

**ADN DE *M. leprae* EN CONVIVIENTES DE PACIENTES CON LEPRA DE  
MUNICIPIOS CAUCANOS DE ALTA ENDEMICIDAD MEDIANTE PCR *-rlep*  
ANIDADA**

**LEYDI CATALINA VIVEROS-PALACIOS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
POPAYAN  
2010**

**ADN DE *M. leprae* EN CONVIVIENTES DE PACIENTES CON LEPROA DE MUNICIPIOS  
CAUCANOS DE ALTA ENDEMICIDAD MEDIANTE PCR *-rlep* ANIDADA**

**LEYDI CATALINA VIVEROS-PALACIOS**

**TRABAJO DE GRADO**

Para optar por el título de bióloga

**Directora:**

**MARIA LILIA DIAZ BETANCOURT**

**Médica especialista en Medicina Interna y Enfermedades Infecciosas  
Profesora del Departamento de Patología  
Facultad Ciencias de la Salud**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACION  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA  
POPAYAN  
2 010**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios: Gracias por ser mi vara, la fortaleza y la luz que ilumina siempre mi camino el que me conforta en toda prueba y nunca me ha abandonado.**

**A mis padres: Jaime Alberto y Elizabeth y hermanos, por su gran amor, comprensión, por ser mi apoyo y sustento en todo momento.**

**A Guido Ortiz: Gracias por estar...por ir conmigo.**

**A mi directora, la Dra. María Lilia Díaz: por darme la oportunidad de aprender y por sus enseñanzas.**

**A lo jurados, por sus importantes aportes y tolerancia**

**Dra. Isabel Dulcey, Dra. Marta Jacóme, Dr. Edgar Rodríguez Enfermera Magnolia Carvajal y Bióloga Mabel Bonilla por su contribución a la consecución de pacientes y toma de muestras.**

**Muchas gracias a la Bacterióloga Gloria Inés Avila, Auxiliar de Laboratorio Mirtha Elena Olave, las Biólogas Victoria Niño y Angela Torres, por su colaboración, apoyo, enseñanzas y amistad. Siempre las recordaré.**

**A los pacientes y convivientes que aceptaron participar en el estudio.**

**A las siguientes Instituciones y personas por la contribución y ayuda recibida para el desarrollo de la tesis:**

**Fundación Fontilles de España en convenio con la Asociación de Exalumnos de la Universidad del Cauca y al programa de Operación Comercial del Laboratorio e Inmunología y Biología Molecular del Departamento de Patología de la Universidad del Cauca, por la financiación.**

**Secretaria de Salud del Cauca por aporte económico para la financiación y colaboración del personal encargado del Programa de lepra.**

**Unidades de Atención de Nivel I de los municipios de Puerto Tejada, Padilla, Santander de Quilichao, Villa Rica, Mercaderes, Sucre, Bolívar, El tambo por el apoyo para la convocatoria y examen de pacientes y convivientes.**

**Bacterióloga Oriana Rivera por la contribución en la lectura de las baciloscopias.**

**Laboratorio de Patología. Universidad del Cauca, en especial al Dr. Harold Bolaños, por la participación en la lectura de las biopsias.**

**Al profesor Víctor Campo por su colaboración en los análisis estadísticos.**

**Dra. Martha Inírida Guerrero; Dra. Clara Inés León y Dra. Nora Cardona por donación de ADN de *M.leprae*.**

**A la Universidad y cada uno de los profesores de Biología y a todas las personas que me orientaron en el transcurso de la carrera y me ayudaron a culminar una etapa de mi vida.**

## CONTENIDO

	Pág.
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>13</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>17</b>
<b>2. HIPOTESIS</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
<b>4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	<b>23</b>
4.1 GENERALIDADES	23
4.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE <i>M. leprae</i>	23
4.3. EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN	24
4.4 PRESENTACIÓN CLINICA Y CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN	27
4.4.1 Clasificación de la OMS.	28
4.4.2 Clasificación inmunológica.	28
4.4.3 Clasificación de Ridney y Jopling	29
4.4.4 Infección Subclínica.	31

4.5. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN	31
4.6. TRANSMISIÓN DE <i>M. leprae</i>	31
4.7 FACTORES DE RIESGO	32
4.8 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN	36
4.8.1 Diagnóstico clínico.	36
4.8.2 Diagnóstico Microbiológico.	37
4.8.3 Diagnóstico histopatológico.	39
4.8.4 Pruebas serológicas.	40
4.8.5 Diagnóstico mediante pruebas moleculares.	42
4.8.6 Principios básicos de la PCR.	44
4.8.7 La PCR anidada.	45
4.8.8. Detección del ADN amplificado	45
4.8.9 La secuencia repetitiva <i>rlp</i>	46
4.9    DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DE <i>M. leprae</i> Y SU UTILIDAD EN EL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN	53
4.9.1 Diagnóstico basado en la respuesta inmunológica del huésped.	53
4.9.2 Métodos moleculares.	55
<b>5.    METODOLOGIA</b>	<b>62</b>
5.1    TIPO DE ESTUDIO	62
5.2    POBLACIÓN DE ESTUDIO	62
5.3    DEFINICION DE LA POBLACION	63
5.4    CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSION	64
5.4.1    Criterios de Inclusión.	64
5.4.2    Criterios de Exclusión.	64
5.5    PROCEDIMIENTOS	64
5.5.1    Consideraciones éticas	64
5.5.2    Recursos humanos	64
5.5.3    Recolección de datos y obtención de muestras clínicas	64
5.6    PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO.	66

5.6.1 Baciloscopia.	67
5.6.2 Extracción de ADN	67
5.6.3 Amplificación de ADN.	67
5.6.5 Detección del producto amplificado.	68
5.6.6 Detección de Inhibición.	69
5.7. ANALISIS ESTADISTICO.	69
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>71</b>
6.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE CASOS INDICES Y CONVIVIENTES	71
6.2 VARIABLES CLÍNICAS DE LOS CASOS ÍNDICES	73
6.3 VARIABLES CLINICAS EN CONVIVIENTES	74
6.4 VARIABLES DE CONVIVENCIA	75
6.5 DETECCIÓN DE DE <i>M.leprae</i> MEDIANTE BACILOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA EN CASOS INDICES Y CONVIVIENTES	76
6.6 DETECCIÓN DE ADN DE <i>M.leprae</i> MEDIANTE PCR- <i>rlep</i> ANIDADA	76
6.7 PCR <i>rlep</i> ANIDADA EN CASOS ÍNDICES	76
6.8. PCR <i>rlep</i> ANIDADA EN CONVIVIENTES	77
6.9 ASOCIACIÓN DE LA POSITIVIDAD DE LA PCR <i>rlep</i> ANIDADA EN CONVIVIENTES CON VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y DE CONVIVENCIA CON EL CASO INDICE	78
<b>7. DISCUSIÓN</b>	<b>81</b>
<b>8. CONCLUSION</b>	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>95</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Índice bacilar en la enfermedad de Hansen para Colombia.....	39
Tabla 2. Resumen de antecedentes de la aplicación de la PCR para detectar ADN de <i>M.leprae</i> en convivientes.....	60
Tabla 3. Oligonucleótidos de la <i>rlep</i> .....	68
Tabla 4. Municipios de procedencia de casos índices y convivientes.....	71
Tabla 5. Características sociodemográficas de casos índices y convivientes .....	72
Tabla 6. Variables clínicas de los casos índices. ....	73
Tabla 7. Variables clínicas de los convivientes .....	74
Tabla 8. Variables de convivencia.....	75
Tabla 9. Relación de parentesco de los convivientes con el caso índice.....	75
Tabla 10. Resultados de la PCR en diferentes muestras de los casos índices .....	77
Tabla 11. Resultados de la PCR en los casos índices.....	77
Tabla 12. Relación del resultado de la PCR en casos índices con el tipo de enfermedad y el estado clínico al momento de inclusión en el estudio.....	77
Tabla 13. Resultados de la PCR en diferentes muestras de los convivientes .....	78
Tabla 14. Resultados de la PCR en los convivientes.....	78
Tabla 15. Distribución de la positividad de la PCR según los municipios .....	78
Tabla 16. Distribución de la positividad de la PCR según el rango de edad.....	79
Tabla 17. Distribución de variables clínicas y de duración del tratamiento de casos índices asociada según los resultados de la PCR en convivientes .....	79
Tabla 18. Distribución de variables sociodemográficas y clínicas entre convivientes según resultado de la PCR .....	79
Tabla 19. Distribución de las variables continuas cuantitativas entre convivientes según resultado de la PCR .....	80

## LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Globias de <i>M. leprae</i> .....	24
Figura 2. Distribución de la lepra a nivel mundial (P.R: Prevalencia).....	26
Figura 3. Incidencia (100 habitantes) de la Lepra 1998-2010 .....	26
Figura 4. Incidencia de la enfermedad de Hansen en Colombia.....	27
Figura 5. Clasificación de la lepra según el estado inmunológico (Escala de Ridley y Joppling) .....	29
Figura 6. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Hansen .....	30
Figura 7. Tinción de Zielh Nielsen para <i>Mycobacterium leprae</i> .....	38
Figura 8. Modelo esquemático de la pared celular de <i>M. leprae</i> con presencia de PGL- 1 en la cápsula. ....	42
Figura 9. Esquema de reacción de la PCR anidada. ....	45
Figura 10. Municipios con casos de lepra en el Departamento del Cauca. ....	62
Figura 11. Lámina para baciloscopia .....	65
Figura 12 Procedimientos toma de muestras.....	66
Figura 13. Diagrama de Flujo .....	70
Figura 14. Seguridad social de casos índice.....	72
Figura 15. Ocupaciones de los casos índices .....	72
Figura 16. Afiliación a la seguridad social en convivientes. ....	73
Figura 17. Ocupaciones de los convivientes.....	73
Figura 18 Compromiso de los órganos y nervios del sistema nervioso periférico en casos índices .....	74



## LISTA DE ANEXOS

	<b>pág</b>
Anexo A. Consentimiento Informado	95
Anexo B. Formato historia clinica de caso índice	96
Anexo C. Formato Historia Clinica de contactos	98
Anexo D. Formato historia clinica en el momento del diagnóstico del caso índice	100

## RESUMEN

La lepra es una enfermedad infecto-contagiosa, es causa de discapacidad severa y discriminación social. Se ha estimado que la prevalencia global de la lepra se ha reducido en un 90% como resultado de la implementación de la terapia multidroga (TMD), pero a pesar de las estrategias para su control se mantiene la incidencia y en algunos países en vía de desarrollo es un problema de salud pública. A nivel global para el 2008 se diagnosticaron 249 007 casos nuevos de lepra (WHO, 2010). Colombia cumple con la meta de eliminación ( $1 < 10\ 000$  habitantes), no obstante en algunas regiones continúa la aparición de casos nuevos, lo cual sugiere que existe la infección subclínica y la transmisión del activa de *M.leprae*. Se ha estimado que los convivientes de pacientes MB y PB especialmente en casos no tratados, tienen mayor probabilidad de infectarse y/o desarrollar la enfermedad que la población en general y además constituir un reservorio que los convierte en foco de diseminación de bacilo.

Los métodos disponibles para el diagnóstico de lepra son pocos, éste generalmente se realiza mediante el examen clínico que suelen ser inespecífico, además el agente etiológico no es cultivable *in vitro*. Los métodos microbiológicos (la baciloscopia) mediante la tinción de Ziehl-Neelsen es poco sensible y específica, permite la observación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR) en muestras de linfa del lóbulo de la oreja/lesiones de piel o linfa codo, rodilla y moco nasal cuando estos se encuentran en una cantidad menor a 5 000 – 10 000/ mL de muestra; otro método al cual se recurre cuando la baciloscopia es negativa es la histopatología de la piel o el nervio, que en ocasiones puede mostrar algunas alteraciones inmunohistológicas que pueden ser inespecíficas. En resumen estas pruebas son positivas generalmente en casos MB pero en las formas PB y en las subclínicas tienen limitaciones.

Para mejorar el diagnóstico se ha desarrollado los métodos moleculares como la PCR que puede detectar entre 10 a 100 bacilos y es específica en un 100% y la metodología de PCR anidada detecta menor cantidad de ADN.

El grupo de Investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca (GINIIN), estandarizó previamente en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular, una técnica de PCR anidada que amplifica un fragmento de 99 pb dentro de uno de 129pb de la secuencia *rlep*, encontrando que la prueba detecta hasta 1 fg de ADN de la micobacteria en forma específica. Esta investigación se desarrolló para determinar la proporción de DNA de *M.leprae* en convivientes de pacientes de lepra en municipios caucanos con alta endemicidad y determinar las posibles variables asociadas a la positividad de la PCR. Se estudiaron 111 convivientes de 38 pacientes, de los cuales 39,6% son menores a 15 años. La PCR fue positiva en al menos una muestra en 35,1% de los convivientes, el 35,8% de PCR positivos corresponde a los menores a 15 años y 31,8% entre los menores a 15 tienen PCR positiva. Con relación al tipo de muestra, la PCR fue positiva en 23,2% de 99 orinas, 12, 3% de 106 mocos nasales, 15,2 % de 33 linfas de oreja y 37,5% de 8 linfas de lesión mientras que la baciloscopia fue negativa en todos los casos con una frecuencia de detección igual a cero.

La PCR positiva en al menos una muestra fue más frecuente a una mayor edad, a mayor tiempo de convivencia y a mayor tiempo transcurrido desde el diagnóstico del caso índice a la toma de la muestras, aunque no se encontró diferencia estadísticamente significativa. La PCR fue más frecuentemente positiva en el género masculino con 43,8% versus en el femenino, en los individuos procedentes del área rural (37,9% versus 32,1%), en los que comparte habitación con el caso índice (40,4% versus 29%), en conyugue y nieto con 42,9% versus otro tipo de relación) y en los no vacunados con BCG (47,4% versus 34,5%), no obstante la diferencia no mostró significancia estadística. Se concluye que la PCR *rlep* anidada es una buena herramienta para detectar ADN de *M .leprae*. Existe una proporción alta de convivientes con DNA de *M.leprae*. Los niños constituyen aproximadamente la tercera parte de los PCR positivos y están infectados en una tercera parte. Estos datos causan preocupación, por lo que es necesario realizar el seguimiento a esta población y determinar la relación entre la positividad del PCR y el riesgo de desarrollar lepra.

## INTRODUCCIÓN

La lepra (hanseniasis o enfermedad de Hansen), es una infección contagiosa, granulomatosa - crónica, no hereditaria, pero con susceptibilidad genética para desarrollarla; endémica en muchos países, especialmente en India y Brasil; producida por *Mycobacterium leprae* (*M.leprae*) un microorganismo, con forma de bacilo que se caracteriza por ser ácido alcohol resistente (BAAR) (Katoch, 2002). El bacilo fue descubierto por el Noruego Armauer Hansen en 1873 (Rees, 1985). *M. leprae* infecta primordialmente macrófagos y células de Schwann; afecta la piel, nervios periféricos y otros órganos como: mucosas, ojos, testículos, tracto respiratorio alto, músculos y huesos (Antumaño, 1998), también es causa de discapacidad física y rechazo social.

La enfermedad de Hansen es muy antigua y es un problema de salud pública en el mundo, especialmente es países en vía de desarrollo. Desde el siglo pasado en los años 80's, el número de casos a nivel mundial han disminuido en un 90%, gracias a la introducción de la terapia multidroga (TMD) (OMS, 1985). La Organización Mundial de la Salud (OMS) desde el año 1991 ha propuesto como meta la disminución de la tasa de prevalencia a nivel mundial a menos de un caso por cada 10.000 habitantes. Esta se pretende alcanzar en el año 2010, debido a que la incidencia (ocurrencia de los nuevos casos) oscila entre 500.000 - 700.000 casos por año, donde 120. 000 de ellos son niños, lo que refleja la transmisión activa del bacilo (WHO, 2003). En Colombia, la enfermedad de Hansen se encuentra en fase de post- eliminación (WHO, 2001), con una prevalencia de 0,8/10 000 habitantes, sin embargo su incidencia ha estado entre 650 - 850 casos nuevos por año en los últimos 10 años, en el año 2006 la incidencia fue 0,98 casos por cada 100 mil habitantes, más del 85% de los casos nuevos en Colombia son de tipo multibacilar y el 3,5% del total de casos reportados en el país corresponde a menores de 15 años (Ministerio de Protección social, 2008).

La enfermedad de Hansen presenta manifestaciones clínicas, histológicas e inmunológicas variadas que van desde el polo tuberculoide hasta el polo lepromatoso. La

OMS la clasifica como paucibacilar (PB)<sup>1</sup> o multibacilar (MB)<sup>2</sup>, otra forma de clasificación es según la escala de Ridley y Jopling, que tiene en cuenta criterios clínicos, histológicos e inmunológicos

El bacilo de *M. leprae*, es transmitido predominantemente de humano a humano por vía respiratoria específicamente en secreciones oronasales (Noordeen *et al*, 1994), aunque se sugieren la existencia de reservorios como el armadillo y el ambiente. Los pacientes sin tratamiento son la principal fuente de diseminación, se estima que los MB infectan de 5 a 8 veces más que los PB (Fine *et al.*, 1997).

En una comunidad endémica la mayoría de la población presenta evidencias de exposición a *M. leprae*, lo cual depende de las oportunidades de contacto con la bacteria, de la respuesta inmunológica de cada individuo expuesto, de las condiciones nutricionales, el hacinamiento y la higiene. Solo se enferman el 1 % (Rupendra *et al.*, 2001) y se incrementa el riesgo a 5 -10% si se convive con el paciente leproso (Mandell y Bennett, 2002 y Van Beers, 1996). El porcentaje restante presentan infección subclínica, es decir que la bacteria permanece en el huésped sin lesiones visibles y tiende hacia la cura. Esta población también puede transmitir la bacteria (Cree y Smith, 1998).

La enfermedad de Hansen se diagnóstica mediante las manifestaciones clínicas las cuales pueden ser inespecíficas, la baciloscopia y el examen histopatológico. La baciloscopia se refiere al examen microscópico en muestras de moco nasal, linfa del lóbulo de la oreja y/o lesión utilizando la tinción Ziehl-Neelsen y el examen histopatológico se basa en la observación microscópica de los tejidos empleando la tinción de Fite-Faraco. Estas pruebas son positivas generalmente en casos MB pero en las formas PB y en las subclínicas tienen limitaciones (Bathia *et al*, 2000 y Cedaro, Miranda y Gorodner, 2006 ); por esta razón en el siglo pasado desde finales de los 80's, con el fin de mejorar el diagnóstico, se han desarrollado métodos moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR siglas en inglés), las pruebas serológicas como la ELISA y pruebas rápidas para la detección de anticuerpos, Inmunoglobulinas M (IgM) contra el glicolípido fenólico 1 (PGL-1) (Buhrer-Sekula *et al*, 2003).

---

<sup>1</sup> PB: Presenta cinco o menos manchas e índice bacilar negativo según OMS

<sup>2</sup> MB: Presenta cinco o mas manchas y el índice bacilar es positivo según OMS .

La PCR cumple con condiciones de alta sensibilidad, especificidad y rapidez (De wit, 1991 y Klatser 1993); especialmente en microorganismos no cultivables *in vitro* como *M. leprae*, puede ser aplicada en diferentes muestras clínicas (moco nasal, linfa, biopsias, sangre, entre otras) tanto en pacientes de lepra con y sin tratamiento como en sus contactos convivientes. Esta técnica tiene 100 % especificidad, sin embargo la sensibilidad ha variado (detección entre 10 a 100 bacilos), según las metodologías de extracción, el fragmento amplificado, el protocolo de amplificación y detección de los productos usados.

Para identificar *M. leprae* por PCR se han utilizado oligonucleótidos cebadores (primers) para amplificar fragmentos de los genes entre ellos: 15 kDa, 18 kDa, 36 kDa, 65 kDa, la secuencia repetitiva (*rlep*), la subunidad 16S del ARNr y la enzima superóxido-dismutasa (Scollard *et al*, 2006).

Una modificación de la técnica, la PCR anidada es capaz de detectar menos cantidad de ADN hasta 3fg, como lo demostró el estudio realizado por Plicatys, Gelber y Shinnick, 1990, quienes utilizaron primers que codifican para la secuencia de 65 kDa y amplificaron un fragmento de 347 pb dentro de uno de 547pb. La PCR anidada con primers para la secuencia repetitiva (*rlep*) la cual se encuentra repetida 28 veces en cromosoma de *M leprae*, amplifican fragmentos cortos entre 130 y 99 pb, ofrece ventajas en cuanto a su capacidad para detectar infecciones subclínicas y enfermedad PB, se ha comprobado que es 10 a 1000 veces más sensibles que la PCR basada en los genes 18kDa y 36kDa respectivamente. (Donogue, Holton and Spigelman, 2001).

En el Departamento del Cauca la prevalencia de la enfermedad de Hansen desde el año 1999 hasta 2007 ha oscilado entre 0.18 y 0.27 /10 000 habitantes, datos que corresponden a la tasa de eliminación, sin embargo algunos municipios como Puerto Tejada, Padilla, Mercaderes, Sucre, Bolívar muestran prevalencia mayores a 1/10 000 habitantes (DDSC, 2008), lo cual sugiere que hay transmisión activa del bacilo que mantiene la aparición de casos nuevos, fenómeno en el cual podrían estar implicados los convivientes infectados y sugiere la necesidad de estudiar el problema con el fin de definir estrategias que contribuyan a su control.

El grupo de Investigación en Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca (GINIIN) estandarizó previamente en el Laboratorio de Inmunología y Biología

Molecular una técnica de PCR anidada que amplifica un fragmento de 99 pb dentro de uno de 129pb de la secuencia *rlep*, encontrando que la prueba detecta hasta 1 fg de ADN de la micobacteria en forma específica. El presente estudio se realizó para detectar ADN de *M.leprae* en contactos convivientes de pacientes diagnosticados entre los años 2001-2007, mediante PCR *rlep* anidada y comparar estos resultados con las metodologías de diagnóstico tradicional y determinar las posibles variables asociadas a la positividad de la PCR.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Según la Organización Mundial de la salud (OMS) los casos de la Enfermedad de Hansen a nivel mundial han descendido casi 90% a partir de 1985, debido a la implementación de la terapia multidroga (TMD) y de las propuestas sugeridas por la OMS desde 1991 hasta la actualidad para eliminar la lepra (1 caso por 10 000 habitantes). Desde ese entonces más de 14 millones de pacientes han sido curados.

A nivel mundial durante el año 2003, se detectaron 500 000 pacientes, en el 2004 unos 490 000 casos nuevos, en el 2005, 290 000 y en año 2007 se presentaron 254,525 casos nuevos de lepra (excluyendo los pocos casos detectados en Europa) (WHO, 2010) mostrándonos que posiblemente seguirán apareciendo casos nuevos, especialmente en las regiones donde la enfermedad es endémica.

En Colombia la tasa de eliminación se logró en el año de 1997, razón por la cual se considera en fase de post eliminación (WHO, 2001). Para el año 2007 según el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila), se registró una incidencia de 0,98 X 100 000 habitantes correspondientes a 431 casos; más de 85% de estos son de tipo MB y el 3.5 % son niños menores de 15 años. Para el Departamento del Cauca la prevalencia entre los años 2001 – 2007, ha fluctuado entre 0.18 y 0.27/10 000 habitantes, sin embargo existen algunos municipios con tasas de prevalencia entre 1.12 y 4.04 /10 000 habitantes, entre ellos los municipios de: Puerto Tejada, Padilla, Mercaderes (Secretaría departamental de Salud del Cauca, 2008). Los anteriores datos muestran que Colombia a pesar, que a nivel global cumple con la tasa de eliminación, en algunas regiones del país continúa la aparición de casos nuevos y persiste la transmisión activa de *M.leprae*, siendo necesario avanzar en el conocimiento referente a la bacteria, la respuesta inmune, el hospedero y la transmisión.

La enfermedad de Hansen tiene características clínicas muy variadas, es causa de discapacidad física permanente, discriminación social y genera problemas psicológicos; el diagnóstico es difícil, especialmente cuando la enfermedad está en sus primeras etapas,



ya que los síntomas no son visibles o se confunde con otras patologías dermatológicas. Los métodos disponibles para su diagnóstico son pocos: El agente etiológico no es cultivable *in vitro*, la microscopia permite la observación de bacilos ácido alcohol resistentes (BAAR), en muestras de linfa del lóbulo de la oreja/lesiones de piel o linfa codo, rodilla y moco nasal (Baciloscopia), se caracteriza por tener baja sensibilidad, requiere aproximadamente 10 000 bacilos/ml o gramo de muestra para ser positivas. Otro examen es el análisis histopatológico de la piel o el nervio, que en ocasiones puede mostrar algunas alteraciones inmunohistológicas que pueden ser inespecíficas. Estos métodos diagnósticos son métodos simples de realizar aunque en muchas personas con síntomas clínicos no es posible detectar el bacilo y el diagnóstico queda sustentado sobre bases clínicas

El mayor riesgo de transmisión de *M.leprae* está asociado a la convivencia con los pacientes. Según Fine (1997), los convivientes tienen mayor probabilidad de infectarse y/o desarrollar la enfermedad que la población en general, ya que tiene una exposición continua a esta micobacteria, como lo corrobora el estudio realizado por Shumin, *et al.*, 2003, quienes encontraron que 252 de 547 casos lepra diagnosticados entre 1999 y 2001 en China, habían tenido contacto con algún caso de lepra y entre ellos 90 habían sido convivientes. También se incrementa el riesgo de enfermar según el tipo de paciente, se ha encontrado que el riesgo de enfermar es 2 veces más si se es contacto de paciente PB y de 5 a 10 veces si se convive con enfermo MB (Douglas *et al.*, 1987; Beers *et al.*, 1999 y Douglas *et al.*, 2004), por ello es de vital importancia realizar el seguimiento a los convivientes.

