

**AISLAMIENTO DE Leishmania braziliensis braziliensis
en Proechimys sp. CAPTURADO EN EL RIO NAPO,
LORETO - PERU**

Braga Vela Janeth (*)
García Martínez Edward (**)
Viena del Aguila Máximo (*)
Braga Ribeiro Roseli (***)

RESUMEN

Se reporta el hallazgo de Proechimys sp. procedente del río Napo, provincia de Maynas, departamento de Loreto, Perú, infectado con Leishmania braziliensis braziliensis.

Mediante trampas Tomahawk se capturé roedores silvestres en dos (2) localidades del río Napo; sacrificados los roedores capturados, se obtuvo muestras de vísceras y piel que se inocularon en hamsters, de donde se aislé en cultivos de Agar sangre - Difco.

Por electroforesis en gel de almidón se corrieron diez (10) enzimas, cuyos perfiles fueron comparados con las cepas patrón de Leishmania mexicana amazonensis, Leishmania braziliensis panamensis, Leishmania braziliensis guyanensis y Leishmania braziliensis braziliensis. De cuatro especímenes capturados uno resultó positivo a Leishmania en el hígado, al ser identificado resultó ser semejante a Leishmania braziliensis braziliensis.

Se discute la coincidencia con afirmaciones de otros autores, de que los huéspedes naturales de Leishmania braziliensis braziliensis son roedores. Asimismo, se analiza la probable presencia de otros tipos de Leishmania en el área.

Esta es la primera comunicación de este tipo en el país.

SUMMARY

We are reporting Proechimys sp. from río Napo, Prov. Maynas, Department of Loreto, Peru, infected with Leishmania braziliensis braziliensis.

* Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) - IQUITOS
** Unidad Departamental de Salud de Loreto - Iquitos
*** Instituto "Evandro Chagas" SESP - Belém, Brasil

Using tomahawk snare we captured wild rodent in two localities of río Napo, in which we extracted samples of viscera and skin that were inoculated in hamster, then it was isolated in agar.

By electrophoresis in starch Gel, it was run 10 enzymes profiles which were compare with patterns of cepas of Leishmania mexicana Leishmania braziliensis panamensis Leishmania braziliensis guyanensis, and Leishmania braziliensis braziliensis. Of the four captured specimens, one resulted positive to Leishmania in the liver which we are discussing the coincident with the affirmation of the other authors that the vector of Leishmania braziliensis braziliensis are rodent.

This is the first report of this kind of work in Peru.

1. INTRODUCCION

El escaso conocimiento de la epidemiología de la Leishmaniasis cutaneomucosa en el departamento de Loreto, ha impulsado a los autores a iniciar su estudio, en búsqueda de probables reservorios de esta enfermedad en animales silvestres, en áreas donde se están efectuando estudios clínico - parasitológicos (1)

El contacto permanente del hombre de la amazonía con los animales silvestres, por razones de alimentación y supervivencia, permite suponer que la enfermedad posee un reservorio natural entre ellos, posibilitando la persistencia del ciclo vital de la Leishmania, siendo el hombre afectado accidentalmente al ingresar a las zonas del monte y ponerse en contacto con el vector, que vive normalmente alimentándose de estos animales. (2) En áreas geográficas del alto Napo, donde se detectaron pacientes de Leishmaniasis, se capturaron animales silvestres mediante la colocación de trampas en el monte. Un ejemplar de Proechimys sp. capturado en la quebrada Aushiri, presentó lesiones compatibles con Leishmaniasis (3), aunque el aislamiento y cultivo de stock de Leishmania se efectuó del hígado y fue caracterizado por el método de Electroforesis de Isoenzimas, en gel de almidón.

El presente trabajo realizado con financiamiento de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) y en convenio con la Unidad Departamental de Salud de Loreto.

2. MATERIALY METODOS

Territorio: Para el estudio se seleccionaron dos localidades en la cuenca del río Napo Aushiri y Mazán, (Fig. 1) que reunieron condiciones de accesibilidad y presencia de monte silvestre a 2 horas de caminata.

Método de muestreo: En lugares de monte alto, se colocaron 4 trampas para especies vivas, Tomahawk (4), en horas de la tarde, permaneciendo durante toda la noche; a la mañana siguiente, se recogieron los especímenes capturados, repitiéndose este trabajo durante 2 noches seguidas en cada localidad.

