

LEISHMANIASIS EXPERIMENTAL EN ANIMALES SILVESTRES

Dr. Rafael Medina *

Uno de los puntos de mayor importancia en lo que se refiere a la epidemiología de la leishmaniasis tegumentaria americana, es lo relativo al conocimiento de los reservorios domésticos y silvestres. En la actualidad, la mayoría de los médicos tropicalistas y de parasitólogos que se ocupan del problema, se inclinan a pensar que la infección humana deriva esencialmente de animales; es decir, que en la Naturaleza la enfermedad se mantiene como una auténtica zoonosis y su aparición en el hombre es un hecho puramente accidental.

Hasta el momento actual, la infección natural leishmánica ha sido comprobada en América en unos pocos animales domésticos y algunos del tipo silvestre. Entre los primeros, figuran el gato y especialmente el perro, comprobado este último desde 1913 por Pedroso y seguidamente por otros investigadores en Argentina, Brasil, Venezuela y especialmente en el Perú, como reservorio de la enfermedad. El anuncio del hallazgo de un caballo infectado, por Mazza en Argentina en 1927 y de un burro por Allencar, en el Brasil en 1959, no ha sido confirmado en otros países. En el grupo de animales silvestres se ha encontrado los siguientes: ratas espinosas (*Proechymis semispinosus panamensis*) y el ratón de campo (*Hoplomys gimnurus*), por Hertig y colaboradores en Panamá en 1958; una rata (*Rattus rattus alexandrinus*) por Allencar, Pessoa y Fontanelle en el Brasil en 1960; un ratón de taguara (*Kannabateomys amblyonyx*), un picure (*Dasyprocta azarae*) y una lapa (*Cuniculus paca*), por Forattini en el Brasil, en 1960; 10 ejemplares entre ratas y ratones de monte, de los géneros *Otodylomys*, *Peromyscus*, *Heteromys* y *Nictomys*, por Lainson y Strangway-Dixon en Honduras Británica en 1962; ratones (*Orizomys goeldi*) por Nery Guimaraes y Azevedo en el Brasil, en 1963-1966 y un ratón de montaña (*Zigodontomys microtinus*) por Kerdel, Conde, Essensfeld y otros, en Venezuela, en 1965. Con excepción de algunas infecciones

* Profesor Titular Cátedras de Medicina Tropical y Dermato-Sifilografía. Universidad Central. Caracas-Venezuela.
Dirección: Avenida Las Rosas, Quinta "Guasábara". San Rafael de La Florida.

encontradas en ratas y ratones, la mayoría de los autores ha fracasado en los intentos de transmitir la parasitosis a los animales sensibles.

Desde el punto de vista experimental, se ha podido transferir la leishmaniasis tegumentaria americana, a animales domésticos : perros y gatos ; a algunos de los llamados animales de laboratorio, ratas, ratones blancos, hamsters y acures ; y a unos pocos animales silvestres, como macacos (*M. rhesus* y *mulata*), el esquilo de Texas (*Citellus tridecemlineatus*), la rata algodonera (*Syngmodon hispidus*), el *Didelphis marsupialis*, la rata de bosque (*Tylomys panamensis*), el *Fotos flavus*, el *Bassaricyon gabbi* y la rata espinosa (*Proechymis semispinosus panamensis*).

Como se puede deducir, los animales reservorios son difíciles de comprobar y mucho más evaluarlos en la naturaleza; basta recordar la numerosa cantidad de animales que todos los investigadores han tenido que revisar, para evidenciar la infección en un número muy reducido de ellos; si a esto se añade la posibilidad de que algunos de los ejemplares considerados sanos, pueden albergar temporalmente los parásitos en forma no patente, se tendrá idea de las dificultades que existen para su rigurosa estimación como reservorios extrahumanos. Concretamente, es necesario precisar si los animales encontrados en la naturaleza con leishmanias, constituyen reales fuentes de infección para otros animales o para el hombre; o bien, si la afección en algunos de ellos es fugaz, los parásitos no tienen virulencia o es muy débil y por lo tanto, no juegan ningún papel en la cadena epidemiológica de la endemia.

En resumen, los huéspedes naturales extrahumanos de la leishmaniasis tegumentaria en América, son poco conocidos y no suficientemente valorados. Por esos motivos hemos creído que los intentos para producir la infección leishmánica en animales de vida rural o selvática, son de gran importancia, ya que permitiría efectuar un estudio detenido de los caracteres clínicos y evolución de las lesiones producidas en ellos, así como la estimación de la virulencia parasitaria. Este análisis además de contribuir al esclarecimiento de los reservorios, posiblemente abriría caminos para un mejor conocimiento de la inter-relación entre las leishmanias tegumentarias y las viscerales.

Desde hace algunos años venimos trabajando en este sentido y el presente informe resume los resultados obtenidos por la inoculación leishmánica en un grupo de animales silvestres.

Material y métodos

1º) Cepas diversas de leishmanias tegumentarias; unas, que aislamos de pacientes de Venezuela, y otras, provenientes de países del Sur y Centro América; en su conjunto el material parasitario estuvo inte-

grado por: *L. brasiliensis* tipo, mexicana, pifanoi, de casos de uta del Perú, y *Leishmania trópica*, aislada esta última en una paciente procedente de Italia, con típicas lesiones de botón de Oriente ¹. Estas cepas se mantuvieron en diversos medios de cultivo y en animales de laboratorio, especialmente en hamsters y ratones blancos. Previa valoración de la riqueza parasitaria (numeración en cámara microscópica), el material infectante fue inoculado en cantidades variables, según el tipo de animal de ensayo y por diferentes vías: piel del hocico, orejas, dorso, cola, patas, mucosa oral y también en algunos casos por las vías peritoneal y testicular.

2º) Animales silvestres de prueba, que comprendieron:

- a) Mamíferos:
 - monos
 - casiraguas (ratas espinosas)
 - picures (acure de monte)
 - cachicamos (armadillos)
 - lapas (pacas)
 - chigüires y
 - murciélagos.
- b) Quelonios.
- c) Batracios.
- d) Reptiles de los géneros:
 - Tropidodactylus*
 - Cnemidophorus*
 - Ameiva
 - Thecadactylus*
 - Polychrus*
 - Tupinambis*
 - Gonatodes* e
 - Iguana.

3º) Lote de hamsters (*Cricetus auratus*), provenientes de crías mantenidas desde hace 10 años, los cuales fueron utilizados para probar la virulencia parasitaria de las lesiones producidas y también para definir los llamados procesos crípticos, en base a que son los animales de laboratorio más sensibles a la infección leishmánica.

1. Agradecemos la gentileza de los Dres. Arístides Herrero, F. Nery Guimaraes y Francisco Biaggi, quienes respectivamente facilitaron las cepas de Uta peruana, la cepa "Raimundo" del Brasil y *Leishmania mexicana* de México.

Haremos referencia solamente, a los animales silvestres en los cuales se obtuvo la infección experimental.

Monos. El lote estuvo integrado por representantes del género *Cebus*, especies *nigrivittatus nigrivittatus* y *nigrivittatus bruneus*. La proveniencia de estos animales fue, Barlovento, Edo. Miranda; Nirgua, Edo. Yaracuy; Valle de La Pascua, Edo. Guárico y el Padamo, Territorio Amazonas, y con edades comprendidas aproximadamente entre 6 meses y 5 años.

Los animales fueron inoculados en la raíz de las cejas, barbilla, dorso y la cola. Las alteraciones más notorias y duraderas fueron obtenidas a nivel de las cejas y la barba (Fot. 1-3).

