

A soro-aglutinação das Leishmanias *

pelo

Dr. A. M. da Cunha

(Chefe de serviço do I.O.C.)

Introdução — A existência da Leishmaniose visceral no Brasil, embora suspeitada, não havia, até 1934 sido demonstrada. Foi nessa data que apareceu o trabalho do Dr. H. PENA, revelando a existência de numerosos casos dessa doença no Norte e Nordeste do país. O trabalho desse autor baseava-se no encontro de parasitos desse gênero em fragmentos de fígado, colhidos por vicerotomia, para diagnóstico de febre amarela. Em vista disso, impunha-se o estudo detalhado da doença bem como do parasito que a produz. Esses estudos foram, em boa hora, empreendidos pelo Dr. EVANDRO CHAGAS, do Instituto Oswaldo Cruz, que seguiu nesse particular os conselhos de seu ilustre pai, o Prof. CARLOS CHAGAS. Coube-nos, nessa tarefa, o estudo do parasito sobre o qual já publicamos vários trabalhos, alguns em colaboração com aquele cientista.

No estudo do parasito, era, por certo, de grande importância a sua identificação a uma das espécies conhecidas ou a possível criação de nova espécie, caso os caracteres apresentados não se enquadrassem em nenhuma delas.

Entre os métodos de laboratório propostos para a identificação das espécies desse gênero soblevam dois : a reação de soro-aglutinação instituída por NOGUCHI e o aspecto macroscópico das culturas em placa, segundo as pesquisas de MAYER e RAY. Nenhum desses métodos recebeu confirmação da unanimidade dos pesquisadores que deles se ocuparam e, porisso mesmo, era de interesse o seu estudo, com o fim de resolver o problema de seu valor diagnóstico e, no caso afirmativo, aplicá-los à identificação do agente do Kala-Azar americano.

No presente trabalho nos ocuparemos apenas da reação de soro-aglutinação, deixando para outra publicação o estudo dos aspectos das culturas em placa, segundo a técnica de MAYER e RAY, que também foi objeto de nossos estudos.

* Recebido para publicação a 5 de março e dado à publicidade em abril de 1942.

No decurso de nossa exposição, empregaremos para designar o agente do Kala-Azar americano a denominação de *Leishmania chagasi*. Assim procedendo, procuramos evitar o emprego frequente de longo circunlóquio para designar esse parasito, sem que isso represente uma mudança na opinião que expendemos em trabalho anterior, no qual consideramos o flagelado em questão como idêntico a *Leishmania infantum*. O termo *Leishmania chagasi* é pois aqui empregado com o fim meramente designativo da procedência das culturas empregadas.

Material e métodos de pesquisa

Material — Em nossos trabalhos sobre aglutinação de Leishmanias utilizamos 26 amostras pertencentes a todas as espécies admitidas. As amostras da *L. donovani*, *L. infantum* e *L. tropica* eram na sua quasi totalidade amostras isoladas há longo tempo e que nos foram enviadas do Velho Mundo por diversos Institutos científicos. Somente uma amostra de *L. donovani*, a amostra 45 de Adler, era recentemente isolada (10 meses antes de seu recebimento) e se mostrou ainda virulenta em nossas mãos, produzindo infecção de um Hamster.

Ao contrário, as amostras de *L. brasiliensis* e da *L. chagasi* eram quasi todas recentemente isoladas quando utilizadas em nossas experiências. Fazia exceção a essa regra, a *L. brasiliensis*, amostra Flavio, isolada há cerca de 10 anos quando iniciamos nossas experiências. A amostra J.A., embora recentemente isolada quando utilizada em 1937, foi empregada cerca de três anos mais tarde com o fim de estudar as alterações por acaso sofridas em sua constituição antigenica.

Damos a seguir a lista das amostras empregadas acompanhadas dos dados sobre sua procedência e data de isolamento.

Leishmania donovani

Mayer-Werner : Isolada em 1913 do sangue de um doente de Kala-Azar indiano no Inst. de Med. Tropical de Hamburgo. Recebida deste Instituto.

Sulimad : Isolada em 1924, de um doente de Kala-Azar indiano no Inst. de Med. Tropical de Hamburgo. Recebida deste Instituto.

Assimody : Isolada em 1925 de um doente de Kala-Azar indiano no Inst. de Med. Tropical de Hamburgo. Recebida deste Instituto.

China : Isolada na China por YOUNG. Recebida do Prof. NOGUCHI, do Instituto Rockefeller.

45 : Isolada em Novembro de 1936, de um doente de Kala-Azar indiano. Enviada pelo Prof. ADLER.

Leishmania infantum

Ka : Isolada por NICOLLE no Norte da África. Recebida do Inst. Bacteriológico de Buenos Ayres.

Prasek : Isolada em Zagreb pelo Prof. PRASEK, do sangue e do baço de um doente. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Taschkent : Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo para onde foi levada pelo Prof. SOFIEFF em 1931.

Leishmania tropica

Nöller : Isolada na Palestina pelo Dr. THEODOR. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Iessner : Isolada em 1921 pelo Prof. IESSNER em Köenisberg de um doente do Turkestão, e recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Moschkowsky : Isolada pelo Dr. MOSCHKOWSKY em Moscou, de um doente do Turkestão. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Tunis : Isolada por NICOLLE, de um doente em Tunis. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Jerichó : Isolada em Hamburgo de um doente infectado em Jerichó. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Leishmania brasiliensis

Flavio : Isolada pelo Dr. FLAVIO DA FONSECA em 1927, em S. Paulo e por ele enviada.

Marilia : Isolada em 1935, de um doente na localidade de Marilia (Estado de S. Paulo).

J. A. : Isolada em 1937, em S. Paulo pelo Dr. L. SALLES GOMES e por ele enviada.

Baptista : Isolada em 1940, em S. Paulo, pelo Dr. BRUNO RANGEL PESTANA e por ele enviada.

Leishmania chagasi

Luis Ferreira : Isolada no Instituto Oswaldo Cruz em 1936, de um doente proveniente do Estado de Sergipe.

Florisvaldo : Isolada de um doente em 1937, no Estado do Pará.

Pantoja : Isolada de um doente em 1937, no Estado do Pará.

Teves : Isolada de um doente em 1937, no Chaco Argentino.

Isaias : Isolada de um doente em 1937, no Estado do Pará.

Cão 1 : Isolada de um cão naturalmente infectado, em 1937, no Estado do Pará.

Jolin : Isolada no Instituto Oswaldo Cruz em 1937, de um cão naturalmente infectado enviado do Estado do Pará.

Cão B : Isolada em 1938, de um cão experimentalmente infectado com as amostras *Jolin* e *Magerona*, esta última proveniente de cão naturalmente infectado no Estado do Pará.

Não te importes : Isolada de cão naturalmente infectado no Estado do Pará com passagens pelo Hamster.

As amostras provenientes do Estado do Pará foram isoladas pelo Dr. EVANDRO CHAGAS e seus auxiliares do Serviço de Grandes Endemias. A amostra *Teves*, proveniente do Chaco Argentino, foi isolada também pelo Dr. EVANDRO CHAGAS de um caso assinalado pelo Dr. C. ROMANA.

Métodos de pesquisa — Duas técnicas diferentes se apresentavam na bibliografia para a execução das pesquisas que desejávamos efetuar. A primeira, proposta por NOGUCHI, consistia em cultivar as *Leishmanias* no meio por ele criado para *Leptospiras*, ao qual se havia juntado imune-soro, obtido em coelhos, em lugar de soro normal; o segundo consistia em executar as aglutinações com técnica semelhante à usada para as bactérias e que havia sido apresentada em sua forma mais perfeita no trabalho de RAY.

O primeiro método apresenta *a priori*, dois inconvenientes: o de reunir dois fenômenos com ótimos de temperatura diferentes e o de não se prestar a uma análise quantitativa. Algumas experiências executadas a princípio, vieram mostrar que esse método realmente não se prestava para chegar aos resultados que tínhamos em vista.

O método que adotamos em nossas pesquisas foi o de RAY, que consiste principalmente em utilizar, quer para a imunização dos coelhos destinados a fornecer os soros aglutinantes, quer para as suspensões de *Leishmania* a

serem usadas nas experiência de aglutinação, de flagelados cultivados em placas, segundo o método de MAYER e RAY.

Os soros aglutinantes eram preparados em coelhos, aos quais se injetavam, por via intra-venosa, suspensões espessas de flagelados, na dose de 1 a 2 cc com intervalo de cinco dias entre cada injeção. Geralmente quatro a cinco injeções eram suficientes para obter um soro aglutinante bastante forte, capaz de aglutinar geralmente a 1/20.000 chegando mesmo por vezes a 1/80.000. A sangria dos coelhos era praticada cerca de 10 dias após a última injeção.