Por otra parte, en los individuos infectados pero asintomáticos, no es posible establecer la infección con los métodos convencionales (baciloscopia), sin embargo estos tienen riesgo de enfermar y constituirse en un reservorio para futuros casos o también contribuir a mantener la transmisión, ya que pueden desarrollar una fase bacilífera de la infección primaria, localizada en la mucosa nasal. El desarrollo de la enfermedad puede tardar entre 2-23 años debido al lento crecimiento de *M.leprae* (Cree and Smith, 1998, Shumin, *et al.*, 2003).

Se ha intentado algunos métodos para determinar tempranamente la enfermedad y estado de infección, uno es la detección en el suero de anticuerpos contra el antígeno

PGL-1, específico de *M.leprae*. Esta prueba en pacientes sin tratamiento multibacilares es positiva por encima del 90% y en paucibacilares detecta entre 30% y el 60 % de los casos (Anonymous, 1986). En convivientes la positividad de esta prueba varía entre 1.7 % a 54.1% (Bakker *et al.*, 2004; Gourelad *et al.*, 2007; Cardona, *et al.*, 2008), aunque no permite distinguir entre la infección pasada y reciente; también ha mostrado seropositividad en individuos de zonas endémicas no contactos de pacientes, sin poder determinar si se debe a la exposición a *M.leprae* o a micobacterias ambientales (Beers, Hatta, Klatser, 1999).

Otros métodos implementados para identificar *M.leprae* están basados en la Biología molecular, que incluye la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus modificaciones como la PCR anidada, empleando diversos fragmentos de genes entre ellos la secuencia repetitiva (*rlep*), mostrando ser más eficientes para la detección de pacientes sospechoso de la enfermedad de Hansen, casos PB o de infección subclínica. En individuos asintomáticos convivientes de pacientes la PCR ha encontrado ADN de *M.leprae* entre un 4% y 10 % en muestras moco nasal, biopsia de mucosa nasal y sangre (Patrocínio *et al.*, 2005; Klaster *et al.*, 1993; Job *et al.*, 2008) y se ha identificado portadores nasales entre el 5% y el 27% en individuos saludables que viven comunidades endémicas (Izumi, 1999).

En Colombia la Guía de Atención de la Lepra del Ministerio de Protección Social (2008), contempla el seguimiento clínico y período de los convivientes cada 6 meses durante 10 años, sin embargo esta estrategia no es aplicada puntualmente por sistema de Salud, como lo demostraron Cardona-castro, *et al.*, 2005, quienes encontraron convivientes de pacientes con lepra MB que presentaban síntomas desde un año antes de esta investigación, sin que hubieran sido detectados por el Sistema. Los autores sugirieron la necesidad de la aplicación de pruebas diagnósticas más eficientes que permitan detectar las personas con riesgo de infección y de enfermar , lo cual fue propuesto también por la OMS (2006) para cumplir con el objetivo de eliminar la lepra para el año 2010 (1<10 000 habitantes). Es importante avanzar en este aspecto en nuestra región, especialmente en las zonas de alta incidencia.

Para avanzar en el conocimiento de la transmisión de infección en los municipios del Cauca donde la enfermedad de Hansen es altamente endémica, el presente estudio

pretende responder siguientes interrogantes: ¿Es posible detectar ADN de *M. leprae* en contactos convivientes de pacientes con lepra diagnosticados en los municipios de alta endemividad en el Departamento del Cauca empleando la técnica de la PCR-*rlep* anidada?, ¿Existe una correlación entre la positividad de la PCR-*rlep* anidada y otras variables asociadas con la transmisión? y ¿Existe diferencia en la probabilidad de encontrar positividad de la PCR *rlep* según el tipo de muestra analizada en los convivientes?

## 2. HIPOTESIS

**Ho:** En los convivientes de pacientes diagnosticados de los municipios del alta endemicidad del Departamento del Cauca se encuentra ADN de *M.leprae*, la cual puede ser detectada empleando la PCR *rlep* anidada y además existen factores sociodemográficos y/o clínicos asociados a la positividad de la prueba.

**Hi:** La PCR *rlep* anidada no detecta ADN en los convivientes de pacientes diagnosticados, en los municipios de alta endemicidad del Departamento del Cauca y no existen factores sociodemográficos y/o clínicos asociados a la positividad de la prueba.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Detectar la presencia de ADN de *M.leprae* en convivientes de pacientes diagnosticados con lepra en municipios endémicos del departamento del Cauca entre los años 2001 a 2007 mediante la PCR-*rlep* anidada.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Determinar la frecuencia de ADN *M. leprae* en muestras clínicas de convivientes mediante PCR – *rlep* anidada.
- Comparar la detección de la presencia de *M. leprae* en convivientes mediante baciloscopia y PCR - *rlep* anidada.
- Establecer la relación entre el perfil sociodemográfico y clínico de los pacientes y convivientes y la positividad para el ADN en convivientes.

## 4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 4.1 GENERALIDADES

La palabra lepra proviene del griego UKHEDU (escama), es una enfermedad muy antigua que data desde los 2000 años a. C y ha acompañando a las sociedades a través del tiempo. Su aparición ha tenido diferentes concepciones: castigo, maldición, plaga, muy contagiosa e incurable. Se propagó por diferentes países entre ellos: India, China, Grecia, Roma, España y el resto de países Europeos. Entre los siglos XVI y XVIII se diseminó al nuevo continente y llegó a lugares como: Brasil, Colombia, Venezuela, Ecuador, Cuba, México y Estados Unidos. (Gonzales, 1963 y Manual para la vigilancia epidemiológica de la lepra, 2004).

El Hansen es una infección, crónica-granulomatosa, asociada a susceptibilidad genética, es de larga evolución, afecta múltiples órganos, principalmente los nervios periféricos, la piel, el tracto respiratorio, la mucosa respiratoria superior, los testículos, causa pérdida progresiva y traumática de manos, pies y daño ocular grave, tanto que es considerada como la tercera causa de ceguera en el mundo (De wit *et al.*, 1991), genera deformaciones, discapacidades físicas, que limitan el desempeño en la sociedad.

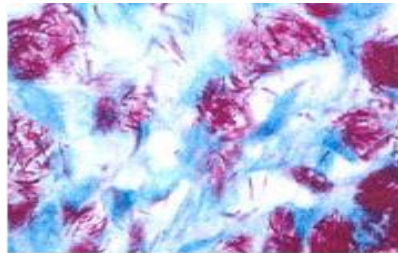
### 4.2 UBICACIÓN TAXONÓMICA Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *M. leprae*

El género *Mycobacterium* se pueden clasificar como: Micobacterias no cultivables o muy difícilmente cultivables (*M. leprae* y *M. lepraemurium*) y el grupo de micobacterias cultivables (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* y *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. fortuitum*, etc).

*Mycobacterium leprae* se clasifica en el suborden Corynebacterinae, orden Actinomycetales, subclase Actinobacteridae, clase Actinobacteria, división Firmacutes, miembro de la familia Mycobacteriaceae, (Aranzazu,1994 y Stackebrandt *et al.*, 1997); fue descubierta por Amaeur Hansen en 1873, es la primera bacteria asociada con enfermedad en el humano, único huésped que la desarrolla (Rees,1985); presenta forma

de bacilo, mide aproximadamente entre 8 x 0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$  y tiene gran cantidad de ácidos micólicos en la pared celular, los cuales la hacen resistente a la decoloración con alcohol ácido después de ser teñidos con fucshina básica fenicada (tinción de Ziehl-Neelsen), método utilizado para la visualización en el microscopio.

*M. leprae*, es un microorganismo patógeno intracelular obligado, inmóvil, se divide por fisión binaria; con un tiempo de generación de 12 a 14 días, la temperatura óptima de crecimiento oscila entre 27-30 °C, prolifera principalmente en macrófagos, produciendo en ellos cambios lipídicos intracelulares que los transforma en las denominados células espumosas de Virchow, también prolifera en las células endoteliales y en la superficie de los nervios periféricos especialmente en células de Schwann y prefiere las zonas frías del cuerpo como son: nariz, piel, orejas; secreta una sustancia conocida como glea, que le permite la formación de globias; es decir; bacilos agrupados paralelamente unos a los otros (Figura 1). El período de incubación es bastante amplio, oscila entre 6 meses y 20 años, por consiguiente los síntomas tardan en aparecer (Anónimo, 1996; Chimenos *et al.*, 2006 y Gouillard and Gouillard, 2008), no ha sido posible cultivarla en medios artificiales e *In vivo* se cultiva en almohadilla plantar de ratones inmunodeficientes o en armadillos de ochos bandas (*Dasypus sabanicolas*) y nueve bandas (*Dasypus novemmcyntus*).



**Figura 1. Globias de *M. leprae***  
Fuente: Suárez, 2007.

Los ácidos nucleicos, como todos los procariontes, las micobacterias poseen ADN, es rico en guanina y citosina de las cuales contiene 55%. El tamaño del genoma es el más pequeño del genero con 1.3-1.8 x10<sup>9</sup> daltons.

#### **4.3 EPIDEMIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN**

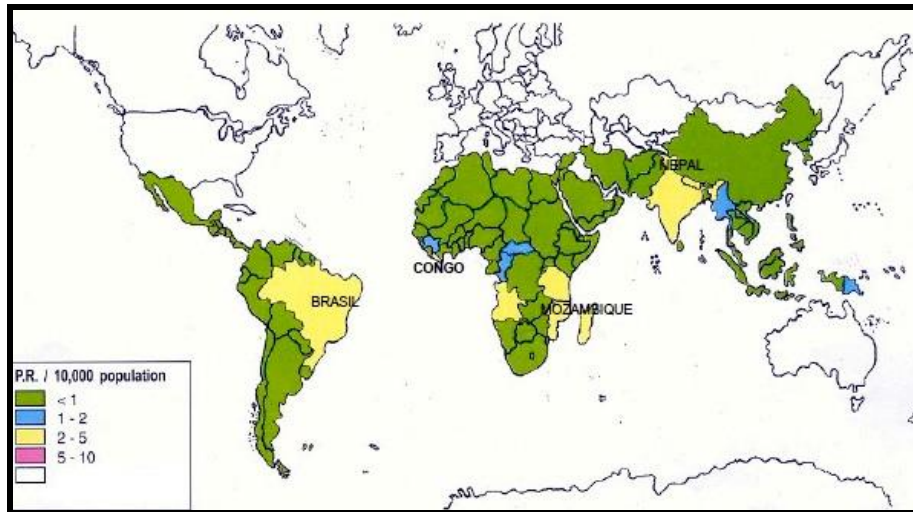
La enfermedad de Hansen ha sido introducida en diferentes lugares del planeta aún en épocas recientes, sin embargo su comportamiento no ha sido igual en todos los lugares.

Las epidemias de la enfermedad de Hansen se produjeron a partir del siglo XIV con índices de prevalencias que se elevaban bruscamente entre el 10 y 30% en regiones como: Nauru, Ponape, Truk, Hawaii, Irían Jaya y el Este de Nigeria. Entre los siglos XIX y XX se presentó una pandemia y la prevalencia de la lepra en el mundo era bastante elevada.

Para detener el avance de la enfermedad de Hansen en 1981, se reunió en Ginebra un grupo de estudio sobre quimioterapia de la OMS, quienes recomendaron la terapia multidroga (TMD) para los pacientes PB como MB. Gracias a la implementación de esta medida a partir de 1985 y a la propuesta de la OMS desde 1991 de eliminar la lepra (definida como menos de un caso por 10 000 habitantes), se ha logrado este objetivo en 113 de 122 países considerados endémicos, lo cual se refleja en la reducción de la prevalencia de 21,1 a 1, 25 por 10 000 habitantes (WHO, 2004), sin embargo en algunos países distribuidos en África, Asia y Latinoamérica como son: India, Brasil, Nepal, Madagascar, Mozambique y Myanmar, todavía existe como un problema de salud pública, (Organización Mundial de la Salud, 2006, Figura 2); estos representan el 75% de la carga mundial de la enfermedad. Para el período 2006-2010 la OMS presentó la “Estrategia Mundial para aliviar la carga de la lepra y sostener las actividades de control de la enfermedad, esta estrategia enfatiza en la necesidad de alcanzar una gran calidad en el diagnóstico, el tratamiento, el registro y la notificación de los casos en todas las comunidades endémicas. A nivel mundial el número de casos nuevos de lepra notificados a la OMS en el 2008, fue de 249 007, mostrando una reducción en la incidencia del 4% con respecto al 2007 (254 525 casos) (WHO, 2010).

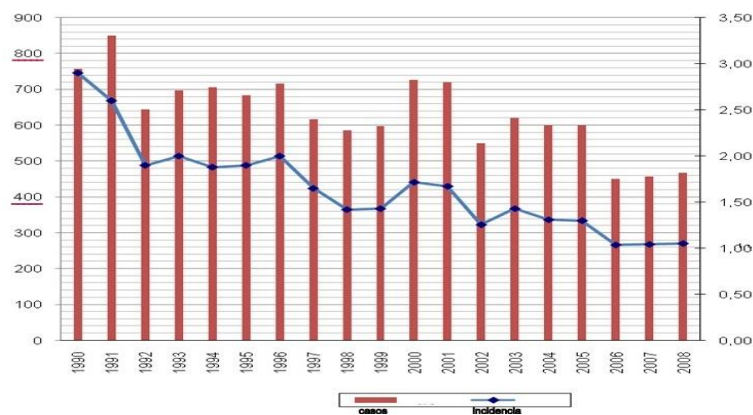
En América Latina la detección anual de casos informada a la Organización Panamericana de Salud, alcanzó un valor máximo de 804 000 en 1998, en el 2002 se estabilizó a aproximadamente 621 000, en el 2003, 515 000, en el 2004, 410. 000, en el 2005, 290. 000 casos, en el 2007, se detectaron 47.612 casos nuevos de estos el 8% son niños menores de 15 años y un 53% pacientes MB (OPS, 2007).





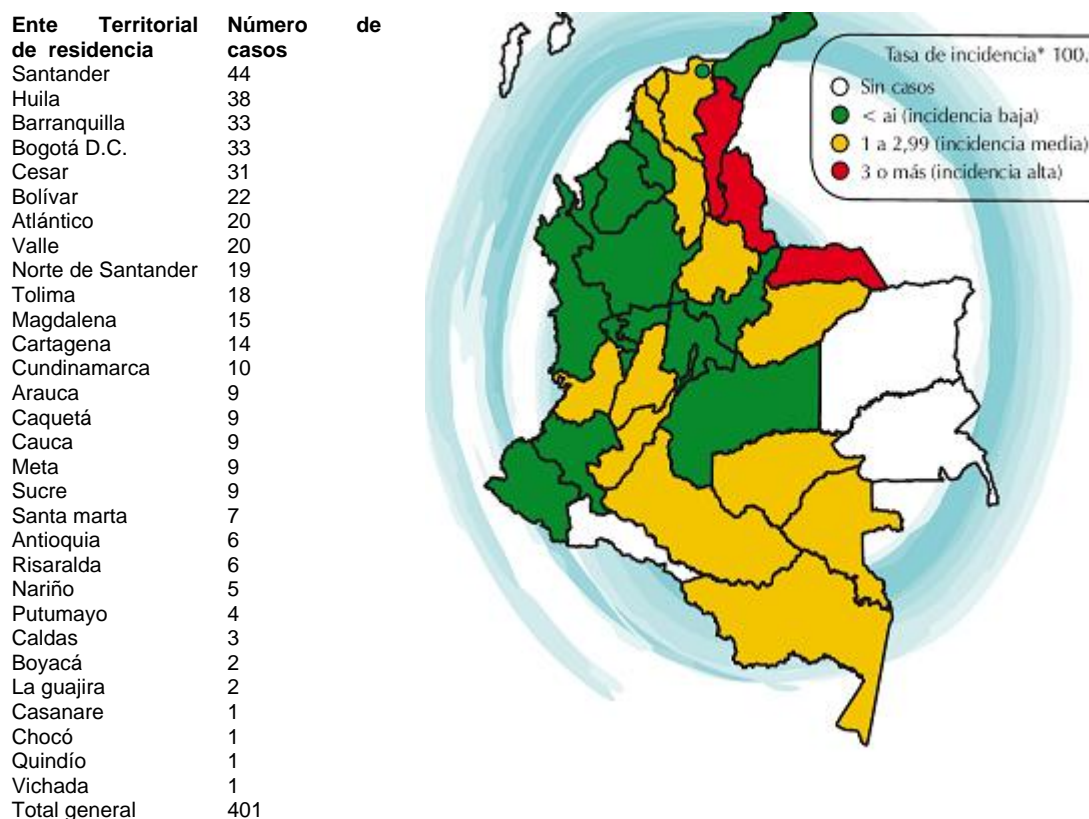
**Figura 2. Distribución de la lepra a nivel mundial (P.R: Prevalencia/ 10 000 habitantes)**  
Fuente: OMS, 2006

En Colombia la enfermedad de Hansen se propagó entre los siglos XVI y XVII llegando a considerarse una epidemia en la década de 1960. En 1985 la prevalencia fue 5,5/10 000 habitantes y se detectaron 12 000 casos nuevos. Con la implementación de la TMD se logró reducir la prevalencia y desde 1997 se alcanzó la tasa de eliminación (1<10000 habitantes), sin embargo la incidencia no declina. En el año 2003, fueron registrados 518 casos nuevos; durante el 2004 se notificaron 470 siendo el departamento del Valle el de mayor incidencia, reportando el 27% de los casos (Manual para la Vigilancia Epidemiológica de la Lepra, 2004). En el 2005 se diagnosticaron 585 casos nuevos. Para el 2007 según Sivigila, la prevalencia fue 0,27/10 000 habitantes y la incidencia fue de 401 casos nuevos (Figura 3).



**Figura 3. Incidencia (100 habitantes) de la Lepra 1998-2010**  
Fuente Programa de lepra del INS (Instituto Nacional de Salud)

Entre los departamentos más afectados por *M.leprae* se encuentran: Norte de Santander, Huila, Barranquilla, Bogotá. Cesar y Bolívar y en estas regiones se considera la lepra como un problema de salud (Figura 4). Para el Departamento del Cauca en el 2007, la prevalencia es de 0,27/10 000, aunque algunos municipios está por encima de la tasa de eliminación entre 1.12- 4.04 (Secretaria Departamental de Salud del Cauca, 2009).



**Figura 4. Incidencia por Departamentos de la enfermedad de Hansen en Colombia**  
Fuente: INS, Sivigila, 2007

Los datos anteriores registrados para Colombia son indicadores de que la Enfermedad de Hansen se encuentra dentro del parámetro mundial de eliminación, ya que la tasa de prevalencia es inferior a 1/10 000 habitantes, aunque estas tasas podrían estar viciadas por el subregistro de pacientes, problemas de orden público y el desmejoramiento de la atención de estas patologías, que ha ocurrido después de la implementación de la ley 100 y otras normas para reglamentación de los servicios de salud como ocurre en el programa de control de la tuberculosis (Alberlaez, M, 2004).

#### 4.4 PRESENTACIÓN CLINICA Y CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN

La enfermedad de Hansen tiene un espectro clínico muy variado, las lesiones se caracterizan, por ser placas o manchas blanquecinas, rojizas o cobrizas, con ausencia de pelos y de sudoración, pérdida de sensibilidad, engrosamiento y/o adormecimiento de zonas inervadas, ocasionalmente pérdida de la fuerza de las extremidades y menos frecuente el compromiso de los órganos como: los ojos, el hígado, los testículos, el sistema óseo y otros (Chimelli *et al.*, 1997). Se ha clasificado teniendo en cuenta los aspectos bacteriológicos, clínicos e inmunológicos:

**4.4.1 Clasificación de la OMS.** Se implementa en 1981, tiene en cuenta los hallazgos bacteriológico, índice bacilar (IB)<sup>3</sup> y el número de manchas. Se clasifica en:

- **Paucibacilares (PB).** Aquel paciente que presenta cinco o menos manchas cutáneas y el IB es negativo.
- **Multibacilares (MB).** Aquel paciente que tiene más de cinco manchas o presenta hallazgo de bacilos, es decir IB positivo en la baciloscopia o histopatología.

4.4.2 Clasificación inmunológica. Propuesta en Madrid con motivo del VI Congreso Internacional de la enfermedad en 1953, trata de reconocer formas clínicas básicas, según el grado de compromiso del sistema inmunológico. Esta clasificación subdivide la enfermedad en 4 formas: Lepra indeterminada, dimorfa (I), Tuberculoide (T) y Lepra Lepromatosa (LL).

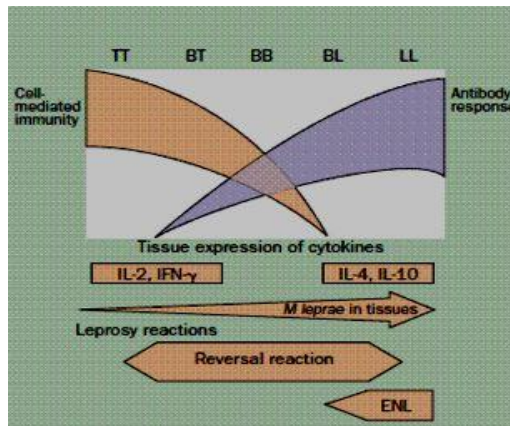
- **Lepra indeterminada.** Estadio temprano de la lepra; se caracteriza por signos de afección cutánea únicamente, como máculas hipocrómicas únicas o múltiples, de tamaños variados y generalmente redondeadas, hipoestésicas al calor y al frío; localizadas generalmente en glúteos y cara, sin afección de los troncos nerviosos, ni mucosas u órganos internos. La baciloscopia es negativa, puede ir hacia la curación o hacia otra forma de lepra. La histología es inespecífica con muy pocos o sin bacilos (Figura 6a). Las otras formas se describen en la clasificación de Ridley y Jopling.

---

<sup>3</sup> IB= Índice bacilar: contar el número de bacilos por muestra.

**4.4.3 Clasificación de Ridley y Jopling.** Definida en 1962, involucra parámetros clínicos, histopatológicos, bacteriológico e inmunológicos, crea 5 subdivisiones estas son: Tuberculoide-Tuberculoide (TT), Borderline-Tuberculoide (BT), Borderline-Borderline (BB), Borderline-Lepromatosa (BL) y Lepra Lepromatosa (LL) (Figura 5).

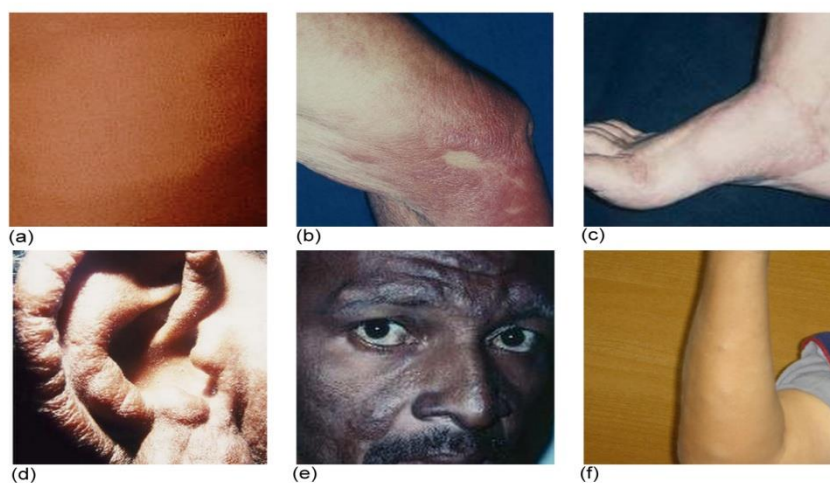
- **Lepra tuberculoide.** Caracterizada por placas en la piel, eritematosas, de límites bien definidos, con el centro hipopigmentado, placas con pérdida de sensibilidad, al calor, al frío, al tacto y al dolor, pueden haber úlceras, quemaduras y mal perforante plantar; se puede afectar el sistema nervioso periférico, por lo que son más frecuentes las parálisis y los engrosamientos nerviosos. La baciloscopia es negativa y en la tinción de la biopsia se encuentran pocos bacilos (Figura 6b).



**Figura 5.** Clasificación de la lepra según el estado inmunológico (Escala de Ridley y Jopling)  
Fuente: Britton and Lockwood, 2004.

- **Lepra bordeline.** Los pacientes presentan generalmente numerosa manchas grandes y muy definidas, placas infiltrativas de color ferruginoso, castaño y se localizan especialmente en el tronco y miembros, los daños son muchos y prominentes. La baciloscopia es positiva. En el examen histopatológico, se encontrarían áreas de reacción sarcoidea al lado de células vacuoladas cargadas de lípidos y bacilos es decir, células epitelioides junto a células de Virchow (Figura 6c). Este grupo incluye las formas:
  - **Bordeline tuberculoide (BT).** En este tipo de forma se presentan lesiones semejantes a la lepra tuberculoide, pero los bordes de las lesiones son menos nítidos.

