

DIFFERENTIATION OF LEISHMANIA TROPICA MAJOR FROM LEISHMANIA TROPICA MINOR BY INOCULATION TO LABORATORY ANIMALS*

A. Nadim**

Gh. Tahviidar - Bidruni**

M. Farshian***

A. A. Heydari - Mohammad abadi***

ABSTRACT The subcutaneous inoculation of 16 white mice and 10 golden hamsters with *L. tropica major* resulted in the development of leishmanial lesions in all, becoming generalized in some.

Two of 10 hamsters inoculated intraperitoneally with this parasite developed generalized lesions. On the other hand, the inoculation of *L. tropica minor* to 128 mice subcutaneously and 170 mice intraperitoneally did not cause any leishmanial lesions, while 22 out of 47 hamsters inoculated with this parasite showed lesions at the site of inoculation.

INTRODUCTION Two types of cutaneous leishmaniasis are known to occur in the Old World: the urban type caused by *L. tropica minor* and the rural type caused by *L. tropica major*. There are several differences in the clinical course and morphology of the parasites of the two types (5,8), but these differences are not always reliable.

* This study was supported in part by the funds of the School of Public Health and Institute of Public Health Research, University Teheran, and partly by the Public Health Research Project of the Ministry of Health and Plan Organization.

** Department of Epidemiology and Pathobiology, School of Public Health and Institute of Public Health Research, University of Teheran, P.O. Box 1310, Teheran, Iran.

*** Student at the School of Pharmacy, University of Teheran (at the time these studies were being carried out).

Animal inoculation is a mean of differentiation of haemoflagellates, especially trypanosomes which are morphologically similar. Therefore, we decided to use this method to test the pathogenicity of parasites of known type for laboratory mouse and golden hamster in order to determine the possible differences in this regard between *L. tropica major* and *L. tropica minor*. The present paper presents the result of these studies.

MATERIALS AND METHODS

Considering the fact that in culture medium the parasite loses its pathogenicity to a great extent, we decided to use only leishmanial forms prepared by scraping of the lesions for inoculation.

The strain of *L. tropica major* was originally isolated from the ear lesion of a *Rhombomys* in the Isfahan area and kept thereafter on laboratory mice at the laboratory of the Isfahan Research Station. The inoculum contained about 0.15×10^6 amastigotes, as described by Edrissian *et al.*(2)

L. tropica minor was inoculated by obtaining scrapings from patients in the city of Teheran. In order to inoculate new series, we used different patients, as it was not possible to ask the same patient to come to the laboratory each time. Altogether, scraping materials of 7 patients were used in these studies, all of them showing large numbers of parasites in stained slides of the scrapings. The inoculum in this case contained a higher number of amastigotes as compared with *L. tropica major*. Mice and golden hamsters were provided by the Dezful Research Station and the Razi Institute. Both subcutaneous (tip of the nose, base of the tail) and intraperitoneal routes of inoculation were used to infect these animals.

RESULTS *Experiment 1: Pathogenicity of L. tropica major*

Sixteen laboratory mice were inoculated subcutaneously with material containing the parasites. Thirty to 40 days later, all of them developed sores at the site of inoculation. The sores contained a large number of parasites and their cultures were also positive for leptomonads. Generalization of the parasite was noticed in most of the infected mice which survived more than 4 months after inoculation, and L.D. bodies were found in smears taken from spleen, liver, lymph nodes and other organs.

Twenty hamsters were also inoculated with this parasite, 10 subcutaneously and 10 intraperitoneally. All hamsters with subcutaneous inoculation developed local lesions within 2 months, but generalization did not occur, possibly because they were sacrificed too early to show generalized lesions.

In the case of intraperitoneal inoculation, 4 out of 10 hamsters died before 3 months and the remaining hamsters were autopsied at intervals of 10-15 days. In one hamster we saw L.D. bodies in the enlarged lymph nodes of the abdomen and in another one, complete generalization occurred with parasites found in all the viscerae. In the same animal, a large sore was seen in the scrotal region containing a very large number of parasites.