Para a prática da aglutinação tomávamos uma série de tubos de hemolise e colocávamos em cada um deles 0,5 cc de água fisiológica com exceção do 1.º quando desejávamos partir de 1/200. Fazíamos separadamente uma diluição de soro aglutinante a 1/100, colocávamos no primeiro tubo 0,5 cc dessa diluição, no segundo tubo juntávamos também 0,5 cc da diluição do soro, misturando bem com a água fisiológica nele contida, retirando depois 0,5 cc, que era acrescentado ao terceiro tubo e assim por diante. Obtínhamos assim a partir de 1/100, uma série de diluições crescentes do simples ao dobro. O último tubo era conservado com 0,5 cc de água fisiológica e servia como testemunha com o fim de excluir a existência da aglutinação espontânea como causa de erro. Fazíamos a parte uma suspensão em água fisiológica de *Leishmanias* cultivadas em placa, suspensão essa que devia apresentar turvação semelhante à observada nas suspensões empregadas na aglutinação de bactérias. Sempre que tínhamos que utilizar em uma mesma experiência, diversas amostras de *Leishmania* e com o fim de obtermos resultados comparáveis entre si, procurávamos fazer as suspensões com igual grau de turvação. A cada um dos tubos, com as diluições de soro, juntávamos 0,5 cc da suspensão de *Leishmanias*, inclusive no tubo testemunha, que em seguida eram levados a estufa a 37°, procedendo-se a leitura cerca de duas horas depois.

E' óbvio que com a junção de 0,5 cc da suspensão de *Leishmanias* as diluições de soro contidas nos tubos ficaram duas vezes mais fortes.

As *Leishmanias* empregadas nas suspensões para aglutinação eram como já foi dito, provenientes de culturas em placa com cerca de oito dias após a semeadura. As culturas muito recentes tem o inconveniente de apresentarem às vezes o fenômeno de aglutinação espontânea, enquanto que as culturas mais velhas apresentam-se menos aglutinaíveis e isso devido a existência de formas mortas, em via de desagregação.

A aglutinação espontânea ocorre muitas vezes nas culturas recentemente isoladas e isso se deu em nossas experiências principalmente com a *Leishmania brasiliensis* sem que possamos afirmar ser esse caráter peculiar a essa

espécie. Além disso, a aglutinação espontânea ocorre esporadicamente sem que se possa ligar o fenômeno a qualquer condição de cultura.

Os resultados obtidos com essa técnica são bastantes nítidos e apresentam-se nos primeiros tubos com a formação de flocos grossos, em pequeno número e com clarificação completa do líquido (++++); nos tubos seguintes, embora os flocos sejam ainda relativamente grossos, o líquido se apresenta ligeiramente turvo (+++); nos demais tubos observamos a presença de flocos mais finos (++) e por fim de flocos finíssimos (+).

Essa descrição corresponde ao aspecto macroscópico da reação. Excluímos em nossas experiências o exame microscópico, pois ele é desnecessário nos tubos em que a aglutinação é perfeitamente visível a olho nú e impreciso nos tubos finais em que, de modo algum, serve para esclarecer os limites da aglutinação.

Conforme veremos ao tratar dos resultados obtidos, a simples reação de aglutinação não fornece resultados suficientemente nítidos, de maneira a permitir uma análise precisa do fenômeno que desejávamos esclarecer. Recorremos por isso a absorção de aglutininas já praticadas nas bactérias, constituindo o conhecido fenômeno de Castellani.

Para esse fim, nas primeiras experiências, fizemos uma espessa suspensão de *Leishmanias* cultivadas em placa, na própria diluição do soro em que pretendíamos praticar a absorção. Esse método apresentava o grave inconveniente de tornar o soro impediente e isso, provavelmente, devido a ação colóide-protetora de substâncias do meio de cultura contidas no líquido que impregnava os corpos dos flagelados.

Com o fim de evitar esse inconveniente, usamos, depois, lavar as *Leishmanias* uma ou duas vezes em água fisiológica antes de juntá-las à diluição do soro em que desejávamos praticar a absorção. Desse modo obtivemos resultados satisfatórios sem que se possa, porém, excluir de todo a ação impediente já referida.

Em todo o caso, quando não se observava aglutinação com nenhuma das amostras empregadas, com o fim de verificar se esse fato corria por conta da absorção total (*) das aglutininas ou da ação impediente do soro absorvido, tomávamos o primeiro tubo de cada uma das séries, isto é, os tubos em que o soro absorvido era contido em maior proporção, juntávamos a esses tubos 0,1 cc de diluições crescentes do soro aglutinante empregado para absorção mas em natureza e obtínhamos assim em cada tubo uma diluição cerca de

(*) A designação *absorção total* significa aqui que não houve aglutinação em nenhum dos tubos da prova com soro absorvido.

10 vezes maior que a acrescentada. Caso observássemos aglutinação nesses tubos, podíamos concluir que a ausência de aglutinação na primeira experiência era realmente causada pela absorção total das aglutininas e não pela ação impediante do soro absorvido.

Parte experimental — Ao iniciar nossas pesquisas, possuíamos uma única amostra de *L. chagasi*, a amostra *L.F.* e algumas amostras de *Leishmanias* de outras proveniências, de todas as espécies admitidas, a maioria delas, porem representada por uma única amostra.

Preparamos a princípio dois soros aglutinantes; um, para a *L. donovani*, amostra *Assimody*, outro, para a *L. chagasi*, a amostra *L.F.*

Com cada um desses soros fizemos uma experiência de aglutinação empregando uma amostra de cada espécie conhecida e a amostra *L.F.* de *L. chagasi*. Essas experiências constam dos quadros 1 e 2; no primeiro, usamos o soro preparado com a *L. donovani* amostra *Assimody*, e no segundo, o soro preparado com a *L. chagasi*, amostra *L.F.*

QUADRO 1
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
Soro anti-donovani (Amostra *Assimody*) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST
<i>Assimody (L. donovani)</i>	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
<i>Ka (L. infantum)</i>	+++	+++	+++	++	—	—	—	—
<i>L. F. (L. chagasi)</i>	+++	+++	++	+	—	—	—	—
<i>Noller (L. tropica)</i>	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
<i>Marilia (L. brasil.)</i>	++	++	+	+	—	—	—	—

QUADRO 2
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
Soro anti-chagasi (Amostra *L. F.*) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
<i>L. F. (L. chagasi)</i>	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
<i>Assimody (L. donovani)</i>	+++	+++	++	+	—	—	—	—
<i>Ka (L. infantum)</i>	+++	++	+	—	—	—	—	—
<i>Noller (L. tropica)</i>	+++	++	+	+	—	—	—	—
<i>Marilia (L. brasil.)</i>	++	++	++	+	+	+	—	—

NOTA — Nestas aglutinações, executadas em 1936 +++ significa aglutinação máxima.

O exame do primeiro quadro mostra que todas as amostras empregadas foram aglutinadas, que os títulos de aglutinação apresentam diferenças pouco acentuadas e que a *L. tropica*, amostra *Nöller*, apresenta o mesmo título de aglutinação que a *L. donovani*, amostra *Assimody* que serviu para o preparo do soro. No segundo quadro, observa-se também aglutinação de todas as amostras empregadas, diferenças mais acentuadas nos títulos de aglutinação sendo que a amostra que mais se aproxima pelo título de aglutinação da amostra *L.F.* que serviu para o preparo do soro, é a *L. brasiliensis*, amostra *Marilia*. Nas duas experiências, observa-se que as *Leishmanias* que mais se aproximam pelo título de aglutinação pertencem a espécie admitidas por todos como diferentes, sendo nos dois casos uma visceral e outra tegumentar. Além disso, as diferenças dos títulos observados, principalmente na primeira experiência, são pequenas para permitir uma segura separação das espécies.

Resolvemos, pois, recorrer as experiências de absorção de aglutininas, empregando a técnica já descrita no capítulo respectivo.

Nos primeiros ensaios, com o fim de formar uma idéia sobre a exequibilidade do método, empregamos sempre para comparação uma amostra visceral e outra tegumentar, isto é, amostras pertencentes a espécies admitidas por todos como distintas. Tanto nessas como em todas as outras experiências de absorção, fazíamos ao lado do ensaio com soro absorvido, outro com o soro em natureza, com o fim de verificar a atividade do soro em relação às amostras empregadas.

Na primeira experiência desse gênero, cujo resultado consta dos quadros 3 e 4, empregamos o soro preparado com a *L. donovani*, amostra *Assimody*, usando para a aglutinação essa mesma amostra e a *L. tropica*, amostra *Iessner*.

No quadro 3, vemos o resultado obtido com o soro em natureza onde se pode observar que ambas as amostras são aglutinadas e que os títulos de aglutinação são bem pouco diferentes, confirmando os resultados obtidos anteriormente. No quadro 4, vemos o resultado da experiência executada com

QUADRO 3

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	TEST.
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Iessner (<i>L. tropica</i>).....	+++	+++	++	++	+	—	—	—

QUADRO 4
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela *L. trópica* (Amostra Iessner)

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	TEST.
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	+++	+++	++	++	+	—	—	—
Iessner (<i>L. tropica</i>).....	—	—	—	—	—	—	—	—

NOTA — Nestas aglutinações, executadas em 1936 + + + significa aglutinação máxima.

o mesmo soro, no qual se praticara a absorção de aglutininas pela *L. tropica*, amostra *Iessner*. Nesse quadro notaremos que a absorção de aglutininas foi completa em relação a essa amostra que não mais foi aglutinada, enquanto persistiam no mesmo soro aglutininas para a *L. donovani*, amostra *Assimody* que continuava a ser aglutinada e em título relativamente elevado.