De 12 ejemplares inoculados, la infección se logró en 9; 3 con *L. brasiliensis* tipo, 2 con *L. pifanoi*, 1 con cepa uta y 3 con *L. mexicana*.

El período de incubación fue bastante variable, 17 días el más corto y 11 meses y 12 días el más largo.

Las lesiones consistieron en nódulos duros, que alcanzaron dimensiones hasta de 3 centímetros de diámetro y nunca llegaron a ulcerarse. El frotis por aposición, efectuado en varias oportunidades, demostró parásitos en número relativamente escaso, a excepción de las determinadas por *L. mexicana*, que casi siempre fueron ricas. Los nódulos se mantuvieron por un lapso promedio de 4-7 meses, después de lo cual comenzaron a decrecer. El número de leishmanias fue disminuyendo proporcionalmente en relación con la pérdida de la infiltración nodular, y en esta etapa regresiva fue curioso observar que en muchos de los parásitos teñidos, no se podía distinguir el blefaroplasto. Las lesiones más notorias y de mayor duración (8 meses y medio), fueron las producidas por *L. mexicana* en primer término y luego por leishmanias tomadas directamente de pacientes con la modalidad tegumentaria difusa.

Una vez desaparecidas las lesiones, la piel donde ellas asentaban fue examinada en repetidas ocasiones y a intervalos variables y nunca se encontraron parásitos en los frotis. El material tomado de estos sitios, que también se transfirió a hamsters, en dos oportunidades fue infectante para 3 de 8 animales inoculados y esto ocurrió cuando las lesiones de los monos tenían 40 a 65 días que habían involucionado; era pues una infección críptica.

En 4 animales (uno infectado con *L. brasiliensis* tipo, uno con cepa uta y 2 con *L. mexicana*), ocurrieron recidivas después de tres a cuatro meses de haber regresado las lesiones iniciales, manteniéndose por lapsos de 3 semanas a 2 meses. Las alteraciones aparecieron siempre en los sitios primitivamente inoculados y nunca se observó diseminación cu-



Foto N° 1.-Cebus nigrivittatus nigrivittatus con gruesos nódulos en regiones ciliares.



Foto N° 2.-Cebus nigrivittatus nigrivittatus con nódulo leishmánico ciliar de seis meses de duración. Parásitos abundantes.

tánea. El aspecto clínico de las lesiones recidivantes en algunas ocasiones fueron más notorias que las obtenidas por primera vez.

Uno de los animales seguido por 9 años, ha permanecido completamente bien, sin parásitos en frotis ni en cultivos y no infectante para los hamsters, dando la impresión de que la enfermedad hubiera desaparecido espontánea y definitivamente.



Foto N° 3.-Lesión ciliar recidivante, cuatro meses después de desaparecidas las iniciales.



Foto N° 4- Casiragua o rata espinosa - Proechymis guyanensis. Discreta infiltración leishmánica del hocico.

Los 9 monos que se infectaron fueron re-inoculadas en 3 oportunidades (utilizando las mismas cepas, en dos ocasiones y cambiándolas en la tercera), después que sus alteraciones cutáneas habían desaparecido; las re-inoculaciones se efectuaron con intervalos de 4 a 6 meses; en 5 se produjeron nuevamente lesiones papulosas, pero fueron pequeñas, bastante pasajeras y con muy pocos parásitos. La respuesta cutánea a las pruebas de re-infección, impresionó, en algunas ocasiones, como si los animales hubieran desarrollado defensas contra la infección leishmánica.

En esta especie de monos, no ocurrió al parecer, invasión visceral; en algunos ejemplares que fueron sacrificados, resultaron negativas las investigaciones de parásitos en hígado, bazo, corazón, pulmones, mesenterio y testículos, así como la transferencia a hamsters.

Comentarios. Los monos *Cebus nigrivittatus*, se infectaron experimentalmente con variadas cepas de leishmanias tegumentarias y mantuvieron los parásitos en forma patente y virulenta por un lapso promedio de 7 meses. Las recidivas que aparecieron en casi la mitad de los animales infectados, inclina a considerarlos como reservorios de cierta importancia.

Casiraguas o ratas espinosas (*Proechymis guyanensis*). Proveniencia: vecindarios cercanos a San Juan de Los Morros, Edo. Guárico; Ocumare de La Costa, Edo. Aragua y caseríos de El Tuy, Edo. Miranda.

Fueron inoculadas en piel del hocico, orejas, dorso y la cola.

De 14 ejemplares utilizados, la infección se obtuvo en 9. (1 con *L. brasiliensis* tipo, 2 con *L. pifanoi* y 6 con cepa uta).

El tiempo de incubación varió de 7 a 36 días; la mayoría de las lesiones aparecieron en un lapso promedio de 15 a 20 días.

Las alteraciones más notorias, y que ocurrieron en las inoculadas con la cepa uta, aparecieron en el hocico y a nivel de la cola (Fot. 4). Las del hocico consistieron unas veces en pequeñas placas infiltradas y escamosas, y otras, en nódulos de medio a un centímetro de diámetro, los cuales nunca se ulceraron. En la cola la respuesta fue del tipo nodular y con frecuencia se abcedaron y posteriormente se abrieron al exterior (Fot. 5-6). Las lesiones mantuvieron el aspecto descrito por espacio de 10 a 46 días y luego comenzaron a involucionar. Tanto las placas infiltradas, como los nódulos, fueron siempre pobres en parásitos y la inoculación de este material en hamsters, infectó un número bajo de animales, las lesiones en estos últimos aparecieron después de un tiempo relativamente largo de incubación y por lo regular fueron fugaces.



Foto N° 5.-Casiragua. Engrosamiento leishmánico de la raíz de la cola.

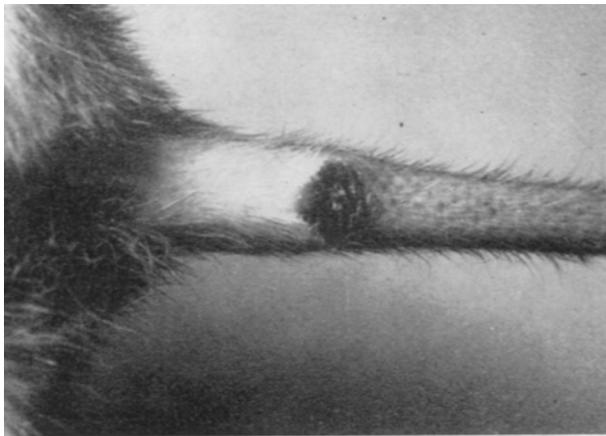


Foto N° 6.-Casiragua. Ulceración leishmánica de la cola.

En 2 de las casiraguas ocurrieron recaídas, consistentes en la aparición de pequeños nódulos en los sitios que ya se habían aplanado. Al igual que las alteraciones iniciales, éstas regresaron en pocos días.

Una vez desaparecidas las lesiones, los animales fueron reinoculados en 4 a 5 oportunidades; la mayoría, 7 de los 9, presentaron lesiones similares en aspecto y duración a las producidas en las primeras pruebas.

Tres de estas ratas espinosas se han seguido por un período de dos años y medio después de la desaparición de sus lesiones, y en el

material tomado de los sitios donde ellas asentaban, no se evidenciaron leishmanias, ni fue infectante para los animales sensibles.

