



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala

BUSQUEDA DE INFECCION NATURAL CON Mycobacterium leprae
EN ARMADILLOS SILVESTRES Dasyus novemcinctus

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G A

p r e s e n t a

ELVIRA MAYEN PIMENTEL

México, D. F.

Abril 1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se desarrolló en el Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas, ISET, DGE, SSA. Bajo la dirección de la Q.B.P. Ma. Eugenia Amezcua de Bernés.

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Alejandro Escobar G. por su valiosa asesoría.

La investigación contó con la colaboración de la Dra. Eleonor E. Storrs. del Medical Research Institute del Florida Institute of Technology, Melbourne, Florida.

A MIS PADRES Y HERMANOS

Con cariño.

A MIS MAESTROS Y AMIGOS.

I N D I C E

	PAG.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
MATERIAL Y METODOS	18
RESULTADOS	24
DISCUSION	31
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFIA	38

R E S U M E N

Se estudiaron 100 armadillos, 36 capturados en el Municipio de Santa Ana Jilotzingo, Edo. de México (área no endémica)- y 64 en Escuinapa, Sinaloa (área de alta endemicidad). Se tomaron muestras para búsqueda de BAAR en impronta de oreja, exudado nasal y se buscaron lesiones externas. Aquellos animales donde se encontraron BAAR fueron sacrificados y se les hizo la autopsia en donde se buscaron nódulos subcutáneos y se tomaron biopsias de ganglio linfático, hígado, bazo, nervios, pulmón, piel y lengua, se hicieron improntas, se tiñeron por el método de Ziehl-Neelsen y se determinó el índice bacteriológico por el método de Ridley.

Se obtuvieron suspensiones bacilares a partir de nódulos subcutáneos y ganglios linfáticos (axilar, inguinal y lateral)- por el método de Prabhakaran.

La identificación de las micobacterias se llevaron a cabo en el Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas y en el Medical Research Institute del Florida Institute of Technology. Melbourne, Florida.

Las pruebas utilizadas para este propósito fueron:

1. Inoculación de las suspensiones bacilar en medios de cultivo Lowenstein-Jensen y Midlebrok 7H10.
2. Extracción de la ácido alcohol resistencia con piridina por-

el método propuesto por Convit.

3. Inoculación en cojinete plantar de ratón por el método de -- Shepard.

En 2 animales de área no endémica se encontraron micobacterias ácido alcohol-resistentes, las pruebas de identificación demostraron que en uno de ellos era M.leprae, mientras que en el otro está por confirmarse si se trata de esta especie o de alguna otra.

En los 64 animales provenientes de el Estado de Sinaloa, solo en uno se aislaron micobacterias que resultaron ser cultivables y hasta ahora no se ha encontrado infección con M.leprae en armadillos de ésta área.

I N T R O D U C C I O N

La lepra es una enfermedad infecciosa, crónica causada por Mycobacterium lepras, que afecta principalmente piel, nervios - periféricos, mucosas y vías respiratorias superiores. De las enfermedades transmisibles es una de las menos contagiosa: su período de incubación varía desde algunos meses hasta años (26).- La enfermedad presenta una variedad de formas clínicas que se han clasificado a lo largo de un espectro (35,59) y que van desde la forma tuberculoide con lesiones localizadas definidas y bien circunscritas, con una inmunidad celular adecuada que limita la proliferación bacilar, hasta la forma lepromatosa en donde está ausente la inmunidad celular específica, lo que favorece la amplia diseminación de bacilos y la aparición de la enfermedad progresiva, generalizada y grave con lesiones externas, difusas y mal definidas.

Puesto que la lepra es una enfermedad que ha recibido gran atención por parte de investigadores de muy diversas disciplinas, ha permitido tener un mejor conocimiento en cuanto a la relación huésped parásito.

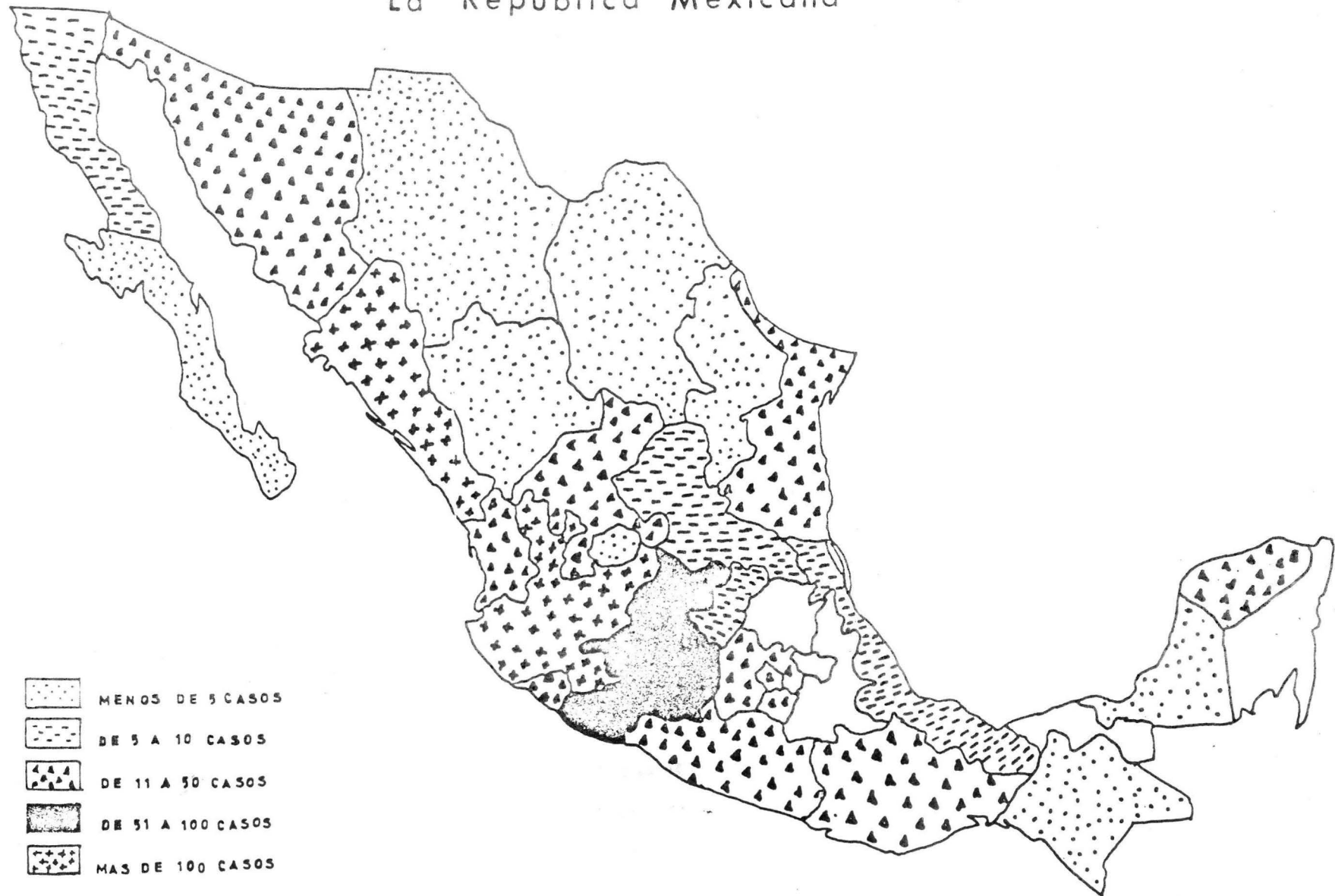
Ridley y Jopling (61,62) propusieron la clasificación en la que se considera que la relación huésped-M. leprae se manifiesta longitudinalmente a lo largo de un espectro en donde se considera que entre el polo lepromatoso (LL) y el polo tubercu-

loide (TT), están grupos intermedios que se han fijado convencionalmente de acuerdo a sus características y que son: límitrofe lepromatosa (BL), el límitrofe (BB) y el límitrofe tuberculoso (BT). Posteriormente se dividió a los lepromatosos en sus formas polares (LLp) y subpolar (LLs). Este último, intermedio entre los LB y los LLp. En esta clasificación no se consideran los casos intermedios (I) que presentan manchas mal delimitadas, hipocrómicas y anestésicas y no siendo posible ubicarlos en ningún sitio del espectro, sólo con el tiempo se definirán.