Experiência semelhante foi feita com o mesmo soro, utilizando, porem, ao lado da *L. donovani*, amostra *Assimody*, a *L. brasiliensis*, amostra *Flavio*.

QUADRO 5
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

25-11-1936

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	TEST.
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—
Flavio (<i>L. brasil.</i>).....	+++	+++	+++	++	+	+	—	—

QUADRO 6
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

26-11-1936

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela *L. brasiliensis* (Amostra Flavio)

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	TEST.
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	++	++	++	+	—	—	—	—
Flavio (<i>L. brasil.</i>).....	—	—	—	—	—	—	—	—

NOTA — Nestas aglutinações, executadas em 1936 + + + significa aglutinação máxima.

Os resultados obtidos foram muito semelhantes aos das experiências anteriores, isto é, desaparecimento total das aglutininas para a *L. brasiliensis*, amostra *Flavio* que serviu para a absorção, persistência de aglutininas para a *L. donovani*, amostra *Assimody*.

Nessas experiências vemos que o soro preparado com uma amostra, absorvido por outra de espécie diferente, conserva as aglutininas para a primeira, embora a absorção tenha sido total em relação a amostra usada para esse fim.

Fizemos, então, uma experiência semelhante a essas, usando, porém, para comparação, além da amostra que serviu para o preparo do soro, outra da mesma espécie.

O resultado dessa experiência consta dos quadros 7 e 8.

QUADRO 7

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

28 e 29-2-1937

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
<i>Assimody (L. donovani)...</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
<i>Sulimad (L. donovani)...</i>	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
<i>Flavio (L. brasil.).....</i>	++	++	++	++	+	—	—	+	—	—

QUADRO 8

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

28 e 29-2-1937

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela *L. brasiliensis* (Amostra Flavio)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
<i>Assimody (L. donovani)...</i>	++	++	++	+	+	—	—	—	—
<i>Sulimad (L. donovani).....</i>	++	++	++	+	—	—	—	—	—
<i>Flavio (L. brasiliensis).....</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—

No segundo desses quadros vê-se que, apesar da absorção de aglutininas ser total em relação a espécie utilizada para esse fim, no caso a *L. brasiliensis*, amostra *Flavio*, persistiam, no soro absorvido, anticorpos capazes não só de

Outra experiência, feita com o soro preparado com a amostra *L.F.*, absorvido pela amostra *Assimody*, deu resultado semelhante, embora menos acentuado, como se pode observar nos quadros 11 e 12.

QUADRO 11

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

9-12-1936

Soro anti-chagasi (Amostra *L. F.*) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	TEST.
<i>L. F. (L. chagasi)</i>	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
<i>Assimody (L. donovani)</i>	+++	+++	+++	++	+	—	—	—

QUADRO 12

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

9-12-1936

Soro anti-chagasi (Amostra *L. F.*) absorvido pela *L. donovani* (Amostra *Assimody*)

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	TEST.
<i>L. F. (L. chagasi)</i>	++	++	+	—	—	—	—	—
<i>Assimody (L. donovani)</i>	—	—	—	—	—	—	—	—

Todas essas experiências foram efetuadas no ano de 1936.

Em 1937 iniciamos nova série de experiências, já então com novas amostras de *L. chagasi*, recentemente isoladas no norte do País. Nessa série empregamos as amostras *Florisvaldo*, *Pantoja* e *Cão 1*, as duas primeiras isoladas de casos humanos e a última de cão naturalmente infectado, comparando-as com as amostras *Assimody*, *Ka* e *Flavio*, pertencentes respectivamente às espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. brasiliensis*. O soro empregado foi o preparado com a amostra *L.F.* e já utilizado em experiências anteriores. Infelizmente havíamos perdido essa amostra pelo que não figura nessas experiências.

Juntamente com as experiências de absorção, fizemos, como de praxe, a prova de aglutinação com o soro em natureza, sobre as seis amostras empregadas. O resultado que consta do quadro 13 mostra que os títulos de

aglutinação, embora apresentando diferenças pequenas, são sempre mais elevados nas amostras de *L. chagasi* do que nas outras.

QUADRO 13

28-4-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	TEST.
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>)....	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—
Ka (<i>L. infantum</i>)....	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	—	—	—
Flavio (<i>L. brasil.</i>)....	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—

As provas de absorção desse soro com cada uma das três amostras acima referidas, deu sempre idênticos resultados, isto é, desaparecimento de aglutinação para a amostra empregada na absorção, persistência de aglutinação, embora em baixo título, para todas as amostras de *L. chagasi*, como se pode verificar nos quadros 14, 15 e 16.

Em continuação a essas experiências, já então de posse de novas amostras de outras espécies e tendo preparado soros aglutinantes para cada uma delas, fizemos outra série de experiências com o mesmo fim, isto é, comparar as diversas amostras de *L. chagasi* com cada uma das amostras de outras espécies.

QUADRO 14

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

22-4-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela *L. infantum* (Amostra Ka)

AMOSTRA	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	TETS.
Ka (<i>L. infantum</i>).....	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	+	+	+	—	—	—	—

QUADRO 15

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

8-5-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela *L. donovani* (Amostra Assimody)

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	TEST.
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	—	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	++	+	+	—	—	—	—

QUADRO 16

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

7-5-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela *L. brasiliensis* (Amostra Flavio)

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
Flavio (<i>L. brasil</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	—	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	—	—	—	—	—

QUADRO 17

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

22-6-1937

Soro anti-infantum (Amostra Ka) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
Ka (<i>L. infantum</i>).....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Prasek (<i>L. infantum</i>).....	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—	—	—
Taschkent (<i>L. infantum</i>)..	++++	++	+	+	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>)	++++	++++	++++	++	+	—	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—	—

QUADRO 18

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

25-6-1937

Soro anti-infantum (Amostra Ka) absorvido pela *L. chagasi* (Amostra Florisvaldo)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 <i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Ka (<i>L. infantum</i>).....	++++	++++	+++	++	+	—	—
Prasek (<i>L. infantum</i>).....	++	++	+	+	—	—	—
Taschkent (<i>L. infantum</i>).....	++	+	+	—	—	—	—

As primeiras provas foram feitas com o soro *anti-infantum* preparado com a amostra *Ka*. Na experiência feita com o soro em natureza e cujo resultado consta do quadro 17, vemos que os títulos de aglutinação das amostras de *L. chagasi* são idênticos entre si e mais baixos que os da amostra *Ka*, que serviu para a preparação do soro, bem como dos da amostra *Prasek*, que dela pouco se afasta. Entretanto, uma amostra de *L. infantum*, a amostra *Taschkent*, apresenta título ainda mais baixo que o das amostras de *L. chagasi*.

QUADRO 19

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

13-7-1937

Soro anti-donovani (Amostra China) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{10240}$	TEST.
China (<i>L. donovani</i>).....	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
Assimody (<i>L. donovani</i>)..	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Mayer - Werner (<i>L. donovani</i>).....	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Prasek (<i>L. infantum</i>)....	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>)..	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>).....	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	++++	+++	+	+	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO 20

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

14-7-1937

Soro anti-donovani (Amostra China) absorvido pela *L. chagasi* (Amostra Florivaldo)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
Florivaldo (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
China (<i>L. donovani</i>).....	+++	++++	+++	+++	++	+	—
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	+++	+++	+	—	—	—	—
Mayer (<i>L. donovani</i>).....	+++	++	+++	++	++	+	—
Prasek (<i>L. infantum</i>).....	+++	++	++	+	+	—	—

Na prova de absorção, que foi feita com a amostra *Florivaldo*, pudemos verificar o desaparecimento total de aglutininas, não só para essa amostra como para as demais da mesma espécie. Ao contrário, persistiam anticorpos capazes de aglutinar todas as amostras de *L. infantum* empregadas, mesmo em títulos bastante elevados. Experiência semelhante foi feita com um soro *anti-donovani* preparado com a amostra *China*. Nessa experiência, empregamos além de diversas amostras de *L. donovani* a amostra *Prasek*, de *L. infantum*, bem como uma nova amostra de *L. chagasi*, a amostra *Teves*, isolada na Argentina.

Os resultados que constam dos quadros 19 e 20 são semelhantes aos da experiência anterior.

QUADRO 21

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

27-7-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST.
Flavio (<i>L. brasil.</i>)..	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—
» Florivaldo (<i>L. chagasi</i>).....	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>)	++++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>)	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO 22
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

27-7-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) absorvido pela *L. chagasi*
(Amostra Florivaldo)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
Florivaldo (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Flavio (<i>L. brasil.</i>)	+++	++++	++++	++++	++++	+++	—

QUADRO 23

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

5-8-1937

Soro anti-tropica (Amostra Iessner) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
Noller (<i>L. tropica</i>)	++++	+++	++	+	+	—	—	—	—	—
Florivaldo (<i>L. chagasi</i>)	++++	+++	+	—	—	—	—	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>)	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>)	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
Mosch (<i>L. tropica</i>)	+++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—

QUADRO 24

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

5-8-1937

Soro anti-tropica (Amostra Iessner) absorvido pela *L. chagasi* (amostra Florivaldo,)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
Florivaldo (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Noller (<i>L. tropica</i>)	++	++	+	+	—	—	—
Moschkowski (<i>L. tropica</i>)	+++	+++	++	++	+	+	—

Experiências semelhantes foram efetuadas com soros preparados com as amostras *Flavio* da *L. brasiliensis* e *Iessner* da *L. tropica*, com idênticos resultados, quadros 21 a 24.