FIGURA 1

LUGARES DE CAPTURA DE ROEDORES
RIO NAPO - DPTO. LORETO

Aislamiento de stock de Leishmania: Los animales capturados fueron observados durante la semana, para detectar cambios de conducta, y posteriormente trasladados en jaulas metálicas hasta la ciudad de Iquitos, donde eran sacrificados aquellos con lesiones sugerentes de Leishmaniasis o puestos en observación durante 3 meses los que no presentaban sintomatología; al término del tiempo considerado, fueron sacrificados, y se obtuvieron las muestras de piel, hígado y bazo (5). Una parte de esta muestra sirvió para hacer el estudio histopatológico y la otra para homogenizar en suero salino estéril con antibióticos e inocular en patas y hocico del hamster (6), de donde se realizó el aislamiento por microaspirado (7) y se cultivó el material en tubos de cultivo con Agar sangre-Difco-bifásico; según procedimiento descrito por Romero, et al (8). El crecimiento masivo se realizó inoculando en 10 tubos de cultivo con el medio anterior, según procedimiento descrito por Braga R. (9), preparándose el extracto del sobrenadante y conservándolo a 70°C hasta su utilización.

3. CARACTERIZACION ISOENZIMATICA

Mediante el método de Electroforesis en gel de almidón, se estudiaron las siguientes enzimas:

E.c: 2.6.1.1.	Aspartatoaminotransferasa (ASAT)
E.c: 2.6.1.2.	Alaminoaminotransferasa (ALAT)
E.C: 5.3.1.9.	Glucosafosfatoisomerasa (GPI)
E.c: 1.2.1.49	Glucosa -6- fosfodeshidrogenasa (G-6-PD)
E.c: 2.7.5.1.	Fosfoglucomutasa (PGM)
E.c: 1.1.1.44	6-Fosfoglucoeshidrogenasa (6 PGDH)
E.C: 1.1.1.37	Málico deshidrogenasa (MDH)
E.C: 4.2.1.1.3	Aconitasa hidratasa (ACON)
E.c: 5.3.1.8.	Málico fosfatoisomerasa (MPI)
E.c: 3.4.11.1	Aminopeptidasa (citosol) (PEP)

Las pruebas electroforéticas se realizaron de acuerdo al procedimiento de Miles, donde se detallan los reactivos utilizados y las condiciones de corrida (10). Se utilizaron como cepas la referencia a:

	Código	Huésped	Procedencia
<u>Leishmania braziliensis braziliensis</u>	MAN/BR/1975/M22903	Hombre L.M.C.	Pará - Brasil
<u>Leishmania braziliensis guyanensis</u>	MAN/BR/1975/M4147	Hombre L.C.	Pará - Brasil
<u>Leishmania braziliensis panamensis</u>	MAN/PA/1975/M 4037	Hombre L.C.	Panamá
<u>Leishmania mexicana amazonensis</u>	VEC/BR/1967/PHB	Lutzomvia Flaviscutellata	Pará - Brasil

Los datos del stock de Leishmania son:

<u>Leishmania sp.</u>	RES/PE/1986/HR - 3	Roedor L.V.	Napo- Loreto Perú
-----------------------	--------------------	-------------	----------------------

4. INDICE DE SIMILARIDAD

Se determinó el índice de similaridad para el stock caracterizado, comparándolo con la presencia o ausencia del carácter isoenzimático en los patrones de las cepas de referencia utilizadas, de acuerdo a procedimientos descritos por Réady (11) y Godfrey (12). La ecuación de referencia es la siguiente:

$$IS. = \frac{Z}{a + b - z}$$

I.S. =	Indice de similaridad
a = #	de bandas de stock (a)
b = #	de bandas de stock (b)
c = #	de bandas compartidas

5. RESULTADOS

Se capturaron 4 especímenes de roedores: tres de ellos en la localidad de Mazán, los que fueron 2 "ratas de campo, Rattus rattus y un ratón del monte, Proechimys sp.; el cuarto ejemplar fue capturado en la localidad de Aushiri, siendo también un "ratón del monte, Proechimys sp.

