

As leishmanioses devem ainda considerar-se como doenças potencialmente perigosas mão obstante a sua redução nalgumas áreas de endemia, pois a sua incidência é ainda apreciável em certos territórios e novos focos teem sido descritos recentemente.

Como base de toda a acção a desenvolver é muito importante definir os tipos patogénicos de leishmanias em relação com a sua distribuição geográfica e considerar o seu mecanismo de disseminação.

Em face dos aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos das leishmanioses, propõe-se a constituição do *Complexo donovani* ou visceral para as leishmanias tìpicamente viscerotropas e do *Complexo tropica* ou cutânea para as dermatropas.

Em relação ao *Complexo donovani* são apontadas as principais características biológicas dos tipos descritos, considerando os respectivos hospedeiros e habitat no organismo parasitado e as manifestações resultantes do seu parasitismo nas células do Sistema Reticulo-Endotelial.

A sua estructura antigénica, fenómenos imunitários e comportamento perante os medicamentos são considerados.

No que respeita ao seu destino fora do organismo parasitado apreciam-se os elementos pró e contra a disseminação pelos flebotomos ou por contacto directo ou indirecto e salienta-se a importancia dos dados que poderã o ser fornecidos y pela sua cultura.

Dadas as numerosas incógnitas que ainda hoje nos oferecem diversos aspectos da leishmanioses é apontado finalmente um programa de pesquisas a efectuar com vista a facilitar a luta contra tais endemias.

RÉSUMÉ

Les Leishmanioses doivent être considérées encore comme des maladies ayant une importance considérable. En effet, bien que moins répandues qu'autrefois dans quelques zones d'endémie, leur incidence est encore appréciable dans certains territoires, et l'on a récemment décrit de nouveaux foyers.

Comme base de toute l'action à mettre en oeuvre, il importe de définir les types pathogéniques de leishmanies, en relation avec leur distribution géographique, et d'en considérer le mécanisme de dissémination.

Etant donné les aspects épidémiologiques, cliniques et immunologiques des leishmanioses, on propose la constitution du *Complexe donovani,* ou *viscéral,* pour les leishmanies typiquement viscérotropes, et du *Complexe tropica,* ou *cutané,* pour les leishmanies dermotropes.

Pour le *Complexe donovani,* on signale les principales caractéristiques biologiques des types décrits ; on étudie les hôtes respectifs, l'habitat dans l'organisme parasité et les manifestations résultant de leur parasitisme dans les cellules du système réticulo-endothélial..

On étudie également leur structure antigénique, le phenoménes d'immunité et leur comportement à l'égard des médicaments.

En ce qui concerne leur existence en dehors de l'organisme parasité, on apprécie les éléments pour et contre la dissémination par les phlébotomes, ou par contact direct ou indirect, et l'on souligne l'importance des données qui pourront être fournies par leur culture.

Étant donné les nombreuses inconnues qu'offrent encore divers aspects des leishmanioses, on propose enfin un programme de recherches à effectuer, en vue de faciliter la lutte contre ces endémies.

SUMMARY

Leishmaniases should still be considered as potentially dangerous diseases in spite of their reduction in some endemic areas, because their incidence is still remarkable in some territories and some new foci have been recently described.

As a basis for all actions to be taken, it is very important to define pathogenic types in relation with their geographic distribution and to consider their dissemination mechanism.

In view of the leishmaniases epidemiologic, clinical, and immunologic aspects we propose the constitution of the *Donovani* or *Visceral complex* for the typically viscerotropic leishmaniae and of the *Tropica* or *Cutaneous complex* for the dermatropic ones.

Concerning the *Donovani complex* we mention the main biological characteristics of the described types, considering their respective hosts and habitat in the parasited organism and the changes connected with the presence of the leismaniae in the cells of the Reticulo-Endothelial System.

We consider the antigenic structure, immunitary phenomena and reaction to drugs.

Concerning the behaviour out of the parasited organism we consider the elements for and against dissemination by phlebotomes or by direct or indirect contact, and we stress the importance of the data which might be obtained through culture.

Finally, due to the many incognits which still persist in some leishmaniasis aspects, we point out a research program to implement the fight against such endemias.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ACTOR, P.—Protein an Vitamine Intake and Visceral Leishmaniasis in the Mouse. *Exp. Parasit. N. Y.*, 10, 1 : 1-20, 1960.

ADLER, S.—Observations of two races of *L. tropica.* Citado por ADLIR, S. & KATZENELLENBOGEN in *Annals of Trop. Med. a. Par.*, 46, 1 : 25-32, 1952.