Essas experiências mostram que a *L. chagasi* se comporta, em relação a soro aglutinação, de maneira diferente das amostras de outras espécies e que todas as amostras de *L. chagasi* se comportam de maneira idêntica.

Restava comparar as diversas amostras de *L. chagasi* entre si. Para isso, fizemos as provas que constam dos quadros 25 a 28.

QUADRO 25
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
24-4-1937
Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{20}$	$\frac{1}{40}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{160}$	$\frac{1}{320}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{2560}$	$\frac{1}{5120}$	$\frac{1}{10240}$	TEST
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—

QUADRO 26
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
7-5-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela *L. chagasi* (amostra Florisvaldo)

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	1 TEST.
Florisvaldo <i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja <i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—

Nas duas primeiras utilizamos o soro preparado com a amostra L.F. em natureza e absorvido pela amostra *Florisvaldo*. O soro em natureza (quadro 25) aglutinou todas as amostras em título sensivelmente idêntico, enquanto que o soro absorvido (quadro 26) não mais aglutinou nenhuma das amostras empregadas. Nas duas outras experiências lançamos mão do soro preparado com a amostra *Florisvaldo*, em natureza e absorvido pela amostra *Cão 1* e os resultados obtidos foram idênticos aos das experiências precedentes.

QUADRO 27

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

17-8-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TES.
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>)	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—	—

QUADRO 28

17-8-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) absorvido pela *L. chagasi* (Amostra Cão 1)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>)	—	—	—	—	—	—	—

Examinando em conjunto os resultados obtidos até então, vemos que todas as amostras empregadas de *L. chagasi* se separavam pela soro-aglutinação das de outras espécies, ao passo que apresentavam, entre si, idêntica constituição antigênica, qualquer que fosse o local de sua proveniência, Norte do Brasil ou Argentina, qualquer que fosse o animal de que tivesse sido isolada, homem ou cão.

Resolvemos então fazer nova série de experiências comparando as diversas espécies conhecidas entre si. Essas experiências deram resultados inesperados e contraditórios. Assim, de um lado, amostras de espécies diferentes apresentavam as vezes constituições antigênicas idênticas ou muito próximas para permitir sua separação; por outro lado, amostras da mesma espécie mostravam constituições antigênicas bastante diferentes entre si. Como exemplo citaremos algumas de nossas experiências. Nos quadros 29 a 32 vemos

os resultados obtidos com as amostras *Assimody* e *Ka*, pertencentes, respectivamente, às *Leishmanias donovani* e *infantum*.

QUADRO 29

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

10-4-1937

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
Assimody (<i>L. donovani</i>)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
Ka (<i>L. infantum</i>).....	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—

QUADRO 30

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

10-4-1937

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela *L. infantum* (Amostra Ka)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Ka (<i>L. infantum</i>).....	+	+	+	—	—	—	—	—	—

QUADRO 31

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

9-4-1937

Soro anti-infantum (Amostra Ka) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
Ka (<i>L. infantum</i>).....	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Assimody (<i>L. donovani</i>)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—

QUADRO 32

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

9-4-1937

Soro anti-infantum (Amostra Ka) absorvido pela *L. donovani* (Amostra Assimody)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST
Ka (<i>L. infantum</i>).....	++	++	+	+	-	-	-	-	-
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Nos dois primeiros quadros (29 e 30) empregamos o soro preparado com a amostra *Assimody* em natureza e absorvida pela amostra *Ka*. Os títulos de aglutinação do soro em natureza para as duas espécies é o mesmo, no soro absorvido, embora não houvesse absorção total das aglutininas, pois ambas foram ainda aglutinadas; a diferença observada entre os títulos de aglutinação das duas espécies é muito pequena para ser significativa. Duas outras experiências foram feitas com o soro preparado com a amostra *Ka* com idêntico resultado. Outras provas foram efetuadas empregando o soro preparado com a *L. brasiliensis*, amostra *Flavio*, comparando essa espécie com duas amostras de *L. tropica*, *Tunis* e *Iessner*.

Na primeira experiência (quadro 33) feita com o soro em natureza, vemos que as amostras *Flavio* de *L. brasiliensis* e *Tunis* de *L. tropica* são aglutinadas a títulos sensivelmente idênticos, enquanto que a amostra *Iessner* pertencente também à *L. tropica*, era aglutinada em título muito mais baixo. A absorção do soro por essa última amostra, embora não esgotasse de todo as aglutininas para ela, deixa ver uma queda muito grande no título de aglutinação dessa

QUADRO 33

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

10-2-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST.
Flavio (<i>L. brasiliensis</i>).....	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
Tunis (<i>L. tropica</i>).....	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-
Iessner (<i>L. tropica</i>).....	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-	-

QUADRO 34

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

10-2-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) absorvida pela *L. tropica* (Amostra Iessner)

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	TES.
Flavio (<i>L. brasil.</i>).....	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Tunis (<i>L. tropica</i>).....	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Iessner (<i>L. tropica</i>).....	+	+	+	—	—	—	—	—

QUADRO 35

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

11-2-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) absorvido pela *L. tropica* (Amostra Tunis)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{1280}$	$\frac{1}{25600}$	TEST
Flavio (<i>L. brasil.</i>).....	—	—	—	—	—	—	—	—
Tunis (<i>L. tropica</i>).....	—	—	—	—	—	—	—	—
Iessner (<i>L. tropica</i>).....	—	—	—	—	—	—	—	—

amostra, enquanto as outras duas sofreram queda muito menor e na mesma proporção em ambos, quadro 34.

Dessas experiências se pode concluir que a *L. tropica*, amostra *Tunis*, apresenta uma constituição antigênica muito mais próxima da amostra *Flavio*, da *L. brasiliensis*, do que a amostra *Iessner*, pertencente à mesma espécie. Para confirmar esse resultado, fizemos a absorção do mesmo soro pela amostra *Tunis* e pudemos então verificar o desaparecimento total das aglutininas para as três amostras em questão, o que prova ter a amostra *Tunis* da *L. tropica* a mesma constituição antigênica que amostra *Flavio* da *L. brasiliensis*. Por essas experiências vemos que uma amostra de *L. tropica*, a amostra *Tunis*, apresenta constituição antigênica diferente de outra da mesma espécie, a amostra *Iessner* e idêntica a da amostra *Flavio* de espécie diferente.

Muitas outras experiências foram executadas com idênticos resultados, isto é, amostras de uma mesma espécie, apresentavam quase sempre constitui-

ção antigênica diferente, enquanto que, quando duas amostras, apresentavam constituição antigênica idêntica ou muito próxima pertenciam geralmente a espécies diferentes.

Comparando esses resultados com os anteriormente obtidos em que todas as amostras de uma mesma espécie (*L. chagasi*) mostraram idêntica constituição antigênica, procuramos qual a diferença entre essas amostras e as demais com que trabalhamos, a que pudéssemos atribuir essa diversidade de comportamento. Ora, a única particularidade que encontramos foi que todas as amostras de *L. chagasi* utilizadas eram *recentemente isoladas*, ao passo que todas as amostras das outras espécies *haviam sido isoladas há muito tempo* e conservadas em cultura desde então. Poder-se-ia pois, admitir que a permanência em cultura por longo prazo tivesse alterado a constituição antigênica primitiva dessas amostras, com formação de antígenos secundários, responsáveis pela diversidade dos resultados obtidos.

Resolvemos, então, em novas experiências, utilizar somente amostras recentemente isoladas das diversas espécies, comparando-as entre si. Esse nosso propósito, porém, esbarrou em grande dificuldade pois, se de um lado possuíamos numerosas amostras recentemente isoladas de *L. chagasi*, por outro era difícil obter amostras nas mesmas condições das demais espécies, principalmente daquelas que teriam de ser enviadas do Velho Mundo.

Recebida a primeira amostra nessas condições, a amostra J.A. de *L. brasiliensis*, fizemos a experiência que consta dos quadros 36 e 37. Nessas experiências, utilizamos o soro preparado com a *L. chagasi*, amostra *Floris-*

QUADRO 36

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

22-10-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST.
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>).	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—
T e v e s (<i>L.</i> <i>chagasi</i>)	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. cha-</i> <i>gasi</i>)	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	—	—	—
J. A. (<i>L. bra-</i> <i>sil.</i>)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—	—

NOTA — A aglutinação com amostra Cão 1, foi feita em 10-11-1937.

QUADRO 37
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
29-10-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) absorvido pela *L. brasiliensis* (Amostra J. A.)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
J. A. (<i>L. brasiliensis</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Teves (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (<i>L. chagasi</i>).....	—	—	—	—	—	—	—

valdo, em natureza e absorvido pela amostra J.A. da *L. brasiliensis*, empregando para aglutinação, além da amostra usada na absorção, três amostras de *L. chagasi* inclusive aquela que serviu para preparo do soro.