La enfermedad está mundialmente distribuída principalmente en las regiones tropicales y subtropicales, por lo que se considera un problema de Salud Pública mundial. Ya que afecta aproximadamente 20 millones de individuos, existe en casi todo Asia.- En la India, en el Sur de China, en el centro de Africa, en algunas islas del Pacífico, Europa y en América desde el sur de Estados Unidos hasta América del sur (7,26).

En México la lepra se encuentra ampliamente distribuída (Fig. No. 1) y según los datos de 1980 y 1984 reportan el número de casos nuevos que se registraron, encontrándose que el Estado de Sinaloa sigue sufriendo el problema de la lepra con mayor magnitud, le sigue en importancia, Colima, Nayarit, Jalisco, Guanajuato, Michoacán, Sonora y así sucesivamente las demás entidades en las que el problema tiene poca importancia (5,6).

Distribución de la Lepra en La República Mexicana



Tomado de: Boletín Epidemiología, S.S.A., 1981, No.13
Fig. No.1

M. leprae, descrito por Armauer Hansen en 1874 (24), es un bacilo recto o ligeramente curvo, con extremos generalmente redondos, mide de 0.3-0.5 X 1.0-8.0 micras. Es un parásito intracelular obligado, no forma esporas, es Gram (+), ácido alcohol-resistente y en ocasiones muestra gránulos de naturaleza desconocida. Taxonómicamente pertenece al orden de los Actinomicetales, familia Mycobacteriaceae y al género Mycobacterium. debido a sus características antigénicas, y a la presencia de ácidos micólicos en su pared celular. Biológicamente se encuentra más relacionado al grupo de micobacterias de crecimiento rápido que a las de crecimiento lento. El tiempo de generación es de 10 a 20 días (57,73).

La transmisión de la lepra se efectúa por el contacto íntimo y prolongado del individuo susceptible con el caso infectante, es decir bacilífero. La susceptibilidad del huésped es de gran importancia para entender la epidemiología, la historia natural y la clasificación clínica de la lepra. Generalmente se presenta en todas las edades y principalmente en estratos socioeconómicos bajos.

El establecimiento de un estado infeccioso para M.leprae, depende de las características genéticas y del estado inmunológico del huésped más que de las propiedades patogénicas del bacilo.

Desde el punto de vista genético se ha tratado de encontrar si la susceptibilidad a la lepra está relacionada con genes del MHC. Por lo que respecta a los loci A,B y C existe mucha controversia y no se ha encontrado ninguna asociación, sin embargo si se ha encontrado alguna asociación de los antígenos HLA - DR2 con la lepra tuberculoide, pero ninguno con la lepra lepromatosa (63).

Se presenta con mayor frecuencia en niños y jóvenes y en el sexo masculino más que en el femenino. La incidencia de la lepra así como la variedad, varía de una región geográfica a otra.

Es difícil determinar la fuente de transmisión, se piensa que puede ser a través de piel, (51) vías respiratorias (18,49) o bien por la participación indirecta de vectores (30,45). Así diversos investigadores han reportado que en piel intacta de pacientes con lepra lepromatosa, se presenta un gran número de M. leprae (48,51): asimismo han indicado que la mayor carga bacteriana se presenta en los dedos. Es de gran importancia mencionar que un paciente lepromatoso con lesiones ulcerantes libera al medio ambiente en forma constante más de 20 millones de bacilos -- (66). También se ha considerado que sea por vía respiratoria -- (18,49) ya que en un estornudo se liberan alrededor de 2.8×10^8 bacilos (18). Otra posibilidad de infección pero de forma indi--

recta sería la llevada a cabo a través de vectores como ha sido propuesto por Rees (58,59) y Narayanan (45) dado que, experimentalmente, encontraron que cuando un mosquito pica a un paciente con lepra lepromatosa, el germen permanece viable hasta por 48-horas en el vector (46).

Kazda y col., (29) realizaron un estudio en vegetación musgosa en 6 regiones del área costera de Noruega, que fue una zona endémica en el pasado. Los resultados obtenidos, mostraron la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes no cultivables en dichos vegetales, por tanto es muy probable que la bacteria aislada sea M.leprae.

Durante mucho tiempo los estudios sobre M.leprae en cuanto a su comportamiento, patogenicidad y la relación huésped-parásito se vieron muy limitados por la imposibilidad de cultivarlo en medios sintéticos.

Por esta razón en 1956 Binford (3) empezó a buscar un animal de experimentación el cual pudiera proporcionar un buen abasto de bacilos. Dado que M.leprae tiene preferencia por las zonas frías, inoculó con este bacilo, las patas y orejas de ratones, obteniendo cierta multiplicación en el sitio de la inoculación. Con estos hallazgos, se inició la búsqueda de un modelo experimental que permitiera no sólo la obtención de bacilos sino el poder llevar a cabo estudios a largo plazo que permitie--

ran un mejor conocimiento de la enfermedad.

Un avance importante para la investigación en lepra, fue - en 1960 cuando Shepard (67) logró la multiplicación relativamente abundante de M.leprae fuera del humano al inocular cojineteplantar de ratón. Sin embargo este crecimiento se limita y no - hay diseminación como la que se presenta en la lepra lepromatosa y no se prolonga más de 10 meses.

Sin embargo la utilización de este procedimiento no resultó adecuado como fuente de M.leprae, pero si de gran aplicación en otros aspectos importantes, como la determinación de viabilidad del bacilo, en el control de pacientes en tratamiento, evaluación de la efectividad de fármacos anti-leproso, determinación de cepas resistentes a los medicamentos, estudios sobre vacunas y como uno de los métodos utilizados para la identificación del bacilo.

En 1971, Storrs (75), Kirchheimer y Storrs (32) inocularon experimentalmente armadillos (Dasypus novemcinctus) con M.leprae obtenido a partir de nódulos humanos, logrando 17 meses después de la inoculación una infección generalizada, con todas las características histopatológicas, clínicas y bacteriológicas de -- una lepra lepromatosa (13, 31, 33).

La lepra en los armadillos es más severa que en el humano - debido a que los primeros son más susceptibles de modo que un --

gramo de tejido de armadillo infectado contiene de 100 a 1000 - veces más bacilos que lo que se podría obtener de 1g de tejido humano.

DESCRIPCION

Al igual que la mayoría de los mamíferos, los edentados se originaron en el Paleoceno y pertenecen a la misma serie filogenética (unguiculados) donde también se ubican los insectívoros, dermópteros, quirópteros, folidotos y primates (70,78). Probablemente el lugar de origen de los armadillos haya sido América del Norte a partir de los Paleonodontes y rápidamente se extendieron por el continente antes que hubiera la separación de los continentes. Su mayor florecimiento fue al final del Eoceno hace 40 millones de años, donde llegaron a existir 29 géneros, de los cuales 20 están extintos (74).

La familia Dasypodidae, comprende 20 especies y se encuentran distribuidos en 9 géneros: 3 especies en el género Chaetophractus, 1 en Euphractus, 1 en Zeadyus, 1 en Priodontes, 4 en Cabassous, 2 en Tolipeutes, 1 en Clamidophorus, 1 en Burmeisteria y 6 en Dasypus.

TAXONOMIA DEL ARMADILLO DE NUEVE BANDAS

Phyllum	Cordata
Subphyllum	Vertebrata
Clase	Mammalia
Suclase	Eutheria
Orden	Edentata
Suborden	Xenarthra
Superfamilia	Dasypodoidea
Familia	Dasypodidae
Subfamilia	Dasypodinae
Género	<u>Dasypus</u>
Especie	<u>novemcinctus</u> Linn: 1758

(39)

DISTRIBUCION

Actualmente se encuentra distribuído desde la parte noroccidental de Argentina y Uruguay, las islas de Trinidad Tobago y Granada, toda América Central, México, salvo en la parte nortedel altiplano central, Sonora y Baja California. En Estados Unidos se encuentra distribuído en Florida y la parte central sur- (39,81).