Los 3 primeros resultaron negativos a la presencia de Leishmania; del último roedor, Proechimys sp., se aislé y cultivó un stock de Leishmania desde el hígado, que sometida a la caracterización por patrones isoenzimáticos, en gel de almidón, a través de 10 enzimas, resulté ser semejante a L. braziliensis braziliensis. Los patrones de migración de las enzimas ASAr, ALAT, GPI, G6PD, 6PGHD, PGM Y PEP, se muestran en la Fig. 2; con un índice de similaridad de 66% (Tabla 1).

6. DISCUSION

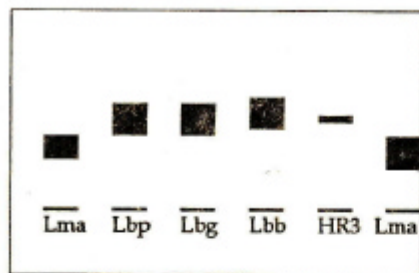
Los perfiles isoenzimáticos determinados a través de la técnica de gel de almidón, permiten identificar con seguridad la categoría taxonómica de subespecie, dentro del Complejo Leishmania brasiliensis, del stock aislado del hígado del roedor Proechimys sp., desde al alto Napo.

La presencia de Leishmania braziliensis braziliensis en animales silvestres en esta área, es la primera comunicación de este tipo en el país.

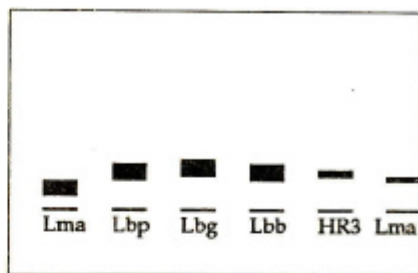
Este hallazgo coincide con la afirmación de Lainson (13), cuando menciona que los huéspedes naturales para L. braziliensis braziliensis son algunos roedores y que la infección en el animal es comúnmente inaparente, encontrándose los parásitos en vísceras y piel, pero no coincide cuando el mismo autor (14), menciona que el roedor del género Proechimys sp. Está infectado con L. braziliensis guyanensis y Leishmania mexicana amazonensis en la amazonía brasilera.

La cercanía entre el área de captura del roedor, quebrada Aushiri, y la residencia del paciente detectado con Leishmania braziliensis guyanensis (15), permite suponer la presencia de ambas subespecies en la misma área geográfica, lo que explicaría la casuística clínica, de formas cutáneas y cutáneomucosas encontrada (16).

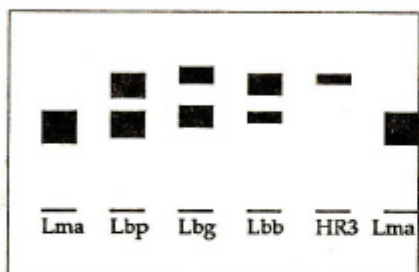
FIG. 2: PATRONES DE MIGRACION DE ISOENZIMAS