Na experiência feita com o soro em natureza, o título de aglutinação foi, por assim dizer, idêntico em todas as amostras, na prova executada com o soro absorvido, nenhuma delas foi aglutinada, deixando ver claramente que todas elas possuem idêntica constituição antigênica. A contra-prova feita, segundo a técnica descrita anteriormente, mostrou, de maneira nítida, que o resultado observado não corria por conta de qualquer ação impediante do soro adsorvido, pois mesmo em baixa concentração (1/3200), o soro acrescentado se mostrou capaz de aglutinar com bastante intensidade na presença da dose máxima de soro absorvido utilizada.

QUADRO 38
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
10-11-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST.
Amostra 45 (<i>L. donovani</i>).....	++++	++++	++++	++++	++	++	+	—	—	—	—
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Joly (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
J. A. (<i>L. brasil.</i>)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—	—

NOTA — A aglutinação com a amostra *L. brasiliensis* (J. A.) foi feita em 22-10-37.

Outra experiência desse gênero foi efetuada empregando a amostra 45 de ADLER, isolada cerca de 10 meses antes de um caso de Kala-Azar indiano. Nessa prova, o soro utilizado foi ainda o preparado com a amostra *Florisvaldo* de *L. chagasi* empregando para absorção a amostra 45 acima referida.

QUADRO 39
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
15-12-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) absorvido pela *L. donovani* (Amostra 45)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
Amostra 45 (<i>L. donovani</i>).....	+	+	--	--	--	--	--
J. A. (<i>L. brasiliensis</i>).....	+	--	--	--	--	--	--
Pantoja (<i>L. chagasi</i>).....	+	--	--	--	--	--	--
Joly (<i>L. chagasi</i>).....	+	--	--	--	--	--	--

Nessa experiência cujo resultado consta dos quadros 38 e 39, não houve absorção total das aglutininas pois a aglutinação era ainda observada em todas as amostras no primeiro tubo da prova, isto é, na diluição de 1/400 sendo que, a amostra 45 que serviu para absorção se mostrou mesmo aglutinada no título de 1/800. Esse fato não diminui de forma alguma o valor da experiência, pois foi a amostra que serviu para absorção a que se mostrou mais aglutinada e isso provavelmente devido a maior aglutinabilidade na ocasião da cultura empregada. No caso contrário, se fossem as outras amostras as aglutinadas a título mais alto, poder-se-ia suspeitar de qualquer divergência na constituição antigênica, embora a diferença de título observada não fosse significativa.

QUADRO 40
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
14-12-1937

Soro anti-donovani (Amostra 45)

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST.
Amostra 45 (<i>L. donovani</i>).....	++++	+++	+++	+++	+++	++	+	--	--	--	--
J. A. (<i>L. brasil.</i>).....	++++	++++	++++	+++	++	++	+	--	--	--	--

Esses resultados provam que tanto a amostra *J. A.* da *L. brasiliensis*, como a amostra 45 de *L. donovani* possuem a mesma constituição antigênica da amostra Florisvaldo de *L. Chagasi*, bem como das outras da mesma espécie com que foram comparadas, e são, portanto, idênticas entre si sob esse ponto de vista.

Duas outras experiências corroboram esse resultado, conforme se verifica nos quadros 40 e 41.

QUADRO 41

Soro anti-brasiliensis (Amostra *J. A.*)

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST.
<i>J. A. (L. brasil.)</i>	++++	+++	+++	+++	++	+	--	—	—	—	—
Amostra 45 (<i>L. donovani</i>).....	++++	++++	+++	++	+	+	--	—	—	--	—

No primeiro, um soro preparado com amostra *J. A.* aglutinou a igual título essa amostra e a amostra 45 de *L. donovani*; no segundo, o mesmo fato ocorre com um soro preparado com essa última amostra atuando sobre ela e a amostra *J. A.* já referida. Vemos assim que amostras recentemente isoladas, pertencentes a três espécies diferentes, mostraram idêntico constituição antigênica entre si. As três espécies utilizadas, por feliz coincidência, são uma tegumentar e as duas outras viscerais, sendo que essas divergem não só pelas características zoogeográficas como pela forma da doença que produzem.

Examinando os fatos relatados, podemos concluir que todas as Leishmanias, qualquer que seja a espécie a que pertençam e o tempo por que foram conservadas em cultura, apresenta um *antígeno comum*, o que faz com que o soro preparado com uma amostra aglutine sempre todas as demais, embora à títulos diferentes.

Vemos também que as amostras recentemente isoladas possuem idêntica constituição antigênica, muito embora pertençam a espécies admitidas por todos como distintas.

Por outro lado as amostras conservadas por longo tempo em cultura sofrem modificações em sua constituição antigênica, modificações essas que independem das espécies a que pertencem.

As experiências, contudo, foram continuadas, não só para trazerem mais ampla documentação aos fatos observados, como para esclarecer alguns pontos que, a nosso ver, não haviam ficado convenientemente estabelecidos.

Evidentemente, seria de grande interesse verificar se amostras recentemente isoladas de outras espécies, tais como a *L. infantum* e *L. tropica*, apresentavam também constituição antigênica idêntica às demais, embora tudo leve a crer que isso se dê. Infelizmente, porém, não nos foi possível obter amostras recentes dessas espécies.

Outro ponto a esclarecer, era a causa da permanência de aglutininas nos soros preparados com amostras recentes, quando absorvidas por amostras antigas.

Para explicar esse fato, fomos levados a admitir a existência nas amostras recentes, de um antígeno especial, peculiar a essas amostras, e que desapareceria com a cultura da mesma por longo tempo. Como a presença desse antígeno e a virulência são propriedades que coexistem nessas amostras, julgamos poder assemelhar o antígeno em questão ao encontrado nas bactérias em idênticas condições e denominado antígeno *vi*.

Se examinarmos, porém, atentamente os quadros ns. 14, 15 e 16, em que um soro preparado com amostra recente foi absorvido por amostras antigas, veremos que as aglutininas que persistem após a absorção, são em pequena quantidade e capazes de aglutinar as amostras recentes somente a baixo título. Esse fato se torna particularmente nítido quando comparamos esses quadros com os de ns. 18, 20, 22 e 24, em que soros preparados com amostras antigas eram absorvidos por amostras recentes.

Essa diferença de comportamento poderia ser atribuída ao título relativamente baixo do soro empregado nas primeiras experiências em contraposição aos soros de títulos muito mais elevados, utilizados nessas últimas.

QUADRO 42

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

15-7-1938

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST
Jerichó (<i>L. tropica</i>).....	++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Assimody (<i>L. danovani</i>)...	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Florisvaldo (<i>L. chagasi</i>)	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—
Cão B. (<i>L. chagasi</i>).....	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
J. A. (<i>L. brasili</i>).....	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—

QUADRO 43
AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

22-7-1938

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) absorvido pela *L. donovani* (Amostra Assimody)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
Assimody (<i>L. donovani</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Jerichó (<i>L. tropica</i>).....	—	—	—	—	—	—	—
Cão B, (<i>L. chagasi</i>).....	+	+	—	—	—	—	—
Isaias <i>L. chagasi</i>).....	+	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (<i>visc. L. chagasi</i>)...	+	—	—	—	—	—	—

Fomos assim levados a fazer novas experiências utilizando soro preparado com amostra recente de título mais elevado.

Essa experiência não deu, porem, o resultado esperado, pois as aglutininas persistentes após a absorção não eram em maior quantidade que as observadas na experiências anteriores, conforme se pode verificar no quadro n. 43. Essa verificação está em desacordo com a hipótese da existência de um antígeno *vi*, peculiar às amostras recentes, pois com o aumento do título de aglutinação do soro deveria também crescer a quantidade de anticorpos correspondentes a esse antígeno, acarrentando assim, uma elevação no título de aglutinação do soro absorvido.

Pensamos, então, que o fenômeno em questão poderia correr por conta, não da existência de um antígeno peculiar às amostras recentemente isoladas, mas de diferenças nas quantidades nelas contidas de *antígeno comum*, que seria mais abundante nas amostras recentes que nas antigas. Realmente, sabemos que para que haja aglutinação é necessário que exista certa relação quantitativa entre o antígeno e o anti-corpo correspondente. Ora, se as amostras recentes contivessem maior quantidade de antígeno comum que as antigas, pequenas quantidades de aglutininas persistentes no soro absorvido poderiam ser capazes de ainda aglutinar essas amostras e se mostrarem inativas diante das amostras antigas, devido a não conterem essas quantidade de aglutinogeneo suficiente para a realização do fenômeno. Se essa hipótese correspondesse à realidade, aumentando a quantidade de *Leishmanias* empregadas na absorção, deveríamos chegar a um ponto em que a quantidade de aglutininas persistentes após a absorção, seria também incapaz de aglutinar as amostras recentes. Esse fato não pode, porem, ser confirmado na prática, pois com o

aumento da quantidade de flagelados empregados na absorção, cresce o poder impediante do soro absorvido, sem que se possa, de modo algum, obviar a esse inconveniente, de maneira que, toda vez que o soro se mostrava de todo inativo, o poder impediante deste era tão grande que poderia por si só explicar o fenômeno.