Comentarios. Las casiraguas se infectaron fácilmente y en alto porcentaje con diversas especies de leishmanias tegumentarias. A pesar de la gran cantidad de parásitos utilizados en el inóculo, las lesiones fueron generalmente poco ostensibles y de duración pasajera. La transferencia de la infección a hamsters, se logró en escasas oportunidades y las lesiones por lo regular fueron discretas, mostrando tendencia a la involución después de corto tiempo. La positividad obtenida en diferentes reinoculaciones, permite suponer que los animales desarrollaron escasas defensas cutáneas. Las casiraguas aparecen en estas experiencias, dado lo efímero de las lesiones cutáneas y su pobreza parasitaria, como reservorios de poca importancia.

Picures o aguti (*Dasyprocta rubrata*). Proveniencia: Barlovento, Edo. Miranda; Aroa, Edo Yaracuy y Santiño del bajo Padamo, Territorio Amazonas.

Fueron inoculados 5 ejemplares y se logró la infección en 3. El material infectante, que contenía 5 a 10 leishmanias por campo microscópico (aumento de 900), se inyectó en cantidad igual, en partes laterales del hocico, dorso y la cola. Las lesiones que aparecieron primero y que duraron más tiempo fueron las del hocico. El período de incubación osciló entre 5 y 14 días.

Los tres animales que enfermaron habían sido inoculados, uno con *L. brasiliensis* tipo, otro con *L. pifanoi* y el tercero con la cepa uta del Perú. El aspecto de las lesiones y su evolución fueron, en términos generales, bastante parecidas. Consistieron en pequeñas placas engrosadas y finamente escamosas, en las que aparecieron dos o tres nodulillos en el curso de 20 a 25 días (Fot. 7-8). La duración de los nódulos fue de 6 meses y 12 días en uno, 3 meses y 14 días en otro, y 2 meses y 17 días en el otro. En uno de los animales cuyas lesiones tenían 3 semanas que habían regresado, volvieron a aparecer y alcanzaron el mismo aspecto y tamaño anterior; es decir que hubo una recaída.

La involución de las alteraciones en los tres roedores se hizo en forma gradual.

Desde el punto de vista parasitario, las leishmanias encontradas en frotis por aposición fueron en número escaso, pero infectantes para los hamsters. En algunas oportunidades no fue posible encontrar parásitos en las áreas de poca infiltración, sin embargo, el material extraído de ellas infectó los animales de prueba.



Foto N° 7.-Picure - *Dasiprocta rubrata*, con nódulos leishmánicos en el hocico.



Foto N° 8.-Picure con área plana del hocico después de la involución de las lesiones. En la piel se evidenciaron parásitos escasos, pero infectantes.

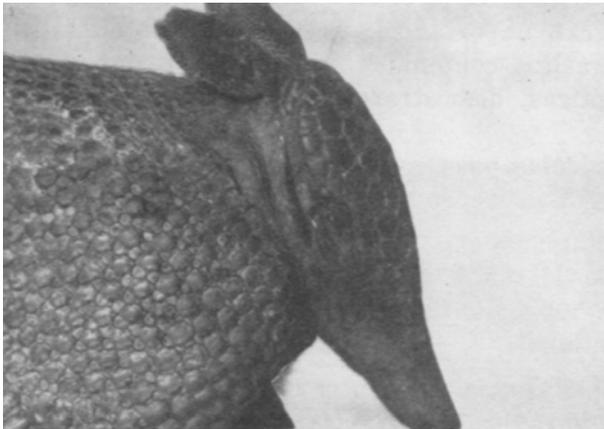
Los 3 picures que se infectaron, fueron reinoculados varias veces; unas, estando las lesiones en pleno apogeo, y otras, cuando ya habían desaparecido; siempre se obtuvo una nueva infección, pero de menor relieve y mucho más pasajera que las iniciales.

Una vez involucionadas las lesiones, los animales fueron seguidos por 10 a 15 meses y en este lapso no fue posible demostrar leishmaniasis con ninguno de los procedimientos utilizados.

Comentarios. Los picures, desde el punto de vista experimental, se comportaron como reservorios de leishmanias por un lapso promedio de 4 meses. Al parecer, la infección tiende a regresar espontánea y definitivamente en este grupo de animales.

Cachicamos o armadillos (*Dassypus novencinctus*). Proveniencia: cercanías de San Fernando de Apure, Edo. Apure, y Yaritagua, Edo. Yaracuy.

De 5 animales inoculados, la infección se obtuvo en dos, (uno con *L. mexicana* y el otro con cepa "Raimundo"). Uno de ellos, inyectado en la raíz de la cola, presentó una zona infiltrada y escamosa con escasas leishmanias y tuvo una duración efímera, 7 días solamente.



*Foto N° 9.-Cachicamo - *Dassypus novencinctus*, con infección leishmánica de hígado y bazo, obtenida por inoculación peritoneal.*



*Foto N° 10.-Lapa - *Cuniculus paca*. Lígero engrosamiento leishmánico del hocico, de tres meses y medio de evolución.*

Muy interesante fue lo observado en el otro armadillo (foto 9), espécimen joven, de unos 4 meses de edad, inoculado por vía intraperitoneal con una cepa brasilera, la cepa "Raimundo", obtenida por el Dr. F. Nery Guimaraes, de un caso de leishmaniasis tegumentaria difusa. El animal fue sacrificado 24 días después, debido a encontrarse triste e inapetente. A pesar de no haberse comprobado parásitos en hígado, bazo, pulmones, riñones ni en testículos, la inyección de material hepático a 10 hamsters, produjo 36 a 40 días después, la infección en 6 de ellos, los cuales presentaron gruesos nódulos que rápidamente se ulceraron y eran muy ricos en parásitos.

Comentarios. La infección con leishmanias tegumentarias pudo lograrse en un armadillo por inoculación cutánea, traduciéndose clínicamente por engrosamiento discreto y pasajero. En otro, y el resultado lo estimamos de gran importancia, fue el haber obtenido la infección visceral, y los parásitos contenidos en el hígado, aun cuando estaban en condiciones crípticas, demostraron fuerte virulencia para los hamsters.

Lapas (Cuniculus paca). Proveniencia: cercanías de Urachiche, Estado Yaracuy, y Barlovento, Estado Miranda.

De tres ejemplares inoculados, se logró la infección en uno. Era un macho mayor de dos años, que se inyectó en partes laterales del hocico, dorso y la cola, con cultivo de *Leishmania brasiliensis* tipo, de muy reciente aislamiento.

A los 42 días aparecieron en el hocico y en el dorso, áreas de poca infiltración, cubiertas de finas escamas (Fot. 10-12).

El frotis por aposición de estos sitios fue positivo en muchas oportunidades y se mostró infectante para los hamsters. Las lesiones se mantuvieron con el mismo aspecto clínico por espacio de 7 meses, después de lo cual disminuyeron rápidamente hasta desaparecer por completo.

El animal fue seguido por el largo período de cinco años y en los exámenes hechos a intervalos de 2, 4 y 6 meses, siempre se demostró a nivel del dorso, la existencia de leishmanias en frotis por aposición, y aun cuando fueron en número escaso, mantuvieron su virulencia para los animales de prueba.

A los cinco años fue sacrificado, con la finalidad de investigar parásitos en vísceras. El examen del corazón, hígado, bazo, mesenterio y testículos, resultó negativo.

Comentarios. La lapa infectada se comportó como un auténtico reservorio, en el sentido de que presentó pequeñas alteraciones en los sitios inoculados y luego, en piel normal, mantuvo por un tiempo muy largo parásitos leishmánicos con virulencia probada.

