

## COMPORTAMIENTO EXPERIMENTAL DEL *Sporothrix schenckii* Y LA *Leishmania mexicana* EN EL HAMSTER

Luz Angela GONZÁLEZ DE POLANÍA (1), Alberto ALZATE (2) & Nancy SARAVIA (3)

### RESUMEN

La descripción macroscópica del proceso de patogénesis en hamsters inoculados subcutáneamente en nariz con *Sporothrix schenckii* ó *Leishmania mexicana* spp. proporcionó bases para diferenciar estos dos microorganismos en un modelo animal utilizado comunmente para estudiarlos.

Observaciones secuenciales durante 150 días permitieron afirmar que en las infecciones causadas por estos patógenos se presentaron edema y eritema como signos primarios, seguidos de alopecia, necrosis y ulceración. La producción de pus fué una característica distintiva para el *S. schenckii*. Estos signos clínicos se observaron más temprano en la esporotricosis que en la infección por *L. mexicana*, mostrando diferencias estadísticas significantes en días promedio de aparición.

El presente trabajo muestra que las lesiones producidas tanto por el *S. schenckii* como la *L. mexicana* en este modelo experimental comparten signos clínicos, pero el tiempo de aparición de los mismos y su frecuencia relativa permiten diferenciarlas.

Las condiciones de inoculación como: cepa de los microorganismos, dosis del inóculo, sitio y vía de inoculación, deben tenerse presentes en la evaluación de su comportamiento experimental.

**UNITERMOS:** Esporotricosis experimental; Leishmaniasis experimental; *Sporothrix schenckii*; *Leishmania mexicana*.

### INTRODUCCION

La esporotricosis y la leishmaniasis son enfermedades tropicales frecuentes en la población colombiana, comparten un ámbito epidemiológico semejante y con frecuencia debe hacerse diagnóstico diferencial entre ellas, debido a la gran similitud que presentan las lesiones tanto en su apariencia macroscópica como en su localización<sup>1, 4, 6</sup>.

El aislamiento de los agentes causales en cultivo es el mejor método para confirmar el

diagnóstico clínico en ambos casos. sin embargo, en lesiones únicas de curso crónico, en las cuales hay escasos parásitos ó blastoconidias del hongo con poca capacidad para multiplicarse fuera del huésped, el cultivo puede ser negativo. En éste caso la inoculación en hamsters, del aspirado de las lesiones puede ser útil en el aislamiento de los agentes causales, al igual que en los casos en los cuales las lesiones están contaminadas secundariamente con bacterias.

(1) Profesor Asistente, Departamento de Patología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

(2) Profesor Asociado, Departamento de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

(3) Directora Científica, Centro Internacional de Investigaciones Médicas, Cali, Colombia.

La inoculación subcutánea de *Sporothrix schenckii* en hamsters, produce esporotricosis en estos animales con características clínicas similares a las observadas en humanos<sup>5</sup>. Se ha utilizado el hamster como modelo animal para examinar la respuesta inmune en la esporotricosis, localizada ó sistémica y la influencia de la inmunización activa subsiguiente a infección con *S. schenckii*<sup>2</sup>. Al inocular subcutáneamente un número moderado de levaduras viables de *S. schenckii*, se producen en el animal lesiones limitadas a tejido subcutáneo con compromiso de los linfáticos similar a la enfermedad de tipo linfagítico en humanos. Esto hace que el hamster sea considerado un buen modelo para el estudio de la esporotricosis experimental<sup>2</sup>. Se ha observado también una mayor resistencia a la reinfección después de una infección subcutánea activa<sup>2</sup>.

Debido a susceptibilidad a la leishmaniasis, el hamster ha sido utilizado para aislar el parásito de los tejidos de pacientes, de animales reservorios y de los vectores hematófagos<sup>3, 9</sup>. En pacientes colombianos con leishmaniasis cutánea, los aislamientos han sido en su mayoría compatibles con *Leishmania* del complejo *braziliensis* presentando un crecimiento lento en los hamsters con lesiones de tipo nodular, algunas ulceradas, metástasis infrecuente y con pobre a moderada densidad de amastigotas<sup>9</sup>. El hamster ha servido además como modelo animal para estudiar la patogénesis de infecciones causadas por *L. mexicana* y *L. braziliensis*<sup>11</sup> y en particular para estudiar el fenómeno de inmunosupresión específica en pacientes con leishmaniasis cutánea difusa<sup>7, 10, 11</sup>.

Observaciones realizadas en el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) en Cali, permiten afirmar que la inoculación en hamster de especímenes clínicos positivos para *S. schenckii* ó *L. mexicana* pueden causar en el animal lesiones similares, especialmente al inicio de la infección (datos no publicados).