- **Bordeline bordeline (BB).** Presencia de máculas y placas numerosas, asimétricas, eritematosas y superficie brillante. Son anulares con borde externo difuso y borde interno nítido. El centro es definido y claro. La sensibilidad está moderadamente disminuida.
- **Bordeline lepromatosa (BL).** Presencia de máculas, placas, lesiones anulares e infiltradas, hay tendencia a la simetría. Es muy semejante a la lepromatosa. Afecta poco la sensibilidad. El diagnóstico es primordialmente clínico.
- **Lepra lepromatosa.** El bacilo ataca la piel con lesiones grandes, poco definidas, simétricas, brillantes, muchas infiltraciones y a menudo desarrollan placas y/o nódulos. Estas lesiones se encuentran en cualquier área de la piel como: cara, brazos, piernas, espalda y glúteos. Afecta mucosa nasal, el sistema nervioso periférico, causa lepromas, infiltración de las orejas, “fascies leonina” y afecta órganos internos produciendo: rinitis, glositis, faringitis, disfonía, compromiso hepático, del bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, polo anterior del ojo, atrofia testicular y ginecomastia. La baciloscopia es positiva y con presencia de globias. El estudio histológico muestra un infiltrado inflamatorio en la dermis de tipo granulomatoso con abundantes células vacuoladas cargadas de lípidos y bacilos de Hansen, conocidas como células de Virchow (Figura 3d,e,f).



**Figura 6.** Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Hansen. **(a)** Lepra indeterminada **(b)** Lepra tuberculoide, **(c)** Lepra borderline, **(d), (e) y (f)** lepra lepromatosa con infiltrados en el lóbulo de la oreja, cara y nervios (Fuente: Lupi and *et al*, 2006).

**4.4.4 Infección Subclínica.** Actualmente no existe una prueba disponible para el diagnóstico de la infección Subclínica. Esta se define la como persona saludable sin signos clínicos de lepra pero que muestra una reacción positiva de anticuerpos contra PGL-1 de *M.leprae* (Prakoewa, Agusni, Izumi, 2006). En poblaciones endémicas se ha detectado seropositividad entre 1.7% y 58,4 %. La limitante es que los anticuerpos son pocos frecuentes en individuos con baja carga bacilar y que no desarrollan la enfermedad.

#### **4.5 TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN**

Los pacientes de la enfermedad de Hansen son tratados con antibióticos, los cuales se suministran teniendo en cuenta la clasificación de la OMS. El tratamiento fue sugerido en 1981 por un grupo de estudio de la enfermedad de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 1985), estos medicamentos proporcionan efectividad en un 90 % de los casos MB o PB y es disponible en todos los pacientes de forma gratuita.

La terapia multidroga (TMD) consta de rifampicina (RMP), dapsona (DDS), clofazimina (CLO). Esta combinación farmacológica mata al patógeno y cura al paciente; para casos MB se utiliza durante menos de 12 meses con RMP y DDS y aquellos pacientes PB se le coloca tratamiento durante seis meses o menos de RPM y DDS (WHO, 2005).

#### **4.6 TRANSMISIÓN DE *M. leprae***

Se conoce ampliamente sobre la enfermedad pero muy poco sobre el proceso de infección y transmisión debido en parte a la ausencia de herramientas diagnósticas que permitan detectarla con certeza.

*M.leprae* se transmite de persona a persona probablemente por aerosoles provenientes de las vías respiratorias superiores (Internacional federation of anti-Leprosy associations, 2002) es decir, secreciones oronasales emergentes a través de la nariz, al respirar también al gritar o al estornudar (Pedley and Geater, 1976 citado por Smith, 2004 y Ramaprasad *et al.*, 1997) principalmente de pacientes MB, en especial aquellos no tratados, cuyo órgano puede llegar a albergar  $10^{11}$  bacilos, también los pacientes con lepra PB pueden transmitir la infección pero en menor proporción. Otra fuente de diseminación de la micobacteria, es a partir de individuos que desarrollan una etapa

primaria de la infección sin señales clínicas, especialmente en países donde es altamente endémica (Klaster, *et al.*, 1993).

El bacilo de Hansen puede ser transmitido también por contacto directo con vectores naturales, principalmente los armadillos de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) (Style, 1995), especie nativa de los Estados Unidos; se ha demostrado en un estudio realizado en Texas que estos animales tienen ADN de *M. leprae* en la sangre (Deps, Santos and Yamashita-Tomimori, 2002), además las personas que tuvieron un contacto más directo con este animal desarrollaron la enfermedad (Bruce, 2000 y Suárez, 2007). La transmisión de la infección se ha asociado al contacto con algunos primates como el mono mangabey (*Cercocebus torquatus atys*) y un Chimpancé (*Pantroglodytes*), los cuales fueron exportados desde África Occidental a los Estados Unidos; también se ha asociado al contacto con ratones, picaduras de insectos como las moscas y también el bacilo puede persistir en el suelo o vegetación como un organismo saprófito (Blake, West and Lary, 1987 y Cree, 1998).

*M. leprae* es endémica de zonas donde las temperaturas son muy variables, la altitud y humedad son altas, por lo tanto su supervivencia depende de las características climáticas. Se ha estimado que los pacientes inoculan en el ambiente  $3.3 \times 10^4$  bacilos, los cuales perduran durante 10 minutos (De las Aguas, 1998), aunque en condiciones de humedad pueden sobrevivir entre 9 a 30 días con un radio distribución de un metro (Kazdaj, 1986).

#### **4.7 FACTORES DE RIESGO**

Se conoce a través de pruebas serológicas que *M. leprae*, se encuentra entre 1,7% y 31% en poblaciones endémicas (Gonzales- Abreu, *et al.*, 1996; Cunan, Chan y Douglas, 1998) y en convivientes puede variar entre el 8 y 35%. (Rodríguez y Orozco, 1996) Existen distintos factores que favorecen la infección o determinan la evolución de un estado de latencia a enfermedad, entre ellos:

- **Factores socioeconómicos.** Tienen una gran importancia en el desarrollo de la enfermedad, especialmente cuando se viven en hacinamiento, en condiciones higiénicas y nutricionales desfavorables.
- **Exposición a enfermo.** El riesgo de infección y de enfermar es mayor entre los contactos de los enfermos que entre la población en general. Se conoce que el riesgo se incrementa teniendo en cuenta la cercanía al paciente. Los convivientes (definidos como personas que viven en la misma casa y comparten la mismas instalaciones), al parecer tienen mayor riesgo, también se incluyen otros tipos de contactos como los sociales y vecinos.
- **Tipo de lepra del caso índice.** Se ha demostrado que todos los contactos de pacientes con lepra tienen un riesgo relativo de enfermar igual a 6 comparados con población en general (Doull, 1942). El riesgo de enfermar es de 2 veces para los convivientes de enfermos PB y se incrementa a 5 y 10 para los convivientes de pacientes MB. Sin embargo existen poblaciones donde los pacientes aparecen entre la población general, sin contacto conocido con la enfermedad de Hansen, lo cual fortalece el concepto de que la infección es más frecuente de lo que se cree y que no se necesita un contacto prolongado. En Colombia alrededor de un 15 - 20% de los casos nuevos se obtienen a través del examen de convivientes, lo cual equivale a un riesgo relativo de 8, cuando se compara con la población en general.
- **Factores genéticos.** Existen genes que podrían influenciar el desarrollo de la enfermedad, especialmente aquellos asociados a la respuesta inmune de huésped, según Scollard (2006) se conocen dos niveles que controlan esta respuesta, en primer lugar está la susceptibilidad o resistencia a la infección, es una manifestación de la resistencia innata mediada por los monocitos del linaje de los macrófagos, especialmente las células de Schwann y epidémicas. Si la resistencia innata es insuficiente, se produce la infección, se expresan mecanismos genéticos de segundo nivel donde interviene la respuesta adaptativa con sus posibles mecanismos de hipersensibilidad.

Entre los factores genéticos que intervienen en la respuesta innata de la enfermedad de Hansen se conocen:



- **PARK2/PACRG.** Asociado con la susceptibilidad de humanos a *M.leprae*, el locus específico es una región promotora del PARK - 2 y un gen co regulador "PACRG" localizado en el cromosoma 6q25-q27. El mecanismo exacto por el que estos genes intervienen en la susceptibilidad a la lepra se desconoce.

Funcionalmente, se sabe que el locus específico del gen *PARK2/PACRG*, codifica para la síntesis de una ligasa en la vía ubiquitina-proteosoma de degradación de proteína intracelular, participando en la regulación del procesamiento del antígeno dentro de los macrófagos, por ello podrían afectar la presentación antigénica a los linfocitos.

- **NRAMP-1(Proteína Macrofágica Asociada a la Resistencia Natural 1).** La resistencia natural a un número de parásitos intracelulares, no relacionados tales como: *Mycobacterium bovis*, *Leishmania donovani* y *Salmonella typhimurium*, están controlado en el ratón por el gen *NRAMP-1*. El homólogo en el humano está ubicado en la región 2q35 y se expresa en bazo, pulmón, hígado y en leucocitos de sangre periférica. Este gen se ha asociado con diferentes tipos de lepra, en algunas poblaciones influye la expresión de moléculas clase II, regulación de la expresión del TNFA e inducción de la óxido nítrico sintetasa (Blackwell, *et al.*,2000).
- En humanos no se ha precisado definitivamente el mecanismo, se conoce que es similar a los murinos, influye en la viabilidad y /o replicación del macrófago en los mismos macrófagos.

Existen factores genéticos que intervienen en la respuesta inmune adquirida en lepra entre estos se encuentran:

- **HLA (complejo de histocompatibilidad).** Es un conjunto de genes localizados en el cromosoma 6p21. En el caso del sistema HLA las moléculas de clase II se han relacionado como factores genéticos implicadas en la susceptibilidad al Hansen. El análisis de segregación de

varias poblaciones sugiere una relación de alelos particulares de los antígenos de clase II con el desarrollo de determinadas formas de lepra. Entre los alelos estudiados se encuentran HLA-DR2 y DR3 asociados con el desarrollo de lepra tuberculoide y DQ1 con lepra lepromatosa.

- **TAP. Transportador Asociado con el Procesador de Antígenos (TAP).** Está formado por dos polipéptidos, TAP 1 y TAP2, estrechamente se relacionan con los genes localizados en el HLA de clase II en el cromosoma 6p21. Funcionalmente las proteínas del TAP transportan péptidos al retículo endoplasmático en células presentadora de antígeno, donde se une a las moléculas de MHC clase I para la presentación del antígeno. Variantes en el TAP-2 llevan a la susceptibilidad a lepra de tipo de tuberculoide.
- **Cromosoma 10p13.** Está vinculado a microsatélites en el cromosoma 10p13, se asocia este gen con la susceptibilidad a la lepra tuberculoide.
- **TLRS (Receptores Toll Like).** Son moléculas de la superficie celular que se encargan del reconocimiento de patógenos. Como resultado de su activación se produce la liberación de varios mediadores químicos de la inmunidad, los genes que codifican TLRS controlan aspectos de la resistencia a *M.leprae*, producción de señales celulares y citoquinas.
- **VDR (Receptor de la vitamina D).** La  $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$  forma activa de la vitamina D es un importante regulador de la respuesta inmune y ejerce diferentes efectos sobre sus distintas células.

El gen del VDR está localizado en el cromosoma 12q12, codifica una proteína receptora intracelular unida a metabolitos de la vitamina D  $1\alpha, 25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ . Está vinculada a la activación de monocitos e influye en la función de linfocitos  $\text{CD4}^+$  y  $\text{CD8}^+$ . Se ha demostrado que el polimorfismo en este receptor se relaciona con los diferentes fenotipos de lepra, especialmente tuberculoide y lepromatosa.

- **Factores fisiológicos.** Los cambios hormonales producidos durante la pubertad, la menopausia, el embarazo y la lactancia predisponen al desarrollo o al empeoramiento de la enfermedad de Hansen.
- **Edad.** Se ha encontrado mayor riesgo de enfermar y de infectarse en menores de 15 años que en los adultos (Moet, 2004).
- **Género.** Tanto la incidencia como la prevalencia parecen ser más elevadas en el género masculino (Vijayakumaran *et al.*, 1998), aunque en ciertas poblaciones de África se han registrado índices más altos en las mujeres. El número superior de casos entre los varones ha sido atribuido a veces a su mayor movilidad y oportunidades de contactos con individuos infectados (OMS, 1985). La diferencia por género se presenta en la edad adulta, en los niños esta diferencia no existe. En Colombia la razón hombre: mujer es 2:1, con variaciones dentro las diferentes regiones.

#### 4.8 DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN

Se realiza teniendo en cuenta los hallazgos clínicos, bacteriológicos e histológicos. En las últimas décadas se están desarrollando técnicas de la biología molecular como la PCR y serológicas como ELISA, empleadas con diferentes marcadores que todavía no tienen amplia difusión. A continuación se describen cada una de ellas:

**4.8.1 Diagnóstico clínico.** Tiene en cuenta primero el interrogatorio al paciente indagando si en la familia se han presentado casos similares o si es un conviviente de paciente con lepra (antecedentes epidemiológicos); en segundo lugar se realiza el examen físico que comprende el examen de la piel, en donde se examina la presencia de las lesiones cutáneas, que pueden ser una o múltiples, con características distinguibles: color, superficies elevadas o planas, no pican, no duelen, no típicas de alguna otra enfermedad cutánea, estas pueden ser manchas, placas, nódulos, úlceras, lesiones similares a quemaduras; con disminución de la sensibilidad térmica, dolorosa y táctil; también se examina los ojos para buscar la disminución de la visión e imposibilidad para cerrar los párpados; las fosas nasales para detectar úlceras, perforación del tabique

nasal, congestión y/o secreciones mucosas; en las articulaciones se busca deformidad dolor o acortamiento de los dedos y nivel de los nervios se evalúa la sensibilidad y/o motilidad de los territorios y músculos inervados por:

- Auricular posterior. Sensibilidad auricular.
- Trigémino. sensibilidad corneana.
- Facial. músculo orbicular de los párpados.
- Cubital. región hipotenar, dedos 4,5.
- Mediano. Región tenar de los dedos 1, 2 y 3.
- Radial. cara dorsal de la mano y dorsiflexores de la muñeca.
- Ciático popleo externo. cara externa de la pierna, dorso del pie y músculos intrínsecos.

Se consideran como signos clínicos cardinales el engrosamiento o dolor espontáneo o a la palpación de los nervios anteriormente mencionado (Ministerio de Protección social, 2008).

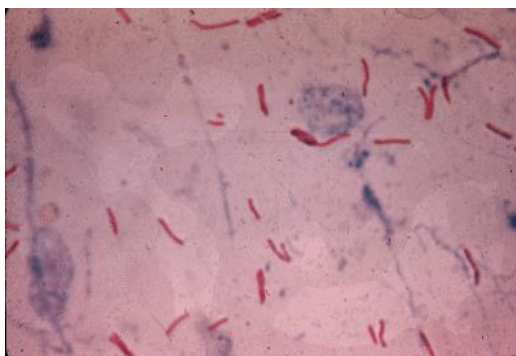
En la enfermedad de Hansen los síntomas pueden ser variables dependiendo el tipo de enfermedad; se pueden considerar como sospechosos de lepra los casos donde se encuentra apenas uno de los signos cardinales de los anteriormente mencionados. Se definen como lepra incipiente cuando están presentes dos signos cardinales (o equivalentes), representados por un número limitado de lesiones, en ausencia de discapacidades; mientras la lepra avanzada se define cuando las lesiones son extensas y/o hay discapacidades (López-Antuñano, 1998). La historia clínica adecuada y el examen clínico minucioso (Anexo D) y sistémico son necesarios para el diagnóstico y para el manejo posterior del paciente.

#### 4.8.2 Diagnóstico Microbiológico.

- **Baciloscopia.** Consiste en la observación microscópica de las muestra de moco nasal, liquido intersticial (linfa) del lóbulos de la orejas, codos o rodillas y/ o lesión. Esta técnica se caracteriza por ser rápida, de bajo costo aunque requiere por lo menos 10000 bacilos por mL de muestra o gramo de tejido para ser positiva, por

ello se le considera una prueba de baja sensibilidad, además es poco específica ya que no diferencia entre las especies de micobacterias.

- **Coloración de la baciloscopia.** Se realiza tinciones directas para la identificación de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), la técnica utilizada es la tinción diferencial de Zielh-Neelsen (Figura 7), referida por dos doctores alemanes Franz Ziehl (1859-1929) microbiólogo y Friedrich Neelsen (1854-1894), patólogo. Se basa en la capacidad de las micobacterias de retener colorantes (fuschina) y luego retenerlos ante la acción de una mezcla de alcohol y ácido (decolorante); pudiendo formar complejos ácido estables, cuando se exponen a colorantes aniónicos, con lo lípidos de la pared, especialmente los ácidos micólicos; con este método los bacilos se observan rojos en un fondo azul (Britton and Lockwood, 2004).



**Figura 7. Tinción de Zielh Nielsen para *Mycobacterium leprae***  
Fuente: Scollard *et al.*, 2006

- **Lectura de la baciloscopia.** La lectura en el microscopio de cada muestra requiere entre 10-15 minutos por lámina, se reporta mediante el índice bacilar, que consiste en contar el número de bacilos por muestra en cruces según una escala (Tabla1), posteriormente se calcula el promedio aritmético de las cruces encontradas en cada una de las muestras leídas; se suma el número de cruces del punto anterior y se divide por el número de muestras leídas (Ministerio de la Protección Social, 2005); cuando hay presencia de globias en cualquiera de las muestras indica una gran cantidad de bacilos.

La clasificación bacteriológica de la OMS tiene en cuenta el índice bacilar, si este es mayor de cero será un paciente MB, por el contrario, si es igual a cero es un paciente PB.

**4.8.3 Diagnóstico histopatológico.** Consiste en obtener una pequeña parte de la piel afectada, fijada en formol al 10%, posteriormente los cortes de parafina se somete a una coloración de hematoxilina– eosina y la identificación de los BAAR se hace con la tinción modificada de Zielh- Neelsen conocida como Fite - Faraco.

La biopsia cutánea se hace cuando la baciloscopia es negativa, permite detectar 35 % de los casos, confirma definitivamente la sospecha clínica, además contribuye a evaluar los resultados de los tratamientos y establecer diagnóstico diferencial.

**Tabla 1. Índice bacilar en la enfermedad de Hansen para Colombia**

Índice bacilar	Concentración de BAAR por campo promedio de inmersión
0	Ninguno en 100 campos
1	Menos de 1 en 100 campos examinados
2	De 1 a 10 en 100 campos examinados
3	De 1 a 10 en cada campo examinado
4	De 10 a 100 por campo examinado
5	De 100 a 1000 por campo examinado
6	Más de 1000 por campo examinados

Fuente: Ministerio de Protección Social, 2005

El criterio histopatológico se basa en el tipo y distribución de los infiltrados granulomatoso y cambios de los nervios, principalmente los más afectados son los filetes profundos situados en la unión dermo-hipodérmica; define el polo hiperérgico formas tuberculoide (T) y borderline-tuberculoide (BT) donde se observan granulomas epitelioides, linfocitos destruyendo o infiltrando los filetes nerviosos, los folículos pilosebáceos, el músculo piloerector, las glándulas sudoríparas. No hay presencia de bacilos; mientras en el polo anérgico que incluye las formas borderline-lepromatosa y lepromatosa se observan granulomas de células espumosas con BAAR (Freedman Weinstein and Kaplan, 1999).

*M.leprae* es un microorganismo que no se ha logrado cultivar *in vitro*, es posible cultivarlo *in vivo* en la almohadilla plantar de armadillos y ratones inmunocomprometidos los cuales no son muy viables por ello se optan por realizar otras pruebas diagnósticas como:

**4.8.4 Pruebas serológicas.** El objetivo de estas pruebas ha sido realizar un diagnóstico precoz de la infección, están poco asociadas a la enfermedad; buscan la respuesta humoral del individuo a través de la detección de anticuerpos Inmunoglobulinas (Ig), A (IgA), M (IgM) y G (IgG) contra antígenos específicos de la micobacteria. Se han desarrollado las siguientes pruebas:

- **La fijación del complemento.** Utilizada al principio del siglo; empleó como antígeno un extracto de leproma, mostrando buenos resultados en los pacientes con LL pero no detectaba la lepra indeterminada y tuberculoides, esta prueba se realizó con otros antígenos procedentes de otras micobacterias, muestran que la respuesta a anticuerpos está dirigida contra antígenos comunes a estas.
- **La prueba de Rubino.** Desarrollada en el siglo pasado en los 90's; consiste en la sedimentación de glóbulos rojos tratados con formalina en presencia de sueros de pacientes con lepra, con resultados similares a los encontrados a la prueba de complemento. Esta reacción se utilizó durante muchos años, pero no tenía utilidad en los casos PB y en los MB no avanzados, por lo que se continuó en la búsqueda de pruebas más sensibles y específicas para el diagnóstico precoz de la enfermedad en su fase subclínica, identificación de los grupos de alto riesgo, estudio del pronóstico, evaluación terapéutica y detección de las recaídas. En esta misma época se desarrolló la inmunodifusión y hemaglutinación, mostrando la habilidad de algunos pacientes con lepra para producir anticuerpos, la diferenciación de pacientes con LL y LT y la demostración de reactividad cruzada con otras micobacterias en el suero de los pacientes de Hansen.
- **La prueba de absorción de anticuerpos fluorescentes (FLA-ABS).** Desarrollado en los años 70. El fundamento de la prueba es el examen microscópico con la técnica de fluorescencia directa del suero de personas mezclados y pretratados con anticuerpos de *M. leprae*, haciendo las lecturas con el sistema de filtro UV. Ha presentado una sensibilidad del 96,7% y una especificidad del 99%, sin embargo su uso no se generalizó debido a la dificultad técnica, a la subjetividad de la prueba y posibilidad de reacciones cruzadas con otras micobacterias; fue usada para el monitoreo de pacientes y detección de infección subclínica, también se desarrolló la

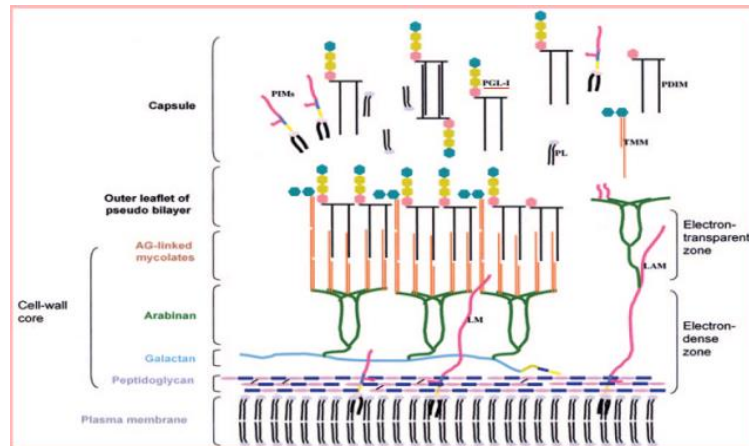
inmunolectroforesis cruzada y el radioinmunoensayo con resultados similares a los anteriores.

A partir de los años 80's, debido a los problemas con las reacciones cruzadas, se comenzó a realizar la serología, con el uso del sonicado crudo de *M.leprae*, se trabajó en la identificación y purificación de antígenos específicos de esta micobacteria, entre ellos la proteína de 35 Kda, los glicolípidos fenólicos, el lipoarabinomanan (LAM), que es el mayor carbohidrato de *M.leprae*, altamente reactivo con anticuerpos IgG, que reacciona de forma cruzada con el LAM de *M.tuberculosis*, por lo tanto es de alta sensibilidad pero de baja especificidad.

Dentro de los antígenos más específicos para *M. leprae*, está el glicolípido fenólico - 1(PGL-1), descrito por Brennan en 1980, este antígeno (Ag), se encuentra en la cápsula del bacilo (figura 8), está representado por un residuo trisacárido, se ha asociado al mecanismo de defensa del bacilo de Hansen, a través de la inhibición de la destrucción oxidativa y la inactivación de las enzimas lisosómicas del macrófago impidiendo que se destruya el bacilo (Vachula, Holzter and Andersen, 1989), además interactúa con la láminina de las células de Schawann, (Arocha, *et al.*, 2006); induce una respuesta de anticuerpos IgM y IgG, aunque se reportan mayores titulaciones de IgM comparadas con la IgG.

Como *M.leprae* no puede ser cultivada *in vitro* y la cantidad de PGL-1 era insuficiente, fue necesaria la síntesis de derivados en los cuales la parte terminal di o trisacárido del PGL-1, esta acoplada a una molécula portadora tal como la albumina de suero bovino (BSA); entre ellos se conocen neoglicoproteínas como mono,di tri sacárido conjugado a la proteína de albúmina de suero bovina (M-BSA), el disacárido – natural- octil-BSA(ND-O-BSA), el ND-P-BSA y el NT-P-BSA





**Figura 8. Modelo esquemático de la pared celular de *M. leprae* con presencia de PGL- 1 en la cápsula.** Fuente: Scollard *et al.*, 2006.