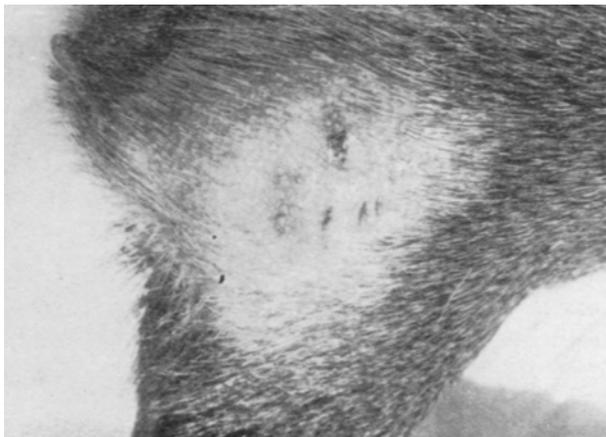


Foto N° 11. Porción superior del muslo de una lapa, con lesiones erosivo-escamosas de seis meses de evolución.

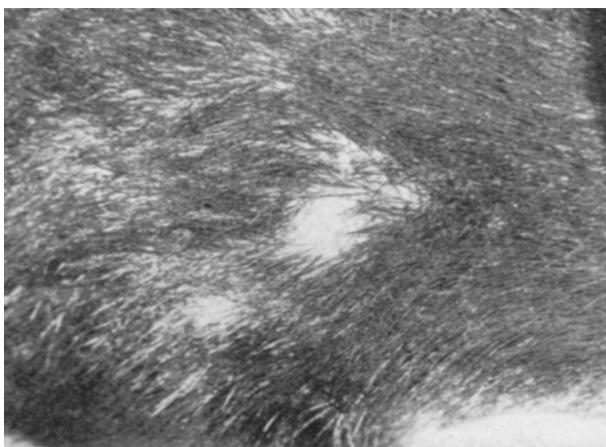


Foto N° 12.-Lapa. Area depilada del dorso, clínica e histopatológicamente normal, con parásitos leishmánicos virulentos, que se mantuvieron por espacio de cinco años que duró la observación.

Chigiüres (*Hydrocoerus hydrocoeris*). Proveniencia: San Fernando de Apure, Edo. Apure y cercanías de Calabozo, Edo. Guárico.

Fueron inoculados por vía cutánea, lados del hocico, dorso y la cola, con material de *L. brasiliensis* tipo, y *L. mexicana*.

De cuatro ejemplares utilizados, la infección se obtuvo en dos machos jóvenes (ambos con *L. mexicana*).

El tiempo de incubación fue de 9 días en uno y 12 en el otro.

Las alteraciones cutáneas consistieron en pequeños engrosamientos de la piel, con descamación mediana tanto en el hocico como en la cola, y se han mantenido (animales todavía en observación), por 5 meses (Fot. 13). En ambos sitios se ha visto en los últimos días una ligera alopecia.

En el frotis por aposición se evidenciaron siempre leishmanias, unas veces escasas en número y otras, abundantes.

La transferencia de este material a hamsters, determinó la aparición de muy pequeños nódulos, que no han mostrado tendencia a regresar en el curso de cuatro meses.

Comentarios. Los chigüires aparecen en estas experiencias, como receptivos a las leishmanias tegumentarias y las observaciones, que están todavía en período de desarrollo, llevan a pensar, que tal vez constituyan reservorios extrahumanos de importancia.

Quirópteros. Los animales fueron capturados en San Pedro, Paracotos y región de Barlovento, Edo. Miranda.

Pequeños lotes de murciélagos de la familia Moloscidae y del género *Carollia* (falso vampiro), fueron inoculados por diferentes vías.

Hasta el presente se ha logrado la infección en dos animales de la familia Moloscidae, utilizando *L. brasiliensis* tipo, e inyectada en el entrecejo. En el sitio se ha producido, 11-26 días después, un área infiltrada con escasos parásitos (Foto 14). En ambos ejemplares de murciélagos, las lesiones regresaron en un lapso promedio de 2 semanas.

En esta oportunidad hacemos solamente una breve referencia, pues las pruebas en murciélagos se iniciaron hace poco tiempo y cierto número de animales está bajo observación. Sin embargo, podemos adelantar la gran importancia que reviste la demostración de los quirópteros como posibles reservorios de leishmaniasis, dada la riqueza de especies en el país y sus peculiares condiciones de vida.

Morrocoy (Testudo carbonaria). Procedencia: Costas del Distrito Federal. Con material de ulceraciones cutáneas humanas (un caso de leishmaniasis tegumentaria corriente y otro de tegumentaria difusa), se inocularon 2 ejemplares de morrocoy (*T. carbonaria*); uno de 25 centímetros de largo y el otro de 10, en piel del cuello, base de las patas delanteras, mucosa de las encías y vía torácica.



Foto N° 13.-Chigüire - Hydrochoerus hydrochoeris. Infiltración escamosa del hocico de dos meses de evolución. Riqueza mediana de parásitos.



Foto N° 14.-Murciélago de la familia Moloscidae con pequeño nódulo leishnaánico del hocico.

No se observaron lesiones cutáneas ni mucosas. El animal más joven (fot. 15), que había sido inoculado con *L. pifanoi*, fue sacrificado al cabo de 3 meses y medio y se practicaron frotis por aposición y cortes histológicos del hígado, bazo, corazón, pulmones, riñones y testículos. No se comprobaron parásitos.

Con material hepato-esplénico se inoculó un lote de hamsters, en hocico, raíz de la cola y peritoneo y al cabo de 56 días, el 75 por ciento de los animales presentaba infiltración alrededor de la boca y algunos también en la cola, con parásitos abundantes en el frotis.

Comentarios. Fue una sorpresa obtener la parasitosis leishmánica en un morrocoy, dada sus reconocidas condiciones de animal refractario para variadas infecciones. En la actualidad otros animales de este género se encuentran en observación experimental.

Lagartos. Fueron utilizados en las pruebas variados géneros de lagartos, provenientes de Barlovento, Edo. Miranda, Costas del Distrito Federal y Distrito Colina, Edo. Falcón.

Se probaron 4 especies leishmánicas: *L. brasiliensis* tipo, *L. pifanoi*, *L. mexicana* y *L. trópica*. Las vías de inoculación fueron: piel del hocico y la cola, mucosa oral y peritoneo. No se obtuvo ninguna respuesta cutánea ni mucosa, las infecciones se alcanzaron exclusivamente por la inyección peritoneal.

Se logró la infección con las 4 especies de leishmanias citadas en los siguientes géneros de saurios (fot. 16-24)

Cnemidophorus lemniscatus
Thecadactylus rapicauda
Ameiva ameiva
Polychrus marmoratus
Tupinambis nigropunctatus
Tropydodactylus onca
Iguana iguana.

La parasitosis (con todas las especies leishmánicas ensayadas), se hizo manifiesta después de lapsos de incubación bastante variables, desde 4 hasta 63 días, apareciendo más prontamente cuando el material infectante provenía de personas o animales, que cuando se utilizaron cultivos de reciente aislamiento.

Algunos ejemplares murieron en el curso de las experiencias, dando la impresión de que el inóculum los hubiera afectado. Otros animales parasitados se conservaron muy bien y fueron sacrificados a diferentes intervalos, 10, 15, 25, 35 días y después de 4 meses.