ADLER, S. & KATZENELLENBOGEN, J.—The Problem of the Association Between Particular Strains of *Leishmania tropica* and the Clinica Manifestations Produced by them. *Ann. Trop. Med. Paras.*, 46, 1 : 25-32, 1952.

ADLER, S. & THEODOR, O.—Transmission of Diseae Agents by Phlebotominae Sand-Flies. *Annual Rev. Entom.*, 2 : 203-26, 1957.

ADLER, S. & THEODOR, O.—The behaviour of cultures of *Leishmania* sp. in *Phlebotomus papatasi. Ann. Trop. Med. Par.*, 21 : 111-134, 1927.

AHUIR, R. M. y GARCÍA, G. B.—Electroforesis sobre papel y reacción del antígeno metílico en el Kala-azar infantil. *Rev. Cl. Esp.* Madrid, 68, 4 : 228-233, 1958.

ANDRADE, Z. A.—Aspectos morfológicos da disproteinémia do calazar. *Rev. Assoc. Med. Brazileira,* 5, 6 : 413-21, 1959.

ANDRÉ, R., BRUMPT, L., DREYFUS, B., PENALECQ, A. et JACOB, S.—Leishmaniose cutanée, leishmaniose cutanée-ganglionaire et Kala-azar transfusionnel. *Bull. et Mem. Soc. Med. Hop. de Paris,* n.° 25-26 : 854-860, 1957.

APPUNN, E. & WEISS, C.—Schzogonieformen von *Leishmania donovani* in menschlichen Knochenmark. *Ztschr. F. Tropenmed. u. Parasit.* Stuttgard, 7, 1 : 93-9, 1956.

BALZER, R. J., DESTOMBES, P., SCHALLER, K. F. & SÉRIÉ, C.—Leishma-

niose cutanée pseudolépromateuse en Ethiopie. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 53, 2 : 293-8, 1960.

BASHIR, Y.—A Preliminary Report on the Occurrence of Infantile Kala-Azar in Northern Iraq. *Bull. Endem. Dis. Baghdad*, 1, 1 : 77-80, 1954. In *Trop. Dis Bull.*, 52, 3 : 260, 1955.

BAYARRI, V. S.—Datos de Laboratorio aplicabes al Diagnóstico del Kala-azar. *Medicamenta*, 7 : 179-186, 1949.

BAYARRI, V. S. y AHUIR, R. M.—Diagnóstico serológico del Kala-azar, con el antígeno metílico tuberculoso. *Rev. Cl. Esp.*, 25, 2 : 103-107, 1947.

BIAGI, F.—Intradermo reacciones com Leishmanina en Escárcega, Camp. (Mex.). *Medicina*, 33 : 255-260, 1953.

BIAGI, F.—Algunos comentarios sobre las Leishmanias y sus agentes etiológicos. *Leishmania Tropica Mexicana*, nueva subespecie. *Medicina*, 33 : 401-406, 1953.

BIAGI, F.—Síntesis de 70 historias clínicas de Leishmaniasis Tegumentaria en México (úlcera de los chicleros). *Medicina*, 33 : 385-396, 1953.

BOGLIOLO, L.—Sobre a anatomia patologica da leishmaniose visceral (a *Leishmania donovani*). *O Hospital*, 20, 4 : 591-610, 1941.

BRENER, Z., PELLEGRINO, J. & BATISTA, S. M.—A reacção de fixação do complemento com antigeno do bacilo da tuberculose no calazar humano. *Rev. Bras. Mal.* Río de Janeiro, 10, 2 : 195-8, 1958.

BROOKS, A. G.—Kala-azar in India and the Sandfly. *Ind. Med. Gaz.*, 85, 8 : 380-384, 1950.

CASTELLÁ, P. C.—Biología de las leishmanias. *Med. Cl.* Barcelona, 7, 2 : 97-109, 1946.

CAVOLLA DA MOTTA, L. A. C.—Epidemiologia e Profiláxia das leishmanioses Humanas. I parte. Epidemiologia geral das Leishmanioses. *Bol. Cl. Hosp. Civis de Lisboa*, 15, 2 : 313, 1951.

CHATTERGEE, A. N. & GHOSH, J. J.—Carbon Dioxide Assimilation by *Leishmania donovani*. *Nature*, 185 : 322, 1960.