Embora as experiências a que nos referimos não permitissem chegar aos resultados desejados, constituem elas um argumento em favor da maior riqueza em antígeno comum das amostras recentes. Assim, vemos que com quantidades relativamente pequenas de *Leishmanias* recentemente isoladas, podemos, por absorção, obter a inativação de um soro, no qual, após a absorção, o poder impediante é por assim dizer inexistente, como se pode verificar na experiência complementar do quadro n. 37; com as amostras antigas isso não é possível devido à grande massa de flagelados exigida para a absorção, o que acarreta o aparecimento da ação impediante já referida.

Com o fim de demonstrar essa hipótese, instituímos experiências em que procuramos avaliar a quantidade de antígeno comum contido em diversas amostras pela capacidade de absorção de aglutininas em relação a um soro determinado, sendo que, para aquilatarmos da maior ou menor absorção de aglutininas, dosávamos o poder aglutinante do soro absorvido, sendo óbvio que, quanto mais baixo fosse o título do soro em questão maior seria a absorção verificada.

Para isso, tomamos um soro preparado com amostra recente, que em nossas experiências foi o soro obtido com a amostra *Florisvaldo*, e juntamos, a determinadas quantidades desse soro, quantidades iguais em peso, de um lado, de uma amostra recente, de outro de uma amostra antiga.

Na prática, tivemos que modificar essa técnica, pela dificuldade em obter pesos idênticos de *Leishmanias*, juntando a quantidades de *Leishmanias*, previamente pesadas, quantidades de soro proporcionais a esse peso o que, evidentemente, não altera o resultado final.

A primeira experiência foi feita com as amostras *Cão B* (recente) e *Assimody* (antiga) e dela damos a seguir, em protocolo, descrição detalhada:

“Tomamos dois tubos numerados, respectivamente, 1 e 2, e pesamos.

1.^a pesagem | Tubo 1 — 7,290 g.
 | Tubo 2 — 7,228 g.

Colocamos em cada um deles uma suspensão de *Leishmanias*, sendo no tubo 1 da amostra *Cão B* (*L. chagasi*, recentemente isolada) e no tubo 2 da amostra *Assimody* (*L. donovani*, antiga). Centrifugamos, retiramos o líquido, pesando de novo os tubos.

2.^a pesagem { Tubo 1 — 7,389 g.
 Tubo 2 — 7,362 g.

Tomando a diferença entre as segunda e primeira pesadas encontramos :

Tubo 1, 0,099 g. e tubo 2, 0,134 g., que representam o peso da massa de *Leishmanias* contidas em cada tubo.

Juntamos a cada tubo quantidades de uma diluição de soro anti-*Florisvaldo* a 1%, na proporção de 0,02 cc. por miligramo de peso, isto é, 1,98 cc., no tubo 1, e 2,68 cc., no tubo 2. Deixamos duas horas na estufa a 37° para absorção das aglutininas, centrifugando depois para separar a diluição de soro dos corpos de *Leishmanias* que serviram para a absorção.

Com cada um dos soros assim absorvidos e com o mesmo soro em natureza, cuja diluição havia também permanecido duas horas na estufa a 37°, foram feitas, com suspensão da amostra *Cão B*, provas de aglutinação, cujo resultado se pode observar no quadro n. 44''.

QUADRO 44

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

28-7-1938

Aglutinação com a amostra *Cão B*

Soro anti-chagasi (Amostra *Florisvaldo*)

DILUIÇÕES	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST
Soro em natureza.....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	-	-
Soro <i>Florisvaldo</i> , absorvido com <i>Cão B</i>	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
Soro <i>Florisvaldo</i> , absorvido com <i>Assimody</i>	++++	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-

Vemos por essa experiência que a amostra recentemente isolada tem maior poder absorvente que a amostra antiga em relação a um soro preparado com amostra recente.

Experiência semelhante à precedente foi feita empregando as amostras *Cão B* e *J.A.*, ambas recentemente isoladas, a primeira visceral e a segunda tegumentar, cujo protocolo damos a seguir :

1.^a pesagem { Tubo 1 (*Cão B*.) 6,911 g.
 Tubo 2 (*J.Ã.*) 6,947 g.

$$2.^{\text{a}} \text{ pesagem } \left\{ \begin{array}{l} \text{Tubo 1} - 7,052 \text{ g.} \\ \text{Tubo 2} - 7,090 \text{ g.} \end{array} \right.$$

$$\text{Diferença } \left\{ \begin{array}{l} \text{Tubo 1, } 7,052 - 6,911 = 0,141 \text{ g.} \\ \text{Tubo 2, } 7,090 - 6,947 = 0,143 \text{ g.} \end{array} \right.$$

Juntamos, a cada tubo, soro anti-*Florisvaldo* a 1% em quantidades proporcionais ao peso de *Leishmanias*, isto é, tubo 1, 2,82 cc.; tubo 2, 2,86 cc. Absorção, duas horas a 37°, centrifugação e prova de aglutinação com amostra Cão B, cujo resultado damos no quadro n. 45.

QUADRO 45

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

8-8-1938

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo)

Aglutinação, com amostra Cão B

DILUIÇÕES	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	$\frac{1}{102400}$	TEST
Soro em natureza.....	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Cão B.....	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com J. A.....	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—

Essa experiência demonstra que duas amostras, recentemente isoladas, de espécies diferentes, tem igual poder absorvente, o que constitui mais uma prova da identidade da constituição antigênica das amostras recentemente isoladas, mesmo quando pertencem a espécies diferentes.

Embora a experiência do quadro n. 44 demonstre o maior poder absorvente de uma amostra recente em relação a um soro preparado com amostra nas mesmas condições, ela não permite excluir a existência nessas amostras do antígeno *vi*, pois o maior poder absorvente poderia resultar da absorção simultânea do antígeno comum e do antígeno *vi*, pela amostra recente que, deixado em liberdade pela amostra antiga, seria o responsável pela diferença observada. Teríamos, assim, para explicar o resultado da experiência do quadro n. 44, duas hipóteses: ou a maior riqueza das amostras recentes em antígeno comum, ou a existência, ao lado desse antígeno, do antígeno *vi* peculiar às amostras em questão.

Para verificar qual das duas hipóteses corresponde à realidade, fizemos nova experiência em que um soro preparado com amostra recente foi absorvido por quantidades iguais de duas amostras, uma recentemente isolada e outra antiga, fazendo os soros assim absorvidos atuar, não só sobre uma amostra recentemente isolada, como sobre uma amostra antiga. Como essa última não contem o antígeno *vi*, não se deveria observar aqui a diferença existente quando os soros atuam sobre amostra recente, no caso em que esse antígeno fosse realmente a causa da diferença do poder absorvente. A persistência da diferença em questão viria então demonstrar claramente que o maior poder absorvente das amostras recentes corre realmente por conta da maior riqueza em antígeno comum e não da existência do antígeno *vi* nas amostras recentes.

Essa experiência foi feita utilizando a amostra *Isaias*, de *L. chagasi* (recentemente isolada), e a amostra *Jerichó*, de *L. tropica* (amostra antiga). Nessa experiência empregamos menor quantidade de soro em relação ao peso de Leishmanias, isto é, utilizamos apenas 0,01 cc. da diluição a 1% do soro para cada miligrama de corpos de flagelados. Assim procedendo aumentamos a proporção de *Leishmanias* empregadas na absorção o que, a nosso ver e de acordo com os resultados das experiências anteriores viria tornar mais nítidas as diferenças observadas. Com os soros assim absorvidos, procedemos as provas de aglutinação, tanto com a amostra *Isaias* (recentemente isolada) como com a *Jerichó* (antiga), fazendo simultaneamente a prova com o soro em natureza, da mesma maneira que nas experiências anteriores. Damos a seguir o protocolo dessa experiência.

Experiência semelhante à precedente, mas empregando a amostra *Isaias* (*L. chagasi* recentemente isolada) e *Jerichó* (*L. tropica* antiga):

1.^a pesagem { Tubo 1 (*Isaias*) — 6,999 g.
Tubo 2 (*Jerichó*) — 6,987 g.

2.^a pesagem { Tubo 1 — 7,180 g.
Tubo 2 — 7,171 g.

Diferença { Tubo 1, 7,180 — 6,999 = 0,181 g.
Tubo 2, 7,171 — 6,987 = 0,184 g.

Juntamos a cada tubo soro anti-*Florisvaldo* a 1% em quantidades proporcionais ao peso de Leishmanias, isto é, tubo 1, 1,81 cc.; tubo 2, 1,84 cc. Absorção, duas horas na estufa a 37°, centrifugação e prova de aglutinação com as amostras *Isaias* e *Jerichó*, quadros ns. 46 e 47.

QUADRO 46
 AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
 15-6-1938
 Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo)
 Aglutinação com a amostra Isaias

DILUIÇÕES	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{640}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
Soro em natureza.....	++++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Isaias.....	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Jerichó.....	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—

QUADRO 47
 AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS
 15-9-1938
 Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo)
 Aglutinação com a amostra Jerichó

DILUIÇÕES	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
Soro em natureza.....	++	++	+	+	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Isaias	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Jerichó.....	+	+	—	—	—	— ^a	—	—	—

Empregando para aglutinação a amostra *Isaias*, obtivemos diferença nítida entre o poder aglutinante dos soros absorvidos por cada uma das amostras, mostrando a amostra *Isaias*, recentemente isolada, um poder absorvente bem maior que a amostra antiga *Jerichó*, o que vem confirmar a experiência anteriormente feita com outras amostras. Utilizando para a aglutinação a amostra *Jerichó*, antiga, essa diferença persiste aproximadamente na mesma proporção, o que demonstra claramente que a diferença do poder absorvente das amostras recentes não corre por conta da existência de um antígeno peculiar a essas amostras e sim pela maior riqueza delas em antígeno comum. Fica, assim, resolvida a questão que desejávamos esclarecer.