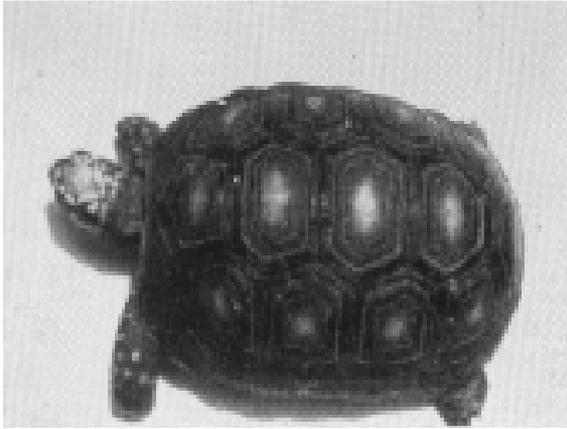


Foto N° 15.-Morrocoy - Testudo carbonaria. Infección visceral por L. brasiliensis, obtenida por inoculación intratorácica.



Foto N° 16. Cnemidóphorus lemniscatus.

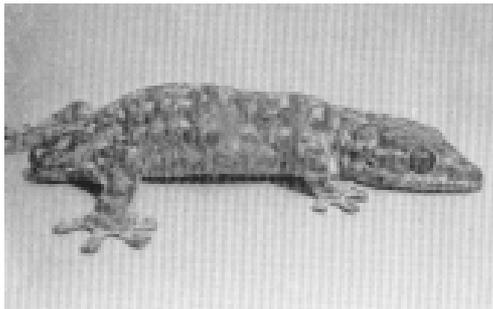


Foto N° 17.-Thecadactylus rapicauda.

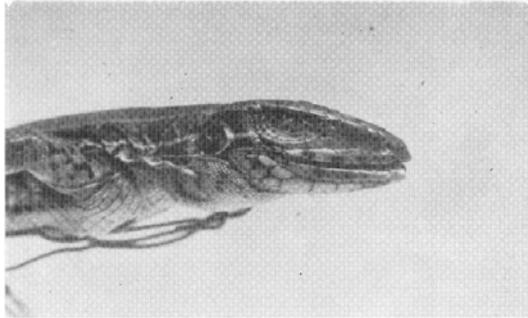


Foto N° 18.- Ameiva ameiva

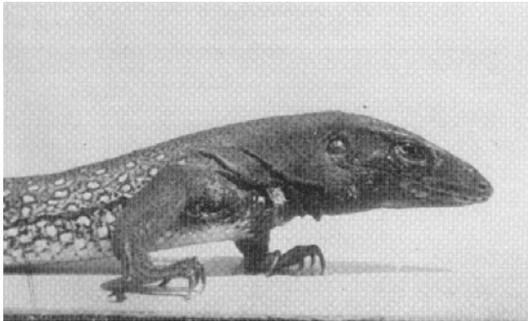


Foto N° 19.- Variedad del género Ameiva

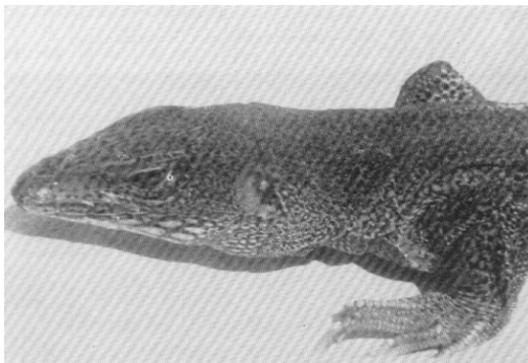


Foto N° 20.- Variedad del género Ameiva

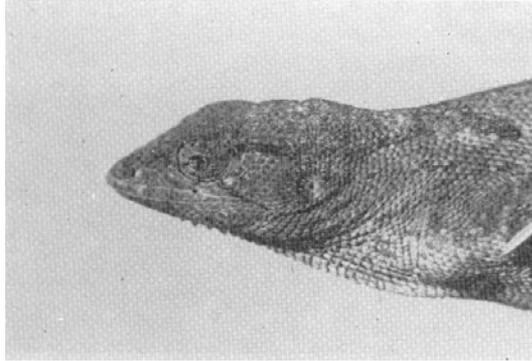


Foto N° 21. Polychrus marmoratus.

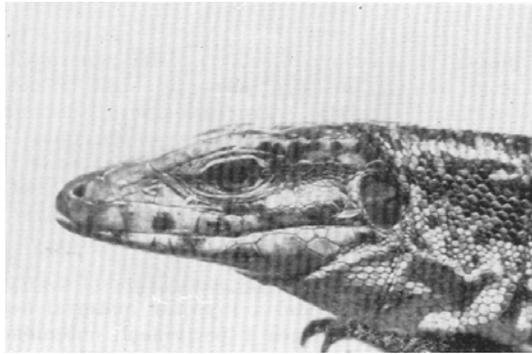


Foto N° 22.-Tupinambis nigropunctatus.

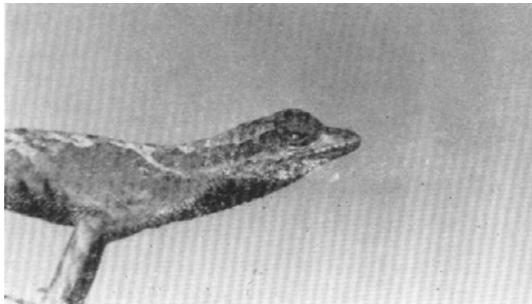


Foto N° 23.-Tropydodactylus onca.



Foto N° 24.-Iguana iguana.

Los más susceptibles resultaron ser los del género *Cnemidophorus*, en el cual se comprobó en un alto porcentaje una parasitosis hepatoesplénica generalmente mediana, pero que en algunos ejemplares fue relativamente abundante (fot. 25-26) ; en ciertas ocasiones se comprobó la invasión miocárdica. Le siguieron en orden los *Thecadactylus* (fot. 27), *Ameiva*, *Polychrus*, *Tupinambis*, *Iguana* y, finalmente, los *Tropydodactilus*; en un ejemplar de la especie onca, se llegó a identificar leishmanias en frotis de testículos y en uno de la especie *marmoratus*, en el mesenterio.

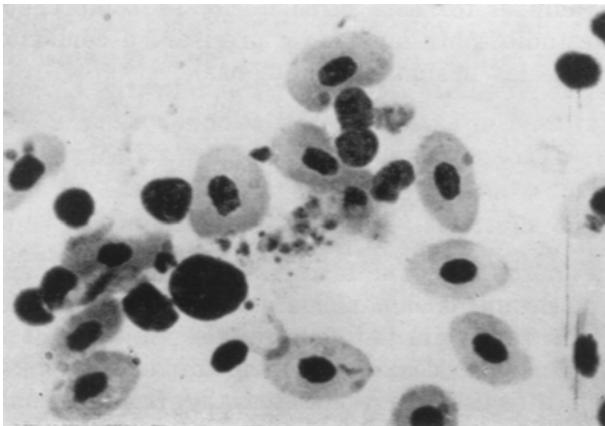
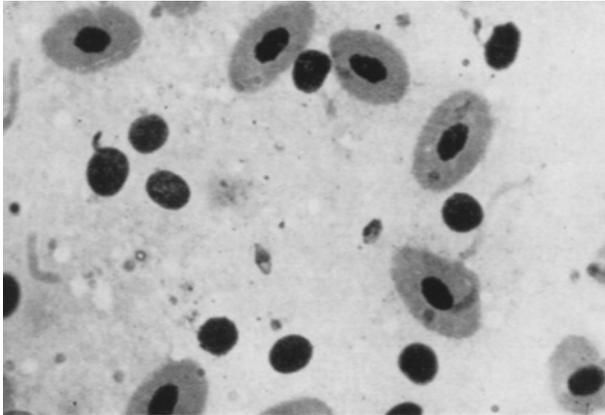
Con el fin de estimar la virulencia de los parásitos encontrados en las vísceras de los reptiles, se procedió a inyectar material hepato-esplénico a lotes de hamsters por vía cutánea y peritoneal, obteniéndose una respuesta positiva, 10 a 39 días después, en aproximadamente el 100% de los animales. Las lesiones cutáneas que presentaron los hamsters fueron de dos tipos: unas veces se redujo a ligeros engrosamientos de la piel y en otras, se formaron nódulos, que por lo regular se ulceraron pocos días después. En ambas alteraciones fue común observar una gran riqueza parasitaria. Cuando el material hepático se inoculó a los hamsters por vía peritoneal, se observó la invasión masiva de la vaginal testicular y también del bazo y el hígado.