La detección de los anticuerpos contra antígenos de *M. leprae* es simple y se pueden realizar en diferentes fluidos biológicos como suero, plasma, sangre total, sangre capilar, filtros de papel con sangre y orina, entre otras. Hay diferentes pruebas para detectar anticuerpos tales como: el radioinmunoensayo (RIA), prueba de hemaglutinación pasiva (PHA), la prueba de inhibición de anticuerpos (Ac) monoclonales y la más usada la prueba de ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA). En los últimos años se han implementado otras pruebas como la de aglutinación de partículas de gelatina, conocida como MLAP (Izumi, 1990), en 1998, Bükher *et al*, desarrolló ML Dipstick, capaz de detectar anti IgM; en 1999, Roche describió el uso de una prueba que usa la detección indirecta de anticuerpos contra la proteína de 35 Kda, la cual fue discontinuada y Buhresekula, 2007 está evaluando el uso de la inmunocromatografía conocida como ML Flow. Los ensayos serológicos tienen especificidad del 100%, pero su sensibilidad varía con el tipo de lepra, 80 % al 100% para MB y del 30 a 60% para pacientes PB, 56% para BL y 18% para BL (Arocha *et al*, 2006), las desventajas es que no pueden identificar todos los casos PB, no distingue entre una infección pasada y actual; no permite identificar la infección subclínica; todas estas pruebas parecen no ser útiles en la detección temprana de la enfermedad, ni la evaluación de la transmisión e infección.

**4.8.5 Diagnóstico mediante pruebas moleculares.** La biología molecular ha contribuido no solamente al entendimiento de las enfermedades infecciosas, sino que también han proporcionado herramientas para su diagnóstico.

La detección de ADN específico implica la presencia del microorganismo en la muestra que se está analizando. Existen técnicas como los diferentes sistemas de hibridación pero la técnica reina en este campo es la reacción en cadena de la polimerasa o PCR en inglés polymerase chain reaction, la cual se ha usado para detección de enfermedades oncológicas, genéticas, en trasplantes y enfermedades infecciosas, particularmente en lepra, donde no se cultiva el agente causal.

La PCR fue una técnica ideada por Kary Mullis, publicada por primera vez el año 1985, en la revista científica Science. Esta es una síntesis enzimática *in vitro*, la cual trata de reproducir la habilidad natural de duplicar material genético. Consiste en una amplificación exponencial ( $2^n$ ) de secuencias específicas de ADN o ARN a partir de cantidades pequeñas de una región específica de este mismo (Corvalán, 2002). La principal ventaja que confiere la rapidez, especificidad además capaz de detectar la presencia aún cuando no es visible en la baciloscopia e histopatología, aunque su desventaja es el costo. Para desarrollar la PCR se requieren de los siguientes reactivos:

- **Buffer o amortiguador.** Contiene diversos iones ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{K}^+$ , entre otros), se encarga de optimizar y equilibrar las condiciones de reacción.
- **Taq polimerasa.** Es una enzima aislada de *Thermus aquaticus*, una bacteria termofílica, esta enzima es activa a una temperatura  $72^\circ\text{C}$ , aunque puede resistir las altas temperaturas aproximadamente  $117^\circ\text{C}$  necesarias para la separación de las cadenas del ADN y permite que el reanillado sea más sensible y específico (Corvalán, 2002 y Rodríguez, 2001), se encarga de la síntesis exponencial en dirección de 5' a 3'.
- **Cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ).** Es donador de iones y actúa como cofactor para la actividad de la enzima Taq polimerasa.
- **Oligonucleótidos (primers).** Son secuencias nucleotídicas cortas, deben tener entre 10 y 24 nucleótidos de longitud, actúan como iniciadores de la síntesis del ADN, son complementarios a las cadenas opuestas del ADN y se unen específicamente a las secuencias que flanquean la región a amplificar (región

blanco); son reconocidos por la enzima taq polimerasa permitiendo iniciar la reacción.

- **Desoxinucleótidos trifosfatos (Dntps).** Son cuatro: dATP, dGTP, dCTP y dTTP, se deben añadir en la solución de la reacción en concentraciones iguales que normalmente oscila entre los 20 y los 200 mM. Los Dntps pueden captar  $Mg^{++}$ , por lo que las concentraciones de ambos componentes deben guardar siempre la misma relación.

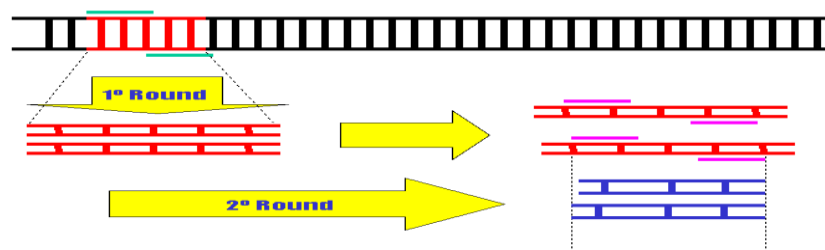
**4.8.6 Principios básicos de la PCR.** Las dos hebras de ADN pueden disociarse y reasociarse *in vitro* por calentamiento y enfriamiento; proceso que es llevado a cabo por un controlador microprocesador llamado termociclador, que permite la automatización de la PCR, lo usual es que los ciclos se repitan de 25 a 45 veces (IPGRI y Cornell University, 2003). Las reacciones de la PCR incluyen tres fases:

1. **Desnaturalización.** Para la separación de la doble cadena de ADN, se realiza a una temperatura de 94 - 95° °C por minuto, con el fin de que cada hebra sirva de molde para la síntesis de una nueva molécula de ADN. Al iniciar la amplificación se recomienda 5 minutos a esta temperatura, para separar toda molécula.
2. **Hibridación de los cebadores o iniciadores.** Se enfría la molécula ADN para una óptima polimerización, la temperatura oscila a 45-60°C; cada oligonucleótido (primer) se une a una cadena blanco complementaria, en sus extremos 3' apuntándose entre sí. La temperatura de esta hibridación depende de la longitud de los iniciadores y de su proporción en G+C; en cualquier caso a más temperatura la especificidad de la reacción es mayor.
3. **Extensión de la cadena complementaria.** Cuando alcanza una temperatura de 72°C, el fragmento del ADN localizado entre los iniciadores es rápidamente amplificado utilizando una enzima polimerasa, procedente de la bacteria *Thermus aquaticus*, se ha comprobado que esta es capaz de incorporar 60 nucleótidos por segundo, por lo tanto en un minuto es capaz de incorporar 1000 nucleótidos. Esta amplificación extiende desoxynucleótidos

complementarios a la cadena de ADN molde en los extremos 3' de los iniciadores, después de la extensión dos cadenas blancas de ADN y dos cadenas complementarias sintetizadas, se combinan para formar dos nuevas hebras dobles de ADN, luego se repite la reacción un número (n) determinado de ciclos (aproximadamente 30) para la obtención suficiente de ADN, en cada ciclo se obtiene una copia de cada una de las cadenas preexistentes; al finalizar los ciclos, el producto de ADN, teóricamente pueden ser 2<sup>n</sup> de copias, obtenidas en pocas horas, aunque la saturación de la enzima, la hibridación del ADN diana y otros factores limitan la amplificación.

Las reacciones de PCR no son todas igualmente eficientes y necesitan variarse para mejorar la eficiencia (Birmingham and Luetlich, 2003); entre estas tenemos la PCR anidada, cuya sensibilidad aumenta con la realización de una segunda PCR que amplifica una región interna del producto de la primera reacción (Bascuñana y Belak, 1996 y Gillis and Brennan, 2002).

**4.8.7 La PCR anidada.** Consiste en una reamplificación; en la cual se selecciona un grupo de oligonucleótidos (primers) dos externos que amplifican una secuencia larga, correspondiente a la secuencia blanco del genoma y dos primers internos que amplifican sobre el producto de los primers externos, produciendo productos más pequeños (Figura 9).



**Figura 9. Esquema de reacción de la PCR anidada.**

Fuente: Vieira, 2006.

**4.8.8. Detección del ADN amplificado.** Los amplímeros de la reacción pueden ser detectados por hibridación o electroforesis, en esta última el producto es sometido a corriente eléctrica que migrará de acuerdo al tamaño del fragmento amplificado (Corvalan, 2002) y la resolución dependerá del medio que se utilice agarosa o poliacrilamida a distintas concentraciones, las cuales forman una red de poros de tamaños variables,

haciendo posible la separación de fragmentos, a mayor concentración, mayor capacidad de distinguir fragmentos de tamaños más próximos.

La visualización del fragmento en el gel, se debe a la reacción del ADN con el bromuro de etidio, que es un compuesto que tiene la capacidad de insertarse en la cadena de ADN y presentar fluorescencia cuando es excitado con luz ultravioleta, permitiendo comparar el peso del producto amplificado con un patrón de peso molecular, también se usa para la detección de ADN por tinción con plata o radioactividad.

La PCR puede aplicarse en una amplia variedad de muestras (cultivo puro, tejidos, líquidos), para el diagnóstico de *M.leprae* se ha realizado en muestras de linfa del lóbulo de la oreja y/o lesión, moco nasal, biopsias de piel, sangre, bulbo de cabello, suero, orina, entre otras. En todos los casos se requiere que las células que contienen el ADN que va a ser amplificado estén lisadas para liberar su genoma, por lo que es necesario el desarrollo de un método de extracción adecuado a cada muestra, además se debe conocer la secuencia del ADN a amplificar para escoger los oligonucleótidos adecuados, las condiciones óptimas para cada reacción, teniendo en cuenta los reactivos (concentraciones de oligonucleótidos, taq polimerasa, desoxinucleótidos, MgCl<sub>2</sub> y el Buffer), la temperatura, duración de cada paso y número de ciclos (Innis *et al.*, 1990), los cuales condicionarán la cantidad de ADN obtenido y la sensibilidad de la prueba.

En el estudio de la enfermedad de Hansen, se han conseguido introducir parte de ADN de *M.leprae* en bacterias de fácil cultivo como *E.coli*, con el fin de producir grandes cantidades de proteínas, que son identificadas con anticuerpos monoclonales; con esta metodología se ha podido establecer la librería del genoma de este microorganismo y se ha construido el mapa cromosómico. Entre las secuencias utilizadas en los ensayos de PCR se encuentran las que codifican proteínas de 18, 36, 45 y 65 Kilodaltons (Kda), también secuencias repetitivas y las secuencias del gen del ARN ribosomal (ARNr) y 16S ARNr, en este trabajo se utiliza la secuencia repetitiva *rlep*, específica de *M.leprae*.

**4.8.9 La secuencia repetitiva *rlep*.** Es una secuencia no codificante, que se encuentra repetida 28 veces en el cromosoma de *M.leprae*, lo que multiplica las posibilidades de amplificación del ADN en comparación con otros genes o secuencias con una única copia por genoma bacteriano.

En las últimas décadas, para el diagnóstico de la enfermedad de Hansen, se ha comparado la PCR con los resultados de técnicas convencionales como la baciloscopia e histopatología y la clínica.

En el estudio de Misra *et al.*, 1994, emplearon 87 muestras de biopsias de piel y linfa, provenientes de 46 pacientes (1LI, 9 TT, 14 BT, 12 LL y 10 BL) y 4 controles; usaron iniciadores para amplificar un fragmento de 321pb de la secuencia de gen *LSR/A15* que codifica para el antígeno de 15 KDa. Esta prueba fue sensible y específica con un nivel de detección entre 10 y 100 bacilos, la PCR fue positiva en 34. 48% (30/87). Se detectó mediante PCR 1 caso del polo TT, 3 de BT (1 linfa, 2 muestras biopsias), 26 de polo lepromatoso (12 linfa, 14 biopsia), 8 de los pacientes fueron positivos para PCR y negativos para las técnicas convencionales (baciloscopia en linfa o histopatología), correspondientes a 2 muestras de biopsia de pacientes del polo BT y 6 de polo lepromatoso, en tres casos se mostraron falsos negativos, aun cuando no se encontró evidencia de inhibidores. Estos resultados mostraron mayor positividad en casos lepromatoso y afirman que la PCR es una herramienta útil para la detección de pocos bacilos. Esta técnica puede considerarse como una alternativa para la identificación de pacientes infectados con *M. leprae* contribuyendo a determinar la prevalencia oculta.

En 1997, Job *et al.*, estudiaron 39 lesiones de piel sospechosas de Hansen mediante examen histopatológico, coloración de BAAR y PCR. La PCR fue positiva de las 26 con diagnóstico histopatológico (7 de 17 de BT, 1 de 3 TT y 1 de 6 con LI), también fue positiva en dos casos de 13 lesiones MHN (maculas hipopigmentadas no características) En Zielh Neelsen fue positiva solo en 2 de las biopsias con diagnóstico histopatológico (1BT y 1 TT). Los autores sugieren que para diagnóstico de esta enfermedad se incluya además del examen histopatológico la PCR. Otro estudio en Estados Unidos, en 89 biopsias de piel de 53 pacientes diagnosticados entre 1999 - 2002 y 36 de pacientes no leproso. Amplificando la banda de 360bp del fragmento del gen *hsp18* que codifica la proteína para 18-kDa, detectó el 38.8 % de la forma TT y 92.6% de LL por PCR. La sensibilidad de la prueba en todos los tipos de pacientes fue del 79% y especificidad del 100%. En conclusión este ensayo conjunto con la clínica y el análisis histopatológico contribuye a la identificación de *M. leprae*, particularmente donde la clínica es problemática

y el área es de baja endemicidad. Además recomiendan se evalué la practicabilidad y el costo beneficio de las distintas técnicas (Williams *et al.*, 2003).

El tipo de tratamiento que reciben los tejidos antes de la PCR influye en los resultados de esta. De wit *et al* (1991), amplificaron un fragmento de 530 pb, que codifica el gen del antígeno rico en prolina (36Kda) con primers S62 y S13, en 31 biopsias de piel de pacientes tratados y no tratados con medicamentos para lepra; una parte de la muestra fue refrigerada, otra fijada en formalina, otra en formalina neutra y otra en FMA (formaldehído-mercurio-cloro ácido acético). La PCR fue positiva en el 100% de las biopsias BAAR positiva, el 56% de las BAAR negativa refrigeradas de los pacientes no tratados, mientras que el PCR fue positivo en un 92% de las biopsias BAAR positiva y 61% de las BAAR negativa tratadas con formalina neutra procedentes de los mismos pacientes no tratados. La fijación de las biopsias con FMA y formalina no neutralizada producen una baja amplificación, Los autores concluye que la PCR puede ser una herramienta para la detección de la infección pero que el tipo de fijación previa a la extracción de ADN afecta la sensibilidad de la prueba y recomienda realizar la PCR a partir de tejidos frescos y congelados.

En los estudios las muestras más comunes para encontrar ADN son las biopsia de piel, aunque es posible realizar PCR en orina, como lo mostró Parkash, *et al.*, (2004), en 16 pacientes, 11 con LL y 5 con LT y 8 individuos sanos, emplearon primers S62 y S63, que codifican para antígeno de 36 kDa, amplificaron un fragmento de 530 pb. La positividad fue de 36.4% en pacientes LL y 40% en pacientes LT, ninguna de las muestra de los individuos saludables fue positiva. Los resultados obtenidos muestran presencia de ADN en la orina de pacientes con lepra; encontraron una positividad 66.6% de 6 pacientes tratados mientras que los no tratados solo el 20% de 10. Este estudio permitió concluir que es posible detectar ADN en muestras de orina y podría ser aplicable para monitorear la respuesta al tratamiento de los pacientes.

En general, en la enfermedad de Hansen la especificidad del PCR encontrada es de 100% y la sensibilidad es de 34 a 74% en pacientes con formas PB y más del 80% en las formas MB (Williams, *et al*, 2003); en casos PB, especialmente en los subclínicos es baja debido a que los bacilos son muy pocos, por ello Plikaytis, Gelber and Thomas, 1990, desarrollaron una PCR anidada, usando cuatro iniciadores oligonucleótidos, L1 y L2, que

amplifican un fragmento externo de la secuencia del gen *Gro EI* de 578pb y oligonucleótidos L3 y L4 para un fragmento interno de 347 pb. Lograron detectar hasta 3fg correspondientes a un solo bacilo. También amplificaron ADN de *M.leprae* en muestras de biopsias de almohadilla plantar de ratón, hígado de armadillos infectados con *M. leprae* y en biopsia de paciente con LL. No hubo productos de amplificación con las otras 19 especies de *Mycobacterium*, tampoco en células de ratón y células humanas. Se observaron productos de amplificación pero de menor tamaño con tres especies de *Mycobacterium*: *M. lufu*, *M. simiae* y *M. smegmatis*, estos productos fueron fácilmente distinguidos del producto de *M. leprae* por el tamaño y por el patrón de corte de las enzimas de restricción. La PCR anidada se ha empleado con otras regiones del genoma como el ensayo de Santos, *et al.*, (2007) en Brasil, que amplificando un fragmento 133 pb dentro de un producto de uno de 231pb del gen para la proteína antigénica de 65 kDa, en muestras de mucosa oral de 7 pacientes MB a las cuales se les realizó examen histopatológico. La PCR detectó el ADN en 5 casos que estaban recibiendo tratamiento, en 1 sin tratamiento que también tenía BAAR y el otro fue PCR negativo y se le aisló una micobacteria diferente a *M.leprae*. Los autores concluyen que este método es rápido, fácil para la detección en períodos asintomáticos.

El descubrimiento de la secuencia no codificante, *lep* (Woods and cole, 1989) abrió todo un horizonte de posibilidades para la detección de esta bacteria, gracias a este elemento genético la PCR puede tener mayor sensibilidad ya que cada bacilo de *M.leprae* cuenta con 28 copias de la secuencia (Donogue, Holton and spigelman, 2001), lo que multiplica las posibilidades de detección en comparación con genes o secuencias con una única copia en el genoma bacteriano. Esta fue evaluada por Yoon K, *et al.*, 1993, con primers R1 y R2 que amplifican una banda de 372pb y se compara con la prueba microscópica en 102 muestras de biopsia de pacientes con lepra sin tratamiento. Este ensayo mostró 100% de especificidad y sensibilidad del 86.3 %. Los resultados comparando la PCR y el IB fueron los siguientes: En 15 muestras de pacientes con IB-, la PCR obtuvo un 73.3% de positividad y de 87 muestras con IB positivo 96,6% fueron PCR positivo. Estos resultados demuestran que la PCR con esta secuencia permite detectar *M.leprae* en muestras donde la prueba microscópica es negativa. Para incrementar su sensibilidad Santos *et al.*, 1993, optimizaron la extracción de ADN realizando un pretratamiento a las muestras con NaOH, para disminuir la presencia de inhibidores. Usó la secuencia *lep*, amplificando un fragmento de 372pb con primers ML1 y ML2, incluyó la detección por



hibridación, en muestras de sangre, linfa y biopsias de 27 pacientes (8 LL, 8 BL, 3 BB, 6 BT, 1TT, 1LI) sin tratamiento. Detectaron hasta 100 ag ADN ( $ag=1 \times 10^{-18} g$ ). En biopsia la PCR fue positiva en 13(76.3%) de 17 visualizadas por electroforesis y de 15 hibridadas el 87% fueron positivas. En 19 muestras de linfa vistas por electroforesis el 21% fueron PCR+ y en el proceso de hibridación el 68% fueron positivas.

Donogue, Holton and spigelman en el 2001, amplificaron fragmentos de ADN más pequeños que los anteriormente usados, emplearon PCR anidada, diseñaron y evaluaron primers (LP1,LP2,LP3,LP4,LP5,LP6,LP7), que codifican para el gen del antígeno de 18 kDa y la *rlep* amplificando un producto interno de 110pb en uno externo de 136pb y una banda de 99pb y sobre una de 129pb, respectivamente; utilizaron 2 muestras de linfa de pacientes diagnosticados hace 20 y 30 años, pero con recaída y 6 muestras arqueológicas. Se logró detectar *M.leprae* mediante la amplificación de la *rlep* (secuencia 17153), en las muestras clínicas y en 3 arqueológicas. Los resultados mostraron primers de la *rlep* son más sensibles que los de la secuencia de 18kDa, sugieren que podría deberse a que detectan ADN dañado o que se encuentra en pequeñas cantidades y evidencian la necesidad de evaluar estos en diversas muestras clínicas. También Kang *et al.*, (2003), comparó los primers para un fragmento de 129pb de *rlep* y primers para un fragmento de 360 pb de la secuencia de 18kDa. Realizando la técnica PCR Touchdown (TP), que comienza con una temperatura de alineamiento alta y se reduce en 1° C en cada ciclo, procesaron 30 muestras de biopsias y 37 de linfa de pacientes provenientes de Corea. Se obtuvo que los primers que codifica para el gen 18kDa fue positivo el 56.7% en biopsias y en linfa 10.8 %, con la secuencia *rlep* el 80% en biopsia y 73% linfa; además se encontró que la PCR dió positivo en 67.7% de 31 pacientes con IB- y 6 pacientes tuvieron IB y PCR positivo, mientras que 2 de estos mostraron resultados negativos utilizando primers de 18kDa, por lo tanto se demuestra que *rlep* es más sensible que la secuencia 18 kDa. Otro estudio de PCR aplicando primers que codifican para esta secuencia, fue realizado por Gouillard, *et al.*, (2007) en biopsias provenientes de 110 pacientes no tratados, clasificados según la escala de Ridley y Jopling en: 15 TT, 45 BT, 17 BB, 12BL, BL, LL 21 y como controles utilizaron 35 muestras de piel provenientes de cirugías plásticas (abdomen y cara) con baciloscopia negativa. Utilizaron primers que amplificaban dos bandas una de 372pb y otra de 130 pb. La especificidad para ambos fragmentos fue del 100%; se detectó el fragmento 130 bp en 81 pacientes (73,6%) de 110 del grupo de pacientes del polo TT fue positivo en 40%, en BT el 55.5%. El 100% de BB,

BL y LL fueron positivos por PCR; mientras el fragmento de 372 bp se detectó en 52.7% del total pacientes, 13.3% en el grupo de pacientes TT, 33.3% en el BT, 64.7% BB, 83.3%BL y 95.2% LL. Las baciloscopias de la biopsias fueron positivas 39.1% así: TT (0%), BT (2.2%), BB (64.7%), BL (91.6%) y LL (95.2%). Se observó una mejor probabilidad de diagnóstico utilizando el fragmento de 130pb, especialmente casos de lepra tuberculoide.

La PCR amplificando la secuencia *rlep*, también se ha usado en pacientes tratados, Santos, *et al.*, 2001, incluyeron 33 personas que habían tenido diagnóstico de lepra indeterminada, tratamiento regular al menos 6 ó 4 años atrás, con prueba de Mitsuda negativa, IB=0. De los pacientes incluidos (14) 42.4 % habían tomado tratamiento para MB y (19) 57.6% para PB. Tomaron 90 muestras (26 bulbos de cabello, 30 linfa, 13 secreción nasal, 4 biopsia de piel, 17 sangre). Fueron PCR positivo en al menos una muestra 18 casos (54.5%), no se encontró diferencia significativa entre el esquema de tratamiento y la positividad de PCR. La positividad fue más alta en muestra de sangre, 4 individuos fueron PCR positivos en sangre y alguna otra muestra, No hubo correlación entre la PCR, los parámetros clínicos e histopatológicos. El ADN en pacientes PB persistió en más de la mitad de una década después de haber terminado el tratamiento, mostrando que el bacilo puede vivir y circular en él, pero no se puede excluir la reinfección además los autores consideran que la PCR podría ser ayudar a la detección de la infección subclínica y casos donde el diagnóstico por técnicas convencionales es inespecífico.

Por su parte, Gomes, *et al.*,(2005) en Brasil, amplificaron el fragmento de 372pb (X17153); en muestras de 52 pacientes leprosos no tratados (37 MB y 15 PB), los cuales clasificaron según la escala de Ridley y Jopling, se les práctico el examen clínico, prueba de Mitsuda, tomaron muestras linfa, biopsia de mucosa nasal. A los pacientes con lesiones se les tomó biopsia de la zona afectada, a estas muestras se le realizó baciloscopia y PCR. La baciloscopia en muestras de linfa fue positiva en el 65.4% (34) pacientes, por histopatología se encontró que el 69.2% (36) tenían IB positivo y 30.8% (16) negativo. En el moco nasal encontraron un IB positivo en 28 (53.8%) y negativo en 24 (46.2%). La PCR se desarrolló en 36 (69.2%) de los pacientes, en el grupo MB fué positiva en 91.9% y 13.3% en PB, se logró detectar ADN de *M.leprae* en 3 de la muestras de biopsia de mucosa nasal con IB negativo, 4 (25%), de 16 linfas de lesiones con

baciloscopia negativa y 8 (33. 3%) de 24 muestras de moco nasal con IB negativo, concluyendo que la PCR es útil para la detección de la enfermedad de Hansen.

Wichitwechkarn, *et al.*, (1995), amplificaron el fragmento de 531pb, utilizando primers S13 y S62 del gen *pra*, que codifica la proteína antigénica de 36kDa. Determinaron la infección causada por *M. leprae* en muestras de biopsia frescas y muestras de linfa de piel de 53 pacientes no tratados en Tailandia, también tomaron muestras después del tratamiento, realizaron comparaciones con las baciloscopias y detección de anticuerpos IgM anti PGL1 mediante la prueba de partículas en aglutinación. La PCR en pacientes MB fue positiva en 27(87.1%) de 31 biopsias y 41.9% (13/31) en muestras de linfa y en PB, 8 (36.4%) de 22 y 4 (18.22%) de 22 fueron positiva en biopsia y linfa respectivamente. Se incluyó 41 pacientes sin tratamiento: 25 MB y 16 PB. Al correlacionar la positividad de la PCR con la presencia de anticuerpos PGL-1, se encontró que el 92% (23/25) de los casos MB fueron positivos por PCR, y 68%(17/25) fueron seropositivos; mientras los casos PB fueron positivos por PCR en 43.75% (7/16) y un caso de estos, es decir 6.25%, mostró seropositividad. A 28 pacientes (20 MB y 8 PB) se les tomo muestras de linfa de lesión a los 1,3 y 6 meses después de iniciar TMD, donde la positividad disminuyó con el tiempo. En este estudio se muestra la PCR muestra una clara ventaja sobre la serología, especialmente en casos PB.