CHATTERGEE, A. N. & GHOSH, J. J.—Studies on the Metabolism of *Leishmania donovani*, the causative Organism for Kala-Azar. *Ann. Biochem. & Exper. Med.* Calcutta, 19, 2 : 37-50. In *Trop. Dis. Bull.*, 57, 5 : 460, 1960.

CLAY, R. D. & ROSS, A. A.—Tardive Cutaneous Leishmaniasis. *Brit. Med. J. June*, 1 : 1279-80, 1956.

CONVIT, J., ALARCÓN, C. J., MEDINA, R., REYER, O. & KERDELL VEGAS, F.—Leishmaniasis tegumentaria difusa. Nueva entidad clínica-patológica y parasitaria. *Archivos Ven. de Med. Trop. & Parasit. Med.*, 3, 1 : 218-51, 1959.

CORRADETTI, A.—Lotta contra la Leishmaniosi mediante la lotta contro i flebotomi in Italia. *Rendiconti Istituto Superiore di Sanitá*, Rome, 17, 5 : 374-384, 1954.

CORRADETTI, A.—I focolai italiani di Kalaazar e il problema della leishmaniosi nel Sud Europa. *Parassitologia, Rome*, 2, 1/2 : 95-8, 1960.

COVALEDA, J., VIVES, J. y DURALL, C. S.—Leishmaniosis canina en Barcelona. *Rev. San. Hig. Pública*, 25 : 710-712, 1951.

CUNHA, R. V. DA, XAVIER, A. F. S. & DE ALENCAR, J. E.—Disproteinemia no calazar e suas relaçôes com a reacção de fixação de complemento. *Rev. Bras. Mal.*, Rio de Janeiro, 11, 1 : 45-54, 1959.

DE ALENCAR, J. E.—Aspectos clinicos do calazar americano. *Rev. Bras. Mal.*, Rio de Janeiro, 11, 1 : 19-44, 1959.

DEANE, L. M.—Epidemiologia e profilaxia do calazàr americano. *Rev. Bras. Mal.*, Rio de Janeiro, 10, 4 : 431-50, 1958.

DI STEFANO, F., PANARA, B. & PIETRANGELI, E.—La Leishmaniosi cutanea in Abruzzo nel decenio 1947-1956. *Ann. d. San. Pub.*, Rome, 20, 6 : 1243-60, 1959.

ERCOLI, N. & FINK, M.—Chemoterapeutic Studies on Cutaneous Leishmaniasis. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 106, 4 : 787-90, 1961.

ETHÉS, Y.—Leishmanioses. In Medecine Tropicale, Marcel Vaucel, Ed. Méd. Flammarion, 1952.

FAUST, E. C. & RUSSEL, P. F.—Craig and Faust' Clinical Parasitology. Lea & Febiger, 1957.

FORATTINI, O. P.—Sobre os reservatórios naturais da Leishmaniose tegumentar americana. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 2, 4 : 195-203, 1960.

FORATTINI, O. P., JUAREZ, E. BERNARDI, L. & DAUER, C.—Leishmaniose tegumentar, no território do Amapá, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, São Paulo, 1, 1 : 11-17, 1959.

FORKNER, C. E. & ZIA, L. S.—Viable *Leishmania donovani* in Nasal and Oral Secretions of Patients with Kala-azar and the Bearing of this Finding on transmission of the disease. *Journ. Exper. Med.*, 59 : 491-499, 1934.

FORKNER, C. E. & ZIA, L. S.—Further Studies on Kala-azar. *Leishmania* in Nasal and Oral Secretions of Patients and the Bearing of this Finding on the Transmission of the Disease. *Journ. Exp. Med.*, 61 : 183-203, 1935.

FRAGA DE AZEVEDO, J.—Sobre a epidemiologia e diagnóstico do Kala-azar. *Conf. Pediatria*, Vol. II, 1948.

FRAGA DE AZEVEDO, J.—L'état actuel du problème du Kala-azar au Portugal. *Arch. Inst. Past. Algérie*, 32 : 234-254, 1954.

FRAGA DE AZEVEDO, J.—Sur le diagnostic du Kala-azar. *Ann. Par. Hum. et Comp.*, 35, 5-6 : 687-703, 1960.

FRANÇA, C.—*Phlebotomus papatasii* (Scopoli) et fièvre à Pappataci au Portugal. *Bull. Soc. Pat. Exot.*, 6 : 123-4, 1913.

FURTADO, T. A., CISALPINO, E. O. & SANTOS, U. M.—«In vitro» Studies of the Effect of Amphotericin B in *Leishmania brasiliensis*. *Antibiotics and Chemotherapy*, N. Y., 10,11 : 692-3, 1960.