This experiment indicates that *L. tropica major* is pathogenic for both laboratory mouse and golden hamster, and sometimes leads to generalization.

Experiment II : Pathogenicity of L. tropica minor

One hundred twenty-eight mice, 55 of which were only 2 weeks old, were inoculated subcutaneously with material from the sores of patients. The autopsy of more than 50% of these mice which died before 4 months after inoculation, as well as examination of the survivals, did not reveal the slightest sign of infection.

Direct examination and culture from the inoculation site were always negative even 6 months after inoculation. We also inoculated 170 mice intraperitoneally with this parasite, but none of them developed infection.

Of 47 hamsters inoculated subcutaneously with the same materials, 22 developed lesions at the inoculation site (tip of the nose) containing parasites both in direct examination and in culture.

Contrary to the sores of *L. tropica major*, the lesions here were small and superficial. The morphologies of these two types of the parasite show the same differences in hamsters as those reported by Nadim and Faghigh⁽⁸⁾ in human infection. We never noticed generalization of the infection.

This experiment indicates that *L. tropica minor* is pathogenic for golden hamster but not for laboratory mouse.

DISCUSSION

There is some controversy in the reports concerning the pathogenicity of *L. tropica* for laboratory mouse. Ansari⁽¹⁾ and Mofidi⁽⁷⁾ from Iran and Gonder⁽³⁾ and Phillipp and Chadli⁽⁹⁾ from North Africa have reported high pathogenicity sometimes leading to generalization. On the other hand, some other authors such as Wenyon⁽¹⁰⁾ and Laveran⁽⁵⁾ (working with a strain from New Delhi) have failed to produce lesions in this animal.

Our experiments show the differences between *L. tropica major* and *L. tropica minor* in this regard and explain the controversies in this way; that those who got positive results were working with *L. tropica major* and those who got negative results

were experimenting with *L. tropica minor*.

The obvious differences observed between the pathogenicity of the two types of the parasite among mice and hamsters can be used as a method to differentiate between *L. tropica minor* and *L. tropica major*.

Therefore, if a patient comes from an area where the type of leishmania is not determined and/or clinical manifestations are not characteristic, in order to distinguish the type of parasite involved we can inoculate leishmanial forms from the patient's sores to white mice and hamsters.

The high pathogenicity of parasites from North Africa for laboratory mice indicates that *L. tropica major* exists in this area. As there is no report of the presence of *Rhombomys* in this part of the world, we must accept that *L. tropica major* is not strictly a natural parasite of *Rhombomys* but may have other animals as reservoir. The report of Gunders *et al.*(4) of the infection of *Psammomys obesus* and a *Meriones* spp. in Israel supports this hypothesis. Further investigations are needed in North Africa to determine the main reservoir of the infection.

1. Ansari N. (1947). Bull. Soc. Path. Exot. 40 :82-86.
2. Edrissian, G.H., Nadim A., Sanati, A. and Afshar, A. (1971) Parassitologia 13 :311-413.
3. Gonder A. (1913). Arch. F. Schiff. V. Trop. Hyg. 17:1968.
4. Gunders A.E., Foner, A. and Montilio, B. (1968). Nature 219:85-86.
5. Kozevnikov, P.V. (1963). Am. J. Trop. Med. Hyg. 11:719.
6. Laveran, A. (1917) Leishmaniose cutanée. Edit. Paris.
7. Mofidi, Ch.M.H. (1945). Thesis, University of Teheran, School of Medicine.
8. Nadim, A. and Faghigh, M.A. (1968). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 62:536-542.
9. Philipp, E. and Chadli, A. (1961). Arch. Inst. Pasteur, Tunis.
10. Wenyon, C.M. (1913). J. Lond. Sch. Trop. Med.