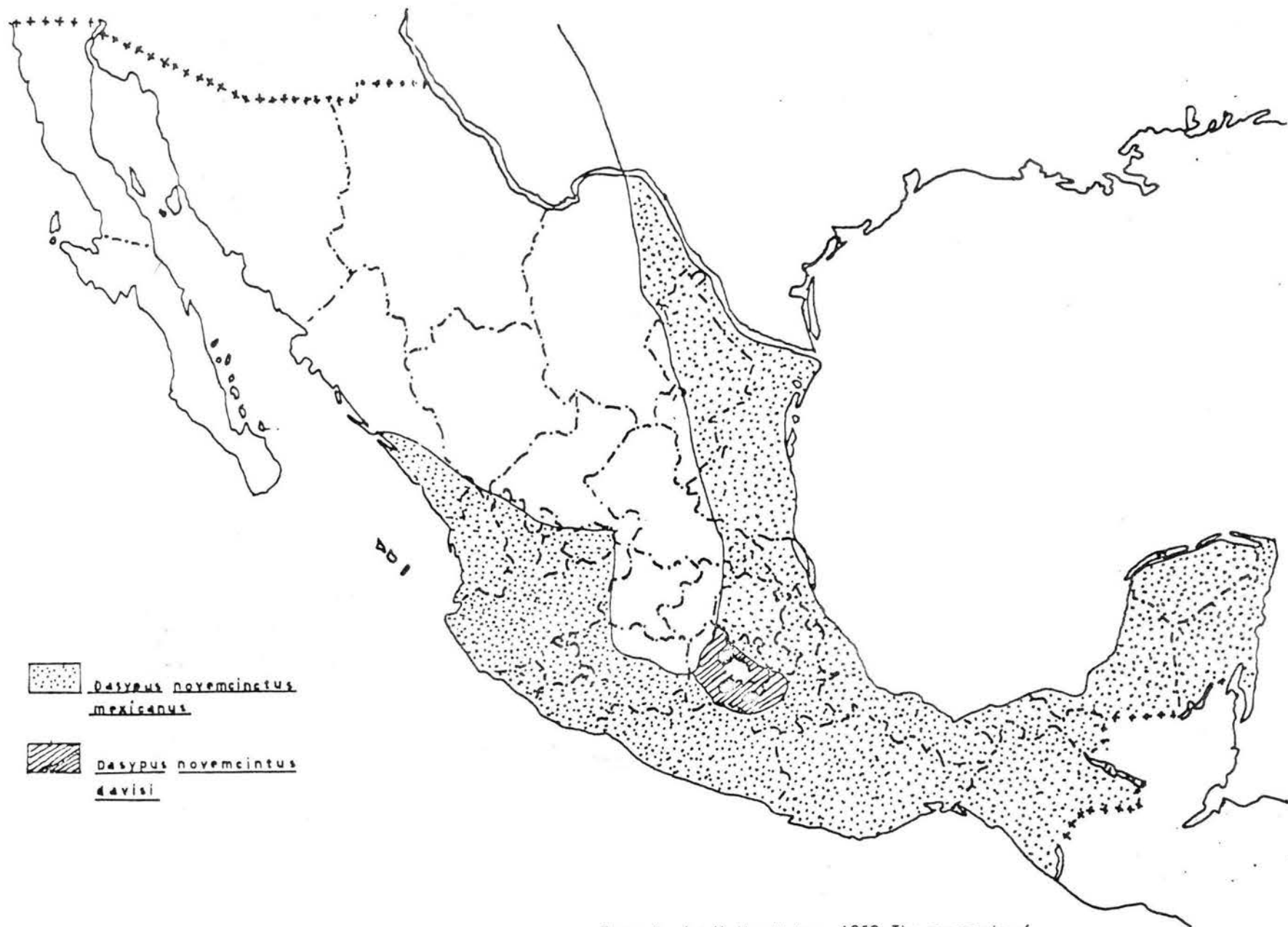
En México solo se encuentra una sola especie, el Dasypus novemcinctus Linn (81), comunmente conocido como armadillo, sin embargo en algunas regiones se conoce como ayo-tochtli, nombre-

derivado del Nahuatl (ayotl, tortuga; tochtli, conejo) (50). De esta especie, se han reportado dos subespecies: Dasypus novemcinctus mexicanus Peters 1864 (52), que se encuentra distribuido en la mayor parte del país, y el Dasypus novemcinctus davisi descrito por Russell en 1953 (64) y se encuentra en la zona de Huitzilac, Morelos, en la cuenca del Balsas y en las montañas al norte de Morelos (Fig. NO. 2).

Los armadillos adultos, son animales que miden aproximadamente entre 70-90 cm de longitud total y llegan a pesar hasta 6 kg (75). Se caracterizan por la presencia de un caparazón, que esta formado por numerosos escudos dérmicos oscificados, su color es café obscuro, negruzco y las zonas laterales se observan de color amarillo sepia.

El caparazón está dividido en tres regiones, la anterior o escapular que cubre la cabeza y hombros, la región posterior o pélvica que cubre la cadera y la parte central que está formada por 9 bandas móviles interconectadas por pliegues. Cada banda puede estar formada de 50 a 70 escudos que de las zonas distales son de forma poligonal y en las bandas son rectangulares -- (20, 39, 75, 81). La cabeza está cubierta por una gruesa capa de escudos que se encuentran estrechamente unidos. La cola puede estar formada por 12 ó 15 anillos. El pelo es escaso, grueso, tieso y áspero, abundando en la región abdominal (20,39). Asimismo poseen patas pequeñas y robustas con poderosas garras: 4-

Distribución del Dasyurus novemcinctus en
La República Mexicana



Tomado de: Holly Kelson. 1959. The mammals of
North America.
Fig. No. 2

en las extremidades anteriores y 5 en las posteriores, que les sirven para cavar y como instrumento de defensa. Otra característica de la especie es la ausencia de incisivos y caninos, y solo están provistos de molariformes simples sin esmalte.

Tienen una gran diversidad de hábitat ecológicos dentro de los cuales se mencionan; zonas planas, cerros desiertos y bosques húmedos. Viven en madrigueras que ellos mismos cavan y tienen varias entradas y salidas. Son de hábitos nocturnos aunque más frecuentemente crepusculares, también suelen salir de madrugada. Son animales solitarios y solo en época de celo se encuentran en parejas. En ocasiones comparten su madriguera -- con animales que no ofrecen peligro o competencia alguna (37,- 39,79).

De acuerdo al estudio que Kalback en 1943 (39,77) realizó sobre el análisis estomacal de armadillos, concluyó que la base alimenticia consiste fundamentalmente de insectos en un -- 77.6% (41% Coleoptera, 1.4% Hymenoptera, 7.8% Lepidoptera y -- 14.2% otros insectos), aunque también de lombrices de tierra, caracoles y mil pies en un 14.4%, de reptiles y anfibios en un 1.2%, huevos de aves, conejos y gramíneas (39,77). Los armadillos buscan a sus presas por medio del olfato, los atrapan con sus garras y con la lengua las retienen debido a que es áspera y pegajosa.

Son animales que no hibernan, son muy sensibles al frío, - quizá este ha sido el motivo por el cual no han logrado habitar lugares de alta montaña, ni tampoco se han distribuido hacia la parte norte del continente (39, 77, 81).

La reproducción es especialmente importante debido a dos - fenómenos aparentemente no relacionados; un largo periodo de - implantación y el fenómeno de poliembrionía, que da lugar a la - formación de cuádruples monocigotos idénticos, del mismo sexo - (74). Los armadillos se reproducen una vez al año y la ovula- - ción ocurre de julio a agosto. Una vez que el óvulo es fecunda- - do, las primeras divisiones se realizan en estado libre y al ca - bo de 14 a 16 semanas se lleva a cabo la implantación. De inme- - diato la vesícula embrionaria da origen a dos yemas, cada una - se subdivide en dos y de esta manera quedan cuatro primordios - de embriones. Cada feto posee su propio saco amniótico, su pro- - pio cordón umbilical y una sola unión a la placenta (1). La pla - centa es hemocorial al igual que en el hombre (19). El parto se - lleva a cabo cinco meses después de la implantación. Los machos - poseen un par de testículos que se encuentran en el interior de - la cavidad abdominal y la hembra tiene un surco urogenital que - simultáneamente sirve como uretra terminal. El útero es simple, - los ovarios se localizan en la pelvis, se encuentran asociados - a un tejido adrenal y gonadal. Cuando las hembras se encuentran - en cautiverio su morfología es diferente a las de vida silves--

tre ya que de alguna manera sufren alteración en su aparato reproductor, motivo por el cual no se ha logrado su reproducción (17).

Tiene una temperatura corporal relativamente baja en relación con la de los demás mamíferos. Debido a que su mecanismo de termorregulación, es relativamente primitivo, por tanto favorece que su temperatura corporal se modifique de acuerdo con la ambiental. Johanse (28) reportó que cuando la temperatura ambiental es de 25°C, los límites de temperatura rectal en horas de reposo (por la mañana) es entre 34°C y 35°C y en horas de mayor actividad (por la noche) es de 35°C y 36°C.