GARNHAM, P. P. C.—World Problems in Leishmaniasis Amoebiasis, Trypanosomiasis and Toxoplasmasis. O. M. S., 21 June 1960.

GHOSH, B. K., HALDAR, D. & CHATTERJEE, A. N.—Effect of Mycobacillin on the Metabolism of a Protozoal Organism, *Leishmania donovani*. *Ann. Biochem. & Exper. Med.*, Calcutta, 20, 11 : 303-8, 1960.

GHOSH, B. K., HALDAR, D. & CHATTERJEE, A. N.—Effect of Nystatin on the Metabolism of a Protozoal Organism, *Leishmania donovani*. *Ann. Biochem. & Exper. Med.*, Calcutta, 20, 2, 55-6, 1960. In *Trop. Dis. Bull.*, 57, 10 : 1034, 1960.

GIRAUD, P., RANQUE, J. et CABASSU, H.—Epidemiologie de la leishmaniose viscerale humaine Méditerranéenne, en particulier dans ses rapports avec la leishmaniose canine. *Arch. Franç. de Ped.*, 11, 4 : 1-17, 1954.

GROSSOWICZ, N. & CITRI, N.—Cultivation of *Leishmania tropica* under Defined Conditions. *Harefrah.*, Jerusalem, 49, 6 : 119-121. In *Trop. Dis. Bull.*, 53, 8 : 980, 1956.

GUIMARAES, N. A. & SILVA, Y.—Leishmaniose primitiva de localização genital e peri-genital. *Bol. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ.*, Bahiia, 1, 1 : 17-25, 1955.

HEISCH, R. B.—The Isolation of *Leishmania* from a Ground Squirrel in Kenia. *East. Afr. Med. Journ.*, 34, 5 : 183, 1957.

HENDERSON, L. H.—Clinical Observations on Kala-azar in the Fung Province of the Sudan. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 31 : 179-190, 1937.

INOKI, S., NAKANISHI, K. & NAKABAYASHI, T.—Study of *Leishmania donovani* with special reference to the Kinetoplast, Mitochondria, and Golgi Zone by Electron Microscope employing the Thin Technique. *Biken's J. Osaka*, 1, 2 : 194-7, 1958. In *Trop. Dis. Bull.*, 58, 1 : 40, 1961.

INOKI, S., NAKANISHI, K., NAKABAYASHI, T. & OHNO, M.—Fine Structure of the Flagellum of *Leishmania donovani* revealed by Electronmicroscope. *Med. J. Osaka, Univ.*, 7, 4 : 719-29, 1957.

JELLIFFE, R. S.—Cutaneous Leishmaniasis in Nigeria and the Western Sudan. *West African Med. J.*, 4 (n.s.), 2 : 92-4, 1955.

JIMÉNEZ, J. J. L. & OPPENHEIMER, W.—Sobre el valor de la electroforesis en papel para el diagnóstico precoz del Kala-azar. *An. Med.*, Barcelona, 43 : 272-276, 1957.

KIRK, R. & LEWIS, D. J.—Studies in Leishmaniasis in the Anglo-Egyptian Sudan : XI. *Phlebotomus* in relation to Leishmaniasis in the Sudan. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 49, 3 : 229-40, 1955.

LAMBORN, W. A.—The Haematophagus Fly as a possible Vector of Leishmania. *Bull. Endem. Dis. Baghdad*, 1, 3 : 239-49, 1955. In *Trop. Dis. Bull.*, 53, 6 : 733, 1956.

LATYSHEV, N. I. & KRYUKOVA, A. P.—The Genetic Relationship between various Species of *Leishmania*. Problems of Regional, General & Exper. Parasit. *Med. Zool. Moscow*, 8 : 211-15, 1953. In *Trop. Dis. Bull.*, 52, 6 : 522-23, 1955.

LEATHEM, J. H. & STAUBER, L. A.—Adrenal Lipid and Alkaline Phosphatase in Hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Endocrinology*, 50, 3 : 311-317, 1952.

LEON, L. A.—La *Leishmania brasiliensis* Viana 1911 y las Leishmaniasis otorrino-buco-faringolaringea y oftalmica. Atti del VI Congresso Internazionale de Microbiologia, Roma, 5, Sez. XV : 311-324, 1953.

MANSON-BAHR, P. E. C.—East African Kala-azar with special reference to the Pathology, Prophylaxis and Treatment. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 53, 2 : 123-36, 1959.