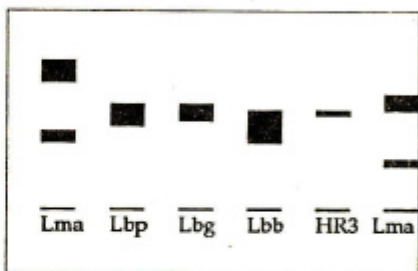
GPI



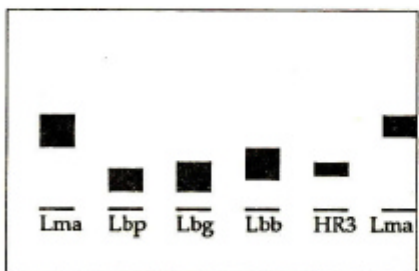
GGPD



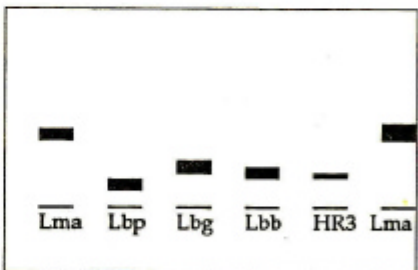
ASAT



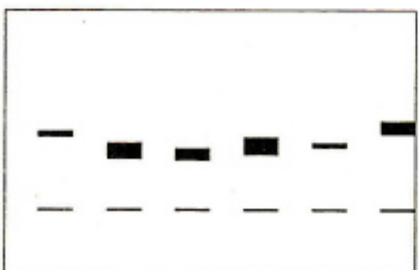
ALAT



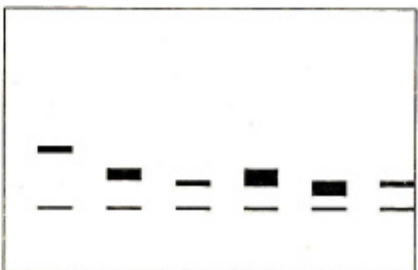
MPI



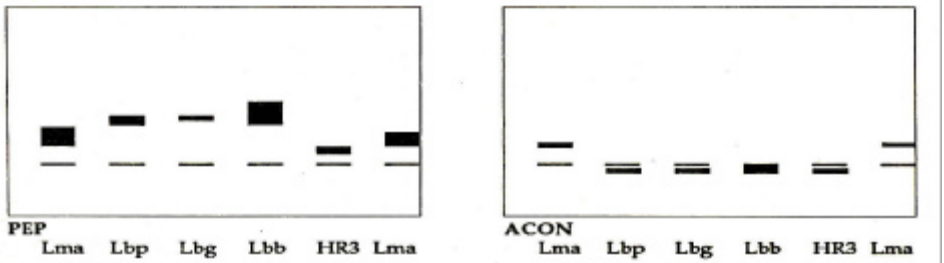
GPGDH



PGM



MDH



Es necesario continuar las investigaciones a este respecto, a fin de poder determinar la presencia de *Leishmania* en otros roedores, y la presencia de *Leishmania braziliensis braziliensis* en pacientes de la misma zona. Llama la atención la ubicación de *Leishmania braziliensis braziliensis* en las vísceras del roedor, lo que haría suponer que este tipo de *Leishmania* no sólo afecta la piel y mucosas, sino que produce una Leishmaniasis visceral en los roedores. Se estima que estudios posteriores arrojarán más luz sobre esta situación.

7. **BIBLIOGRAFIA**

1. Colán , E., Braga, J., García, E. Hallazgos preliminares de Leishmaniasis en Loreto. VII Congreso Latinoamericano de Parasitología. Guayaquil. Ecuador. pp.93.1985.
2. Lainson, R., Shaw J.J. Las Leishmanias y la Leishmaniasis del Nuevo Mundo, con particular referencia al Brasil. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Feb pp.93-114.1974
3. Lainson, R., Shaw J.J. Epidemiology and Ecology of Leishmaniasis in Latino - América. Nature. Vol 273. Jun pp. 595-600...1978
4. Nagorsen, A.W. and Peterson, R. L. Mammals. Collector's Manual. The Royal Ontario Museum. Printed and Bound in Canadá. at the Algor Press. p.79. - 1980.
5. Herrer, A Nature infections of *Leishmania* and *Trypanosome* demostred by skin culture . The Journal of Parasitology. Vol. 52. NI2 5. pp 954- 957-1966.
6. Cuba, C.C. Llanos Cuentas, E. A., Barreto A.C. Magalliaes, KV. Lago,. EL, Reed, S. G. and Marsden, P.O Human Mucocutaneous Leishmaniasis en Tres Braços Bahia - Brasil an area of *Leishmania braziliensis braziliensis* - transmission. 1. Laboratory Diagnosis. Rev. da. Soc. Bras. Med. 1ro . 17. (4): 161 -167. Out Dez.1984.