Otra característica importante de estos animales es que pueden dejar de respirar durante un lapso de hasta 10 minutos. En este tiempo la temperatura no se modifica, pues de inmediato hay una rápida bradicardia y la cantidad de oxígeno arterial se gasta en los primeros dos minutos y para los 8 restantes solo queda un 2%. Esto es interesante primero por sus hábitos de cavar y segundo porque pueden permanecer debajo del agua por un largo periodo de tiempo (69).

El armadillo tiene una variada flora normal (9,53), y a menudo se le ve infectado con microorganismos y helmintos que pueden también infectar al ser humano por lo que el conocimiento de esta situación resulta importante ya que el armadillo podría

considerarse como reservorio natural para dichos agentes. Dentro de estos se mencionan: salmonelas (55), leptospiras (8,10,14,76), nocardias (22,23) y borrelias (75), también ectoparásitos del género Amblioma y endoparásitos como Trypanosoma cruzi (15,16,25,47,79,80,82). Entre los nemátodos se han reportado miembros de los órdenes trichuroidea, strongiloidea, oxiuroidea, ascaroidea, spiruroidea y filarioidea, también otros helmintos como cestodos, acantocéfalos y trematodos digeneos (77). En el laboratorio de investigaciones Inmunológicas se ha estado llevando a cabo un estudio parasitológico en armadillos y hasta ahora se han encontrado los siguientes parásitos: Amblioma auricularium, Trypanosoma cruzi, Strongiloides sp. y un ácaro en estado ninfal conocido como hypopus y pertenece a los astigmatas.

Aunque se ha aceptado que el hombre es el único huésped de M. leprae se han encontrado armadillos silvestres infectados en forma natural con esta micobacteria (65). En 1975 walsh y col., (83) encontraron 7 armadillos silvestres infectados, en el Estado de Louisiana con todas las características histopatológicas y bacteriológicas de una lepra experimental. Posteriormente - - Walhs y Storrs (84), encontraron una incidencia de esta infección natural en el 10% de animales capturados en diferentes - - áreas de Louisiana y en Texas (49 en Louisiana y 1 en Texas) y -

fué demostrado por Meyers (43) y Binford (4) por todos los criterios establecidos para su identificación que era M. leprae u otra micobacteria indistinguible de este bacilo. Otros investigadores han encontrado esta infección en armadillos, Fox (21) - en Mississippi, Anderson (2) y Kirchheimer (34) en Louisiana y - Smith (71) en Texas. A pesar de estos hallazgos no ha podido -- ser confirmado en otros países, en Colombia, Muños Rivas (44) - estudió 205 animales de las especies Dasypus novemcinctus, D. sabanicola y Cabassous centralis, en Praguay, Innami (27) tampoco halló datos sugestivos de infección leprosa en 453 armadi--- llos de las especies D. novemcinctus, Tolypeutes matacus, Chaetophractus villosus y C. vallerousus, asímismo en Venezuela, Argentina y Guyana Francesa, aun no se han encontrado animales in-- fectados en forma natural. Sin embargo el estudio se ha incre-- mentado en algunas zonas. Smith en 1983 (72) en Texas encontró una incidencia del 5%.

Hasta ahora, se pensaba que el armadillo podría ser el segundo huésped de M. leprae, sin embargo Leininger (36) encontró un chimpancé infectado en forma natural con M. leprae, encon--- trándose lesiones nodulares en el labio inferior, en la fosa na-- sal, en las cejas y en los testículos, semejantes a las encon-- tradas en infecciones experimentales. Por otro lado en 1979 - - (40,41,43), se hizo el diagnóstico histopatológico de lepra a -

partir de una biopsia de piel de un mangabey hembra Cercocebus-atys atys que había sido importada de Africa central para estudios no relacionados con lepra. Los hallazgos clínicos en este mono incluyen infiltraciones nodulares difusas en orejas, cara, antebrazo y hocico encontrándose alrededor de 3.9×10^{10} BAAR/g - de tejido, los bacilos ácido alcohol resistentes obtenidos resultaron ser Mycobacterium leprae. Suspensiones purificadas de estos bacilos fueron inoculadas en dos mangabey en donde se encontró que desarrollaban una infección progresiva y generalizada semejante a la encontrada en armadillos experimentalmente infectados. Por lo que resulto ser un excelente modelo, ya que -- las biopsias estudiadas presentaron características histopatológicas que van dentro del espectro desde la forma limítrofe hasta el polo lepromatoso.

Con base a los hallazgos de la infección natural con M. leprae en armadillos, y ya que en nuestro país no se ha llevado a cabo este estudio, fue de gran interés para nosotros realizar la búsqueda de esta infección en la única especie de armadillos D. novemcinctus provenientes de áreas endémicas y no endémicas de lepra.

MATERIAL Y METODOS

1. Se estudiaron 100 armadillos de los cuales 36 fueron capturados en el municipio de Santa Ana Jilotzingo, Edo. de México- (área no endémica) y los 64 restantes en Escuinapa Sinaloa - (área endémica).
2. A su llegada a la ciudad de México se instalaron en la pequeña granja del departamento de Investigaciones Inmunológicas- del ISET, DGE, SSA.
3. La alimentación diaria para cada animal consistió de 75g. de atún, 4 cucharadas de Cerelac, 1 huevo y 250 ml. de agua.
4. A cada armadillo se le tomaron muestras para búsqueda de - - BAAR en: improntas de oreja, exudado nasal y lesiones externas.

La técnica de tinción empleada fue la de Ziehl-Neelsen.
5. En aquellos animales en los que se encontraron BAAR se sacri-ficaron y se llevó a cabo la autopsia buscando nódulos y tomando muestra de: ganglio linfático, hígado, bazo, nervios, - pulmón, piel y lengua. De cada uno se hicieron improntas y - aquellos órganos que resultaron BAAR positivos, y se evaluaron de acuerdo con la escala de Ridley (60), Tabla No. 1. De estos tejidos se utilizó una parte para la obtención de suspensiones bacilares y la otra parte se puso en formol al 10%

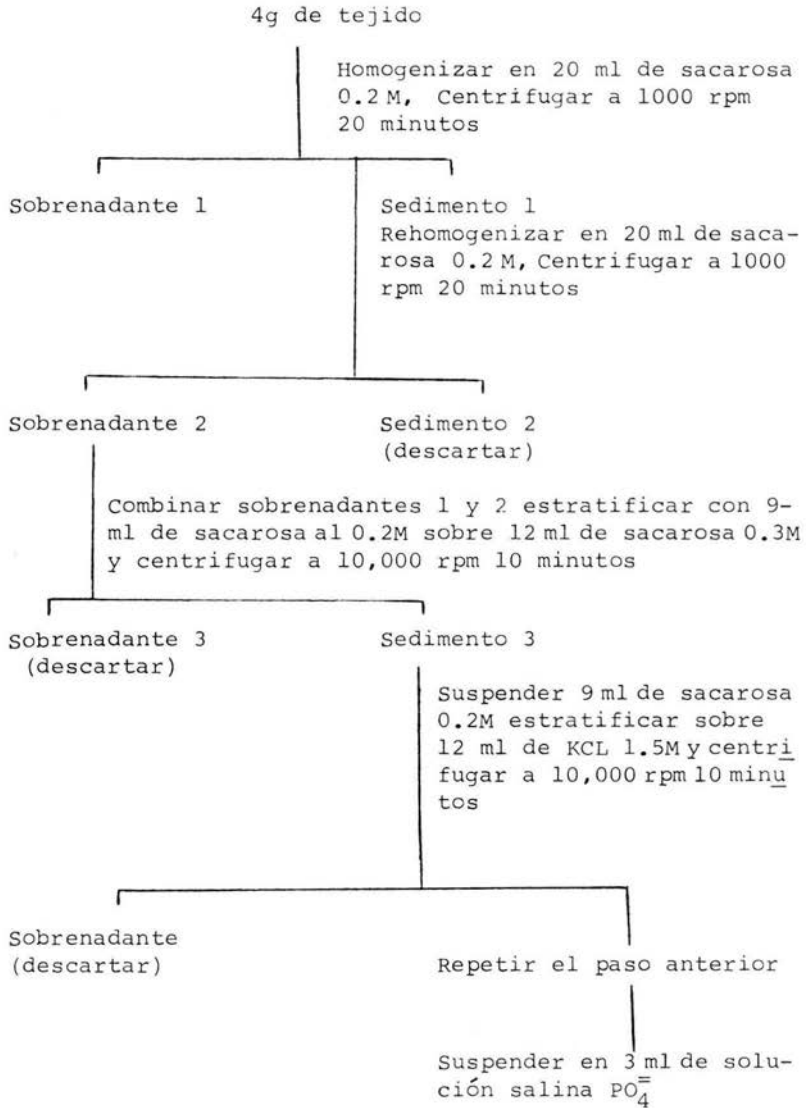
para estudio histopatológico.