MANSON-BAHR, P. E. C.—The leishmanin Test and Immunity in Kala-Azar. *East African Med. J.*, 38, 4 : 165-7, 1961.

MANSON-BAHR, P. E. C. & HEISCH, R. R.—Studies in Leishmaniasis in East Africa. III. Clinical Features and Treatment. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 50, 5 : 465-471, 1956.

MANSON-BAHR, P. E. C., HEISCH, R. R. & GARNHAM, P. C. C.—Studies in Leishmaniasis in East Africa. IV. The Montenegro Test in Kala-Azar in Kenya. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 53, 5 : 380-83, 1959.

MALONE, R. H.—Transmission of Kala-azar in India. The case against the Sandfly. A rejoinder. *Ind. Med. Gaz.*, 82, 9 : 544-554, 1947.

MARUASHVILI, G. M.—Epidemiological Significance of Different Species of *Phlebotomus* in Georgia. *Med. Parasit. & Parasitic. Dis. Moscow*, 27, 5 : 591-5, 1958. In *Trop. Dis. Bull.*, 56, 3 : 285, 1959.

MC KINNON, J. A. & FENDALL, N. R. E.—Kala-azar in the Baringo Dis-

trict of Kenya. A preliminary Communication. *J. Trop. Med. & Hyg.*, 58, 9 : 205-209, 1955.

Mc Millan, B.—The Inhibition of Leptomonads of the Genus *Leishmania* in Culture by Antifungal Antibiotics. *Ann. Trop. Med. & Parasit.*, 54, 3 : 293-9, 1960.

Medina, R. & Romero, J.—Estudio clinico y parasitologico de uma nueva cepa de leishmania. *Arch. Venez. Med. Trop. y Par. Med.*, 3, 1 : 298-326, 1959.

Milovanovic, M. & Popovic, D.—Le Kala-Azar en Yougoslavie. *Acta Parasit. Polonica. Warsaw*, 7 : 559-72, 1959. In *Trop. Dis. Bull.*, 58, 1 : 39, 1961.

Miranda, F. J.—Estudios sobre el Kala-azar. V. La disproteinemia atípica. *Rev. Cl. Esp.*, 62, 4 : 251-254, 1956.

Miranda, F. J.—Métodos de Laboratorio para el diagnóstico del Kala-azar. *Rev. Cl. Esp.*, 65, 4 : 241-256, 1957.

Montiu, X. V.—Reflexiones a propósito de la diseminación de la leishmaniosis cutánea en España. *Medicamenta*, 21 : 45-47, 1954.

Noronha, T.—Mais quatro casos de leishmaniose cutanea autoctone. *Arq. Pat.*, 30, 1 : 105-128, 1958.

Nussenzweig, V.—Reacção de fixação do complemento para leishmaniose visceral com antigeno extraído do bacilo da tuberculose. Tecnica, sensibilidade e especificidade. *O Hospital*. Río de Janeiro, 51, 2 : 217-226, 1957.

Perianes, J., Peláez, J. L. y Vázquez, E.—Alteraciones del espectro proteico en el Kala-azar. *Rev. Cl. Esp.* Madrid, 68, 4 : 225-227, 1958.

Pernot, J., Ferrand, M. et Roumagnac, H.—Le Kala-azar parmi les troupes stationnées en Algérie. *Bul. et Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris*, Séance 25 nov., pág. 1.206, 1960.

Pifano, C. F.—Alguns aspectos de la patologia comparada geografica de la leishmaniasis tegumentaria en el tropica americano. *Gaz. Med. de Caracas*, 68, 1/3 : 89-98, 1960.

Pirame, V. & Becquet, R.—La Leishmaniose cutanée au Tchad. *Bull. Soc. Pathol. Exol.*, 51, 2 : 170-73, 1958.

Pringle, G.—Kala-azar in Iraq : Preliminary Epidemiological Considerations. *Bull. Endem. Dis.* Baghdad, 1, 4 : 275-94, 1956. In *Trop. Dis. Bull.*, 53, 9 : 1.106-7, 1956.

Pulvertaft, R. J. V. & Hoyle, G. F.—Stages in the life-cycle of *Leishmania donovani*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg.*, 54, 2 : 191-6, 1960.

Pyne, C. K. & Chakraborty, J.—Electron Microscopic Studies on the Basal Apparatus of the Flagellum in the Protozoon, *Leishmania donovani*. *J. Protozoology*. Utica, 5, 4 : 264-8, 1958. In *Trop. Dis. Bull.*, 56, 7 : 703-4, 1959.