En algunos lagartos, no se evidenciaron leishmanias en vísceras, pero la inoculación de material de hígado fue positiva en el 65% de los hamsters, demostrando esto que existía una parasitosis no patente.

El examen histopatológico del hígado y el corazón, tanto en las infecciones patentes como en las crípticas, no reveló ningún tipo de alteración.

Ciertas especies de lagartos fueron inoculadas dos veces por vía peritoneal, con intervalos de 8 a 12 días y empleando en cada ocasión una cepa leishmánica distinta. Algunos animales respondieron con una parasitosis hepática, que transmitida a los hamsters, determinó alteraciones cutáneas similares a las producidas por la cepa más virulenta.

En dos oportunidades se pudo aislar en medios de cultivo las leishmanias obtenidas por punción hepática de lagartos de la especie *lemniscatus*. Con este material se preparó antígeno, que fue probado en pacientes con leishmaniasis, utilizando como testigo antígenos conocidos, derivados de cepas leishmánicas de procedencia humana. Las respuestas cutáneas fueron prácticamente idénticas, lo cual significa que los parásitos no modificaron su antigenicidad en su paso por el huésped reptil.



Fotos Nos. 25 y 26. Frotis por aposición de hígado de *Cn. lemniscatus*.

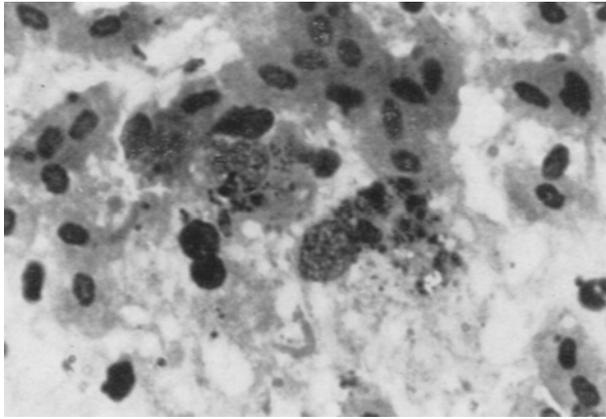


Foto N° 27. Frotis por aposición de bazo de *Th. rapicauda*.

Comentarios. Los resultados obtenidos en este último grupo de animales, concretamente, el haber logrado por primera vez la transferencia positiva de diversas especies de leishmanias de procedencia humana, a seis géneros de lagartos, y la demostración de que los parásitos mantenían su virulencia y también su calidad antigénica, dan idea de la importancia que reviste la investigación en estos vertebrados.

El asunto cobra mayor relieve, al recordar los recientes trabajos llevados a efecto en Centro América, los cuales han comprobado que muy variadas especies de phlebóthomus se alimentan predominantemente de lagartos, pero que ocasionalmente pueden hacerlo en mamíferos e inclusive en el hombre; si a esto se añade que en los reptiles los parásitos pueden invadir el torrente circulatorio, se comprenderá el interés de ahondar el estudio sobre lagartos y precisar su condición de reservorios potenciales de las leishmanias humanas.

SUMMARY

One of the most important features in reference to epidemiology of American tegumentary leishmaniasis is related to the cognizance of domestic and wild reservoirs. At present, the majority of tropical physicians and parasitologists dealing with the problem are inclined to think that the human infection derives essentially from animals; that is to say, the disease is maintained in Nature, as an authentic zoonosis and its appearance in man is an occurrence strictly accidental.

Up to the present time, the natural leishmanic infection, has been confirmed in America on a few domestic animals and some of the wild types. Among the former are the cat and especially the dog (Pedroso 1913). In the group of wild animals, there have been found involved: Spinous rats (*Proechymis semispinosus panamensis*) and the field mouse (*Hoplomys gimnurus*) by Hertig and colaborators in Panamá 1958; a rat (*Rattus rattus alexandrinus*) by Allencar, Pessoa and Fontanelle in Brazil 1960; a "taguara" mouse (*Kannabateomys amblyonyx*), a "picure" (*Dasyprocta azarae*) and a "lapa" or paca (*Cuniculus paca*) by Forattini in Brazil, 1960; 10 specimen between rats and field mice of the genera *Ototylomys*, *Peromyscus* and *Heteromys*, by Lainson and Stranway-Dixon in British Honduras 1962; mice (*Orizomys goeldi*) by Nery Guimaraes and Azevedo in Brazil 1963-1966 and a mountain mouse (*Zigodontomys microtinus*) in Venezuela 1965. With the exception of certain infections found in rats and mice, most authors have failed in their intent to transmit the parasitosis to susceptible animals.

From the experimental point of view, American tegumentary leishmaniasis has been transmitted to domestic animals : dogs and cats ; to some of the so called laboratory animals, rats, white mice, hamsters and guinea pigs, and to a few wild animals, such as the Macaco (*M. rhesus* and *mulata*), the Texas Citellus *tridecemnileatus*, the cotton rat (*Syngmodón hispidus*), the *Didelphis marsupialis*, the bush rat (*Tylomys panamensis*), the *Fotos flavus*, the *Bassaricion gabbi* and the Spinous rat (*Proechymis semispinosus panamensis*).

As it may be inferred, the reservoir animals are difficult to determine, more so their evaluation in Nature ; it is merely necessary to memorize the numerous animals that all investigators have had to examine in order to evidence the infection in a small number of them; if to such circumstance is added the possibility that some of the specimen considered healthy can temporarily shelter the parasites in a form not manifest, all of which gives an idea of the difficulties that exist for their exact evaluation as extra-human reservoirs. Actually, it is necessary to determine if the animals found with leishmaniasis in Nature, do constitute actual sources of infection for other animals or man; or if the infection is brief in some of them, the parasites do not have virulence or such virulence is weak and therefore does not display an important role in the epidemiologic chain of the endemia.

Briefly, the natural extra-human hosts of tegumentary leishmaniasis in America, are barely known and not well evaluated. For these reasons we have thought that the intents to produce the leishmanic infection in rural or wild animals are of great importance, since they would permit a detailed study of the clinical characteristic and evolution of the lesions produced on them, as well as the estimating of the parasitic virulence.

We have been working on this sense for some years, and the present information summarizes the results attained through the leishmanic inoculation on a group of wild animals.

Material and Methods

1°) Miscellaneous Strains of tegumentary leishmanias; some isolated from Venezuelan patients and others originating from South and Central American countries : *L. brasiliensis* type, *mexicana*, *pifanoi*, of Uta cases from Perú and *Leishmania tropica*.

2°) The test wild animals comprised:

- a) Mammalians:
- b) Chelonians.
- c) Batrachia.
- d) Reptiles.

3°) A lot of hamsters (*C. auratus*) was used to determine the parasitic virulence of the lesions produced and also to define the so called cryptic processes.