Tabla No. 1

Está basada sobre el número de bacilos observados por campo - -
usando el objetivo de inmersión

6+	más de	1000	bacilos por campo
5+	de 100 -	1000	bacilos por campo
4+	de 10 -	100	bacilos por campo
3+	de 1 -	10	bacilos por campo
2+	de 1 -	10	bacilos en 10 campos
1+	de 1 -	10	bacilos en 100 campos

6. La obtención de suspensiones bacilares fueron a partir de nódulos subcutáneos, ganglio linfático lateral, axilar e inguinal y nervios, por el método de Prabhakaran (54).
7. Las pruebas utilizadas para la identificación de las micobacterias fueron:
 - a) Inoculación en medio Lowenstein-Jensen y Midlebrok 7H10 - incubándose a 33° y 37°C durante 3 meses.
 - b) Extracción de la ácido alcohol resistente con piridina de acuerdo al método propuesto por Convit (12).
 - c) Inoculación en cojinete plantar del ratón por el método - de Shepard (67).

Método de aislamiento de M. leprae

Método de la extracción de la ácido-resistencia

1. Preparación de extensiones en porta objetos con suspensiones de:
 - a) bacilos obtenidos de armadillo
 - b) M. leprae
 - c) BCG
 - d) M. vaccae
 - e) M. lepraemurium
2. Fijar en solución de Bouins durante 1 hora
3. Pasar en soluciones etanólicas al 90%, 70% y 60% durante 5 - minutos en cada uno.
4. Lavar en agua corriente durante 2 minutos.
5. Tratar con solución de piridina durante 2 horas.
6. Lavar con agua corriente durante 2 minutos.
7. Fijar en solución de formol-calcio durante 1 hora.
8. Lavar en agua corriente durante 2 minutos.
9. Dejar secar.
10. Teñir con Ziehl-Neelsen.
11. Leer con objetivo de inmersión.

Inoculación en cojinete plantar de ratón.

1. Se inocularon los cojinetes plantares derechos de 16 ratones Balb/c con 0.03 ml de una suspensión que contenía 5×10^3 bacilos/ml.
2. Se obtuvieron suspensiones bacilares a partir de los cojinetes plantares de 4 ratones, cada 6, 9, 11 y 11 $1/2$ meses.
3. Se hizo la cuenta bacilar por cojinete plantar para evaluar el incremento en la multiplicación por el método de Shepard (68).

Método para la cuenta de BAAR.

1. Sobre un portaobjetos se distribuyen 10 μ l de la suspensión bacilar en 3 círculos de 1 cm de diámetro.
2. Se dejan secar.
3. Fijar a emisión de vapores de formol durante 3 minutos.
4. Calentar las preparaciones sobre un baño de agua hirviendo durante 2 minutos.
5. Cubrir con solución de gelatina-fenol y dejar escurrir.
6. Repetir pasos 3 y 4.
7. Teñir por el método de Ziehl-Neelsen.
8. Contar el número de bacilos por campo a lo largo del diámetro horizontal de cada uno de los 3 círculos (alrededor de -

20 campos/ círculo).

9. Determinar el número de bacilos aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{BAAR/ml de muestra} = \frac{\text{Número de BAAR en los 3 círculos}}{\text{Número de campos en los 3 círculos}} \times \frac{1 \text{ ml}}{10 \mu\text{l}} \times \frac{(D/2)^2}{\text{área/campo}}$$

4. Con las suspensiones obtenidas se reinocularon nuevamente 16 ratones para confirmar los resultados previamente obtenidos.

R E S U L T A D O S

De los 36 armadillos estudiados de Santa Ana Jilotzingo en dos se encontraron BAAR en impronta de oreja y exudado nasal.

1. El armadillo No. 1 llegó el 6-VIII-79 y murió el 23-X-79 por causas desconocidas.

a) De la necropsia se obtuvieron los siguientes resultados - de acuerdo con la escala de índice bacteriológico de Riddle (60).

<u>Organos</u>	<u>BAAR (BI)</u>
Ganglio linfático	+2
Nódulo	+2
Hígado	+1
Bazo	+1
Nervio	+1
Lengua	+1

b) Se obtuvieron suspensiones bacilares de ganglio linfático y nódulo. Debido a que en nuestro laboratorio no se contaba con todas las condiciones necesarias para llevar a cabo la identificación de las micobacterias halladas, las suspensiones se enviaron a la Dra. E.E. Storrs, al Florida Institute of Technology, Medical Research Institute. - Melbourne, Florida.

Resultados Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas

- c) Las suspensiones obtenidas se sembraron en medio Lowens--
tein-Jensen y Middlebrok 7H10 y se incubaron durante 3 me--
ses a 37°C, no observandose crecimiento alguno.
- d) Se hizo extracción de la ácido alcohol-resistencia con pi--
ridina y estos organismos perdieron la capacidad de rete--
ner la carbol fuchsina como sucede con M. leprae de ori--
gen humano y de armadillo.

Resultados del Medical Research Institute.

1. Las suspensiones bacilares que se enviaron fueron inoculadas
en el cojinete plantar de ratones hembras Balb/c.
Debido al escaso número de bacilos se hizo pase ciego.
2. Las cosechas de los cojinetes se llevaron a cabo a los 6, 9,
11 y 11 ^{1/2} meses después de la inoculación.
3. Se hizo cuenta bacilar de cada una de las suspensiones para--
determinar el grado de multiplicación (Tabla No. 2)
4. Los bacilos obtenidos a partir del cojinete plantar se inocu--
laron en medio de Lowenstein-Jensen y Middlebrok 7H10 incu--
bándose a 33° y 37°C no encontrándose crecimiento después de
3 meses y hubo pérdida de la ácido alcohol resistencia cuan--
do se trataron con piridina.
5. Se hizo una reinoculación en ratones encontrándose resulta--

dos similares a los anteriores con lo que se demostró que -- los BAAR encontrados eran Mycobacterium leprae.

2. El armadillo No. 2 llegó el 3-I-80 y murió por neumonía el - 14-I-80.

a) Tanto en exudado nasal como en impronta de oreja se observaron BAAR.

b) En el estudio de las biopsias obtenidas en diferentes órganos en la necropsia, se obtuvieron los siguientes resultados:

<u>Organos</u>	<u>BAAR (BI)</u>
Ganglio linfático	+2
Nódulo	+2
Hígado	+1
Bazo	+1
Lengua	+1

c) Se obtuvieron suspensiones a partir de ganglio linfático- y nódulos.

d) Las suspensiones bacilares se dividieron en dos partes, - una se estudió en nuestro laboratorio y la otra se envió- a la Dra. Storrs para su identificación.

Resultados Laboratorio de Investigaciones Inmunológicas.

- a) Las suspensiones se inocularon en medio de Lowenstein - - Jensen y Middlebrok 7H10 a 37°C durante 3 meses, no encontrándose crecimiento alguno.
- b) Se hizo extracción de la ácido-resistencia con piridina y se encontró un comportamiento similar al de M. leprae.

Resultados del Medical Research Institute.

- a) A las suspensiones enviadas se les hizo cuenta bacilar, - encontrándose los siguientes resultados (Tabla No. 3).
- b) La suspensión bacilar de nódulo, tuvo 3.8×10^5 bacilos/ml de esta suspensión se inoculó 0.03 ml en cada cojinete -- plantar, en 10 ratones hembra Balb/c.
- c) La cosecha de los cojinetes se llevó a cabo 10 meses después de la inoculación y se encontró un incremento tardío de la multiplicación del bacilo de 5.7×10^5 BAAR/ por cojinete.
- d) La utilización de las pruebas de identificación demostraron que son BAAR no cultivables y que por tratamiento con piridina pierden la ácido alcohol resistencia.

Por los resultados obtenidos es muy sugerente que el bacilo aislado de este armadillo sea también M. leprae, por lo que se harán reinoculaciones en cojinete plantar de ra

tones para su confirmación.

b. De los 64 armadillos provenientes de Escuinapa, Sinaloa en uno de estos (A - 14) se encontraron BAAR en exudado nasal - así como en impronta de oreja. El animal llegó a nuestra - granja el 7-III-81 y fué sacrificado el 7-V-81.

a) Se hicieron suspensiones a partir de oreja y de hígado.

b) Los métodos utilizados para la identificación de estos -- BAAR demostraron que no se trataba de M. leprae ya que en la inoculación en el cojinete plantar del ratón a partir de una suspensión que contenía 6×10^3 bacilo/ml. se encontró un incremento en la multiplicación del bacilo durante los 2 primeros meses, siendo de 70×10^6 hasta 1.7×10^9 , - por otro lado hubo crecimiento en Lowenstein-Jensen y - Middlebrok 7H10 presentando colonias características de - micobacterias escotocromógenas y no hubo pérdida de la -- ácido resistencia cuando se trataron con piridina.