Torres *et al.*, (2003) compararon la prueba microscópica y la PCR, para la cual amplificaron el fragmento de 531pb que codifica el gen del antígeno de 36 kDa, mediante los primers S62 y S63 en muestras de linfa de piel, moco y biopsia de 60 de pacientes atendidos en un sanatorio en España. Los pacientes se clasificaron en grupos: 20 MB con TMD con IB positivo; 30 MB con IB negativo tratamiento completo mínimo por dos años y 10 PB que hubieran completado tratamiento 6 meses o al menos 8 años atrás; para la PCR se incluyeron 4 controles, en los métodos serológicos 40 individuos saludables y 10 pacientes con tuberculosis. La PCR fue negativa en todos los casos PB. En los pacientes MB con IB + la PCR detectó 13 (65%) de 20 muestras de moco nasal, 17(85%) de 20 linfas del lóbulo de la oreja, en 16(80%) de 20 linfas de lesión y en biopsia 20 (100%), mientras en los pacientes del grupo con IB negativo, el PCR fue positivo en 3(10%) de 30 biopsias en 1 (3.3%) de 30 linfas de lesión. En la serología los pacientes MB con IB + mostraron seroprevalencia para el antígeno DBSA del 85% y del 60% para el PGL-1. Los autores concluyen que los métodos convencionales y la PCR son sensibles

para la detección de la infección también muestran que la positividad de la PCR se correlacionan con los resultados de serología especialmente en casos MB con IB positivo; además estos métodos son importantes para el seguimiento de los pacientes y en el diagnóstico en casos donde hay pocos bacilos.

#### **4.9 DIAGNÓSTICO DE LA INFECCIÓN DE *M. leprae* Y SU UTILIDAD EN EL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN**

La infección antes de las manifestaciones clínicas a *M. leprae*, no es posible detectarla mediante la baciloscopia o histopatología debido a que estas necesitan gran cantidad de bacilos para mostrarse positivas, además esta bacteria no es posible cultivarla *in vitro* y el periodo de incubación es largo y variable, por ello se están estudiando otras metodologías más específicas y sensibles que permitan identificar tempranamente portadores de *M. leprae* que pueden transmitirla o que estén en riesgo de desarrollar lepra (Lombardi y Suárez ,1997), específicamente en poblaciones susceptibles como son los convivientes, vecinos o contactos sociales de pacientes con lepra.

**4.9.1 Diagnóstico basado en la respuesta inmunológica del huésped.** Estas pruebas tratan de detectar la respuesta inmunológica que se produce en el hospedero a consecuencia de la infección. Existen pruebas enfocadas a la detección de la infección en sus fases iniciales donde predomina la respuesta inmune celular y pruebas enfocadas a la detección de infecciones más avanzadas que muestran una respuesta fuerte de tipo humoral.

- **Detección de la inmunidad celular: intradermorreacción (lepromina).** Prueba cutánea, descrita por Mitsuday Hayasi en 1919, se basa en la reacción inflamatoria (respuesta retardada hipersensibilidad local) que se produce al inyectar en la cara anterior intradérmicamente 0,1 mL de una suspensión preparada de bacilos muertos de *M. leprae* obtenidos a partir de de biopsias de lesiones (lepromas) de pacientes con LL o de tejidos de armadillo infectado con el bacilo de Hansen. La interpretación de los resultados se realiza midiendo la induración a los 3 ó 4 días (Reacción de Fernández) y una induración papular 3 ó 4 semanas (Reacción de Mitsuda). El diámetro de la induración producida se mide y califica como sigue: sin induración es negativa, induración entre 1 y 2 mm dudosa, > 5 mm positiva, con úlcera, fuertemente

positiva. Una reacción de Fernández o Mitsuda positiva indica la presencia de hipersensibilidad retardada a los antígenos de *M. leprae* y sugiere infección previa, es decir la persona ha sido expuesta a los sus antígenos y ha sido capaz de montar respuesta específica mediada por células contra esta micobacteria.

Esta intradermorreacción no es considerada una prueba diagnóstica, se utiliza para la clasificación del enfermo de lepra, es positiva en pacientes con Hansen del tipo tuberculoide y lepromatoso en tratamiento, pero es negativa en estos últimos antes del tratamiento; también se emplea como pronóstico de la enfermedad y para el estudio de sujetos con riesgo de contraer la enfermedad aunque en estudios con lepromina se ha encontrado respuestas positivas en personas que nunca han estado expuestos a *M.leprae*, por lo cual la lepromina no se considera específica, especialmente en países con alta incidencia de tuberculosis, con práctica en vacunación BCG y exposición a micobacterias ambientales no patógenas (Geluk, *et al.*, 2005).

- **Detección de la inmunidad humoral.** Se basa en la detección de anticuerpos que genera el sistema inmune del hospedero infectado. La respuesta humoral suele ser fuerte y fácil de detectar en los estadios avanzados de la enfermedad, pero no en fases iniciales de la infección.

Se han realizado varios estudios encaminados al estudio de la serológicos en pacientes contactos y población en general con el propósito de determinar las personas que están en riesgo de padecer la enfermedad en un futuro. La seropositividad en contactos han variado entre 1.7 y 93%, estos resultados varían según la prevalencia de la enfermedad en el área, algunas veces se asume que la seropositividad es debido a las reacciones cruzadas con micobacterias ambientales, pero nunca ha sido comprobado. (Oskam, *et al.*, 2003); también se ha encontrado que en áreas endémicas las personas seronegativas también pueden enfermar (Meerker, *et al.*, 1986; Bakker *et al.*, 2004 y Goulart *et al.*, 2008), No obstante estas pruebas contribuyen a la detección de focos de transmisión, pero no permite diferenciar entre la infección pasada y/o reciente.

**4.9.2 Métodos moleculares.** Como la PCR puede detectar el bacilo en los individuos saludables como lo publicó De Wit *et al.*, (1993). Estos autores usando primers S12 y S13, que amplifican un fragmento de 531pb en muestras de moco nasal, incluyeron 81 personas de Filipinas; 56 eran trabajadores de un hospital, los cuales fueron divididos en dos grupos: 31 eran trabajadores ocupacionales que tenían contacto diario con los pacientes de lepra y 25 fueron considerados controles (11 no endémicos y 14 endémicos); los restantes correspondían a pacientes con previo diagnóstico (20 no tratados y 5 tratados). En los pacientes no tratados la PCR fue positiva el 55% (11) mientras en los tratados todas la muestras se mostraron negativas. En los contactos ocupacionales la PCR fue positividad en 6(19%) de 31, en los controles endémicos la positividad fue del 3 (12 %) de 14 y fue negativo en todas muestras de las personas del grupo no endémico. Por otra lado, Goullart, *et al.*, (1993), detectaron *M. leprae* en muestra de moco nasal y saliva de un paciente con lepra BT y sus familiares, amplificando un fragmento de 372 pb con primers ML1 y ML2 de la secuencia *rlep*. Fueron positivos el moco nasal del paciente y 4 (80%) de sus convivientes familiares, mientras en la saliva fue positivo en el paciente y 1 (20%) familiar también Almeida *et al*, (2004), amplificaron el ADN de las muestras de sangre y moco nasal de 125 convivientes de paciente y encontraron PCR positivo el 3.4%.

Una fuerte evidencia que involucra a los convivientes en la cadena de transmisión es la presencia de ADN de *M. leprae* en biopsias de la mucosa nasal, como lo demuestra Gomes, *et al.*, (2005) en Brasil, incluyeron 99 de contactos familiares, a los cuales los definieron como personas que viven o habían vivido con pacientes antes de 5 años del diagnóstico. Se realizan el examen clínico, para la PCR se toma muestras de biopsia de nasal, amplifican el fragmento de 372pb de la región X17153 y baciloscopia de moco nasal y linfa. El IB de linfa y moco nasal fueron negativos en todos los casos, la biopsia de mucosa nasal fue positiva para 10.1%, en su mayoría era familiares de pacientes MB y 1 de un PB. Por lo tanto se demuestra que la PCR puede ser una prueba importante para el identificar la infección subclínica y su transmisión. Sin embargo la sensibilidad de esta prueba es 69.2% y especificidad 89.9%, además se requiere procedimiento invasivo para obtener la biopsia de mucosa nasal.

En Colombia, Guerrero, *et al.*, 2002, estandarizaron una prueba de PCR utilizando iniciadores para un fragmento de 321 pb del gen *LSA/15* de *M. leprae* y se aplicó en población de ocho municipios del departamento del Cesar. Se investigaron los contactos

intradomiciliarios sin signos, ni síntomas de enfermedad de todos los casos nuevos de lepra diagnosticados durante el semestre de julio a diciembre de 1998. Se incluyeron 70 contactos en los cuales se tomaron muestra de moco nasal para el PCR: el 62,8% eran contactos intradomiciliarios de casos MB y 37,2% de casos PB. El PCR fue positivo para un 12,8% de los contactos. Se encontró una mayor probabilidad de infección entre los cónyuges que entre el resto de los convivientes con parentesco o sin él.

Por otra parte, Job *et al.*, 2008, evaluaron el frotis de la piel y la secreciones nasales de contactos de pacientes MB. Las muestras fueron analizadas por microscopia y PCR. Los resultados mostraron que el 60% de pacientes no tratados tenían BAAR en la piel y el 80% y 60% tenía ADN de lavado de piel y moco, respectivamente. El análisis de 93 contactos mostró 17% de positividad de PCR en muestras de piel y 4% en moco antes del tratamiento del caso índice, a los dos meses de tratamiento todos fueron negativos para el ADN, sugiriendo que los pacientes MB contribuyen a la diseminación de *M. leprae* en el ambiente y los contactos están en riesgo de infectarse a través del moco nasal y la superficie de la piel.

Se ha investigado la dinámica de la transmisión de *M.leprae* en la población en general como el estudio realizado por Klaster, *et al.*, (1993), en dos ciudades en Indonesia, donde la lepra es endémica. Tomaron muestras de moco nasal de las personas incluidas y frotis de piel de pacientes para calcular IB; amplificaron un fragmento de 531 pb del gen *pra*. Se examinaron 1302 personas, de los cuales, 0.33% (13) eran pacientes. Se realizó PCR a 1228 personas, encontrándose positiva 7.8%. Entre los 11 pacientes incluidos 1(9.1%) fue positivo, de 42 contactos familiares fue positivo 1 (2.4%) y en 1175 no contactos 94 (8.0%) fueron positivos. Este estudio mostró que la población en general tiene exposición a *M .leprae* y también podrían considerarse como un grupo transmisor del bacilo.

Hatta *et al.*, 1995; en Indonesia evaluaron la PCR, para determinar portadores de *M. leprae* en la población en general, realizaron examen clínico y toma de muestras nasofaríngeas y a los pacientes linfa de piel para el IB. La PCR fue específica para un fragmento de 530 pb del gen *pra*. Registraron 1923 personas, 1171 les realizaron examen clínico, se encontraron 6 pacientes nuevos en su mayoría PB. La PCR se le practicó a 418 y fueron positivos 12 equivalente 2.9%. Con esta técnica fue posible

encontrar casos nuevos, los que en su gran mayoría eran PB. Las personas positivas a la PCR durante la primera encuesta fueron negativas en la segunda, lo cual sugiere que los portadores nasales son transitorios. La tasa de detección de casos clínicos no cambió mucho durante los dos años, desde la introducción de la TMD. Aunque la presencia de *M. leprae* no implica infección, la excreción de bacilos podría favorecer la expansión, en el ambiente, también Chan, *et al.* (1997), en Filipinas estudiaron tres áreas, a la población en general les realizaron el examen clínico y toma de muestra de moco nasal. A 8289 personas entre las cuales encontraron 48 casos de lepra (prevalencia de 5.8/1000), hubo 218 contactos familiares. Mediante PCR se detectaron 6.9% portadores nasales de los cuales 10 eran contactos de pacientes en tratamiento, 4 contactos de pacientes que habían dejado el tratamiento y 1 un paciente nuevo.

Cardona y Beltrán, (2004), estudiaron 61 convivientes de 16 pacientes con lepra MB en Antioquia Colombia, se les realizaron el examen clínico, coloración de Zielh Neelsen y PCR en muestras de moco nasal y linfa de oreja, para el PCR, emplearon los primers de 18kDa1 y 18kDa2, también detectaron anticuerpos IgM contra el antígeno PGL-1 y aplicaron lepromina leída entre los 21-28 días. Encontraron las baciloscopias y la PCR negativos en todos los convivientes, sin embargo el 10% tuvieron IgM anti PGL-1, 54% fueron Mitsuda positiva. Los autores concluyeron que es importante la evaluación desde diferentes metodologías para la detección de casos nuevos e infectados en nuestro país. En el 2008 Cardona-Castro, Beltrán- Alzante y Manrique -Hernández, investigaron la infección en 402 convivientes de 102 pacientes provenientes de regiones de Colombia con prevalencia alta de Hansen. 54 (13.4%) fueron anticuerpos positivos para anti-PGL-1, para la PCR se amplificaron una banda de 289 pb, incluyó 71 de muestras moco nasal de las cuales fueron positivas 22 (31%), demostrando la transmisión de *M.leprae* entre la población y la identificación temprana de la infección.

En una investigación en tres poblaciones de Indonesia, Izumi, (1999), realizó un seguimiento de la infección subclínica causada por *M.leprae* entre 1997-1998. Examinó en 1997 a 936 personas, encontró 35 pacientes, de los cuales 24 fueron nuevos (MB=18 PB =6). En 1998, evaluó 861 personas donde encontró 21 pacientes (MB=15 PB =6). Desarrolló una PCR anidada usando cuatro iniciadores oligonucleótidos, L1 y L2, que amplifican un fragmento externo de la secuencia del gen *Gro El* de 548pb y



oligonucleótidos L3 y L4 para un fragmento interno de 347 pb, en muestras de moco nasal de 890 personas saludable, encontró una positividad 26,6% distribuida entre contactos convivientes y no contactos. Entre 1997-1998 se diagnosticaron 13 casos nuevos quienes presentaron con anterioridad alguna evidencia relacionada con lepra: 6 fueron convivientes de pacientes, 6 fueron seropositivos, 6 tenían lesiones sospechosas y uno tenía el nervio engrosado, sin embargo ninguno de estos se considero factor para desarrollar lepra. Este autor concluye que no existe una relación directa entre la infección en contactos convivientes y no contactos, posiblemente se deba al grado de endemismo de la bacteria.

Torres *et al.*, (2003) en su estudio realizado en España, incluyeron 43 contactos (12 familiares y 31 ocupacionales), emplearon lepromina , serodiagnóstico para los antígenos específicos de *M.leprae* (PGL-1 y DBSA) y la PCR amplificando el fragmento de 531pb que codifica el gen del antígeno de 36 kDa, mediante los primers S62 y S63 en muestras de moco nasal. Todos fueron lepromina negativa, 2 individuos fueron positivos para PCR y anticuerpos IgM anti PGL-1 o DBSA, y un caso fue solo positivo para anticuerpos, estos pacientes fueron considerados como personas con alto riesgo de enfermar y se sugiere la posibilidad de incluirlos en un programa de control y quimiprofilaxis.

Cairns *et al.*, (2004), combinaron la técnica del PCR y técnicas inmunológicas, para estudiar tres comunidades endémicas en la India, las cuales se examinaron por 2 a 3 años. Para la PCR utilizaron primers que codifican para el gene *pra* y *rlep*; solo el 1.6%(42) de 2552 moco nasales fueron PCR positivos y el 68% de las salivas tuvieron anticuerpos IgA anti *M leprae*. De los PCR positivos 14.3 % (6), tuvieron también fuertemente positiva IgA. El antecedente de BCG fue asociado con la respuesta inmune de la mucosa, pero no con la positividad de la PCR. En esta última prueba los resultados no persistieron. Los resultados positivos por PCR fueron observados en estación húmeda.

Prakoeswa, Agusni and Izumi (2007), detectaron ADN de lepra en muestras de sangre de 29 casos subclínicos, definidos como aquellos asintomáticos con anticuerpos IgM positivos (>600 u/mL) de los cuales 89,7 % eran contactos de pacientes de MB y 10,3% de PB. Realizaron PCR anidada, amplificando un fragmento de a 99 pb en una de 130pb

de la las secuencia *rlep*, utilizando primers LP1, LP2, LP3 y LP4. Mostraron amplificación 20,7%, no hubo diferencia significativa entre el nivel de anti – PGL-1 observados y los PCR positivos. En conclusión se sugiere la activa transmisión de *M.leprae* y la posibilidad de detectar mediante la PCR grupos de transmisión.

Finalmente, los hallazgos en estas investigaciones (Tabla 2) contribuyen al conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad de Hansen, además permiten discriminar los individuos que se encuentran en riesgo de desarrollar la enfermedad, realizar el monitoreo de los contactos y por consiguiente contribuir al control de la transmisión de esta enfermedad y justificar la quimioprofilaxis.

#### **4.10 QUIMIOPROFILAXIS EN HANSEN**

Todavía no existe una vacuna efectiva contra la lepra, aunque se conoce factores de protección como la vacuna (BCG) contra la tuberculosis la cual se recomienda aplicarla a todos los convivientes asintomáticos (Protocolo de vigilancia de lepra, 2008). Esta ha mostrado una efectividad entre el 20% y el 80% contra la lepra. En algunos países, la quimioprofilaxis es más factible que la vacunación BCG y se ha propuesto su uso en grupos con riesgo a desarrollar la enfermedad.

La quimioprofilaxis con dapsona tiene una eficacia del 60% para prevenir lepra en los contactos, requiere un tratamiento largo y es generador de resistencia (Smith and Smith, 2000). Moet, *et al.*, 2008, evaluaron con una sola dosis, en 28 092 contactos cercanos de 1037 casos de lepra recientemente diagnosticados en una región altamente endémica. Realizaron el seguimiento cada año durante 4 años, encontrando una reducción de la incidencia de 57% a 34,9% y Cartel *et al* 1992, trataron dos poblaciones una de 2786 habitantes y 3 144 emigrantes y sus familias, con dos dosis de rifampicina con un intervalo de tres meses durante 4 años, logrado reducir la incidencia. Se obtuvo una eficacia de 40 a 50%

Según los estudios, la quimioprofilaxis puede contribuir a disminuir el desarrollo de señales clínicas en personas infectadas con *M leprae*, aunque estos es incierto por el largo periodo de incubación de esta micobacteria, no se conoce a cerca de los efectos secundarios que causa estos medicamentos y no se ha recomendado su uso universal.

**Tabla 2. Resumen de antecedentes de la aplicación de la PCR para detectar ADN de *M.leprae* en convivientes**

Región genómica	Tipo de PCR	Tamaño del fragmento (pb)	Primer	Tipo de muestra	Tamaño de la muestra (n) y descripción	Resultados PCR	Literatura
						% total de positividad	
Gen <i>pra</i> (proteína antigénica de 36 kDa)	Convencional	531	S62 S13	Moco nasal	81 personas: (Trabajadores ocupacionales =31 controles= 25 (no endémicos=11 y endémicos =14),Paciente=25 (tratados =14 no tratados11 ))	Contactos ocupacionales =19 Controles endémico= 12 Pacientes no tratados : 55 Pacientes tratados =0	De Wit <i>et al.</i> , 1993
<i>Rlep3</i> (X1715 3)	Convencional	372	R1 – R2	Moco nasal y saliva	5 Convivientes de 1 paciente	Moco nasal y saliva paciente= + Moco nasal convivientes =80 Saliva conviviente = 20	Gourlart, <i>et al.</i> , 1993,
<i>Rlep3</i> (X1715 3)	Convencional	372	R1–R2	Bx de la mucosa nasal	99 convivientes	10,1	Gomes, <i>et al.</i> , 2003
LSA/15	Convencional	321	Mig 1- Mig2	Moco nasal	70 contactos asintomático intradomiciliarios	12,8	Guerrero, <i>et al.</i> , 2002
Gen <i>hsp18</i> (codifica la proteína 18kDa)	Convencional		18k-18 k	frotis de la piel y la secreciones nasales	Pacientes no tratados cuantos 93 contactos de pacientes MB	<b>Pacientes no tratados</b> Moco nasal=60 Frotis de piel=80 <b>Contactos antes de tratamiento de paciente</b> Frotis de piel= 17% Moco nasal= 4% <b>Contactos: Dos meses de tratamiento</b> Moco nasal y frotis = 0	Job <i>et al.</i> , 2008
Gen <i>pra</i> (proteína antigénica de 36 kDa)	Convencional	531 pb	S62 y S13	Moco nasal	1302 personas	Moco nasal = 7.8 de 1228 Moco nasal de contactos familiares= 2,4 de 42 No contactos= 8 de 1175	Klaster, <i>et al.</i> ,1993
<i>Rlep</i>	Convencional	372	ML1- ML2	Moco nasal y sangre	125	3,4	De Almeida, 1993
Gen <i>pra</i> (proteína antigénica de 36 kDa)	Convencional	531 pb	S62 - S13	Moco nasal	1923	2,9 de 418	Hatta <i>et al.</i> , 1995

**Tabla 2. Resumen de antecedentes de la aplicación de la PCR para detectar ADN de *M.leprae* en convivientes**

Región genómica	Tipo de PCR	Tamaño del fragmento (pb)	Primer	Tipo de muestra	Tamaño de la muestra (n) y descripción	Resultados PCR	Literatura
						% total de positividad	
NR	Convencional	NR	NR	Moco nasal	8289	Portadores nasales =6.9%	Chan, <i>et al.</i> 1997
Gen <i>hsp18</i> (codifica la proteína 18kDa)	Convencional	NR	18kDa1 y18kDa 2	moco nasal y linfa de oreja	61	0	Cardona y Beltrán, 2004
Gen <i>hsp18</i> (codifica la proteína 18kDa)	Convencional	289 pb	18kDa1 y18kDa 2	moco nasal	402 convivientes	31% de 71	Cardona–Castro, Beltrán-Alzante y Manrinque – Hernández, 2008
Gen <i>Gro EI</i> (Codifica el antígeno de 65 KDa)	Anidada	Ext 548 Int 347	Ext L1-L2 Int: L3 - L4	moco nasal	890 personas	contactos convivientes y no contactos 26,6	Izumi, (1999)
Gen codifica el antígeno de 36 kDa	Convencional	531pb	S62 y S63	moco nasal	43 contactos (12 familiares y 31 ocupacionales)	4,6%	Torres <i>et al.</i> , 2003
<i>Pra;</i>	Convencional	531 pb	S62 y S13	moco nasal	2552 Personas	1,6	Cairns <i>et al.</i> , 2004
<i>Rlep</i>	Anidada	Externo 120 Interno 99	Ext: Lp1-Lp2 Int: Lp3-Lp4	Sangre	Personas con anticuerpos anti PGL-1-+	20,7	Prakoewa, Agusni and Izumi, 2007

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 TIPO DE ESTUDIO

Este estudio es de tipo descriptivo, de corte transversal, llevado a cabo en los municipios con alta endemicidad de la enfermedad de Hansen en el Departamento del Cauca entre los años 2001-2007.

### 5.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se citaron a todos los convivientes de pacientes con diagnóstico de Hansen registrados en la Secretaría Departamental de Salud del Cauca entre los años 2001-2007, provenientes de los municipios del departamento del Cauca con alta endemicidad ( $1 > 10$  000 habitantes (Figura 10), en total se incluyó una muestra (n) de 111 convivientes procedentes de: Puerto Tejada, El Tambo, Villa Rica, Mercaderes, Bolívar, Padilla y Sucre, adicionalmente se incluyó Santander de Quilichao y Popayán.

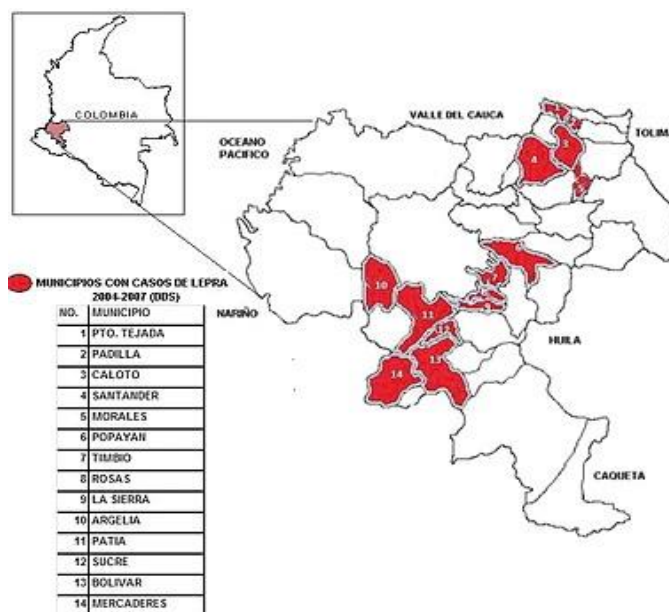


Figura 10. Municipios con casos de lepra en el Departamento del Cauca.