Este estudio muestra una comparación macroscópica entre las lesiones producidas experimentalmente con el *S. schenckii* y la *L. mexicana* en hamsters. La descripción macroscópica del proceso de patogénesis proporciona bases para discriminar entre las dos entidades en este modelo.

## MATERIALES Y METODOS

### Organismos

La cepa de *S. schenckii* (M. 83/85) utilizada se aisló de un paciente a quien se le confirmó el diagnóstico de la esporotricosis en el laboratorio de Micología del Hospital Universitario del Valle (HUV). La cepa de *L. mexicana* spp (1-117) utilizada se obtuvo de las cepas de referencia del CIDEIM y fué aislada de un paciente con leishmaniasis cutánea con historia de residencia en Barquisimeto, Lara, Venezuela.

### Cultivos y preparación de inoculos

El *S. schenckii* se cultivó en BHI Agar (Difco Laboratories)<sup>6</sup> a 37°C y se hicieron subcultivos cada siete días para mantenerlo en fase de levadura. Para el inóculo de *S. schenckii* se resuspendieron las levaduras de los cultivos con buffer salino (PBS) estéril PH 7.4, se filtró con gasa estéril para retirar posibles restos de micelio, se centrifugó a 1500 G y resuspendió en PBS, hasta obtener la concentración requerida. Las blastoconidias se cuantificaron en un hemacitómetro contando los 9 cuadros de la cámara. La dosis del inóculo fué de 2.500 blastoconidias viables del hongo, en 0,05 cc de PBS, previa titulación de éste para lograr la infección localizada en tejido subcutáneo<sup>2</sup>. La viabilidad se determinó por el porcentaje de blastoconidias lisadas de *S. schenckii*, se utilizó una solución de naranja de Acredina con concentración final de 1.44 mg/ml en dilución 1:10. Se mezclaron partes iguales de la Naranja de Acredina y de la suspensión de blastoconidas del hongo. En un portaobjetos se observó de inmediato al microscopio de fluorescencia (Leitz Cat. No. M1935). Se realizaron los recuentos para levaduras no viables y se hizo la corrección respectiva al inóculo.

La *Leishmania* se cultivó en medio difásico de Senekjic<sup>8, 9</sup> a 25°C por 4 a 5 días para obtener las promastigotas del parásito. Para el inóculo se lavaron las promastigotas de los cultivos en PBS, se centrifugaron a 1.400 G y resuspendieron de nuevo en PBS hasta obtener la concentración requerida. El recuento de promastigotas móviles se hizo en hemacitómetro, contando los 9 cuadros de la cámara. La dosis del inóculo fué de  $2 \times 10^6$  promastigotas en 0.1 ml de PBS<sup>9</sup>.

### Infección experimental

Un total de 50 hamsters dorados (*Mesocricetus auratus*) machos de 50 a 60 gr. de peso y 6 semanas aproximadas de edad, fueron inoculados subcutáneamente en la nariz con jeringas hipodérmicas. En la misma fecha 30 hamsters recibieron la dosis de *S. schenckii* y 20 la de *L. mexicana*. Se sacrificaron grupos de 4 y 3 animales a los 7, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 días post-inoculación. Las revisiones se iniciaron a los siete días post-inóculo observándolos tres veces por semana durante el primer mes y una vez por semana hasta la fecha del sacrificio, para determinar el tiempo de aparición de los signos clínicos.

La infección localizada se confirmó a partir de triturado de biopsia de la nariz al sacrificio de los hamsters y en cada caso, por aislamiento de los agentes causales en cultivo (BHI Agar a 37°C, ó medio de Senecca a 25°C) y por su visualización en los exámenes directos respectivos (P. S.A. ó Giemsa). Se cultivaron también triturados de hígado y bazo para descartar una diseminación a vísceras y de nódulos para confirmar metástasis.

### RESULTADOS

Las características clínicas que se observaron en los hamsters con la esporotricosis ó la

leishmaniasis se muestran en el cuadro I. A excepción de la secreción purulenta ausente en los animales con la leishmaniasis, se observaron los mismos signos en los dos grupos de enfermedad.