Outra conclusão a que chegamos era que as amostras conservadas em cultura por largo tempo sofrem alterações em sua constituição antigênica.

Seria, pois, interessante verificar a ocorrência dessa modificação em uma mesma amostra. Foi o que fizemos nas experiências seguintes praticadas com a amostra *J.A.*, de *L. Brasiliensis*, três anos após sua conservação em cultura.

Empregamos nessas experiências dois soros, ambos preparados com essa amostra, um quando recentemente isolada (1937) e outro três anos mais tarde (1940).

Com o soro preparado, em 1937, com a amostra recentemente isolada, executamos as experiências que constam dos quadros ns. 48 e 49, empregando para comparação a amostra *N.T.I.*, de *L. chagasi*, recentemente isolada.

QUADRO 48

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

Soro preparado em 1937 com *L. brasiliensis* (Amostra *J. A.*) recentemente isolada (1937)

Soro em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
<i>J. A. (L. brasil.)</i>	++++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
<i>N. T. I. (L. chagasi)</i>	++++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-

QUADRO 49

O mesmo soro absorvido pela *L. chagasi* (Amostra *N. T. I.*)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
<i>J. A. (L. brasil.)</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>N. T. I. (L. chagasi)</i>	-	-	-	-	-	-	-

No primeiro desses quadros empregamos o soro em natureza, que aglutinou em igual título as duas amostras; no segundo, o mesmo soro absorvido pela amostra *N.T.I.*, de *L. chagasi*. Nesse último, o soro não mais aglutinou ambas as amostras, o que prova a identidade de constituição antigênica de uma amostra de *L. chagasi*, recentemente isolada com outra de *L. brasiliensis*, quando também recentemente isolada, confirmando os resultados anteriormente obtidos. Com soro preparado em 1940, com a mesma amostra, conservada, porém, em cultura por cerca de três anos, fizemos experiência semelhante às anteriores e cujos resultados constam dos quadros ns. 50 e 51.

QUADRO 50

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

21-11-1940

Soro preparado em 1940 com *L. brasiliensis* (Amostra J. A.) isolada cerca de três anos antes (1937)

Soro em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{5400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
J. A. (<i>L. brasil.</i>).....	++++	++++	++++	++++	++	+	+	—	—	—
N. T. I. (<i>L. chagasi.</i>)....	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—

QUADRO 51

O mesmo soro absorvido pela *L. chagasi* (amostra N. T. I.)

AMOSTRA	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	TEST.
J. A. (<i>L. brasil.</i>).....	++++	+++	+++	++	++	+	—
N. T. I. (<i>L. chagasi.</i>).....	—	—	—	—	—	—	—

No primeiro desses quadros, vemos que o soro em natureza aglutinou ambas as amostras a títulos semelhantes; no segundo, em que utilizamos o mesmo soro absorvido com a amostra *N.T.I.*, enquanto essa última amostra não era mais aglutinada, a amostra *J.A.* o era em alto título, o que prova ter essa amostra sofrido profunda alteração em sua constituição antigênica durante o prazo de três anos em que foi conservada em cultura.

Uma outra experiência foi também executada com a amostra *J.A.*, três anos após o seu isolamento e com o soro preparado com a mesma, comparando-a com outra amostra de *L. brasiliensis* recentemente isolada, a amostra *Batista*. quadros ns. 52 e 53.

Na primeira dessas experiências, que consta do quadro n. 52, executada com o soro em natureza, ambas as amostras foram aglutinadas a igual título; na segunda, (quadro n. 53), em que utilizamos para absorção a amostra *Batista*, essa não mais foi aglutinada, enquanto que a amostra *J.A.* apresentou apenas pequena baixa no título de aglutinação. O resultado dessa

última experiência deixa ver que duas amostras da mesma espécie podem apresentar constituições antigênicas diferentes, de acordo com o prazo por que foram conservadas em cultura.

QUADRO 52

6-12-1940

Soro preparado em 1940 com *L. brasiliensis* (Amostra J. A.) isolada cerca de três anos antes (1937)

Soro em natureza

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	$\frac{1}{12800}$	$\frac{1}{25600}$	$\frac{1}{51200}$	TEST.
J. A. (<i>L. brasil.</i>).....	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—	—
Baptista (<i>L. brasil.</i>).....	++++	+++	+++	+	+	—	—	—	—	—

QUADRO 53

O mesmo soro absorvido pela *L. brasiliensis* (Amostra Baptista)

AMOSTRA	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{1600}$	$\frac{1}{3200}$	$\frac{1}{6400}$	TEST.
J. A. (<i>L. brasil.</i>).....	++	+++	++++	+	—	—	—
Batista (<i>L. brasil.</i>).....	—	—	—	—	—	—	—

Discussão : Ao iniciarmos nossas pesquisas sobre aglutinação das *Leishmanias*, não tínhamos um plano de trabalho prestabelecido de maneira que, no decurso das pesquisas, os resultados de uma série de experiências, serviram para estabelecer as normas a seguir nas experiências seguintes. Assim procedendo, durante a descrição da parte experimental, fomos forçados a incluir as principais conclusões a que chegamos, de modo que, no presente capítulo, nos limitaremos a fazer algumas considerações sobre essas conclusões e seus fundamentos, bem como sobre a nossa maneira de interpretar os resultados obtidos.

A primeira conclusão a que chegamos é a da existência de um *antígeno comum* a todas as *Leishmanias* quaisquer que sejam as espécies a que pertençam, qualquer que seja o tempo por que foram conservadas em cultura. Não é preciso insistir sobre os fundamentos dessa conclusão. Trabalhamos

com 26 amostras, pertencentes a todas as espécies admitidas, das mais diversas proveniências, empregamos em nossas experiências, soros preparados com 10 dessas amostras e nem uma só vez deixamos de observar o fenômeno de aglutinação.

Outra conclusão de grande importância é a que estabelece que todas as amostras recentemente isoladas, mesmo as de espécies diferentes, possuem idêntica constituição antigênica. A demonstração desse fato, em relação às amostras de uma mesma espécie foi bem fundamentada em relação a *L. chagasi*, como se vê nos quadros ns. 26 e 28. Quanto à identidade antigênica das amostras recentemente isoladas de espécies diferentes, a documentação não é tão abundante como desejaríamos. Trabalhamos apenas com amostras recentemente isoladas de três espécies diferentes, *L. chagasi*, *L. brasiliensis* e *L. donovani*. Essas amostras são, uma tegumentar e duas outras viscerais, sendo que essas últimas divergem, não só pela forma da doença que dão origem, como por sua distribuição geográfica. Queremos chamar particularmente a atenção para esse ponto. Realmente, se tivéssemos trabalhado com o mesmo número de espécies, mas que fossem todas viscerais, como no caso de serem elas as *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, seria lógico admitir que a identidade de constituição antigênica decorria do fato de pertencerem todas as *Leishmanias viscerais* a uma mesma espécie, fato, aliás, admitido por grande número de pesquisadores.

Ainda trabalhando com o mesmo número de espécies, mas que fossem todas provenientes do velho mundo, como no caso de serem elas as *L. donovani*, *infantum* e *tropica*, poder-se-ia ainda pensar que fosse a proveniência a causa da identidade da constituição antigênica observada. No caso, porém, qualquer dessas hipóteses fica desde logo excluída, de modo que, se pode, com boas razões, estender a conclusão a todas as espécies. Ocorre ainda que, conforme será exposto posteriormente, as leishmanias, quando recentemente isoladas, apresentam em sua constituição antigênica unicamente o antígeno comum já referido. Ora, as amostras de *L. infantum* e *L. tropica* com que trabalhamos, embora conservadas em cultura por longo tempo, possuíam o mesmo antígeno comum encontrado nas amostras de outras espécies, o que constitui forte argumento em favor de apresentarem também as amostras dessas espécies, quando recentemente isoladas, a mesma constituição antigênica que as demais.

A afirmação que fizemos anteriormente de que as amostras recentemente isoladas são unicamente constituídas pelo antígeno comum, decorre das experiências que fizemos com o fim de verificar da existência ou não de um antígeno peculiar às amostras recentes. Ora, as experiências que constam dos

quadros ns. 46 e 47 demonstram claramente a inexistência de um tal antígeno, donde se pode concluir que as amostras recentemente isoladas são constituídas unicamente pelo antígeno comum acima referido.