ANEMIE ET HYPOCHOLESTEROLEMIE L'ETUDE DE 120 SUJETS ANEMIQVES

Mohsen Nafici*

Seyed Nasrolah Sayar**

RESUME

L'étude de la cholestérolémie chez 100 sujets anémiques et 30 sujets bien portants démontre dans la plupart des cas des anémies une hypocholestérolémie. Aussi il existe une diminution du cholestérol sanguin chez les 20 sujets présentant un syndrome néphrotique plus l'anémie par rapport de 20 sujets présentant un syndrome néphrotique isolé.

INTRODUCTION

Dans l'article que Refkind publia sur l'anémie et la diminution du cholestérol rappelait que Erben signala pour la première fois en 1902 l'hypocholestérolémie chez les chlorotiques (9); les autres travaux démontrent la diminution du cholestérol et les phospholipides sanguins, dans l'anémie à étiologie différente. En 1931 Peters and Van Slyke ont déclaré l'augmentation des lipides neutres et les acides gras avec diminution du cholestérol et des phospholipides dans l'anémie (9).

Une étude faite sur 50 sujets anémiques de l'origine variée démontre la diminution du cholestérol, des phospholipides et des triglycérides sanguins en comparaison avec les sujets non anémiques de la même âge (5). En Nigeria on n'a pas trouvé la relation entre l'anémie et l'hypocholestérolémie (10). Chez les femmes âgées de moins de 50 ans une relation existe entre le taux du cholestérol sanguin et l'ischémie de myocarde, ce qui veut dire que les cas de l'ischémie de myocarde sont plus fréquents chez les femmes dont le taux de cholestérol a augmenté (8). En effet, l'anémie peut être la cause de la diminution du cholestérol sanguin et par conséquent diminuer les cas de l'ischémie de myocarde (4).

* Département de médecine, centre Medical pahlavi.

** Laboratoire, Centre Médical pahlavi .

Etant donné qu'en Iran le régime alimentaire était différent avec celui des pays où ces expériences ont été faites, nous avons étudié le taux du cholestérol sanguin chez 170 sujets dont 120 anémiques et les autres non-anémique alors que tous étaient dans les mêmes conditions sociales, et nous avons observé ce qui suit.

MATERIEL et METHODES

Nous avons choisi 120 malades dont le taux d'hémoglobine était inférieur à 10gr50%. Parmi nos sujets, 20 présentent un syndrome néphrotique plus l'anémie pour lesquels nous discutons séparément et le reste présente l'anémie d'étiologie variée.

Hémoglobine sanguine a été examinée selon le procédé cyanmethémoglobine. Le procédé de measurement du taux de cholestérol sanguin est basée sur la réaction Liebermann et se résume ainsi : prendre 2 tubes d'essai; introduire dans le premier 0.2 centimètre cube (cc) de sérum et dans le second 0.2 cc de solution étalon de cholestérol (1gr91/lit.); ajouter dans chaque tube 1 cc de solution composée d'acide sulfosalicylique et d'acide acétique; puis ajouter dans chaque tube 3 cc d'anhydride acétique l'agiter et laisser ensuite pendant dix minutes; ajouter encore dans chaque tube 0.4 cc d'acide sulfurique pure et agiter jusqu'à ce qu'une coloration verte soit obtenue, après colorimétrer au spectrophotomètre (filtre 680 mr).

RESULTATS

La cause de l'anémie chez les 100 sujets anémiques figure dans le tableau 1.

Tableau — 1

Pétiologie	nombre de malades
Ferriprives	65
Infectieux	11
Cirrhotiques	8
Cardiaques	5
Tumeurs	5
Hémolytiques	4
Amylose rénaux	2

Les groupes d'ages de sexe, ainsi que le taux d'hémoglobine et le taux de cholestérol sanguin figurent dans le tableau - 2.