Fuente: Datos DDSC, 2006.

### 5.3 DEFINICION DE LA POBLACION

Se tuvo en cuenta las siguientes definiciones:

- **Caso índice.** Persona con diagnóstico de Hansen entre los años 2001-2007, notificado en la Secretaria Departamental del Cauca (DDSC). Los casos índices se clasificaron teniendo en cuenta las siguientes definiciones:
  - **Tratado asintomático.** Persona que ha terminado tratamiento para Hansen y el examen clínico al momento de ingresar al estudio no presenta signos, ni síntomas de la enfermedad.
  - **Paciente en tratamiento.** Persona que está recibiendo terapia multidroga PB o MB para Hansen al momento de ingresar al estudio.
  - **Paciente en recaída.** Persona que ha tomado tratamiento para Hansen pero en el examen clínico presenta reaparición síntomas de esta enfermedad además el examen histopatológico es positivo para BAAR.
- **Conviviente.** Es toda persona que vive o ha vivido en el hogar del caso índice, al menos un mes antes de iniciar el tratamiento para la enfermedad de Hansen. Este grupo se definió así:
  - **Conviviente asintomático.** Persona que en el examen clínico al momento de ingresar al estudio no presenta síntomas o signos de la enfermedad de Hansen.
  - **Conviviente sospechoso.** Persona que en el examen clínico al momento de ingresar al estudio presenta algunos de los siguientes signos: manchas, placas eritematosas de límites nítidos, infiltradas con el centro deprimido o con bordes difusos, con alteración de la sensibilidad térmica, algica o táctil (con o sin la disminución de la sudoración y el pelo), nódulos uno o varios, troncos nerviosos engrosados o dolorosos espontáneamente o a la palpación, alopecia de la cola de las cejas y/o engrosamiento del pabellón auricular.

- **Conviviente enfermo.** Persona con diagnóstico de Hansen después del caso índice.
- **Conviviente con antecedente de enfermedad.** Persona con diagnóstico de Hansen antes del caso índice.

## **5.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

El presente estudio tuvo en cuenta los siguientes criterios:

**5.4.1 Criterios de Inclusión.** Convivientes de casos índices con diagnóstico de lepra dentro de los últimos 6 años y que convive en la misma casa por lo menos un mes antes del diagnóstico del caso índice, además que acepten los parámetros de consentimiento informado.

**5.4.2 Criterios de Exclusión.** Persona que no aceptaron participar en el estudio.

## **5.5 PROCEDIMIENTOS**

**5.5.1 Consideraciones éticas.** Este estudio se tuvo en cuenta las consideraciones éticas de la Declaración de Helsinki y la Resolución No.008430 del Ministerio de Salud de Colombia. Todos los participantes fueron voluntarios, se les informó de los objetivos del estudio y los procedimientos (examen clínico, la toma de muestra y su proceso) se realizaron con la previa la aprobación del consentimiento informado de los adultos participantes y a los niños con la aprobación de un adulto responsable(Anexo A).

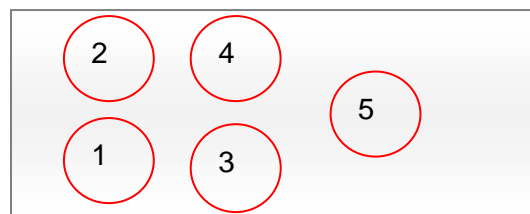
**5.5.2 Recursos humanos.** Personal médico y enfermera, realizaron el examen clínico (búsqueda manchas en la piel y evaluación) y toma de las muestras según las guías de manejo de la lepra (Ministerio de Protección social, 2008).

**5.5.3 Recolección de datos y obtención de muestras clínicas.** A los casos índices y conviviente se le realizó una visita domiciliaria. Se les registró los datos personales, epidemiológicos, clínicos de los formatos correspondientes (anexo B y C) y se clasificaron según parámetros anteriormente mencionados. A los pacientes y convivientes

asintomáticos se les tomó muestras de moco nasal, orina y algunos linfa del lóbulos de las orejas; en los pacientes con sospecha de recaída y convivientes sintomáticos se les tomó las anteriores muestras y adicionalmente de linfa de la lesión y/o biopsia del área afectada (alteración de la sensibilidad térmica, álgica o táctil), con el fin de clasificar clínicamente los casos índices y determinar posibles focos de transmisión.

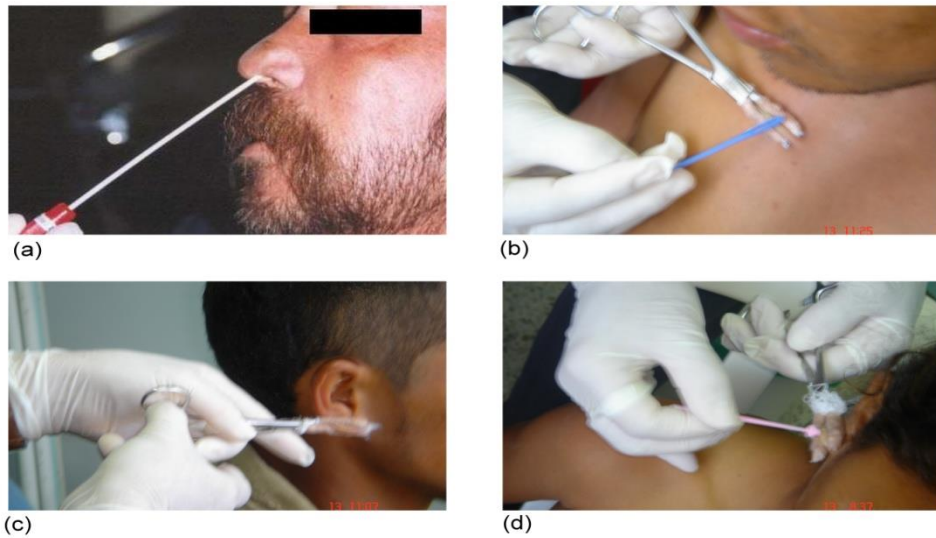
A los pacientes y convivientes se les realizó toma de muestras para la baciloscopia en un portaobjetos limpio con cinco círculos pequeños hechos con lápiz de cera y codificado para posterior tinción y lectura (Figura 11), extracción de ADN y PCR *rlep* anidada. Los procedimientos se describen a continuación:

- **Moco nasal.** Se frotó varias veces cada fosa nasal con un hisopo estéril humedecido en solución salina, en un portaobjetos limpio, se realizó un frotis de 5mm de diámetro en dos de los círculos; con otro hisopo estéril se hizo el mismo procedimiento y se colocó en tubo eppendorf nuevo y estéril que contenía 500 uL de alcohol al 75% (preparado con agua tratado con Dnasa) y previamente codificado (Figura 12a).
- **Líquido intersticial o linfa (lóbulos de la oreja y/o lesión).** Se desinfectó el área (oreja o lesión de piel) con alcohol antiséptico, se presionó empleando una pinza tipo kelly, mosquito o con los dedos índice y pulgar, se punzó con una lanceta desechable y se extendió directamente sobre la placa realizando un frotis de 5mm diámetro. Para la extracción de ADN, la linfa se tomó con un palillo nuevo estéril y se colocó en un tubo eppendorf nuevo y estéril con 500 uL de alcohol al 75%(Figura 12 b,c,d)



**Figura 11. Lámina para baciloscopia** (1) y (2) moco fosa nasal izquierda y derecha (3) y(4) Linfa de oreja izquierda y derecha (5)lesión.





**Figura 12.** Procedimientos toma de muestras. (a) Moco nasal; (b) Linfa de lesión; (c) y (d) Linfa del lóbulo de las orejas

- **Biopsia de piel.** Se realizó en condiciones asépticas, en seguida se aplicó anestesia local subcutánea; se retiró un fragmento de 1cm de diámetro aproximadamente y se procedió a suturar. La muestra se dividió una parte para la extracción de ADN y otra en formol para la estudio histopatológico.

Las muestras linfa, moco nasal y biopsia, se condujeron en hielo hasta el laboratorio, se centrifugaron por 8' a 12000 rpm y se dejaron secar a temperatura ambiente. A cada tubo se le añadió 400µl de solución tampón Tris- EDTA 1X (TE-1X), se agitó fuertemente y la suspensión se dividió en dos viales conservados a -20°C hasta la extracción de ADN.

- **Orina.** Se recolectó preferiblemente en horas de la mañana, en un frasco nuevo, se transportaron en hielo hasta el laboratorio. Se tomó 2 muestras de orina de 1500 µl en tubos eppendorf, se centrifugo a 12000 rpm por 8'. El sobrenadante se decantó y el botón se resuspendió en alcohol al 75.

## 5.6 PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO.

**5.6.1 Baciloscopia.** La tinción de Ziehl Neelsen fue realizada en el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca y sus resultados se reportaron en IB (Ver Tabla 1).

### **5.6.2. Extracción de ADN**

A cada de la muestras recolectadas (moco nasal, linfa de oreja y/o lesión, biopsia frescas o al sedimento de 1500 µl de orina) se realizó una desactivación: colocando la muestra en 500 µl de etanol al 75%, se procedió a centrifugar a 12000 rpm por 6 minutos, luego se decantaron y el botón se dejó secando a temperatura ambiente (mínimo 2 horas), luego se guardaron en el congelador de -20°C hasta la extracción.

Para la extracción de ADN se empleó el método de digestión enzimática estandarizado por INS (Instituto Nacional de Salud) modificado por el Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular de la Universidad del Cauca. A cada muestra se le adicionó 400 µl de Tris- Edta 1X (TE-1X), con el fin de resuspender el botón, se sometieron a ebullición por 20 minutos e incubación a 37° C con lisozima (10mg/mL). Se trató con proteinasa K (7 mg / mL) y SDS 10% a 65° C por 1 hora. Se agregó 100 µl de NaCl 5M seguidamente se incubaron por 10 minutos a 65°C, se adicionó cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y por inversión se mezclaron por 30´y se centrifugaron 14.000 rpm por 15´ a temperatura ambiente, se separa el anillo proteico del ADN, transvasándolo a un nuevo tubo eppendorf debidamente codificado, se adicionó etanol absoluto (100%) y se procedió a incubar en el congelador de -70° C por 2 horas; se centrifugaron a 14000 rpm por 15´, en seguida se desechó el sobrenadante, se agregó 1mL de etanol al 70% y se centrifugó por 15´y se repitió dos veces este paso centrifugando por 5´, posteriormente se dejaron secar a T° ambiente. Las muestras de ADN se resuspendieron en TE 1X (50 µl para orina y biopsias, 40 µl para linfa y 30 µl para muestras de moco nasal). Se incluyó control de contaminación de extracción. El ADN se cuantificó a 260 nm, con un espectrofòmetro Gene Quan, utilizando diluciones de 1: 250.

**Amplificación de ADN.** Se empleó un PCR anidado para la secuencia *rlep*, la primera amplificación se utilizaron los oligonucleótidos externos LP1 y LP2 que amplifican el fragmento de 129 pb entre los nucleótidos 490-509 y 618-599, respectivamente (Tabla 2); en la segunda amplificación, se emplearon los oligonucleótidos internos LP3 y LP4, entre

los nucleótidos 505-522 y 603-586 de *rlep* respectivamente, que amplifican un fragmento de 99 pb (Tabla 3) dentro del fragmento de 129pb. Después de probar el protocolo estandarizado previamente por GININ, se realizo algunas modificaciones que optimizaron su funcionamiento:

En la primera amplificación: La mezcla de reacción contenía un volumen final de 50 µL constituida por: Buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> a 25mM, Dntps 200mM cada uno, LP1 y LP2 a 1µM, 2 Unidades (U) Taq polimerasa y agua ultrapure, cada mezcla de reacción se cubrió con 35 µL de aceite mineral. Se agrega entre 0,5 - 2 µg de la muestra de ADN. En cada procedimiento de amplificación se incluyó un control negativo una muestra ADN de tejido paciente con tuberculosis (*M.tuberculosis*) proporcionado por Laboratorio de Inmunología y enfermedades Infecciosas, como control positivo se incluyo de 10 fg de ADN *M. leprae* y 2 a 3 controles de contaminación de reactivos sin ADN. Las condiciones de amplificación fueron desnaturalización a 94°C x 5´ y 45 ciclos que consiste en: desnaturalización a 94°C x 1´, la hibridización a 59°C x 1´, extensión a 72°C x 1´, autoextensión 5 seg/c más una extensión final 72°C x 6´.

En la segunda amplificación: La mezcla de reacción contenía un volumen final de 50 µL constituida por: Buffer 10X, MgCl<sub>2</sub> a 25mM, Dntps a 200mM cada uno, LP3 y LP4 a 1µM,(Tabla 3), 2 Unidades (U) Taq polimerasa y agua ultrapura, cada mezcla de reacción se cubrió con 35 µL de aceite mineral. En cada procedimiento de amplificación se incluyeron 2 a 3 controles de contaminación de reactivos sin ADN. El programa de termociclado fue desnaturalización a 95°C X 5´ y 35 ciclos distribuido en: desnaturalización a 94° C por un 1´, la hibridización a 59°C x 1, la extensión a 72 °C y la autoextensión 5 seg/C más una extensión final 72°C x 6´.

**Tabla 3. Oligonucleótidos de la *rlep***

Nombre	Regió	Tamaño	Oligonucleotidos
	<b>n</b>		
LP1 490 - 509	<i>rlep</i>	129	5'TGCATGTCATGGCCTTGAGG3'
LP2 618 - 599	<i>rlep</i>		5'CACCGATACCAGCGGCAGAA3
LP3 505 - 522	<i>rlep</i>	99	5'TGAGGTGTCGGCGTGGTC3'
LP4 603 - 586	<i>rlep</i>		5'CAGAAATGGTGCAAGGGA3'

Fuente: Donoghue, 2004.

**5.6.5 Detección del producto amplificado.** Se sometió a corriente eléctrica en gel de agarosa al 2.7% en, coloreado con bromuro de etidio al 2.3 µg/mL; en cuanto a las

condiciones electroforéticas empleó el buffer TBE 1X (Tris-Borato-EDTA), con Condiciones de corrida 110V, 400 mA y 80w, como fragmento de comparación se utilizó el marcador de peso molecular (Ladder 123 pb); fue visualizado y retratado bajo luz ultravioleta.

**5.6.6 Detección de Inhibición.** Para descartar la presencia de inhibidores las muestras negativas se amplificaron para el gen de betaglobina con primers Bg1 (5' ACACAAACTGTCTTCACTAGC 3') y Bg2 (5' CAACTTCATCCACGTTCCACC 3') que amplifica un fragmento de 123 pb. La mezcla para PCR en un volumen final de 50µl contiene: Buffer para PCR 1X, MgCl<sub>2</sub> a 2,5 mM, Dntps a 200 uM, Bg1 y Bg2 a 50ng/µl, formamida al 0.01 %, Taq DNA polimerasa 1U. El programa de termociclado fue: denaturalización a 94° C x 4' y 45 ciclos de desnaturalización a 94°C x 1', hibridación a 57° C x 2' y extensión a 72° C x 1:30' con autoextensión de 5" en cada ciclo y una extensión final a 72°C x 7'. La detección del fragmento de 123 pb se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 3 % en TBE 1X, teñido con Bromuro de Etidio 2.3 µg/mL; el fragmento se comparó con marcador de peso molecular (Ladder 123 pb). Condiciones de corrida 110V, 400 mA y 80w.

## 5.7. ANALISIS ESTADISTICO

Todos los datos se registraron en una base de datos de Excel ® fueron analizados mediante un software estadístico SPSS versión 11.5. Los datos se analizaron para determinar la frecuencia de presentación de cada variable y su distribución. En las variables continuas se obtuvo, mediana, desviación estándar (ds), promedios y rangos. La asociación estadística entre la variable resultado y las explicativas se evaluó mediante tablas de 2x2. La significancia estadística de las tablas de contingencia se determinó mediante la prueba de Chi-cuadrado o la prueba exacta de Fisher en caso necesario. Para las variables numéricas se empleó la prueba T Student o U de Mann-whitney Se consideró significativa una probabilidad menor de 0,05 ( $p \leq 0,05$ ). (Figura 13)

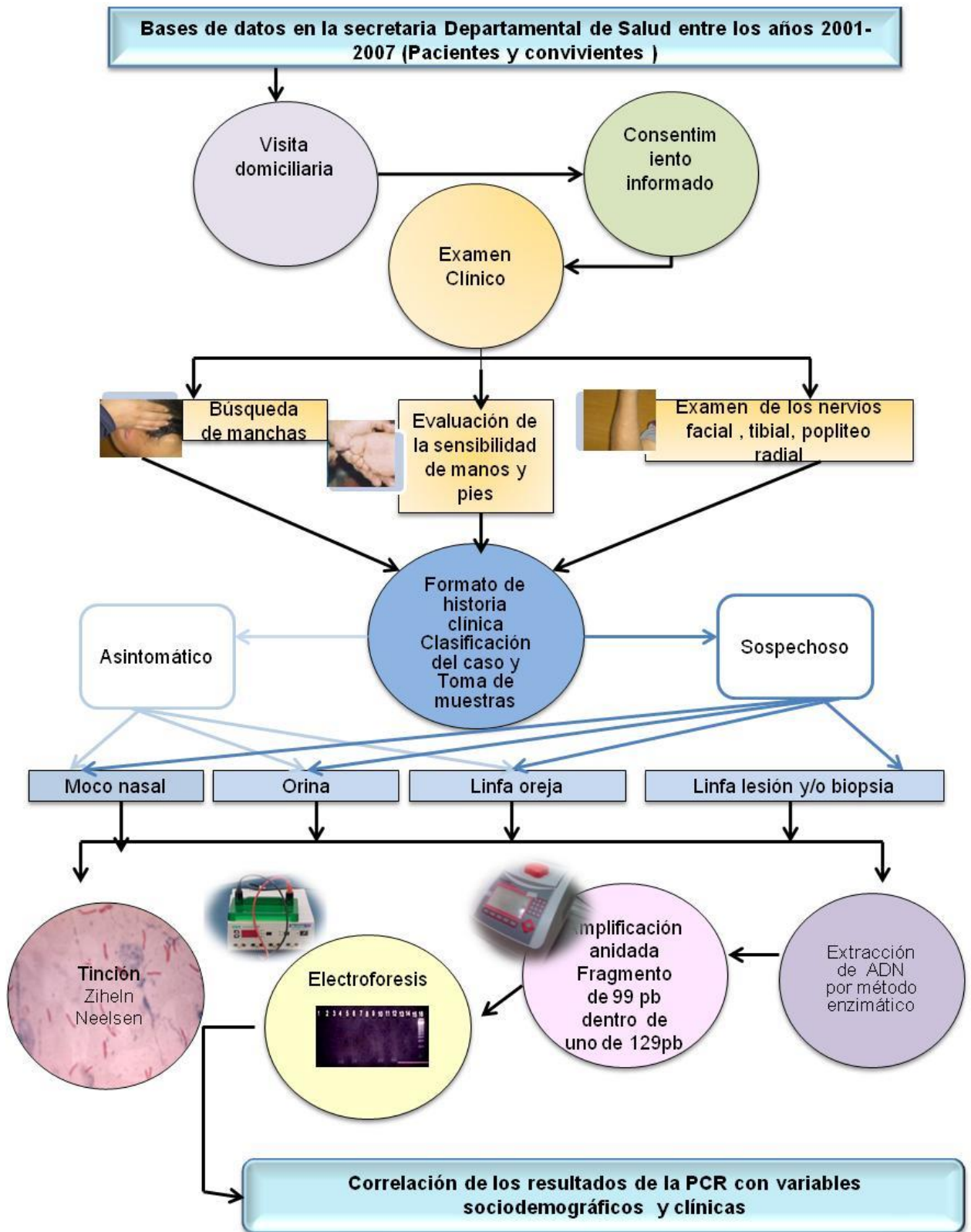


Figura 13. Diagrama de Flujo de la metodología usada

## 6. RESULTADOS

En el presente estudio se incluyeron 111 convivientes de 38 pacientes con Hansen diagnosticados de modo clínico, microbiológico y/ o histopatológico e inscritos en el programa de control de la lepra de la Secretaria Departamental del Cauca entre los años 2001 – 2007. El periodo de ingreso de los convivientes fue entre dos lapsos de tiempo 2005-2006 y 2007-2008, provenientes de los municipios de Puerto Tejada, El Tambo, Villa Rica, Mercaderes, Bolívar, Padilla, Sucre, Santander de Quilichao y Popayán. (Tabla 4).

**Tabla 4. Municipios de procedencia de casos índices y convivientes**

Municipio	Casos Índices		Convivientes	
	n.	%	n.	%
Puerto Tejada	14	36,8	40	36,0
Padilla	4	10,5	17	15,3
Santander	2	5,3	2	1,8
Villa Rica	1	2,6	1	0,9
Bolívar	3	7,9	9	8,1
Sucre	4	10,5	13	11,8
Mercaderes	3	7,9	10	9
Popayán	4	10,5	10	9
El Tambo	3	7,9	9	8,1
<b>Total</b>	<b>38</b>	<b>100</b>	<b>111</b>	<b>100</b>

El municipio con mayor porcentaje de pacientes y convivientes fue Puerto Tejada con 36, 8% y 36 %, respectivamente, seguido por Padilla con 10, 5 % casos índices y 15, 3% convivientes, el municipio con menor cantidad es Villa Rica con un caso 2,6% y un conviviente, es importante resaltar que en Popayán se incluyeron 3 casos provenientes de otras zonas que residen actualmente en esta localidad.

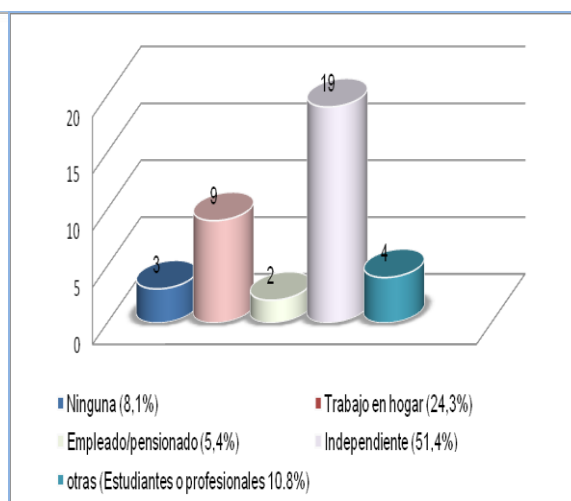
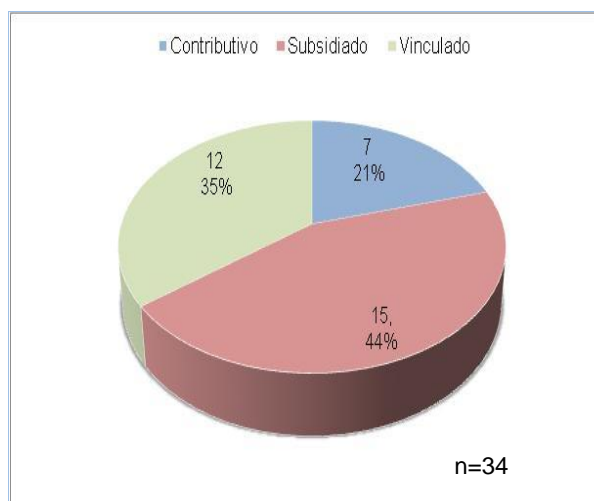
### 6.1 CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS DE CASOS INDICES Y CONVIVIENTES

Los datos sociodemográficos se encuentran relacionados en la tabla 4. En los 37 de 38 casos índices con edad conocida, la media de edad fue de 48 años (ds  $\pm$ 20,5) con rango entre 6 y 87 años, se encontraron 3 casos menores a 15 años que corresponden 8.1%. El 65,8 % de los casos pertenecían al género del masculino, en el grupo de pacientes la razón de hombre a mujer fue (1:2). El 52,6% viven en zonas categorizadas como urbana

**Tabla 5. Características sociodemográficas de casos índices y convivientes**

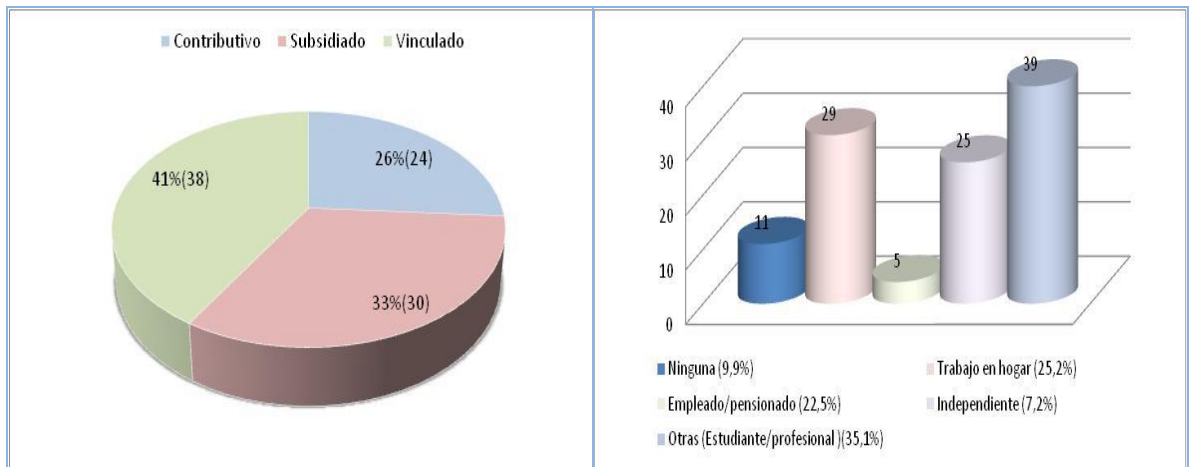
Característica	Casos índices		Convivientes	
	n	%	n	%
<b>Edad (Años)</b>				
1-4	0	0	11	9,9
5-14	3	8,1	33	29,7
15-44	13	35,1	40	36,0
45-64	14	37,8	17	15,3
>65	7	19	10	9,0
<b>Promedios (años) <math>\pm</math>ds</b>	48 $\pm$ 20,5		27,5 $\pm$ 21,9	
<b>Rango (años)</b>	(6-87)		(1 - 86 )	
<b>Género</b>				
Masculino	25	65,8	48	43,2
Femenino	13	34,2	63	56,8
<b>Procedencia</b>				
Urbana	20	52,6	53	47,7
Rural	18	47,4	58	52,3

La edad de los convivientes fluctuó entre 1 a 86 años, con una media de 27,5 años (ds  $\pm$ 21,9), el grupo de edad con más número de personas fue los menores a 15 años con 44 equivalentes a 39,6%, en menor proporción se encuentran los mayores de 65 años, la mayor parte de los convivientes están representados por el género femenino con 56,8% y en su mayoría son provenientes de la zona rural con 52,3% (Tabla 5).