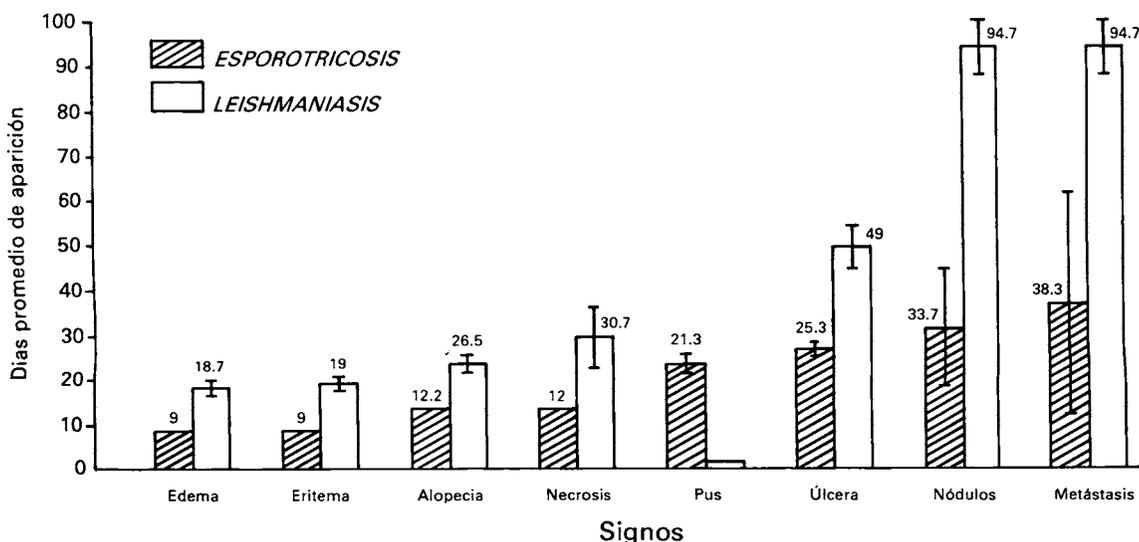
En la esporotricosis los primeros signos fueron edema y eritema presentes a los nueve días en la totalidad de los animales (Gráfica 1). La aparición de necrosis a los doce días en el 100% de los hamsters evolucionó a ulceración (Fig. 1). A pesar de la titulación previa del inóculo de *S. schenckii* para lograr una infección localizada, siete hamsters presentaron nódulos en las patas confirmándose metástasis en 3 de ellos.

CUADRO 1

Número de hamsters y porcentaje positivo para cada signo clínico

Signos	Esporotricosis		Leishmaniasis	
	No.	%	No.	%
Edema	26	100.0	13	100.0
Eritema	26	100.0	13	100.0
Alopecia	26	100.0	13	100.0
Necrosis	26	100.0	12	58.3
Pus	22	100.0	12	0
Úlcera	22	100.0	9	33.3
Nodulos	26	26.9	5	80.0
Metastasis	22	13.6	5	80.0

No. = Numero total de hamsters



Gráfica 1 — Significancia estadística de los signos clínicos en la Esporotricosis y la Leishmaniasis ( $\bar{X} \pm 2 ee$  en días)



Fig. 1 — Hamster mostrando úlcera de 5 mm de diámetro en la nariz a los 25 días post-inoculación de *S. schenckii*.

El *S. schenckii* fué aislado en cultivo a partir del triturado de los nódulos. Las lesiones nodulares en animales con cultivo negativo, se atribuyeron a traumatismo por el cautiverio. En la leishmaniasis experimental los primeros signos clínicos fueron edema y eritema a los 18.7 y 19 días promedio respectivamente (Gráfica 1). Aunque se observaron zonas de exfacelación ó necrosis en el 58.3% de los animales (Cuadro 1), sólo el 33.3% de ellos presentaron ulceración. Cuatro hamsters mostraron nódulos en patas y orejas, los cuales correspondieron a metástasis confirmadas por cultivo (Fig 2).

La Gráfica 1 muestra la diferencia en días promedio para la aparición de cada signo clínico con sus respectivos límites de confiabilidad del 95% para los dos grupos experimentales.

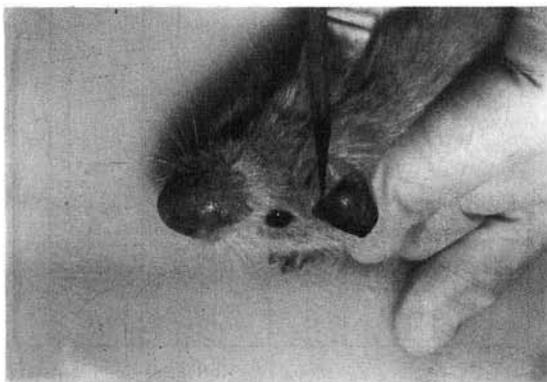


Fig. 2 — Hamster mostrando metástasis en oreja y edema marcado en la nariz a los 100 días post-inoculación de *L. mexicana ssp.*

Los resultados al sacrificio de los hamsters se indican en el Cuadro 2. Los animales con la esporotricosis se sacrificaron en grupos de 4 en las fechas establecidas. En el primer grupo, negativo a la revisión macroscópica, los exámenes directos de triturados de biopsia de la nariz coloreados con el Acido Periódico de Shiff (PAS) fueron todos positivos. En todos los casos se aisló el *S. schenckii* en cultivo, al igual que en resto de los animales. Los cultivos de triturado de bazo e hígado fueron todos negativos.