Tabla No. 2

Pase ciego a cojinete plantar inoculando con suspensiones de	Bacilos ácido alcohol resistentes obtenidos de cada cojinete plantar	6 meses	9 meses	11 meses	11 1/2 meses
Ganglio linfático		0.56 X 10 ⁵	4 X 10 ⁵	-----	2.8 X 10 ⁵
Nódulo		0.38 X 10 ⁵	1 X 10 ⁵	1.4 X 10 ⁵	1.6 X 10 ⁵
Nervio		negativo	negativo	negativo	negativo

Tabla No. 3

Suspensión	Descripción	Tinción
Ganglio linfático	Denso muy turbio	3 bacilos/100 campos
Nervio	Denso muy turbio	4 bacilos/100 campos

D I S C U S I O N

A pesar de que el hombre ha sido considerado como el único huésped susceptible de M. leprae, en 1975 Walsh y Storrs (83),- encontraron que 7 armadillos silvestres que habían sido captura dos en el estado de Louisiana, Estados Unidos estaban infecta dos con una micobacteria y que presentaban una enfermedad simi lar a la lepra humana. La identificación de estas micobacterias, utilizando los criterios establecidos por Binford y col., (4),- Meyers y col., (42), demostró que se trataba de M. leprae. En - 1977 Walsh y Storrs (84), encontraron una incidencia del 10% de esta infección en forma natural en estos animales (49 en el es tado de Louisiana y 1 en el estado de Texas) Anderson (3), - - Smith (71), Fox y Kirchheimer (33) corroboraron estos hallazgos aún cuando con una incidencia muy baja. Smith en Texas en 1983- reportó una incidencia del 5%.

Por otro lado investigadores como Muños Rivas en Colombia- (44), Convit en Venezuela (11), Innami en Paraguay (27) y Baran tan en Guyana Francesa, no encontraron esta infección con M. -- leprae.

En nuestro país desde 1978 se inició la búsqueda de la in fección natural por M. leprae de armadillos silvestres prove --- nientes de diversas áreas del país.

De los 36 animales estudiados en el Estado de México (área

no endémica de lepra) en dos se encontraron bacilos ácido alcohol resistentes. En uno de ellos se ha clasificado como M. leprae según los criterios de identificación establecidos, mientras que los resultados obtenidos del segundo animal son sugerentes de que sea M. leprae, pero aún falta confirmarlo.

De los 74 armadillos estudiados provenientes del estado de Sinaloa (área endémica) solo en uno de ellos se encontraron -- BAAR, los resultados de la identificación demostraron que se -- trataba de una micobacteria cultivable.

En el momento actual es difícil dar una explicación en -- cuanto a la importancia del hallazgo de esta infección con M. leprae en armadillos silvestres. Desde luego, existe la posibilidad de que este animal resulte ser un reservorio del germen, en cuyo caso deberá hacerse un estudio epidemiológico en áreas en donde coexistan casos de lepra con abundancia de armadillos.

Sería difícil explicar los hallazgos de infección con M. leprae en armadillos provenientes de un área no endémica pero -- podría haberse debido a que estos animales hayan migrado de alguna zona cercana en donde existan casos de lepra o bien el que en el área en donde se capturaron hayan existido enfermos leproso que no fueron registrados. Por lo que consideramos necesario llevar a cabo un estudio epidemiológico tanto en aquellas -- áreas en donde la incidencia de la lepra es alta y en aquellas--

que se consideran no endémicas.

La discrepancia que existe entre la incidencia de la infección en armadillos informada por diferentes investigadores puede deberse al azar, en cuanto al número de armadillos estudiados y el área en donde han sido capturados. Puede ser que la alta incidencia de animales infectados en forma natural corresponda a áreas en donde la enfermedad en el hombre es también alta como sería lo que reportan Walsh y Storrs en el Estado de Louisiana en Estados Unidos. También puede ser, que el hábitat de esos lugares sea más favorable para la transmisión de la enfermedad, aunque también es probable la posibilidad de que existan diferencias de susceptibilidad de las cepas de armadillos, pudiendo ser esta mayor en unas áreas que en otras.

Se presume que el armadillo puede adquirir la infección a través del contacto directo con individuos infectados, fomites o desechos contaminados. La forma de transmisión de armadillo a armadillo no se conoce, pero se ha observado que hay una gran eliminación de bacilos en secreciones nasales de animales con una infección generalizada y también ha sido encontrado el bacilo en la leche de las hembras lactantes capturadas con la enfermedad (85).

Puesto que se ha observado que el M. leprae puede sobrevivir en diferentes tipos de suelo, podría ser esta una explica--

ción de la infección de armadillos silvestres. Del suelo se han aislado diferentes especies de micobacterias, algunas son saprófitas mientras que otras son patógenas al hombre o animales, -- por ejemplo M.tuberculosis, M.bovis, M.avium y M.intracellulare. Lobel en 1936 (38), reportó el hallazgo de una infección leprosa en búfalos acuáticos (Bubalus bubalis), distribuída en piel y mucosa nasal, adquirida probablemente por el contacto con el fango. Por otro lado Van Ness relacionó la aparición de infecciones micobacterianas en ganado vacuno con los suelos alcalinos húmedos y ya sea que estos tipos de suelos favorecen el crecimiento de bacilos ácido alcohol resistentes o bien pudieran bajar la resistencia del huésped.

La hipótesis de Van Ness y Kazda sobre la posibilidad de que M.leprae pueda subsistir en suelos con pH extremos parecería improbable, sin embargo pudiera ser que hay una adaptación del microorganismo al medio ambiente.

Estos resultados son congruentes con los hallados por Walsh y Storrs, en Louisiana ya que el tipo de suelo en ésta área es alcalino, Kazda (21) encontró bacilos ácidos alcohol resistentes no cultivables en raíces de musgo de pantanos (Sphagnum) en Noruega en donde la lepra fue endémica. Cuando estas bacterias fueron inoculadas en el cojinete plantar de ratón, estas presentaron una curva de crecimiento tardío característico de M.leprae.

El musgo de los pantanos posee un pH de menos de 5.

Si la micobacteria es capaz de sobrevivir en este tipo de medio, esto podría demostrar que es una de las más resistentes.

Otra posible forma de transmisión es a través de vectores como ha sido propuesto por Rees (58) y Narayanan (45) quienes encontraron que el número de bacilos que puede obtener por piquete un artrópodo de un paciente lepromatoso, aún cuando no llega a ser tan grande como el que se elimina por secreciones nasales, podría ser el adecuado para infectar tanto a humanos como armadillos de acuerdo con su susceptibilidad. También el picar armadillos infectados pudieran ser un medio de transmisión ya sea al hombre o a otro animal. El M.leprae puede permanecer viable de 2 a 7 días después de haber sido excretado por vía nasal aún en condiciones ambientales secas (18) esto es importante ya que las moscas pueden contaminarse a través de secreciones humanas o del medio ambiente (23,59).

Las diferentes hipótesis para explicar la forma en que el armadillo adquiere la infección con M.leprae hacen necesario que se siga investigando para demostrar cuál de ellas es válida. Además, es necesario indagar si existe una vía de transmisión de armadillo a armadillo o bien de hombre al armadillo y de este al hombre. Si esto resulta cierto, podría entonces considerarse a este animal como un reservorio de M.leprae.

Otra posibilidad que debería ser explorada, es que la mico bacteria aislada no sea M.leprae, sino otra que por los métodos de identificación con que se cuenta actualmente no es posible - diferenciarla.

C O N C L U S I O N E S

Este trabajo tuvo como finalidad la búsqueda de infección natural con M.leprae en armadillos silvestres, provenientes de un área en donde la lepra es de alta endemicidad y de otra zona en donde no es endémica.

Se encontraron 2 armadillos de área no endémica infectados con micobacterias, en uno de estos se demostró que era Mycobacterium leprae, y en el otro animal los resultados preliminares de identificación son muy sugerentes de que se trate de esta micobacteria. Estos resultados aun cuando el número de animales estudiados es pequeño concuerdan con los hallazgos de otros investigadores.