Reference is only made to wild animals in which the experimental infection was attained.

Monkeys. Of the genus *Cebus*, specie *nigrivittatus nigrivittatus*.

These were inoculated in the roots of the eyebrows, chin, back and tail. The most notorious and enduring alterations were obtained at the level. of the eyebrows and chin.

The infection was attained in 9 out of 12 specimen inoculated.

The period of incubation was fairly variable, 17 days the shortest and 11 months 12 days the longest.

The lesions consisted of hard nodules measuring 1-3 centimeters in diameter which did not ever become ulcerated. The smears by apposition carried out in several opportunities revealed parasites in a relatively scarce number. The nodules were maintained during an average lapse of 4-7 months. The most notorious and enduring lesions were those produced by *L. mexicana* firstly and secondly by the *pifanoi*.

Once the lesions had disappeared, the skin where they had been was examined on various occasions and at variable intervals of time, not having ever found parasites in the smears. The material taken from these places, which was also transferred to hamsters, resulted in 2 occasions infectant to 3 out of 8 animals.

There occurred relapses in 4 animals after 3 to 4 months of the involution of the initial lesions. The alterations always appeared in the sites originally inoculated.

One of the animals under observation for 9 years has kept absolutely well, without parasites neither in smears nor in culture and non-infectant to hamsters. The 9 monkeys that had been infected were re-inoculated in 3 occasions once their cutaneous alterations had disappeared; the re-inoculations were performed at 4 to 6 months intervals; papulose lesions having developed again in 5 of them, the cutaneous response to the reinfection test impressed in certain occurrences, as if the animals had developed defense against the leishmanic infection.

Casiraguas or spinous rats (*Proechymis guyanensis*). Were inoculated under the skin of the nose, ears, back and tail.

Out of 14 the specimen used, the infection was attained in 9. Incubation varied between 7-36 days.

The alterations were most notorious on the nose and at the level of the tail; those of the nose consisted at times of small infiltrated and squamous plaques and at other times of nodules ranging between and 1 centimeter in diameter, which did not ever become ulcerated. The response at the tail was of the nodular type and frequently abscessed a term between 10 to 46 days and thereafter started to involution.

Once the lesions had disappeared, the animals were re-inoculated in 4 or 5 occasions; the majority, 7 out of the 9 presented lesions similar in aspect and duration to those attained on the original test.

Picures or agouties (*Dasyprocta rubrata*). Out of 5 specimen inoculated, the infection was attained in 3, the period of incubation varied between 5 and 14 days.

The three animals that contracted the disease had been inoculated one with *L. brasiliensis* type, other with *L. pifanoi* and the third one with the strain Uta from Perú. The aspect of the lesions and their evolution were in general terms very much alike, there were small plaques engrossed and finely squamous. The duration was of 6 months and 12 days in one, 3 months and 14 days in the second and 2 months and 17 days in the other. In one of the animals whose lesions had 3 weeks of having involuted, these reappeared and attained the same previous aspect and size; that is to say, there was a relapse.

From the parasitic point of view, the leishmanias found in smears by apposition were scarce in number, but infectant to hamsters. The 3 picures that had been infected, were re-inoculated several times, on certain cases while the lesions were in full development and

in others, after these had disappeared; there was always a new infection attained, but of lesser importance and much more transitory than the initial ones.

Cachicamos o armadillos (*Dassypus novencinctus*). Of 5 animals inoculated, the infection was attained in 2. One of them inoculated at the root of the tail, presented an infiltrated and squamous zone with scarce leishmanias.

The observation in the other armadillo was quite interesting, a young specimen, 4 months old, inoculated intraperitoneal with *L. pifanoi*. The animal was killed 24 days later, on account of being dull and inappetent. In spite of not having confirmed parasites in the liver, spleen, lungs, kidneys nor in the testicles, the inoculation of hepatic material to 10 hamsters produced the infection in 6, 36 to 40 days later.

Lapas (*Cuniculus paca*). Out of 3 specimen inoculated, the infection was observed in one. Being a male over 2 years old, which was inoculated on the sides of the nose, back and tail, with culture of *Leishmania brasiliensis* type, of rather recent isolation.

Areas of scarce infiltration covered with thin scales appeared at 42 days on the nose and back.

The smear by apposition to these sites was positive in many occasions and proved infectant to hamsters. The lesions maintained the same clinical aspect for an interval of 7 months, after which they diminished and gradually disappeared.

The animal was observed during 5 years and throughout this long term, parasites virulent to hamsters were always ascertained.

On reaching 5 years, the animal was killed. Examination of its heart, liver, spleen, mesentery and testicles was found negative.

Chigiüres (*Hydrochoerus hydrochoeris*). These were inoculated subcutaneously on the sides of the nose, back and tail with material from *L. brasiliensis* type and *L. mexicana*.

Out of 4 specimen used, the infection was attained in 2 young males. The period of incubation lasted 9 days in one and 12 days in the other.

The cutaneous alterations consisted of small engrossings of the skin with medium desquamation on the nose as well as tail.

Cheiroptera. Small lots of bats of the family Moloscidae and of the genera *Carollia* (false vampire), were inoculated through different routes.

Up to the present (various animals are actually under observation), the infection has been attained in two animals of the family Moloscidae, having used *L. brasiliensis* type inoculated between the eyebrows. At the site it did develop 11-26 days subsequently an infiltrated area with scarce parasites. In both animals the lesions involuted within an average of two weeks.

Land Turtle. "Morrocoy" (*Testudo carbonaria*). Two massive inoculations were effected (at a week interval) with material from a human cutaneous ulcer, under the skin (neck and base of fore legs), mucosa of the gums and through the torax, in 2 specimen of Morrocoy; one measuring 25 cms. long the other rather small, merely 10 cms.

Neither cutaneous nor mucosal lesions were observed. The youngest animal was killed on reaching 3-1 months and smears and histological cuts of the liver, spleen, heart, lungs, kidneys and testicles were performed.

A lot of hamsters was inoculated with hepato-splenic material, on the nose, root of the tail and peritoneum and at 56 days, 75% of the animals presented infiltration around the mouth, and some also in the tail, with abundant parasites in smears.

Lizards. The infection was practised in several genera of lizards.

Four leishmanic species were tried : *L. brasiliensis* type, *L. pifanoi*, *L. mexicana* and *L. tropica*. The routes of inoculation were, the skin of the nose and tail, oral mucosa and peritoneum. The infections being attained exclusively by peritoneal inoculation.

The infection was attained with the aforementioned 4 species of leishmanias on the genera of Sauria listed below:

Cnemidophorus lemniscatus, *Thecadactylus rapicauda*, *Ameiva ameiva*, *Polychrus marmoratus*, *Tupinambis nigropunctatus*, *Tropydodactylus onca* and *Iguana iguana*.

The parasitosis was manifest subsequent to variable lapses of incubation, from 4 to 63 days.

Those of the genus *Cnemidophorus* were the most susceptible, in which a high percentage of hepato-splenic parasitosis of medium grade was evidenced, accompanied in several occasions of myocardial invasion. There followed in order, *Thecadactylus*, *Ameiva*, *Polychrus*, *Tupinambis*, *Iguana* and finally *Tropydodactylus*. Leishmanias were found in the testicles on a specimen of the *onca* species.