Tableau _2

Groupés	Nombre		Groupés d'âge ans				Hémoglobine gr%				Cholestérol gr/lit.				
	Mas	Fem	Tot	≤15	16-20	21-40	41-60	Moy	±6	Min	Max	Moy	±6	Min	Max
Anémiques	38	62	100	1	22	52	25	6	2	2,50	10.5	1.40	0.34	0.85	2.22
Témoins	13	17	30	1	5	18	6	14.20	1.1	12	16	2.26	0.36	1.74	2.75

Tableau _3

Groupés	Nombre		Groupés d'âge ans				Hémoglobine gr%				Cholestérol gr/lit.			
	Mas	Fem	Tot	15-30	31-50	Moy	±6	Min	Max	Moy	±6	Min	Max	
Sy. Néphrotique plus Anémie	14	6	20	13	7	9	2	5.50	10.50	2.70	0.56	1.70	3.82	
néphro - tique isolé	13	7	20	15	5	13	1.16	11	15	3.77	1.58	2.90	7.12	

En outre 20 malades atteints de syndromes néphrotiques avec anémie et un groupe de témoins (syndrome néphrotique isolé) ont été examinés et les résultats obtenus figurent dans le tableau - 3.

La cholestérolémie chez les sujets anémiques et les groupes de témoins se répartit comme suit :

La cholestérolémie chez les 100 sujets anémiques,

28 cas	Ogr85 à 1gr20/lit.	(litre)	en moyenne	1gr06/lit.	$\pm 0.09\sigma$
28 " "	1gr21 " 1gr50/ " "	" " " "	" " " "	1gr40/ "	$\pm 0.15\sigma$
27 " "	1gr51 " 1gr80/ " "	" " " "	" " " "	1gr70/ "	$\pm 0.08\sigma$
12 " "	1gr81 " 2gr00/ " "	" " " "	" " " "	1gr90/ "	$\pm 0.06\sigma$
5 " "	2gr00 " 2gr22/ " "	" " " "	" " " "	2gr13/ "	$\pm 0.08\sigma$

Le taux moyen de cholestérol chez les 100 sujets anémiques est 1gr40 $\pm 0.34\sigma$.

La cholestérolémie chez les 30 sujets sains :

30 cas 1gr74 à 2gr75/lit. en moyenne 2gr26/lit. $\pm 0.36\sigma$.

La cholestérolémie chez les 20 sujets présentant un syndrome néphrotique plus l'anémie :

20 cas 1gr70 à 3gr82/lit. en moyenne 2gr70/lit. $\pm 0.56\sigma$.

La cholestérolémie chez les 20 sujets présentant un syndrome néphrotique isolé :

20 cas 2gr90 à 7gr12/lit. en moyenne 3gr77/lit. $\pm 1.58\sigma$.

DISCUSSION

Normalement les lipides totaux plasmatique sont de 4 à 8gr/lit., le cholestérol et les phospholipides en constituent 2/3 (3). à Téhéran le dosage de cholestérol sanguin chez 30 sujets sains est de 1gr74 à 2gr75/lit. en moyenne 2gr26 $\pm 0.366\sigma$.

La cholestérolémie est sensiblement diminuée chez les sujets anémiques contrairement à ce qui se passe chez les sujets sains (non-anémiques), appartenant à la même catégorie sociale.

L'étude de cholestérolémie chez 100 sujets anémiques démontre que dans 56% des cas, il existe une hypocholestérolémie nette, dans 27% une hypocholestérolémie plus ou moins nette et dans 17% elle reste normale. Le taux moyen de cholestérol sanguin chez les sujets anémiques est de 1gr40 $\pm 0.34\sigma$ contre 2gr26 $\pm 0.36\sigma$, chez les sujets bien portants, il est même plus bas que la limite inférieure normale qui est de 1gr74. La cholestérolémie est en moyenne 2gr70 $\pm 0.56\sigma$ chez les 20 malades présentant un syndrome néphrotique plus l'anémie, elle est nettement diminuée contre des 20 malades présentant un syndrome néphrotique isolé (3gr77 $\pm 1.58\sigma$). Il n'y a pas de rapport direct entre la gravité de l'anémie et l'hypocholestérolémie, chez les 120 sujets anémiques examinés.

Comment expliquer l'hypocholestérolémie chez l'anémique?