Los animales con la leishmaniasis se sacrificaron en grupos de 3 en las fechas establecidas. En el primer grupo negativo a la revisión macroscópica lo fué también en los exámenes directos y cultivos. El segundo grupo sacrificado a los 15 días, aunque no presentó signos clínicos, fué positivo al examen directo de impresiones de la biopsia de nariz, coloreado con Giemsa. Se observaron las amastigotas del parásito y se obtuvo crecimiento de la *Leishmania* en forma similar al resto de los hamsters. Los cultivos de triturado de bazo e hígado fueron negativos en todos los casos.

## DISCUSION

La revisión bibliográfica tanto colombiana como extranjera, permite concluir que no se ha realizado una comparación macroscópica del desarrollo clínico de las lesiones producidas por los agentes causales de la esporotricosis y la leishmaniasis en hamsters inoculados experimentalmente.

CUADRO 2

Resultados de los exámenes directos y cultivos al sacrificio de los hamsters

Días Sacrificio	Esporotricosis		Leishmaniasis	
	P.S.A.	Cultivos	Giemsa	Cultivos
7	+	+	-	-
15	+	+	+	+
30	+	+	+	+
45	+	+	+	+
60	+	+	+	+
90	+	+	+	+
120	+	+	+	+
150	+	+	+	+

La cinética de la patogénesis en los dos grupos experimentales en este estudio, mostró diferencias estadísticas significantes en días promedio de aparición de los distintos signos clínicos. En la esporotricosis el período pre-patente fué más corto (9 días) que en la leishmaniasis (18.7 y 19 días) y se determinó mediante la observación de los primeros signos de edema y/o eritema para ambas enfermedades. El edema en los hamsters con la esporotricosis fué leve ó moderado durante todo el período de la observación. Estos resultados están de acuerdo con trabajos publicados sobre la patogénesis de la esporotricosis con estos animales, a pesar de haberse utilizado en este caso una dosis de inóculo inferior a la que cita la literatura para lograr una infección localizada en los hamsters<sup>2, 5</sup>.

En la leishmaniasis el edema fué de moderada intensidad a la aparición y muy marcado a medida que evolucionó la enfermedad. La secuencia y tiempo de aparición de estos signos clínicos en este modelo experimental, coinciden con trabajos ya publicados sobre la patogénesis de *L. mexicana* en hamsters<sup>7, 10, 11</sup>. La observación del edema al inicio de la leishmaniasis podría prestarse a confusión con la esporotricosis si no se tiene presente el tiempo de aparición de este signo.

En la esporotricosis la alopecia presente a los 12.2 días en la totalidad de los animales fué parcial durante todo el período de observación, mientras que en la leishmaniasis se presentó a los 26.5 días promedio, siendo marcada al aumentar el edema.

En este estudio para esporotricosis se observó formación de necrosis con secreción purulenta previa a la formación de la úlcera en el 100% de los animales. Estos resultados son similares a estudios publicados sobre la patogénesis de esta enfermedad en hamsters<sup>2, 5</sup>. La necrosis y ulceración se presentaron en la esporotricosis en un período de tiempo más corto que en la leishmaniasis. En la leishmaniasis se presentó también, necrosis, aunque en menor porcentaje y sin secreción purulenta y la ulceración se desarrolló sólo en el 33.3% de los animales durante el período de observación en este grupo experimental.

En la esporotricosis la dosis de inóculo para lograr infección localizada en hamsters según es-

tudios ya realizados fué de  $5.3 \times 10^3$  levaduras del hongo<sup>2</sup>. En este estudio, fué necesario estandarizar el inóculo y se eligió  $2.5 \times 10^3$  blastoconidias de *S. schenckii*, ya que dosis mayores produjeron la enfermedad diseminada. A pesar de dosificar el inóculo, 3 hamsters (13.6%) presentaron nódulos en patas que correspondieron a metástasis al aislar el hongo en cultivo de tejido de los nódulos. Sin embargo, los cultivos de macerados de hígado y bazo fueron negativos, descartando la diseminación a estas vísceras.