To the end of estimating the virulence of parasites found in the viscera of reptiles, hepato-splenic material was inoculated to hamsters,

cutaneously and intraperitoneal, obtaining a positive response, 10 to 39 days subsequently, in approximately 100% of the animals. The cutaneous lesions displayed by hamsters were some times light engrossings of the skin and at other times nodules, which became regularly ulcerated a few days later. There was observed a great parasitic abundance in both alterations. When the material was inoculated intraperitoneal to hamsters a massive invasion of the testicular vaginal tunic was observed and also of the spleen and liver.

Leishmanias were not evident in the viscera of some lizards, but inoculation of the material from the liver resulted positive in 6517c of the hamsters, thus evidencing that there existed a parasitosis which was not manifest.

Leishmanias were twice isolated in culture media by hepatic puncture of lizards of the species *lemniscatus*. Antigen was prepared with this material, which was tested (comparing it with control Antigen) in patients with leishmaniasis. The cutaneous responses were identical, which means that the parasites did not modify their antigenicity on passing through the reptile-host.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, S. (1962). *Sci. Sep. Inst. Sup. Sanit.* 2. 143-150.
- Adler, S. (1962). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* Vol. 4, Nº 2.
- Adler, S. (1964). *Adv. in Parasit.* Vol. 2. Academic Press. London. Edited by Ben Davies.
- Alencar, J. E., Pessoa, E. P. & Fontanelle, Z. F. (1960). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* Vol. 2, Nº 6.
- Amaral, A. D., & Franco Do. (1941). *An. Fac. Med. Univ. S. Paulo XVII.* (Tomo I), página 303.
- Bejarano, J. F. R. *Primeras Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas*, Buenos Aires.
- Benetazzo, B. & Cicchini, T. (1952). *Arch. Ital. di Sc. Med. Trop. é di Parass.* Vol. XXIII. Fasc. 4.
- Biagy, F. (1953). *Med. Rev. Mex.* T. 33, Nº 683.
- Blanc, G., Martín, L. A. & Baltazard, M. (1947). *Archiv. Inst. Pasteur de Maroc.* T. 3. C. 8. 489-515.
- Coelho, M. V., & Falcao, A. R. (1962). *Rev. Med. Trop. S. Paulo.* Vol. 4, Nº 3, é Vol. 4, Nº 4.
- Coelho, M. V. & Countinho-Abath, E. (1965). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* Vol. 7, Nº 3.
- Countinho-Abath, E., & Coelho, M. V. (1965). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* Vol. 7, Nº 3.
- Deane, L. M., & Deane, M. P. (1962). *Rev. Med. Trop. S. Paulo.* Vol. 4, Nº 3.
- Forattini, O. P., Pattoli & Aun, J. R. (1953). *Arq. da Fac. Hig. é Saud. Púb.* Vol. 7, Nº 2.
- Forattini, O. P., & Dos Santos, M. R. (1955). *Rev. Clín. S. Paulo.* 1-3:3-20.
- Forattini, O. P., Juárez, E., Bernardi, L., & Dauer, C. (1959). *Rev. Med. Trop. S. Paulo.* Vol. 1, Nº 1.
- Forattini, O. P. (1960). *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* Vol. 2, Nº 4.
- Fulton, J. D., Joyner, L. P. & Chandler, R. L. (1950). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* Vol. 44, Nº 1.
- Fuller, H. S., & Heimann, Q. M. (1942). *J. Parasitology.* 28-429.
- Garnham, P. C. C., & Lewis, D. J. (1959). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.* Vol. 53, Nº 1.
- Garnham, P. C. C. (1962). *Sci. Repts. Ist. Super Sanit.* 2. - 76-82.
- Hertig, M., & Me Connell, E. (1963). *Exp. Parasit.* 14-92.
- Heyneman, D., & Mansour, N. S. (1963). *Jour. Egypt. Pub. H. Ass.* Vol. 38, Nº 1.

- Hoogstral, H. (1963). *Scient. Prog. Rep. Cairo. Egypt. U. A. R.*
- Houin, R. (1963). *Annal de Paras. Hum. et. Comp. Tom. 38, N° 3.* Hoare, C. (1944). *Trop. Dis. Bull. Vol. 41, N° 5.*
- Hoare, C. (1944). *Trop. Dis. Bull. Vol. 41, N° 5.*
- Johnson, P. T., & Me. Connel, E. (1962). *Journ. of Parasit. 48-158.*
- Johnson, P. T., Me. Connell, E., & Hertig, M. (1963). *Exp. Paras. 14 - 107-122.*
- Kerdel, F., Conde Jahn, F., Essensfeld, E., Henríquez, J. J., Machado, C. E., Darri carrere, R. y Castro, F. (1966). *2da. Reunión Anual. Soc. Venez. Dermat. caracas.*
- Kirk, R. (1950). *Parasitology. Vol. 40, 58-59.*
- Lainson, R., & Strangway-Dixon, J. (1962). *Brit. Med. Journ. 1956-1958.*
- Lainson, R., & Strangway-Dixon, J. (1963). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg Vol. 57, N° 4.*
- Lainson, R., & Strangway-Dixon, J. (1964). *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg. Vol. 58, N° 2.*
- Medina, R., & Romero, J. (1957). *Dermat. Venez. Vol. 1, N°1.*
- Medina, R., & Vegas, M. (1966). *Dermat. Venez. Vol. 5. Nos. 1-2.*
- Mc Connell, E. (1963). *Exp. Paras. 14 - 123-128.*
- Mohiuddin, A. (1952). *Ind. Jour. Med. Res. 40-2.*
- Nery Guimaraes, F. (1951). "0 Hospital". *Vol. 40, N° 1, pp. 25-46.*
- Nery Guimaraes, F. (1951). "0 Hospital". *Vol. 40, N° 2.*
- Nery Guimaraes, F., & Azevedo, M. (19Comentarios.64). "0 Hospital". *Vol. 66, N° 2.*
- Nery Guimaraes, F., & Da Costa, O. R. (1964). "0 Hospital". *Vol. 66, N° 2.*
- Nery Guimaraes, F. (1965). "0 Hospital". *Vol. 67, N° 1.*
- Nery Guimaraes, F. (1966). "0 Hospital". *Vol. 70, N° 2.*
- Paz, Z. E., & Sagher, F. (1961). *South. Afric. Med. J. Vol. 35, No. 28-576.*
- Pessoa, S. B. (1960). *Parasitología Médica.*
- Pessoa, S. B. (1961). *Arq. Hig. é Saud. Púb. Vol. XXVI. N° 87. Sao Paulo, Brasil.*
- Pifano, F. (1960). *Bull. Soc. Path. exot. T. 53. Págs. 510-517.*
- Pifano, F. (1960). *Arch. Ven. Med. Trop. Paras. Méd. 3 - 11-61.*
- Philippe, E., & Chadli, A. (1961). *Arch. Inst. Pasteur de Tunis. T. 38, Nos. 3-4.*
- Ramírez, M. *Comunicación personal. Inst. Zoolg. Tropical. Fac. Cieno. Univ. Cent. Caracas.*
- Rivero, C. R. *Comunicación personal (Escuela de Biología). Caracas, Venezuela.*
- Sen Gupta, P. C. (1962). *Rev. Med. Trop. S. Paulo. Vol. 4, N° 2.* *Trop. Dis. Bull. (1944). Vol. 41, N° 6.*
- Thatcher, V. E., Eisenmann, C., & Hertig, M. (1965). *Journ. of Parasitol. Vol. 51, pp. 842-844.*
- Williams, P., Lewis, D. J., & Garnham, P. C. C. (1965). *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hig. Vol. 59, N° 1.*
- Zeledón, R., & Blanco, E. (1963). *Set. Cong. Intern. Med. Trop. é Malaria.*