**Figura 14. Seguridad social de casos índice**      **Figura 15. Ocupaciones de los casos índices**

Con relación a la seguridad social, 44% de los casos índices estaban afiliados al régimen de seguridad social subsidiado (Figura 14); se ocupan en su mayoría 51,4% en actividades independientes principalmente la agricultura (Figura 15).



**Figura 16. Afiliación a la seguridad social en convivientes.** Figura 17. Ocupaciones de los convivientes.

El mayoría de los convivientes 41% pertenecían el régimen vinculado o no afiliado (Figura 16); el 35,1 % son estudiantes o profesionales y se destaca los trabajos en el hogar con 25,2% (Figura17).

## 6.2 VARIABLES CLÍNICAS DE LOS CASOS ÍNDICES

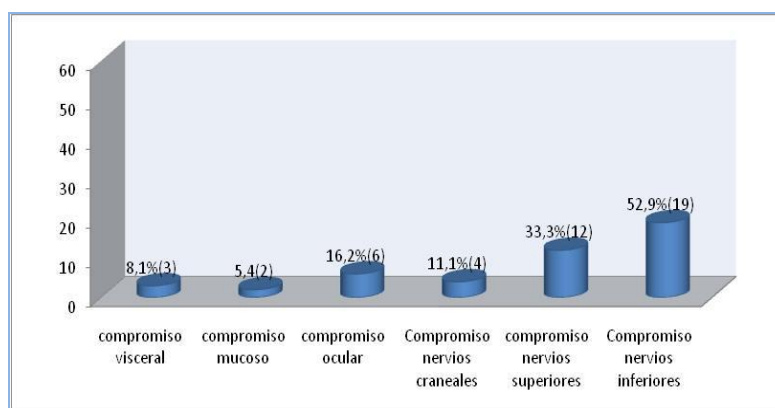
**Tabla 6. Variables clínicas de los casos índices.**

Variable	n	%
<b>Tipo de lepra (OMS)</b>		
PB	13	35
MB	24	65
<b>Antecedente BCG</b>	20	53
<b>Estado del Paciente</b>		
Tratado asintomático	21	58,3
En tratamiento	14	38,9
Recaída	1	2,8
<b>Duración del tratamiento</b>		
Más de 3 meses	1	2,8
Menos de 3 meses	13	36,2
Finalizado	22	61,1
<b>Secuelas</b>	24	66,6

La tabla 6, muestra las variables clínicas registradas de los casos índices, se encontró que el 53% tenían aplicada vacuna de BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), según la historia clínica 65% había sido clasificados MB y 35% fueron catalogados como PB



Al realizar el examen clínico a los casos índices en el momento de ingresar al estudio, el mayor porcentaje 58,3% eran tratados asintomáticos, 14(38,9%) estaban en tratamiento y 1 (2,8%) fue sospechoso de recaída con tratamiento finalizado (Tabla 5) y se encontró que 66,6% presentaban secuelas de la enfermedad; el 16,2% de los pacientes tenían compromiso ocular en una menor proporción visceral y mucoso, 19 (52,9%) tenían afectado el sistema nervioso periférico, principalmente los nervios de miembros inferiores (ciático popliteo externo y tibial posterior) (Figura 18).



**Figura 18 Compromiso de los órganos y nervios del sistema nervioso periférico en casos índices**

### 6.3 VARIABLES CLINICAS EN CONVIVIENTES

**Tabla 7. Variables clínicas de los convivientes**

Variable	n	%
<b>Estado del conviviente</b>		
Asintomático	100	90,1
Sospechosos	8	7,2
Enfermo	1	0,9
Con antecedentes de enfermedad	2	1,8
<b>Antecedente de vacunación BCG*</b>	84	81,6

\* 8 individuos sin dato

La clasificación de los convivientes se realizó a partir del examen y de su historial clínico, se encontró que 18,4% no tenían aplicada BCG, 90,1% fueron considerados asintomáticos, 1,8 % y 0,9% fueron diagnosticados antes y después del caso índice respectivamente y 7,2% mostraron síntomas y signos sospechosos de la enfermedad: 4 con manchas hipocrómicas sin alteración de la sensibilidad, 1 solo con lesión con bordes elevados, 1 con lesión con bordes elevados sin alteración de la sensibilidad, atrofia y

parestesia en manos y pies, 1 con parestesia e hipoestesia en extremidades, 1 con hipoestesia en el nervio poplíteo lateral externo (Tabla 7).

#### 6.4 VARIABLES DE CONVIVENCIA

Tabla 8. Variables de convivencia

Variable	media	Rango
<b>Convivientes por caso índice</b>	3	1-7
<b>Tiempo de convivencia (meses)*</b>	194 (16años)	1-780
<b>Tiempo del diagnóstico a la toma de muestra (meses)</b>	27,5	4,4-84
Variable	n	%
<b>Tipo de caso índice*</b>		
MB	39	35,5
PB	71	64,5
<b>Comparte habitación**</b>	47	43,1

\*1datos desconocidos, \*\*2 datos desconocidos

El promedio de los conviviente por caso índice fue de 3 personas (1 a 7), El tiempo de convivencia de los convivientes con el casos índice osciló entre 1 mes a 780 meses, con una media de 194 equivalentes a 16 años, 64,5% de los convivientes cohabitan con pacientes MB y 43,1% comparten la habitación con los casos índices (Tabla 8).

Tabla 9. Relación de parentesco de los convivientes con el caso índice

Forma de parentesco	Relación de parentesco	n	%
consanguíneo	hijo(a)	42	37,8
	Padre o madre	12	10,8
	Hermano (s)	9	8,1
	nieto (a)	13	11,7
	sobrino	8	7,2
político	Conyugue	21	18,9
	Hijastro (a)	2	1,8
	Padraastro	1	0,9
	Cuñado (a)	2	1,8
	Nuera/yerno	1	0,9
<b>Total</b>		111	100

Teniendo en cuenta las relaciones de parentesco de los convivientes con el casos índice, se encontró que hijo es el parentesco más frecuente 37, 8%, seguido por conyugue con 19, 8 % y nieto con 11,7 % (Tabla 9).

## 6.5 DETECCIÓN DE DE *M.leprae* MEDIANTE BACILOSCOPIA E HISTOPATOLOGIA EN CASOS INDICES Y CONVIVIENTES

La tinción de BAAR fue negativa con índice bacilar igual a 0 en todas las muestras de casos índices y convivientes, obteniendo una frecuencia de detección de infección igual a cero. La biopsia tomada en 1 caso índice con sospecha de recaída, mostró características de la lepra de tipo lepromatoso y se observaron abundantes BAAR. Las biopsias analizadas de 3 convivientes con sospecha de Hansen no mostraron lesiones de la enfermedad ni se observaron BAAR.

## 6.6 DETECCIÓN DE ADN DE *M.leprae* MEDIANTE PCR-*rlep* ANIDADA

Este PCR *rlep* anidada detecta una banda de 99 pb dentro de una 129 pb. El control positivo de 10 fg ADN de *M.leprae* amplificó en todos los experimentos, los controles negativos y de contaminación (*Mycobacterium tuberculosis* y agua ultrapura) no mostraron amplificación (Figura 17), lo que asegura que no hubo contaminación.



**Figura 17. Electroforesis en agarosa del producto de la PCR anidada** (fragmento de la *rlep*) de tamaño de 99 pb . Líneas: 1,2,8, 9, 14,15 controles de reactivos, Line 4 –muestra de linfa, Línea 6- Muestra de moco nasal, línea10-muestra de orina, línea12\_10 fg ADN *M. leprae*, línea 13\_ ADN de tejido de paciente TB y línea 16\_marcador de peso molecular (Ladder) 123-pb

## 6.7 PCR *rlep* ANIDADA EN CASOS ÍNDICES

Se procesaron 73 muestras de 38 pacientes, se encontraron 2 mocos, 1 orina inhibidas (4,1%) y otra muestra de orina con muy baja obtención de ADN. Entre las restantes, moco nasal (33), orina (34), linfa de oreja (1) y biopsia de piel (1) fueron PCR positivo 11 (16%) muestras, 4(12,1%) en moco nasal y 6 (17,6%) en orina (Tabla 10).

**Tabla 10. Resultados de la PCR en diferentes muestras de los casos índices**

Tipo de muestra	PCR+ n(%)	PCR- n(%)	Total n
Moco	4(12,1)	29(87,9)	33
Orina	6(17,6)	28(82,4)	34
Linfas(oreja y lesión)	0(0)	1(100)	1
biopsia de piel	1(100)	0(0)	1
<b>Total</b>	<b>11(16)</b>	<b>58(84)</b>	<b>69</b>

**Tabla 11. Resultados de la PCR en los casos índices**

Resultado	n	%
PCR + en al menos una muestra	11	30,6
PCR + en 2 muestras	1	2,7
PCR - en todas las muestras	25	69,4

Se encontraron 11 casos índices con PCR positivo en al menos una muestra (Tabla11) equivalentes al 30,6% y un paciente (2,7%) tuvo 2 muestras positivas.

**Tabla 12. Relación del resultado de la PCR en casos índices con el tipo de enfermedad y el estado clínico al momento de inclusión en el estudio.**

Variable	PCR - n (%)	PCR +en alguna muestra n (%)	Total n	Valor P
<b>Tipo de caso índice</b>				
PB	9 (25,0)	4(11,1)	13	0,983 <sup>a</sup>
MB	16(44,4)	7(19,4)	23	
<b>Estado clínico del caso índice</b>				
Tratado y asintomático	15(41,7)	6(16,7)	21	0,311 <sup>b</sup>
En tratamiento	10(27,8)	4(11,1)	14	
Recaída	0(0)	1(2,8)	1	

a: Prueba de Fisher exacta ;b Prueba de X<sup>2</sup>; PB: Paucibacilar; MB: Multibacilar

La positividad de la PCR en los casos MB fue mayor 19,4% y similar en los pacientes ya y asintomáticos (16,7 %) además se detectó el ADN de *M.leprae* en el caso con recaída (Tabla 12).

## 6.8. PCR *rlep* ANIDADA EN CONVIVIENTES

Se procesaron 271 muestras entre moco nasal (111), linfa oreja (38), linfa lesión (10), orina (109) y biopsia de piel lesionada (3), se encontraron inhibidas 22(8,1%): 5 de moco nasal, 10 de orina, 7 de linfa, las cuales se excluyen del análisis. De las restantes muestras (249), el 18%(45) fueron PCR positivo; el tipo de muestra con mayor porcentaje de positividad es la orina con 23,2%(23), seguida por el moco 12,3%(13) (Tabla 13).

**Tabla 13. Resultados de la PCR en diferentes muestras de los convivientes**

Tipo de muestra	PCR+ n (%)	PCR- n (%)	Total
Moco	13(12,3)	93(87,7)	106
Orina	23(23,2)	76(76,8)	99
Linfa de Oreja	5(15,2)	28(84,8)	33
Linfa de lesión	3(37,5)	5(62,5)	8
biopsia	1(25,0)	2(75,0)	3
<b>Total n (%)</b>	<b>45(18,0)</b>	<b>204(82)</b>	<b>249</b>

**Tabla 14. Resultados de la PCR en los convivientes**

Resultado de la PCR	n	%
Conviviente PCR + en al menos un muestra	39	35,1
Conviviente PCR+ en 1 muestra	34	30,6
Conviviente PCR+ en 2 muestras	4	3,6
Conviviente PCR +en 3 muestras	1	0,9

Las 45 muestras son de 39 convivientes diferentes equivalentes a 35,1%, en donde 4 tienen 2 muestras positivas (moco nasal y orina; 1 en linfa y orina), un convivientes tuvo tres muestras positivas (Tabla 14).

## 6.9 ASOCIACIÓN DE LA POSITIVIDAD DE LA PCR *rlep* ANIDADA EN CONVIVIENTES CON VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS Y DE CONVIVENCIA CON EL CASO INDIC

Para el análisis de la asociación de la PCR y variables definidas se tuvo en cuenta los convivientes positivos en al menos una muestra.

**Tabla 15. Distribución de la positividad de la PCR según los municipios**

Municipio	PCR-	PCR + en al menos una muestra n (%)
Puerto Tejada	27(24,3)	13(11,7)
Padilla	10(9,0)	7(6,3)
Santander	2(1,8)	0(0)
Villa Rica	1(0)	0(0)
Bolívar	8(7,2)	2(1,8)
Sucre	9 (8,1)	4(3,6)
Mercaderes	4(3,6)	5(4,5)
Popayán	4(3,6)	2(1,8)
El Tambo	7(6,3)	5(4,5)
<b>Total n (%)</b>	<b>72(64,9)</b>	<b>39(35,1)</b>

Los municipios que presentaron mayor porcentaje de positividad fueron Puerto Tejada 11,7, Padilla 6,3%, Mercaderes y El tambo con igual porcentaje 4,5%(Tabla 15).

**Tabla 16. Distribución de la positividad de la PCR según el rango de edad**

Edad	PCR-n(%)	PCR + en al menos una muestra n (%)	Valor p
0-4	9(12,5)	2(5,0)	0.06*
5-14	21(29,2)	12(30,8)	
15-44	29(40,3)	11(28,2)	
45-64	6(8,3)	11(28,2)	
Mayores de 65 años	7(9,7)	3(7,7)	

\* Prueba de X<sup>2</sup>

De 39 convivientes PCR positivo en al menos una muestra, 35, 8% fueron menores de 15 años y 31, 8% de los convivientes menores de 15 años tenían PCR positivo en al menos una muestra (Tabla 16).

No hubo diferencia estadísticamente significativa entre la positividad de la PCR en los convivientes el tiempo de duración del tratamiento del caso índice, aunque esta fue mayor en los casos PB (43,6%) y en los que presentaron un tratamiento menor a 3 meses y en los que finalizaron tratamiento 60,0% y 40,0%, respectivamente (Tabla 17).

**Tabla 17. Distribución de variables clínicas y de duración del tratamiento de casos índices asociada según los resultados de la PCR en convivientes**

Variable	PCR-n(%)	PCR + en al menos una muestra n (%)	Valor p
<b>Tipo de caso índice</b>			
PB	22(56,4)	17(43,6)	0,186 <sup>a</sup>
MB	49(60,0)	22(31,0)	
<b>Duración del tratamiento de caso índice</b>			
Menos de 3 meses	2(40,0)	3(60,0)	0,081 <sup>a</sup>
Más de 3 meses	29(78,4)	8(21,6)	
Tratamiento finalizado	39(60,0)	26(40,0)	

<sup>a</sup> Prueba de la X<sup>2</sup>

**Tabla 18. Distribución de variables sociodemográficas y clínicas entre convivientes según resultado de la PCR**

Características de convivientes	PCR-n (%)	PCR+ en al menos una muestra n (%)	Valor p
<b>Género</b>			
Masculino	27 (56,3)	21(43,8)	0,072 <sup>a</sup>
Femenino	45(71,4)	18(28,6)	
<b>Procedencia</b>			
Urbana	36(67,9)	17(32,1)	0,328 <sup>a</sup>
Rural	36(62,1)	22(37,9)	
<b>Antecedentes de vacunación</b>			
Aplicada	59(65,5)	28(34,5)	0,215 <sup>a</sup>
No aplicada	10(52,6)	9(47,4)	
<b>Estado clínico del conviviente</b>			
Asintomático	66 (66,0)	34(34,0)	0,500 <sup>b</sup>
Sospechoso	5(62,5)	3(37,5)	
Enfermo	1(33,3)	2(66,7)	
<b>Tipo de parentesco</b>			
Consanguíneo 1 <sup>o</sup> y 2 <sup>o</sup>	41 (61,1)	22(34,9)	0,964 <sup>b</sup>
Otros consanguíneo 3 <sup>o</sup> 4	14(66,7)	7(33,3)	
Político	17(63,3)	10(37,0)	
<b>Relación de parentesco</b>			
Conyugue	13(59,1)	9(40,9)	0,619 <sup>a</sup>
No conyugue	59(66,3)	30(33,7)	
Nieto	7(53,8)	6(46,2)	0,376 <sup>b</sup>
No nieto	65(66,3)	33(33,7)	
Nieto y conyugue	20(57,1)	15(42,9)	0,173 <sup>a</sup>
No nieto y no conyugue	52(68,4)	24(31,6)	
<b>Comparte habitación**</b>			
No	44(71,0)	18(29,0)	0,213 <sup>b</sup>
Si	28(59,6)	19(40,4)	

a: Prueba exacta de Fisher; b: prueba de la X<sup>2</sup>\* 1conviviente sin dato; 2 convivientes sin dato

En la tabla 18, se muestran los análisis realizados a los datos mediante la prueba X<sup>2</sup>, no se encontró diferencia significativa entre la positividad de la PCR y las variables sociodemográficas, las clínicas y de convivencia con el caso índice (todas las relaciones fueron p >0,05), aunque llama la atención el incremento de positividad de la PCR en el género masculino (43,8%) versus (28,6%) en el femenino; los procedentes de las zonas rurales (37,9%) versus (32,1%) los que viven en zonas urbanas; en los ausentes de BCG (47,4%) versus los vacunados (34,5%); en la positividad en conyugue y nieto (42,6%) de los casos índices a diferencia (31,6%) de otro parentesco(no conyugue no nieto) y los que comparte la habitación (40,4%) versus (29,0%) los que no la comparten.

**Tabla 19. Distribución de las variables continuas cuantitativas entre convivientes según resultado de la PCR**

Variable	PCR-	media (X)	Desviación típica	Valor P
	PCR+ en alguna muestra			

Edad (Años)	39	72	25,2	21,8	0,163 <sup>a</sup>
Tiempo de convivencia (meses)*	38	70	187,0	175,5	0,278 <sup>a</sup>
Tiempo del dx toma de la muestra en (meses)	39	71	206,1	153,8	0,540 <sup>a</sup>
			26,6	18,6	
			29,1	19,5	

Dx: Diagnóstico; a: prueba no paramétrica de U de Mann Whitney

Se encontró mayor positividad de la PCR a mayor promedio de edad, tiempo de convivencia y tiempo transcurrido de la toma de la muestra al diagnóstico, pero el estudio estadístico de estos datos mediante la prueba U Mann Whitney estableció que la diferencia no estadísticamente significativa (Tabla 19).

## 7. DISCUSIÓN

En este estudio se mostró que la PCR es una herramienta útil para la detección de pequeñas cantidades de ADN de *M. leprae* en diferentes muestras clínicas. El protocolo implementado logró detectar hasta 1 fg de ADN de esta micobacteria en comparación a la baciloscopia que no detectó *M.lepreae* en ninguno de los casos, demostrando su baja sensibilidad que es 500 la veces menor que la PCR (Ramaprasad, et al, 1997). Además la prueba fue negativa para ADN de tejido de pacientes con tuberculosis y otras micobacterias mostrando que la metodología anidada y el uso de la *rlep* incrementan la sensibilidad y especificidad probablemente porque es una secuencia repetitiva y específica del genoma de *M.leprae*.



Este estudio evidenció una alta frecuencia de positividad (35,1 %) de ADN de *M. leprae* en los convivientes de pacientes con lepras provenientes de los municipios endémicos del Departamento del Cauca. Esta positividad encontrada en convivientes es superior a las reportada en diferentes estudios que ha variado entre el 2,4% a 31% (Klaster, *et al.*, (1993), Guerrero, 2001; Cardona — Alzante y Manrinque —Hernández, 2008), posiblemente debido a las características del PCR usado, mencionadas anteriormente y probablemente se deba al estudio de otros tipos de muestras diferentes al moco nasal, como la linfa, la orina y la biopsia, además confirma una amplia exposición a *M.leprae* en esta población.

Una importante contribución de esta investigación es la detección de ADN de *M.leprae* en orina de los convivientes, que solo ha sido reportada en pacientes tratados y no tratados en estudios Brasileños, como el de Parkash, *et al.*, (2004). Esta muestra se encontró frecuentemente positiva (23,2%), sugiriendo que podría ser útil para el seguimiento de poblaciones con riesgo de enfermar, es más fácil de recolectar que el moco nasal y la linfa; además el ADN de *M.leprae* en orina puede representar infección y descartaría el estado de portador transitorio nasal, ya que puede pensarse que cuando el ADN de *M.leprae* es encontrado solo en las fosas nasales de un individuo asintomático, por lo que se requiere una vigilancia estrecha y a largo plazo de los convivientes, ya que la infección es un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad.

Por otra parte, en los casos índices que habían finalizado su tratamiento tuvieron PCR positivo el 16% en al menos una muestra, similar a lo observado por Santos, *et al.*, 2001, quienes estudiaron 54 pacientes entre PB y MB que habían terminado tratamiento 6 o 4 años atrás a la toma de las muestras, encontraron 18 casos PCR positivo, mostrándonos que los pacientes del área endémica a pesar de haber culminado el tratamiento, la bacteria puede permanecer circulando en el organismo sin daño aparente en el huésped o por reinfección.

El porcentaje de casos índices portadores de *M.lepreae* en la nariz fue 12,1% esto sugiere que probablemente estos pacientes podrían secretar bacilos desde la nariz; estudios han encontrado poblaciones en Indonesia de contactos a largo plazo como el Bakker *et al*, 2006, un riesgo 9,36 de desarrollar lepra en los convivientes con casos índices PCR positivos, se requiere el estudio a largo plazo y en poblaciones más grandes para determinar el riesgo en nuestro medio.

Otro aporte para tener en cuenta fue el porcentaje de 40% de PCR positivos en convivientes de casos índices tratados similar a lo encontrado por Getrude *et al*, 1997; esto implica que la vigilancia después de que el paciente ha dejado el tratamiento debería no solo enfocarse en el paciente sino también en los convivientes de estos casos.

En el presente estudio se presentó un porcentaje importante de convivientes PCR positivos entre los menores a quince años (31,8% de 44), que constituyen 35,8% del total de PCR positivos en al menos una muestra, estos resultados causan preocupación, porque probablemente las personas de estas zonas está adquiriendo *M.leprae* a muy temprana edad y podrían desarrollar lepra tempranamente (Fine *et al.*, 1997). Algunos estudios han encontrado que la incidencia más alta de lepra entre convivientes se encuentra en menores de 15 (Jesudasan *et al.*, 1984 y Vijayakumaran *et al.*, 1998).

No se encontró relación estadísticamente significativa entre el género, los antecedentes de vacunación con BCG y la positividad de la PCR, no obstante esta fue más frecuentemente positiva en convivientes masculino, en los que no tenían cicatriz de la BCG; también hubo mayor porcentaje (37,9%) de los convivientes con DNA de *M.leprae* posiblemente se deba que esta micobacteria es apta para sobrevivir en condiciones de vivienda subóptimas (Cree, 1998).

Aunque no hubo diferencia significativa con relación al estado clínico de los convivientes, la PCR fue más frecuentemente positiva en los enfermos y con sospecha que en los asintomáticos, lo cual sugiere que la PCR podría ser útil para detectar la enfermedad, pero necesita ser evaluada con un tamaño de muestras más grande.

Otro resultados para tener en cuenta es la mayor positividad de la PCR en los conyugues y nietos del caso índice (42,9%) que en el resto de los convivientes, aunque no llego a ser significativa ( $p= 0,173$ ), estos fue similar a otros reportes en convivientes y poblaciones endémicas de lepra, de tener en cuenta el estudio de Guerrero I, *et al*, 2002, quienes reportaron frecuentemente PCR positivo solo a los conyugues de casos índices, también se obtuvo mayor positividad en los convivientes que comparte la habitación (40,4%) con el caso índice, una explicación alternativa de estos resultados es el contacto más cercano y prolongado con el paciente y la escasa ventilación de los hogares(Cairns, *et al* 2004).

A pesar de que no existe diferencia significativa entre la positividad de la PCR, la medias de la edad de los convivientes, del tiempo de convivencia y la tiempo transcurrido del diagnóstico del caso índice a la toma de las muestras, la frecuencia de los convivientes PCR positivo fue mayor todas las variables, significando que probablemente existe mayor riesgo de infección a *M.leprae*.