Uma terceira conclusão é de que as amostras de leishmanias, quando conservadas em cultura por longo tempo, sofrem alterações em sua constituição antigênica, modificações essas que independem da espécie a que pertencem. Já vimos as numerosas experiências que permitiram chegar a essa conclusão. Vimos, a princípio, as diferenças nítidas observadas entre as amostras de *L. chagasi* e as das demais espécies com que eram comparadas, o que permitia mesmo pensar na possibilidade da separação das espécies pelo emprego da soro-aglutinação. Vimos depois que experiências tendentes a separar as outras espécies entre si, nos levou a resultados contraditórios, ora separando amostras de uma mesma espécie, ora aproximando amostras de espécies diferentes. Daí, era lícito concluir que as diferenças observadas entre as amostras de *L. chagasi* e as demais, não corriam por conta de diferenças específicas e sim de outras condições, que deveria ser a idade das amostras, pois todas as amostras de *L. chagasi*, com que trabalhamos, eram recentemente isoladas, enquanto que todas as demais eram antigas. Fomos assim levados a comparar entre si amostras recentemente isoladas de espécies diferentes, o que nos permitiu chegar à conclusão exposta anteriormente. Ora, se as amostras recentemente isoladas possuem idêntica constituição antigênica e se depois, quando conservadas em cultura por longo tempo, elas se mostram diferentes, a única explicação é que elas sofreram, durante o período em que foram conservadas em cultura, modificações em sua constituição antigênica responsáveis pelas diferenças observadas. Essas modificações puderam ser verificadas em uma mesma amostra, a amostra J.A. realmente, enquanto o soro preparado com essa amostra em 1937, época em que foi isolada, absorvido pela amostra N.T.I. de *L. chagasi* recentemente isolada, se mostrou completamente inativa, o soro preparado com a mesma amostra três anos depois e absorvido pela mesma amostra N.T.I. ainda aglutinava a título elevado a amostra J.A. Fato semelhante foi também observado utilizando para absorção uma amostra da mesma espécie, mas recentemente isolada, a amostra *Batista*. Qual a natureza das modificações na constituição antigênica das Leishmanias quando conservadas por longo tempo em cultura? Já vimos que as Leishmanias quando recentemente isoladas não possuem nenhum antígeno que lhes seja peculiar e que se pudesse assemelhar ao antígeno *vi* encontrado nas bactérias. Elas são constituídas unicamente pelo *antígeno comum* já referido. Queremos assinalar que é provável que esse *antígeno* não seja único e sim constituído por um grupo de antígenos e nós mesmos, em nota publicada no "C. R. Soc. de Biol.", assinalamos a separação

nas *Leishmanias*, de pelo menos dois antígenos, um flagelar e outro somático, à semelhança do que ocorre com as bactérias.

Por outro lado, as amostras antigas apresentam-se mais pobres em antígeno comum que as recentemente isoladas e deixam ver ao lado dele a existência de outros antígenos formados durante o envelhecimento das amostras em cultura. Como o aparecimento desses outros antígenos, coincidem com a diminuição do antígeno comum, tudo leva a crer que esses antígenos se formem a custa do antígeno comum. Daí propormos para o antígeno *comum* das *Leishmanias* a denominação de antígeno *primário* ou *primitivo* enquanto reservamos o nome de antígenos *secundários* áqueles que se formam pelo envelhecimento das amostras em cultura. Uma vez que esses antígenos secundários não são de modo algum específicos, julgamos que sua formação dependa das condições de cultura, tais como composição do meio, temperatura, tempo por que foram conservadas em cultura, etc.

As conclusões a que chegamos em nosso trabalho não constituem um fato isolado, em meio de nossos conhecimentos sobre a soro-aglutinação, pois entre as bactérias também se observam modificações antigênicas provocadas pela conservação das mesmas em cultura por longo tempo, existindo contudo, uma diferença fundamental, pois as bactérias apresentam sempre um antígeno específico o que não acontece nas *Leishmanias*. Duas hipóteses podem ser formuladas para explicar essa diferença; ou os Protozoários não apresentam aglutininas específicas, sendo portanto impossível a separação das espécies por esse meio ou as *Leishmanias* constituem, quaisquer que sejam as diferenças observadas, uma única espécie, hipótese já aventada por alguns autores.

Os nossos conhecimentos sobre a aglutinação de Protozoários são ainda muito poucos para que se possa formar opinião sobre qual das hipóteses corresponde à realidade. Somente estudos posteriores detalhados, não só, com *Leishmanias* como com outros flagelados, poderão permitir futuramente esclarecer a questão.

Conclusões

1.^a Toda a *Leishmania*, qualquer que seja a espécie a que pertença, e o tempo por que tenha sido conservada em cultura, apresenta um *antígeno comum*.

2.^a As *Leishmanias*, quando recentemente isoladas, mesmo de espécies diferentes, apresentam idêntica constituição antigênica e possuem unicamente o *antígeno comum* já referido.

3.^a As *Leishmanias*, quando conservadas em cultura por longo tempo, sofrem modificações em sua constituição antigênica com o aparecimento de *antigenos secundários*, cuja natureza não depende da espécie a que pertence.

4.^a O aparecimento desses *antigenos secundários* é acompanhado de diminuição do *antígeno comum*, o que leva a crer que os *antigenos secundários* se formem à custa do *antígeno comum* que, por esse motivo, denominamos também *antígeno primitivo*.

5.^a Do que ficou dito pode-se concluir que a reação de soro-aglutinação não se presta à separação das espécies do gênero *Leishmania*.

AGGLUTINATION OF LEISHMANIAS. SUMMARY

The first agglutination experiments (Tables 1 and 2) showed that the serum obtained with any one strain of *Leishmania*, agglutinates all the others even of another species. This finding reveals the existence of a common antigen. However as the titre of agglutination did not permit a sharp differentiation of species we tried the adsorption method.

The first adsorption tests made demonstrated differences in antigenic constitution between a strain of *L. donovani* on one hand and strains of *L. tropica* or *L. brasiliensis* on the other.

Further experiments in which *L. chagasi* was tested against the other species revealed that the former was antigenically different from the others.

These tests were performed by adsorbing an anti-chagasi serum with organisms belonging to the other species or, conversely, adsorbing with *L. chagasi* sera prepared against the other species (See Tables 9 to 24).

On the other hand, the adsorption of a serum prepared against one strain of *L. chagasi* by another of the same species showed that they had identical antigenic constitution.

These findings suggested the possibility of separating different species of *Leishmania* by this method. However, tests to separate the other species from one to another gave inconclusive results. (See Tables 27 to 35).

It was soon observed that all the strains of *L. chagasi* were of recent isolation while all the others had been maintained in artificial culture media for a long time. We were led to believe that this condition was responsible for the differences in behaviour encountered.

Accordingly, recently isolated strains of *L. brasiliensis* and *L. donovani* were tested and shown to be antigenically similar to strains of *L. chagasi* also recently isolated.

The conclusion may be drawn that all strains have the same antigenic constitution when freshly isolated.

It has been noted that when a serum which has been prepared against a freshly isolated is adsorbed with an old strain, the amount of agglutinins left free, is much smaller than when a serum prepared against an old strain is adsorbed with a newly isolated strain.

At first, we thought to explain this by the low titre of the serum. However, the amount of agglutinins left free was not larger when higher titre serum was tested.

These results do not corroborate the view of a special antigen being present in recently isolated strains (*vi antigens*) but rather that the phenomenon is dependent on differences of the amount of the common antigen, more abundant in recent strains.

In order to make this clear, experiments were made in which equal amounts of a serum prepared against a newly isolated strain were adsorbed by equal amounts, by weight, of, on one hand, a new strain, and the other an old strain. The resulting adsorbed sera were then titrated. (Table 44).

Results showed that newly isolated strains adsorb a larger amount of agglutinins (Tables 44, 45).

Two hypotheses have been advanced to explain the stronger adsorbing qualities of the newly isolated strains.

1.º — these strains possess larger amounts of the common antigen and
2.º — they contain a *vi antigen* which adsorbed by the new strain together with the common antigen is the cause of their larger adsorbing capacity.

To find out which of the two hypotheses corresponds to the reality a new experiment was made, similar to the one summarized in table 44.

The adsorbed sera were made to act on a recently isolated strain as well as on an old one. The latter, not containing the *vi antigen*, the difference seen when sera act on new strains should not be observed here in the case of this antigen being responsible for the differences in adsorbing properties.

The difference persisting, the indication would be that the greater adsorbing capacity of recently isolated strains was really related to larger amounts of the common antigen present (Tables 46 and 47).

The results of the experiment excluded the possibility of the *vi antigen* being responsible.

Other experiments, (Tables 48 to 53) using a 3 year old strain, demonstrated the modification in its antigenic constitution during the period it was maintained in cultures.

CONCLUSIONS

1. All Leishmanias, irrespective of species or length of time during which they have been kept in cultivation contain a *common antigen*.

2. Recently isolated Leishmanias, even when they belong to separate species, have identical antigenic constitution and possess only the *common antigen* mentioned above.

3. Leishmanias maintained in cultures for long time are subjected to a modification in their antigenic constitution whereby secondary antigens appear. The nature of these antigens does not depend on the species.

4. The appearance of these *secondary antigens* is accompanied by decrease in the *common antigen*. This suggests that the *secondary antigens* originates from the *common antigen*, for this reason, also designated as *primitive antigen*.

5. The final conclusion is that the serum-agglutination test is of no avail in separating species of the genus *Leishmania*.