Certains pensent qu'à la suite de la diminution de volume

des globules rouges, le volume plasmatique augmente et le cholestérol se dilue davantage. Mais au cours du traitement de l'anémie, l'augmentation de l'hématocrite (hémoglobine) et le cholestérol n'est pas parallèle (2). Après splénectomie on a noté une augmentation de cholestérol et des phospholipides sanguins dans la sphérocytose héréditaire mais ils restent plus bas contre les sujets normaux (9).

Certains auteurs pensent que les sujets anémiques utilisent moins de matières grasses et qu'éventuellement la qualité et la quantité de la nourriture peuvent influencer le taux de cholestérol. L'étude faite en Grande-Bretagne sur le régime alimentaire de deux groupes de 27 femmes, le premier composé de sujets sains et le second de sujets anémiques, a démontré que ces derniers utilisent même une plus grande quantité de matières grasses (2).

Il y a lieu de rappeler que les études plus complètes entreprises en Finlande montrent l'importance du régime alimentaire à taux bas du cholestérol dans la diminution de l'ischémie de myocarde (7).

Les études faites par Bottiger et Carlson en 1972 à Stockholm montrèrent que chez les sujets non anémiques il existait une relation directe entre le taux de cholestérol, triglycérine et d'hémoglobine ainsi que l'ischémie de myocarde c'est-à-dire l'augmentation du taux d'hémoglobine sanguine était considérée comme un facteur efficace en ce qui concernait l'étiologie de l'ischémie de myocarde (1). De nombreuses études ont également montré que l'augmentation du taux de cholestérol sanguin était considéré comme un facteur efficace dans l'apparition de l'ischémie de myocarde (6).

Etant donné que dans les pays en voie de développement l'anémie est fréquente alors que l'ischémie de myocarde rest rare, peut-on se demander s'il y a une relation entre ces deux phénomènes (8)?

Enfin en Iran bien que le régime alimentaire soit différent des pays où cette étude est faite, les résultats sont comparable; ce qui veut dire que le taux du cholestérol diminue chez les anémiques. Il est intéressant de noter que chez les sujets présentant un syndrome néphrotique et qui sont en même temps anémiques, la diminution du taux de cholestérol a été observée.

N.B. — Les auteurs remercient vivement M. le Dr. H. Khorsandi chef de la division de biochimie du Laboratoire ainsi que Mme. L. Amiriak et Melle Fatemie chargée de l'examen de cholestérol sanguin pour leur sincère collaboration.

- serum cholesterol and triglyceride concentration and haemoglobin values in non-anaemic healthy persons; B.M.J. 23 Sept., 731.
- 2) Elwood P.C., et al (1970). Association between circulating haemoglobin level, serum cholesterol, and blood pressure. *The Lancet*, 21 March, 589 (590).
 - 3) Fredrickson D.S., et al (1967). Fat transport in lipoproteins an integrated approach to mechanisms and disorders. *New Eng. J. Med.* 276 :34 (35).
 - 4) Hashemi J.A., Afroz N. (1970). Hypocholesterolaemia in anaemia. *The Lancet* 5Sc 2:530.
 - 5) Hashemi J.A., Afroz N. (1969). Hypolipidemia in anaemia, *Am. Heart J.* 78 :840.
 - 6) Kannel W.B., Castelli W.P. et al (1971). Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease, *Annals Int. Med.* 74 :1, 1-12.
 - 7) Miettinen M., Turpeinen, et al (1972). Effect of cholesterol-lowering diet on mortality from coronary heart-disease and other causes. *The Lancet* 21 Oct., 835.
 - 8) Rifkind B.M. and Gale M. (1967). Hypolipidaemia in anaemia. *The Lancet*, 23 Sept., 640 (642).
 - 9) Rifkind B.M. and Gale M. (1968). Hypolipidaemia in anaemia, *Am. Heart J.* 76 :849.
 - 10) Taylor G.O. (1970). Haemoglobin and cholesterol. *The Lancet*, 19 Sept., 2:617.