Debido a la gran susceptibilidad del hamster al *S. schenckii* es posible encontrar que estos animales desarrollen lesiones a distancia del sitio del inóculo (metástasis), cuando son inoculados subcutáneamente con un número moderado de blastoconidias viables del hongo<sup>2, 5</sup>.

En la leishmaniasis la metástasis se presentó con nódulos no sólo en las patas como se observó en la esporotricosis, sino también en las orejas. Sin embargo, los cultivos negativos de macerados de hígado y bazo descartaron la visceralización de la enfermedad. Estas observaciones son similares a las publicadas en otros trabajos, donde se muestra la patogénesis de las distintas especies de *Leishmania*<sup>9, 10, 11</sup>.

Este estudio muestra que las dos entidades comparten gran número de características de presentación clínica, en este modelo experimental, pero el tiempo de aparición de los signos post-inóculo y su frecuencia relativa permiten diferenciarlas. La producción de pus es una característica distintiva para el *S. schenckii*.

Es importante considerar además de la dosis del inóculo, la cepa del hongo o parásito utilizadas, el sitio y la vía de inoculación, los cuales podrían modificar el comportamiento de los microorganismos en el modelo experimental<sup>2, 5, 10, 11</sup>.

## SUMMARY

### Experimental behavior of *Sporothrix schenckii* and *Leishmania mexicana* in hamsters

The macroscopic description of the pathogenic process of *Sporothrix schenckii* and *Leishmania mexicana* spp in hamsters inocula-

ted subcutaneously in the nose provided bases for the differentiation of the behavior of these two microorganisms in a model frequently utilized for their study. Sequential observations over 150 days demonstrated that infections caused by these pathogens results initially in edema and erythema followed by loss of hair, necrosis and ulceration. The pus production was a characteristic presented only by *S. schenckii*. These clinical signs were observed earlier in sporotrichosis than in *L. mexicana* infection. Differences in the mean day of appearance were statistically significant.

The lesions produced by *S. schenckii* and *L. mexicana* in this experimental model share clinical signs, but their incubated period and relative frequency allow us to differentiate them. The circumstances of inoculation such as strain, dose of inoculum, place and route of inoculation are related to the experimental behavior of them.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos al CIDEIM por la asesoría y asistencia técnica prestada en el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Angela Restrepo Moreno del CIB, Medellín, Colombia, por sus valiosas críticas y sugerencias a éste trabajo.

Al ICFES (Instituto Colombiano para la Educación Superior) y la Universidad del Valle quienes mediante la donación #1086 financiaron esta investigación.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BEAVER, P. C.; JUNG, R. C. & CUPP, E. W. — *Parasitología clínica* 2da. ed. Barcelona (España), Salvat Ed., 1986. p. 65-88.
2. CHAROENVIT, Y. & TAYLOR, R. L. — Experimental sporotrichosis in Syrian hamsters. *Infect. Immun.*, 23: 366-372, 1979.
3. LAINSON, R. & SHAW, J. J. — The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. In: LUMSDEN, W. H. R. & EVANS, D. A., ed. *Biology of the kinetoplastida*. New York, Academic Press, 1979. v. 2, p. 1-116.
4. LAVALLE, P. — Esporotricosis. Desarrollo y estado actual de la Micología Médica en México. Simposio Syntex. México, 1980. p. 115-138.
5. MARIAT, F. & DROUCHET, E. — Sporotrichose experimentale due hamster: observation de formes esteroides de *Sporothrix*. *Ann. Inst. Pasteur*, 84: 485-492, 1954.
6. RIPPON, J. W. — *Medical mycology*, 2nd. ed. Philadelphia, Saunders, 1982. p. 277-302.
7. SEHGL, S. & ARORA, S. K. — Role of immunosuppression in *Leishmania mexicana* induced lesions in hamsters. *Indian J. med. Res.*, 82: 202-206, 1985.
8. WALTON, B. C.; SHAW, J. J. & LAINSON, R. — Observations on the "in vitro" cultivation of *Leishmania braziliensis*. *J. Parasit.*, 63: 1118-1119, 1977.
9. WERNER, J. K. — Colombian strains of *Leishmania* from man: growth characteristics in culture media and hamsters. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 75: 619-622, 1981.
10. WILSON, H. R.; DIECHMANN, B. S. & CHIEDS, G. E. — *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana* experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Exp. Parasit.*, 47: 270-283, 1979.
11. ZELEDÓN, R.; SOTO, R. & GONZÁLEZ, G. — Experimental superimposed infection of the hamsters with *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis*. *Acta trop. (Basel)*, 39: 367-372, 1982.

Recebido para publicação em 10/11/1989.