Ramos, A. & Farinhote, A. A. C.—Contribuição para o conhecimento do Kala-azar em Portugal. *An. Inst. Med. Trop.*, 2, 4 : 1.485-1.500, 1952.

Rés, J. F.—Contribuição para o conhecimento da Leishmaniose em Portugal. *Anais Inst. Med. Trop.* Lisboa, 14, 3/4, 527-545, 1957.

Ribeiro, H.—Novos dados sobre a biologia dos *Phlebotomus*. Apresentado à Soc. Portuguesa de Biologia.

Rittérson, A. L. & Stauber, L. A.—Protein Intake and Leismaniasis in the Hamster. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 70 : 47-50, 1949.

Rossi, B.—Distribución Geográfica de la Leishmaniasis Tegumentaria y algunos datos para el plan de estudio del Kala-azar en Venezuela. Caracas, 1942.

Sabater, J. V.—Especies de *Phlebotomus* hallados en Barcelona y sus alrededores. *Rev. San. e Hig. Publ.*, 28 : 301-341, 1954.

Sampaio, S. A. P., Godoy, J. T., Paiva, Lamartine, Dillon, Neusa, L. & Lacaz, C. da S.—The Treatment of American (Mucocutaneous) Leismaniasis with Amphotericin B. *Arch. Dermat.*, 82, 4 : 627-35, 1960.

Sen Gupta, P. C. & Chatterji, A.—Observations on Drug Resistant Kala-Azar. *J. Indian Med. Ass.*, 36, 6 : 225-30, 1961.

Sergent, E., Parrot, L., Donatien, A. et Lestoquard.—La prophylaxie de la leishmaniose général méditerranéenne. *Arch. Inst. Past. d'Alg.*, 17, 2 : 221-230, 1939.

Shanker, A.—Electrophoretic Differential Serum Protein Pattern in Kala-azar. *Brit. Med. J.* May, 9 : 1.221-1.223, 1959.

Shortt, H. E. et Swaminath, C. S.—The Presence of *Leishmania donovani* in the Nasal Secretion of Cases of Indian Kala-azar. *Ind. Journ. Med. Res.*, 23 : 437-39, 1935.

Shóshina, M. A.—On the Mechanism of Transmission of Cutaneous Leishmaniasis. *C. R.* (Doklady), *Acad. Sci. U.R.S.S.* Moscow, 92, 447-8, 1953. In *Trop. Dis. Bull.*, 52, 9 : 884, 1955.

Silver, R. T., Pedreira, L., Korngold, L. & Engle, R. L., Jr.—Studies of Serum Protein Abnormalities in Kala-azar. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.*, 106, 2 : 365-8 1961.

Simitch, T., Gwozdenovitch, M. & Nevenitch, V.—Peut on considérer le chien comme réservoir d'infection pour l'homme par le

Kala-azar, dans toutes les régions de la Yougoslavie où cette maladie est endémique? *Bull. Acad. Serbe des Sci.*, Belgrade, 11 (n.s.), *Classe Sci. Méd.* 2, 42-3, 1954. In *Trop. Dis. Bull.*, 52, 7 : 620, 1955.

SOLANO, E. & VARGAS, S. M.—Nuevo tratamiento de leishmaniasis por *Leishmania brasiliensis* con Pirimetamina. Nota prévia. *Acta Med. Costaricense*, 3, 3 : 265-9, 1960.

SYMMERS, W. ST. C.—Leishmaniasis acquired by contagion. A Case of Marital Infection in Britain. *Lancet*, Jan., 16 : 127-32, 1960.

TAY-ELDIN, S. & AL HASSANI, M.—Kala-azar in Iraq. Analysis of 100 Cases. *J. Facul. of Med. Baghdad*, 3 (n.s.), 1 : 1-9, 1961. In *Trop. Dis. Bull.*, 58, 7 : 790, 1961.

TAVARES, A.—A Leishmaniose cutanea autoctone. *Imprensa Medica*, 9 : 129-3, 1943.

VON BRAND, T. & AGOSIN, M.—The utilization of Krebs Cycle Intermediates by the Culture Forms of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania tropica*. *J. Infect. Dis.*, 97, 3 : 247-9, 1955.

WRIGHT, M. I.—Kala-Azar of Unusual Duration associated with Agammaglobulinaemia. *Brit. Med. J.*, May, 9, 1218-21, 1959.