TABLA I

INDICES DE SIMILARIDAD DEL STOCK *Leishmania* sp. DEL RIO ALTO NAPO - LORETO

Enzima	6PGDH	PGM	MDH	ACON	GPI	G6PD	ASAT	ALAT	MPI	PEP	# b
Móvil	1,2,3,4	1,2,3	1,2,3	1,2	1,2,3	1,2,3	1,2,3	1,2,3,4	1,2,3	1,2,3,4	1,2,3,4
<u>Cepa</u>											
PH8	1 0 0 0	1 0 0	1 0 0	1 0	0 0 1	0 0 1	0 0 1	1 0 0 0	1 0 0	0 0 0 1	1 0
M4037	0 0 0 1	0 0 1	0 1 0	0 1	0 1 0	0 1 0	0 1 0	0 0 1 0	0 0 1	0 0 1 0	1 0
M4147	0 1 0 0	0 0 1	0 1 0	0 1	0 1 0	1 0 0	1 0 0	0 1 0 0	0 0 1	0 1 0 0	1 0
M2903	0 0 1 0	0 1 0	0 0 1	0 1	1 0 0	1 0 0	0 1 0	0 0 0 1	0 1 0	1 0 0 0	1 0
HR-3	0 0 1 0	0 1 0	0 0 1	0 1	0 1 0	1 0 0	0 1 0	0 0 0 1	0 1 0	0 0 1 0	1 0
					I.S.	Lma	Lbp	Lbg	Lbb		
						100	0	0	0		
						0	100	38	20		
						0	38	100	12		
						0	5	12	100		
						0	25	17	66		
						PH8	M4037	M4147	M2903		
						100	-	-	-		
						0	100	-	-		
						0	38	100	-		
						0	5	12	100		
						0	25	17	66		

7. Hendricks, L. and Wrigth, N. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis by in viti cultivation of salme aspirates in Schneiders. Drosophila Medium. Am.. J.Trop. Med. Hyg. 28 (6). p.962 – 964 - 1979.
8. Romero, G.G. Arana M., López, M. Montoya, I., BohI, R., Campes,M.,J Arévalo, and Llanos, A. Characterization of Leishmania species from Peru. Trans. of the Royal . Soc. of Trop. Med. and Hyg. 81,14 24.1987.
9. Braga, R. R., Lainson, R., Shaw, J.J., Ryan, L., and Silveira, F.T. Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of Leishmania from man, dogs, and the sandfly Lut zomya longipalpis (Lutz. & Neiva, 1912) isolated during art outbreak of viscera leishmaniasis ja Santarém, Pará,. State. Trans. of the Royal Soc. Of Trop. Med. and Uyg. 80, 143-145.1986.
10. Miles, M.A., Linson, R., Shaw., J.J. Póvoa, M. and de Souza, A Leishmaniasis ir Brazil. XV: I3iochemical distinction of Leishmania mexicana amazonensis Leishmania braziliensis braziliensis y Leishmania braziliensis guyanensis aetiological agent of cutaneous leishmaniaraiatle Amazon. Basin of Brasil . Trans of the Royal of Trap. Med and Hyg. Vol. 75. N° 4 524-529. 1981
11. Ready, P.D., and Miles . M.A. Delimitation of Trypanosome cruzi zymodemes by numerical taxonomy. Trans. of the Royal. Soc. of Trop. Med. And Hyg. Vol 74 N°2 2238-242. 1979.
12. Godfrey, D. G. Biochemical characterization in the taxonomia of Parasitic. Protozoa. M. Bioch. Charact. of Leishmania. Ed. by. Chance, M. L. & Walton, B.C. UNDP / World Bank/WHO. 1980.
13. Lainson, R. Epidemiología e Ecología de Leishmaniose Tegumentar na Amazonia. Heléia Medica. Belém. 3. (1): 35-40 .1981
14. Lainson, R. ,Shaw, J. 1.. Ready, P. D., Miles, M. A. and Próvoa, M. Leishmaniasis in Brazil: XVI: Isolation and identiflcation of Leishmania species from sandflies, Wild niammals and man in noth .Pará State, with particular reference to. L. braziliensis guyanensis causative agent of “pian bois. Trans.of the Royal Soc. of Trop. Med. and Hyg. Vol. 75, pp.530 -536. 1981.
15. Braga, J., García, E., Colán, E., Braga, R.R., Arana, M. Leishmania braziliensis braziliensis y Leishmania braziliensis guyanensis en el Departamentos de Loreto Perú 1987. (impress).

16. Braga, J., García, E., Colán . E., Viena, M ., Marapara, J. Observaciones epidemiológicas de Leishmaniasis en el Departamento de Loreto. X Congreso Latinoamericano de Microbiología y VII Congreso Peruano de Microbiología y Parasitología. Trujillo. Perú 1987.