Queda por llevar a cabo un estudio epidemiológico incrementando el número de armadillos y demostrar de ser posible la forma de adquirir la micobacteria y su posible papel en la transmisión de la enfermedad de armadillo o armadillo así como la -- transmisión de hombre a armadillo y de este al hombre.

B I B L I O G R A F I A

1. Anderson, John M. y Benirschke. (1963). Fetal circulations - in the placenta of Dasypus novemcinctus Linn and their signi-
ficance in tissue transplantation. Transplantation. 1:306- -
310.
2. Anderson, M. (1978). Leprosy in armadillo from Texas.
Leprosy Scientific Memoranda, Memo L.967.
3. Bindord, C.H. (1956). Comprehensive programme for inoculation-
of human leprosy animals. Publ. Hith. Resp. Wash. 71:995-996.
4. Binford, C.H., Meyers, W.M., Walsh, G.P., Storrs, E.E. y - -
Brown, H.L. (1977). Naturally acquired leprosy in the nine--
banded armadillo (Dasypus novemcinctus). Histopathologic -
and Microbiologic studies of tissues. J. Reticuloendothelial
Soc. 22 (4):377-388.
5. Boletín Epidemiología, S.S.A. (1981). Comportamiento de la -
endemia de la lepra en 1980. Año 1. No. 13:1-10.
6. Boletín Epidemiología, S.S.A. (1984). Informe epidemiológico
anual 1982. Lepra. 4(14-15): 12-13.
7. Broune, S.G. (1976). Acta clínica documenta geigy la lépre.-
Ciba Geigy Switzerland, pp 9-85.
8. Brumpt, E.L. Mazzoti y L.C. Brumpt. (1939). Enquetes epide--
miologiquesc sur la maladie de Chagas au Mexique. L. Réduvi--

- dés vecteurs. Animaux réservoirs de virus, cas humains. Ann. Parasit. Hum et Comp. Paris. 17:229-312.
9. Cacchione, R.A., E.S. Cascelli, E.S. Martinez, y J.M. Zuberbuhler. (1966). Leptospirosis en animales silvestres, aislamiento de una cepa de Leptospira canicola de un peludo - - - (Chaetophractus villosus). Rev. Invest. Agrop. 3:51-55.
10. C.G. Carrillo, D.M. Meyers y B Szyfres. (1972). Bataviae -- group leptospirae isolated from armadillos in Argentina. -- Trop. Geogr. Med. 24:377-381.
11. Convit, J. (1978). Indigenous leprosy in the armadillo Dasy-
pus novemcinctus. J. Reticuloendothel. Soc. 24:605-607.
12. Convit, J. y Pinardi, M.E. (1972). A simple method for the -
differentiation of Mycobacterium leprae from other mycobac-
teria through routine staining techniques. Int. J. Lepr. - --
40:130-132.
13. Cuba-Caparó, A. (1977). The armadillo in biomedical re-----
search. Workshop on the armadillo: an animal model for rese-
rach. Caracas, Venezuela, May. 23-27.
14. Cuba-Caparó, A. y D.M. Meyers. (1977). Intertitial nephri--
tis in the seven banded armadillo (Chaetophractus villosus)
and its association with infections caused by several types-

- of leptospirae serotypes. Workshop on the armadillo an animal model for research. Caracas, Venezuela, May. 23-27.
15. Clark, H.C. y L.H. Dunn. (1932). Experimental studies on -- Chagas' disease in Panama. Amer. J. Trop. Med. 12:49-77.
16. Chagas, C. (1912). Sobre un tripanosoma de tatú (Tatusia -- novemcinctus), transmittido pela Triatoma geniculata, Lati. Possibilidade de ser o tatu um depositario de Trypanosoma -- cruzi no mondo exterior. Brasil Medico, 26:305-306.
17. D' Addamio, G.H., Roussel, J.D. y Storrs, F.E. (1977). Response of the nine-banded armadillo (Dasypus novemcinctus) to gonadotropins and steroids. Laboratory Animal Science. - 27:482-489.
18. Davey, T.F., y Rees, R.J.W. (1974). The nasal discharge in leprosy. Clinical and bacteriological aspects. Lepr. Rev. - 45:121-134.
19. Enders, Allen, C. (1960). Development and struture of the villous haemochorial placenta of the nine-banded armadillo- (Dasypus novemcinctus). J. Anat. 94:34-45.
20. Ernest, P. Walker. (1975). Mammals of the world third Edi-- tion Vol. I The Jhons Koprins University prees Baltimore -- and London. pp. 644.

21. Fox, M.O., Anderson, D.C., y Koufman, A.F. (1972). Leprosy-like disease in wild armadillo from Mississippi. Leprosy - - Scientific Memoranda. Memo. L-865.
22. Gezuelo, E. (1972). Fatal infection by Nocardia brasiliensis in an armadillo. Sabouraudia, 10:63-65.
23. Greater, J.C. (1975). The fly as potencial vector in the -- transmission of leprosy. Lepr. Rev. 46:279-286.
24. Hansen, G.H.A. (1974). Investigations concerning the etiology of leprosy. Norsk. Magazin for Laegevidenskaben, 4:76-79.
25. Herbert, C. Clark y Laurence, H. Donn. (1932). Experimental studies on Chagas disease in Panama. Amer. J. Trop. Med. -- 12:49-77.
26. Hunter, G.W., Frye, W.W., Swartzwelder, J. Glyde. (1973). - Manual de medicina tropical 3 ed. La Prensa Médica Mexicana, pp 223-239.
27. Innami, S. (1977). Study on armadillos in Paraguay, Workshop on the armadillo: an animal model for research. Caracas, Venezuela, May. 23-27.
28. Johansen, Ksell. (1961). Temperature regulation in the nine-banded armadillo (Daypus novemcinctus mexicanus). Physiol. Zool. 34:126-144.

29. Kazda, J., Irgens, L.M., y Muller, K. (1980). Isolation of non-cultivable acid-fast bacilli in sphagnum and moss vegetation by foot-pad technique in mice. *Int. J. Lepr.* 48:1-6.
30. Kirchheimer, W.F. (1976). The role of arthropods in the transmission of leprosy. *Int. J. Lepr.* 44:104-107.
31. Kirchheimer, W.F. (1976). Significance of nine banded armadillo in biomedical leprosy research. *Lepr. India.* 48(4):-419-427.
32. Kirchheimer, W.F. y Storrs, E.E. (1971). Attempts to establish the armadillo (Dasypus novemcinctus Linn) as a model for the study of leprosy I reports of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. - - Lepr.* 39:693-707.
33. Kirchheimer, W.F., Storrs, E.E. y Binford, C.H. (1972). - Attempts to establish the armadillo (Dasypus novemcinctus Linn) as a model for the study of Leprosy II Histopatologic and Bacteriologic post-mortem findings in lepromatoid leprosy in the armadillo. *Int. J. Lepr.* 40:229-242.
34. Kirchheimer, W.F., y R. M. Sanchez. (1978). Leprosy in the wild. *Leprosy Scientific Memoranda*, Memo L-966.
35. Latapi, F. (1948). Clasificación de la lepra (tipo, grupo, caso y forma). *Abst. VI Int. Lep. Congress.* *Int. J. Lepr.* - 16:526.

36. Leininger, Joel R., y Donham, Kelley J. (1977). Spontaneous leprosy in a chimpanzee. *Leprosy Scientific Memoranda*, Memo L-887.
37. Leopold, A.S. (1959). *Wild life of México*, University of California press. Berkeley and Los Angeles, pp. 338-343.
38. Lobel, L.W. (1936). *Lepra bubalorum*. *Int. J. Lepr.* 4:79.
39. Mc Bee, K., y Baker, J.R. (1982). *Dasypus novemcinctus*. *Mammalia*. Species. Published by the American Society of Mammalogists. 162:1-9.
40. Meyers, W.M., Walsh, G.P., Briwn, H.L., Fukunishi, y Binford, C.H., Gerone, P.J. y Wolf, R.H. (1980). Naturally acquired leprosy in a mangabey monkey (*Cercocebus sp.*). *Int. J. Lepr.* 48:495-496.
41. Meyers, W.M., Walsh, G.P., Brown, H.L., Binford, C.H., Gerone, P.J., Wolf, R.H., Gormus, B.J., y Martin, L. (1981). *Leprosy in the mangabey (*Cercocebus torquatus atys*, "sooty mangabey")*. Abstracts. Sixteenth Joint Leprosy Research conference. *Int. J. Lepr.* 49:500-502.
42. Meyers, W.M., Walsh, G.P., Brown, H.L., Rees, R.J.W., y Convit, J. (1977). Naturally acquired leprosy in the nine banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*): Reactions in leprosy and patients to lepromins prepared from infected armadi-

- llos. J. Reticuloendothel Soc. 22:369-375.
43. Meyers, W.M., Walsh, G.P., Binford, C.H., Brown, H.L., Wolf, R.H., Gormus, B.J., Martín, L.N., y Gerone, P.J. (1982). -- Multibacillary leprosy in unaltered hosts with emphasis on armadillos and monkeys. Int. J. Lepr. 50:584-585.
44. Muñoz-Rivas, G. (1977). Notes on the granulomatosis of the armadillo inoculated with M.leprae. Workshop on the armadillo: an animal model for reseach. Caracas Venezuela, May. - 23-27.
45. Narayanan, E., Manja, K., Kirchheimer, W.F., y Balusrebrshmanyam, M. (1972). Ocurrence of M.leprae in arthropods. - - Lepr. Rev. 43:194-198.
46. Narayanan, E., Manja, S., K. Bedi, B.M.S., Kirchheimer, W.F., y Balusrebrshmanyam, M. (1972). Arthroped feedings experi ments in lepromatous leprosy. Lepr. Rev. 43:181-187.
47. Packchanian, A. (1942). Reservoir hosts of Chagas' disease- in the State of Texas. Amer. J. Trop. Med. 22:623-631.
48. Pedley, J.C. (1970). Sumary of results of a search of the - skin surfece for Mycobacterium leprae. Lepr. Rev. 41:167- - 168.
49. Pedley, J.C. (1973). The nasal mucous in leprosy. Lepr. Rev. 44:33-35.

50. Peñafiel, Antonio. (1885). Nombres geográficos de México. - Catálogo alfabético. Oficina Tip. de la Secretaría de Fomento. México. Pág. 65.
51. Periaswani, P. (1968). The distribution of M. leprae in different structures of the skin. *Lepr. India.* 40:178-189.
52. Peters, W. (1864). Ueber neue arten der säugethier-gagattungen geomus, Haplodon und Dasypus. Monatsber. Acad. Wiss. -- Berlin 177.
53. Pinto, Cesar. (1944). Um ano de combate ás doencas parasitarias que atacam os rodoviários da estrada Rio-Bahía. 1942 a 1943. Mem. Inst. Os. Cruz. 40(3):209-340.
54. Prabhakaran, K., Harris, E.B., y Kirchheimer, W.F. (1976).- Binding of ¹⁴C-labelled dopa by Mycobacterium leprae in vitro. *Int. J. Lepr.* 44:58-64.
55. Quevedo, F., J. Lastra, y B. Martinez. (1977). The armadillo as a reservoir host of salmonella. (Preliminary communication).
56. Rabello, F.E. (1938). Faits nouveaux del immunologie de la lepre concecuences qui en decoulent pour notre conception de la maladie. *Bul. Soc. Fr. Dermat. Syphilingr.* 45:483.
57. Rees, R.F.W. (1971). Introductory review of leprosy research the impact of experimental human leprosy in the mouse -

- on the leprosy research. Int. J. Lepr. 39:201-215.
58. Rees, J. W. (1972). Can arthropods, transmit leprosy. Lepr. Rev. 46:255-256.
59. Rees, J. W. (1975). Do flies transmit leprosy. Lepr. Rev. - 46:255-256.
60. Ridley, D.S. (1958). Lepr. Rev. 29:45.
61. Ridley, D.S., y Jopling, W.H. (1962). A clasification of leprosy four research purposes. Lepr. Rev. 33:119-128.
62. Ridley, D.S., y Jopling, W.H. (1966). A clasification of leprosy according to immunity. A five group system. Int. J. - Lepr. 34:255-273.
63. Ridley, M.J., y Ridley, D.S. (1982). Unique expression of - HLA-DR (Ia-like) antigen in the lesions of polar tubercu--loid leprosy. Lepr. Rev. 53:249-252.
64. Russell, Robt, J. (1953). Description of a new armadillo -- (Dasypus novemvinctus) from México with remarks on geografic variation of the species. Poc. Biol. Soc. Wash. 66:21.
65. Russell, S. Weiser. (1976). Natural leprosy-like disease in armadillos: A boon to leprosy research. Hansen, 7:37-38.
66. Shankara Manja, K. (1972). Demostrarion of M.leprae and its viability in the peripheral blood of leprosy patients, Lepr.

- Rev. 43:181-187.
67. Shepard, C.C. (1960). The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot pods of mice. *J. Exp. Med.* 112:445-454.
68. Shepard, C.C., y Mc Rae, Dorothy, H. (1968). A method for counting acid-fast bacteria. *Int. J. Lepr.* 36:78-82.
69. Scholander, P.F., L. Irving, y S.W. Grinell. (1943). Respiration in the armadillo with possible implications as to its burrowing. *J. Cell. and Comp. Physiol.*, 21:53-63.
70. Simpson, G.G. (1929). Pleistocene mammalian fauna of the semi nule field. Pinellas country. Florida. *Bull. Amer. Mus.-Nat. Hist.* 56:561-599.
71. Smith, H.J., File, S.F. Nagy, B.A., Folse, D.S., Buckner, J.A., Webb, L.J., y Beverding, A.M. (1978). Leprosy-like disease of wild armadillos in French Acadiana. *J. Reticuloendothel. Soc.* 24:705-719.
72. Smith, H. Jerone, e Imaeda, Tomotsu. (1983). Leprosy in wild armadillos (Dasypus novemcinctus) of the Texas gulf Coast. Eighteenth U.S.-Japan Leprosy Research Conference National Institute of Health. Bethesda, Maryland. 249-258.
73. Stanford, J.L., Shield, M.J., Lord, R., y Rook, G.A.W. - --

- (1977). Therelationship of M.leprae to other Mycobacterias based on positive responses to skin tests in health persons. Leprosy Scientific Memoranda, Memo L-911.
74. Storrs, E.E., y Williams, Roger J. (1968). A study of monozfous quadruplet armadillos in relation to mammalian inheritance. Reprinted from the Proceeding of the National Academy of Sciences. 60:910-914.
75. Storrs, E.E. (1971). The nine-banded armadillo: A model for leprosy and other Biomedical Research. Int. J. Lepr. 39:703-714.
76. Szyfres, B., C.R. Solzer, y M.M. Galton. (1967). A new leptospiral serotype in the bataviae serogroup from Argentina. Trop. Geogr. Med. 19:344-346.
77. Talmage, R.V., y C.D. Buchanan. (1954). The armadillo (Dasy-
pus novemcinctus). A review of its natural history, ecology, anatomy and reproductive physiology the Rice Institute Pamphlet. Monograph in Biology. Volume XLI, Number 2. 1-135.
78. Terry A. Vaugham. (1972). Mamology. W.B. Saunders Company - Philadelphia, London, Toronto.
79. Torrealba, J.F. (1937). El primer caso de la enfermedad de Chagas diagnosticado en Zaraza por despistaje debido al ede

- ma monocular, conjuntivitis esquisotripanosomica "Signo de-Romaña". Gac. Med. Caracas, 44:221-323.
80. Torres, M. (1915). Alguns, fatos que interessam a epidemiologia du molestia du Chagas, Mem. Inst. O. Cruz, 7:120-138.
81. Villa, B. (1952). Mamiferos silvestres del valle de México. An. Inst. Biol. Méx. 23:269-492.
82. W.B. Petana. (1967). American trypanosomiasis in British Honduras. IV. Laboratory observations on *Triatoma dimidiata* -- (Hemiptera, Reduviidae) and its efficiency as a vector of - Chagas' disease in British Honduras. Ann. Trop. Med. Paras. 61:413-416.
83. Walsh, G.P., Burchfield, H.P., Cotrell, E.H., Vidrine, M.F., y Binford, C.H. (1975). Leprosy-like disease acring naturally in armadillos. J. Reticuloendothel Soc. 18:347-351.
84. Walsh, G.P., Storrs, E.E., Meyers, W.M., y Binford, C.H. -- (1977). Naturally acquired leprosy in nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*) Recent epidemiologic findings. J. Reticuloendothel Soc. 22:363-367.
85. Walsh, G.P., Meyers, W.M., Binford, C.H., Harris, L., Dero-ven, M., y Borne, R. (1977). Naturally acquired leprosy in- the armadillo: the presence of organisms in the milk and ma- mary glands of a lactating female. Leprosy Scientific Memo- randa, Memo L-931.