Finalmente, la detección de *M.leprae* tempranamente mediante baciloscopia presenta limitaciones. La PCR anidada amplificando la secuencia repetitiva *rlep* aplicada en nuestro estudio es efectiva para la detección de ADN de *M.leprae* en diferentes muestras clínicas, se logro identificar la presencia el bacilo en 35,1% de los convivientes, constituyéndose en una evidencia de la infección con esta convivientes a esta micobacteria, aunque es imprescindible desarrollar estudios a poblaciones más grades, a otros tipos de contactos y a largo plazo para determinar el significado de la PCR *rlep* anidada positiva, Además esta prueba podría tener un valor diagnóstico especialmente en casos PB.

También hace un llamado al sistema de salud de la importancia de las intervenciones en los convivientes como la realización periódica del examen clínico, la vacunación BCG ya que se tuvo evidencias de infección por *M.leprae* mediante la PCR *rlep* anidada.

Además PCR *rlep* anidada podría identificar el grupo de personas con alto riesgo de desarrollar lepra y realizar intervenciones tales como la quimioprofilaxis, aunque necesita ser evaluadas.

Estos aportes se pueden considerar como un paso para conocer la transmisión y una contribución a la OMS de mantener la tasa de eliminación a nivel global y lograr eliminar la lepra en las zonas endémicas.

## 8. CONCLUSION

La PCR anidada *rlep* permite la identificación de *M.leprae* que no es detectable mediante los métodos convencionales (baciloscopia e histopatología), mostrando que puede ser tener implicaciones importantes en la epidemiología y de control de la enfermedad de Hansen

Existe una alta proporción de convivientes con ADN de *M.leprae*. Los niños constituyen la tercera parte de la población PCR positivo y tercera parte de la población infectada, lo cual justifica el seguimiento a esta población y la necesidad de estudios con un tamaño de población más grande y a lo largo plazo para clarificar el significado de la presencia de ADN de *M.leprae* PCR en convivientes asintomáticos como en los sospechosos, además incluir otros tipos de contactos.

## BIBLIOGRAFIA

- ALI PM Prasad KVN. Contact surveys in leprosy. IN: Lepr Rev. Vol; 37(1966); p.173–182.
- ALBERLAEZ, M *et al.* Tuberculosis control and managed competition In Colombia. IN: The international Journal of Health planning and management. Vol 19 No. 01(2004);p43.
- ANÓNIMO: El proceso de la lucha contra la lepra. Oficina Sanit Panam .Vol 121(1996); p. 348- 349.
- ANONYMUS, Serological tests for leprosy.i, (1986);p. 533 - 535.
- ARANZAZU, N. Enfermedad de Hansen etiología, clínica y clasificación. EN: Dermatología Venezolana. Vol 32, No. 4 (1994); p.145-150.
- AROCHA, F. *et al.* Anticuerpos séricos anti-glicolípido fenólico 1 en personal de centros de salud en contacto con pacientes con enfermedad de Hansen. EN: Kasmera. Vol. 34, No.2 (mayo-oct.2006); p.102-113.
- BAKKER MI, *et al.* Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. IN: International Journal Epidemiology . Vol 33(2004); p.1329–1336.
- BASCUÑANA CR Y BELAK K. Detection and identification of mycobacteria in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. IN: Journal Clinic Microbiology. Vol 34, No10 (1996); p.2351-2355.
- BATHIA, *et al.*,. Clinical and histopatología correlation in classification of leprosy. IN: International Journal Leprosy Other Mycobacterias Disease. Vol 61,(1993);p. 433-438.
- BEERS, V, HATTA M. and KLATSER PR. Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control. IN: International Journal Leprosy other Mycobacterias Diseases. Vol. 67(1999); p. 119-128.
- \_\_\_\_\_ (Seroprevalence rates of antibodies to phenolic glycolipid I among schoolchildren as an indicator of leprosy endemicity. IN: Int J Lepr and Other Mycobact Dis. Vol 67 1999) p.243–249.
- \_\_\_\_\_ The epidemiology of *Mycobacterium leprae*: recent insight. FEMS Microbiol. Lett136 (1996); 221– 230.
- BERMINGHAM, N and LUETTIC K. Polymerase chain reaction and its applications. IN: Current diagnostic pathology. [On line] URL<[www.Sciencedirect.com](http://www.Sciencedirect.com)>(2003);p.59-164.
- BLACKWEL L., *et al.* Understanding the multiple functions of *NRAMP-1*. IN: Microbes Infect. (2000);Vol 2; p. 317–321.
- BLAKE LA, WEST BC and LARY CH,. Environmental non-human sources of Leprosy. IN: Rev Infect Dis.(1987), Vol 9. p. 562-577.
- BRITTON W and LOCKWOOD, D. Seminar leprosy IN: The lancet. Vol 363,(April -2004);. p.1210-1211.

BRUCE, S *et al.* Armadillo exposure and Hansen's disease: An epidemiologic survey in southern Texas. IN: J am acad dermatol. Vol .43,No. 2 (Aug-2000);p. 225-228.

BUHRER-SEKULA, S. *et al.* Simple and fast lateral flow test for clasification of leprosy patientes and identification of contacts with high risk of developing leprosy IN: (2003). Vol 41. p. 1991-1995

\_\_\_\_\_. The ML Flow test as a point of care test for leprosy control programmes: potential effects on classification of leprosy patients IN: Lepr Rev. Vol. 78 (Oct-2007);p. 70-79.

\_\_\_\_\_. Risk for the development of clinical leprosy among contacts and their relevance for targeted interventions. IN: Lepr Rev Vol 75(2004),p310-326

CUNANAN, N, CHAN GP y DOUGLAS J. Risk of developing leprosy among Culton contacts. IN: InterJournal leprosy. Vol 61(1998); p.78.

CARDONA, N. y BELTRAN, C. Frecuencia de infección por *Mycobacterium leprae* en convivientes de pacientes con lepra, Antioquia 2000-2001. EN: Revista CES medicina. Vol.18, No. 8(ene-jul - 2004); p: 61-67.

CARDONA- CASTRO, N. *et al.* Infection by *Mycobacterium leprae* of household contacts of lepromatous leprosy patients from a post –elimination leprosy region Colombia. IN: Mem Inst Oswaldo Cruz de Rio de Janeiro. Vol100; No.7; (2005);p.703-707.

CARDONA-CASTRO, N; BELTRAN–ALZATE, JC y MANRIQUE HERNANDEZ, R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*- infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy of Colombia. IN: Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro.Vol103; No. 4; (June 2008);p.332-336.

CAIRNS, W. *et al.* Approach to understanding the transmission of *Mycobacterium leprae* using molecular and immunological methods: Results from the MILEP study. IN: International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Disease.Vol 72, No 3(jul- may .2004); p 269-277.

CARTEL JL, *et al.* Chemoprophylaxis of leprosy with a single dose of 25mg per kg rifampin in the southern Marquesas; results after four years.IN Int J Lepr Other Mycobact Dis. Vol 60 (1992);p16 1992;60:416-422

CEDARO, M; MIRANDA y GORODNER, J. Detección del bacilo de Hansen por bacilemia y baciloscopia en comunidades de riesgo y etnias Puras del Chaco. En: Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas (2006) en línea URL:< <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/03-Medicas/2006-M-064.pdf>>

CORVALAN, A. Biología molecular en insectología parte I: Desarrollo y Metodología En: Revista Chilena de infectología. Vol 19, No1.(2002);p 9-16.

CREE, I and SMITH, W.C. Leprosy transmission and mucosal immunity: towards eradication? IN: Lepr. Rev. Vol 69 (1998); p.112-121.

CHAN, G. and *et al.* Leprosy Infection and Disease in the National Capital Region. IN: Phil J Microbiol Infect Dist (1997);p.159-162.

CHIMENOS , *et al* Lepra lepromatosa: EN: Revisión y caso clínico. Med. oral patol. oral cir.bucal. Vol. 11, No. 6(2006); p. 474-479. Disponible [online] URL<[http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S169869462006000600004&Ing=es&nr m=iso](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S169869462006000600004&Ing=es&nr m=iso)>. ISSN 1698-694.

CHIMELLI, L. *et al.* Value of nerve biopsy in the diagnosis and follow-up of leprosy: the role of vascular lesions and usefulness of nerve studies in the detection of persistent bacilli. IN: Journal. Neurology. Vol. 244, (1997); p. 318-323.

CUNANAN A, CHAN GP and DOUGLAS JT. Risk of development of leprosy among Cullion contacts. IN: Intenational Journal Leprosy Other Mycobacterias Disease. Vol 66, (1998); p. 78.

DE ALMEIDA, *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts. IN: Mem Ins Oswaldo Cruz Rio Janeiro (2004), Vol 99 No. 5, p 509-511.

DE LAS AGUAS, T. Epidemiológicas sobre la lepra. IN: Rev Leprology Fontilles. Vol 2, (1998); p. 435-460.

DEPS, P., SANTOS, A. and YAMASHITA-TOMIMORI, J. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by PCR in blood sample from nine-banded. IN: International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases. Vol. 70, No. 1(Mar - 2002); p.34 – 35.

DE WIT, M *et al.* Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. IN: Journal Clinical of Microbiology. Vol.29, (1991); p.906–910.

DE WIT, M. *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. IN: Journal of Clinical Microbiology (1993); p. 502-506.

DONOGHUE, H *et al.* Co-infection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae* in human archaeological samples: a possible explanation for the historical decline of leprosy IN: Proceedings of the Royal Society . Vol 72, (feb -2005); p. 389–394.

DONOGHUE H., HOLTON, J. and SPIGELMAN, M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. IN: Journal Medical Mycrobiology. Vol. 50 (2001); p. 177-182.

DOUGLAS, J T *et al.* Comparasion of ELISA antigens for the early detection of preclinical leprosy IN: Indian Journal of leprosy 1S Abstract of the International Leprosy Congress, New Delhi february Vol 56, (1984)p. 20-25

\_\_\_\_\_. Serological reactivity and early detection of leprosy among contacts of lepromatous patients in Cebu, the Philippines. IN: Int J Lepr Other Mycobact Dis . Vol 55, (1987); p.718–721.

\_\_\_\_\_. Prospective Study of Serological Conversion as a Risk Factor for Development of Leprosy among Household Contacts IN: Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. Vol. 11, No. 5 (Sept. 2004);p.897-900.

DOULL, SA. The incidence of leprosy in Cordova and Talisay, Cebu, Philippines. IN: Int J Lepr.; Vol 10: (1942);p107–131.

FAIZAL M. La lepra. Universidad Nacional de Colombia. Servicio de biblioteca virtual. [On line] 2004. <URL [http://: www.unal.edu.co](http://www.unal.edu.co)>.

FINE, P. *et al.* Household and dwelling contact as risk factors for leprosy in northern Malawi. IN: American Journal Epidemiology. Vol 146, No. 1;(1997); p. 91–102.

FREEEDMAN VH, WEINSTEIN DE, KAPLAN G. How *Mycobacterium leprae* infects peripheral nerves. IN:Leprosy journal. Vol 70 (1999);p. 136-139.

- GELUK, A. *et al.* A postgenomic approach to identify novel antigens of *Mycobacterium leprae* for improved immunodiagnosis of *M. leprae* infection. IN: *Infection Immunology*. Vol73, (2005);p. 5636–5644.
- GILLIS T and BRENNAN P. Report on the Workshop on new diagnostic Tools for leprosy. IN: *International Journal of Leprosy*. Vol. 70, No.4, (2002); p.331-337.
- GIRALDO, M y OSPINA, M. Boletín Información para la acción - BIA - Febrero de (2007) Medellín, p 4.
- GÓMEZ L., *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. IN: *Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology*. (2005); p.311-316.
- GONZÁLEZ-ABREU E *et al.* Serodiagnosis of leprosy in patients' contacts by enzyme-linked immunosorbent assay. IN: *Lepr Rev*;Vol 61, No.2 ,(1990);p.145-150.
- GONZÁLEZ-ABREU E., *et al.* Serological reactivity to a synthetic analog of phenolic glycolipid and early detection of leprosy in an area of low endemicity. assay. IN: *Lepr Rev*;Vol 67, (1996);p.4-12.
- GONZÁLEZ, M. Historia de la Lepra en Cuba., Cuba, Cenit. 1963. citado por: MOURIÑO, N., *et al.* Comportamiento clínico serológico microbiológico de la incidencia de lepra Camagüey cuba. 2001-2004. En: *Revista de leprología de Fontilles*. Vol.35, No.5 (may.-ago. 2006);p. 389 396
- GONZÁLEZ PRENDES, MA: Historia de la Lepra en Cuba. La Habana, Cuba, Editorial Cenit. 1963.
- GONZALES G y OROZCO LC. La lepra. Instituto Nacional del Salud (1996), 198p
- GOURLARD I., *et al.* Detection de *Mycobacterium leprae* by PCR in nasal and buccal mucosae in leprosy. Vol.69, suplemento, (2001); p.230.
- \_\_\_\_\_. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin lesion of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. IN: *Arch Dermatol res* Vol. 299,(april-. 2007);p.267-271.
- GOULARD, I. Risk and Protective Factors for Leprosy Development Determined by Epidemiological surveillance of Household Contacts: IN: *clinical and vaccine immunology*. Vol. 15 No. 1, (sep- oct, 2007);p.101–105.
- GOULART, I., *et al.*, Risk and protective factors for leprosy development in an epidemiological surveillance of household contacts. IN: *Clinical Vaccine Immunology* Vol15 (2008); p.101–105.
- GOURLARD I and GOURLARD L. Leprosy diagnostic and control challenges for worldwide disease. IN: *Arch Dermatol res* Vol 300, (2008);p.269 -290.
- GUERRERO MI, PLAZAS N y LEÓN CI. Situación de la lepra en Colombia: un análisis crítico. En: *Biomédica*. Vol. 20, (2000.);p.266-271.
- GUERRERO, I., *et al.* Desarrollo y aplicación de una prueba de RCP para detectar la infección subclínica por *Mycobacterium leprae* EN: *Revista Panamericana de Salud Pública*. Vol. 11, No.4, (2002);p. 269-271.
- HATTA M., *et al.* Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. IN: *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* Vol 89, (1995); p.381-385.



INIS, M and GELFARD, B. Optimization PCR protocols: A guide to method and applications. Academia press, (1990).

INTERNATIONAL LEPROSY ASSOCIATION TECHNICAL FORUM. Report of the International Leprosy Association Technical Forum the diagnostic and classification of leprosy. IN: International Journal of leprosy other Mycobacterial Disease. Vol 70, suplemento(2002); p 23.

IPGRI AND CORNELL UNIVERSITY. Tecnologías basadas en la PCR Fundamentos de la PCR. (2003).

IZUMI, S. Subclinical Infection by *Mycobacterium leprae*. IN: International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases. Vol. 67, No.4,(1997); p:67-71.

IZUMI I, *et al.* An epidemiological study on *Mycobacterium leprae* infection y prevalence of leprosy in endemic villages by molecular biology technique.IN: India Journal Leprosy.(1999); vol 71. P37-41

JESUDASAN K *et al.* Incidence rates of leprosy among household contacts of primary cases. IN: Indian journal of leprosy. Vol 56, No.33, (1984);p 600-614.

JOB, C.,*et al.* Role of Polimerase chain reaction in the diagnostic of early leprosy IN: Journal leprosy and other mycobacteria disease .Vol.65, (1997); p.461-464.

JOB, C.,*et al.* Transmission of leprosy. A study of skin and nasal secrecions of household contact of leprosy patiets using PCR. IN: Transactions of the Roval Society of Tropical Medicine and Hygiene. Vol 78, No. 3, (2008);.p. 518-521.

KAI, M., *et al.* Active surveillance of leprosy contacts in country with low prevalence rate. IN: International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Disease. Vol.72, No. 1,(Mar-2004);p. 50-53.

KANG, T. *et al.* Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. *lep* repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. IN: Clinical and Experimental Dermatology. Vol. 28, (jun-2003);p.20-424.

KATOCH M. Leprosy. Advances in the diagnosis and treatment of leprosy Accession information: [On line].(02)00476-3a.pdf (short code: txt001vka); 22 July (2002). ISSN 1462-3994 <URL <http://www.expertreviews.org/> >p. 1-14.

KAWASAKI, E. Amplification of RNA. IN: Innis M A, Gelfand D H, Stunski J J PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications. New York: Academic Press.(1990); p21--27. Citado por: BERMINGHAM, N and LUETTIC K. Polymerase chain reaction and its applications. IN: Current diagnostic pathology. [On line] URL<[www.Sciencedirect.com](http://www.Sciencedirect.com) >(2003);p.59-164.

KAZDA, J. Isolation of enviroment-derive *M leprae* from soil in Bombay. IN: Lepr Rev Vol.57, p.201-208.

KLATSER, P. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* Nasal Carriers in Populations for Which Leprosy is Endemic IN: Journal of Clinical Microbiology; Vol 31, No.1, (1993);p. 2947-2951.

MANDELL-D y BENNETT; Enfermedades Infecciosas Principios y Prácticas; Ed 5. Médica Panamericana, 2002. p 3159-3167.

MANUAL PARA LA VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA DE LA LEPROSA,[En linea]Disponible URL<<http://www.imss.gob.mx/nr/imss/dpm/dties/normatividad/vigilanciaeipi/Man15Lepra/>>(2004);p. 1-32.

MINISTERIO DE LA PROTECCIÓN SOCIAL. Guía de atención de la lepra. Colombia (2005); p. 67-69.

\_\_\_\_\_. Protocolo de vigilancia de lepra: Colombia (2008);p 29

\_\_\_\_\_. Situación de la lepra en Colombia, 2007 (2008); Vol IN:Inf Quinc Epidemiol Nac Vol 13, No 3(2008); p129-144.

MISRA, N and *et al* .Clinical utility of LSR/15 gene *Mycobacterium leprae* detection in leprosy tissues using the polimerase chain reaction. IN: International journal of leprosy.Vol 63, No.1, (jul-aug-1994); p. 36-41.

. Risk for the development of clinical leprosy among contacts and their relevance for targeted interventions. IN : Lepr Rev Vol 75(2004),p310-326

MOET J., *et al* .dose rifampicine is useful for preventing leprosy in close contacts of patients with newly diagnosed disease. IN : BMJ(2008); Vol 336; 761-764.

\_\_\_\_\_. Physical Distance, genetic, relationship, age, and classification are independent risk factors for in contacts en of patients with leprosy. IN: JID. Vol. 193, (feb-2005); p. 347-353.

LOMBARDI C y Suárez REG. Epidemiologia da Hanseníase. IN: Talhari S, Neves RG (eds) Hanseníase. GráWca Tropical, Manaus. (1997); p 127–136.

LÓPEZ-ANTUÑANO.F. Diagnóstico y tratamiento de la lepra. En: Salud Pública Méx 1998; Vol. 40, No. 1;p.:66-75

LUPI, O., *et al* .Tropical Dermatology: Bacterial tropical diseases IN: Am Acad Dermatol Ogy (abril-2006); p. 210-215.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Epidemiologia de la lepra en relación con la lucha antileprosa (1985);ISBN 9243207164.

\_\_\_\_\_. Estrategia mundial para aliviar la carga de la lepra y sostener las actividades de control de la enfermedad (período del plan: 2006-2010). (2006); 23p disponible [on línea]< URL: [www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/lep-who-global-strategy.pdf](http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/lep-who-global-strategy.pdf) >

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE SALUD. Situación de la lepra en la Región de las Américas. (2007) Disponible [On line]< URL<http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/lep-americas.htm> >

OSKAM, L., SILM, E. and BUHRER-SEKULA, S. Serology: Recent developments strengths and prospects: A state of the art overview. IN: Leprology Rev. Vol. 74, No (2003); p.196-205.

PARKASH A., *et al* .Detection of *Mycobacterium leprae* DNA for 36kDa protein in urine from leprosy patients: A preliminary report . IN: Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao pablo. Vol 45, No 6 (sep.-oct, 2004); p. 275-277.

PEDLEY, J. and GEATER, J. Does droplet infection play role in the transmission of leprosy? IN: Leprosy.(1976);p.97-102. Citado por: SMITH, W Approach to understanding the transmission of *Mycobacterium leprae* using molecular and immunological methods: Results from the MILEP study. IN: International journal of leprosy and other mycobacterial disease.Vol72, No 3, (jul- may .2004); p. 269-277.

PINTO, R. El Control de la Lepra en Colombia. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Colombia (2000).

PLIKAYTIS, B; GELBER, R and SHINNICK, T. Rapid and Sensitive Detection of *Mycobacterium leprae* using nested PCR. IN: journal of clinical microbiology. Vol 28 No.9, (april-jun, 1990);p. 1913-1917.

PRAKOESWA, R; AGUSNI, I and IZUMI S Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Blood of the Subclinical Leprosy IN: Folia Medica Indonesiana. Vol 43. No. 2, (April-Jun 2007); p. 64-67.

RAMAPRASAD P., *et al.* Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity IN. Lepr Rev. Vol 68, (1997); p.301–315

RAMU G., *et al.* Histological and Immunological correlation of suspected leprosy patients. IN Indian J LeprOSY 1996; Vol 68;p153.

REES, J. IN: The microbiology of leprosy (1985) . Citado por: SMITH, W. Approach to understanding the transmission of *Mycobacterium leprae* using molecular and immunological methods: Results from the MILEP study. IN: International Journal of Leprosy and other Mycobacterial Disease. Vol.72, No 3, (jul- may -2004); p.269-277.

RODRIGUEZ, G y *et al.* Recidivas postratamiento de la lepra multibacilar. EN: Biomédica. No. 24 (2004); p.133-139.

RODRIGUEZ Y OROZCO. Lepra. Ed 5. Santafe de Bogotá. Instituto Nacional de Salud. 1996; p.9-35.

RUPENDRA *et al.* Simplified PCR detecation method for nasal *Mycobacterium leprae*. IN: International Journal of leprosy and other micobacterial disease.Vol 69,No.4 (December , 2001);p 299.

SECRETARÍA DEPARTAMENTAL DE SALUD DEL CAUCA, 2008-2009

SANTOS AR., *et al.* Use de PCR mediated amplication of *Mycobacterium leprae* in different types clinical samples for the diagnosis of leprosy. IN: Journal clinical Microbiology. Vol. 39 (1993); p. 298-304.

\_\_\_\_\_Use of Polimerase chain reaction in the diagnostic of leprosy IN: Journal clinical Microbiology. Vol. 46, (1999); p. 102-106.

\_\_\_\_\_. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase chain reaction in blood of individuals eighth years after completion of anti-leprosy therapia. IN: Mem Inst Oswaldo Cruz de Jaineiro. Vol 96 ,No. 8, (2001);p.1129-1133.

SANTOS G., *et al.* Pesquisa de *Mycobacterium leprae* em biópsias de mucosa oral por meio da reação em cadeia da polimerase. EN: Anais Brasileiro de Dermatologia Vol.82;No.3; (2007); p:245-9. Disponible [On line] <URL<<http://www.w3c.org/TR/1999/REC-html401-19991224/loose.dtd>>.

SCOLLAR D. *et al.* The Continuing Challenges of Leprosy. IN: Clinical Microbiology Reviews.Vol. 19, No. 2, (April.-2006); p.338–381.

SENGUPTA U. Serodiagnostic tests for Leprosy. IN: Indian Journal of Clinical Biochemistry. Vol. 12, suplemento (1997); p. 93-96.

SHUMING C. *et al.* Should household contact examination in a low Endemic Situation of Leprosy Continue?. IN: International journal of Leprosy and other Mycobacterial diseases.Vol.71, No. 2, (Jun-2003); p. 95-100.

SMITH C and SMITH W. Chemoprophylaxis is effective in the prevention of leprosy in endemic countries: a systematic review and meta-analysis IN: J Infect. Vol 41: (2000). p137–142.

SOTO ,C *et al.* Isolation, Characterization, Molecular Cloning and Amplification of a Species-Specific *M. leprae* Antigen. IN: International Journal of leprosy. Vol 67 No. 4 (1991);p1998.

SPSS. Copyright 1989-2003© SPSS Inc.

STACKEBRANDT E, *et al.* Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria Classis nov.IN: Int.J.Syst.Bacteriol. Vol 47,No2. (1997);p.479-491.

STYLE, A. Early Diagnosis and treatment of Leprosy in Unites states American Family Physician Vol 52, (july- 1995); p.172-178

SUÁREZ, O. Baciloscopia de la lepra. Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí (2007);p.1-9

SUNDAR, R *et al.* Impact of MDT on incidence rates of leprosy among household contacts. Part I. Baseline data. IN: International journal leprosy and other Mycobacterial diseases. Vol 57(1989); p.647-651.Citado por: MOET, F. and *et al*/ Phisical distance, Genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. IN: The journal of infectious disease. Vol. 193 (Feb, 2006); p. 346.-349

TORRES, P, and *et al.* Comparasion PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in differents types of clinical samples in leprosy patients and contact. IN: Leprology Rev. Vol. 74 (Nov -2003); p.18-30.

VACHULA M, HOLZER TJ and ANDERSEN BR. Supression of monocyte oxidative response by phenolic glycolipidic I of *Mycobacterium leprae*. IN:Journal Immunology. Vol.142, No10,(1989);p.1696-701.

VIEIRA, D. Técnicas de PCR: Aplicações e Padronização de Reações. [On Line] < URL: <http://www.etall.hpg.com.br> >p.1-18.

VISSCHEDIJK, J., y *et al.* Review: *Mycobacterium leprae* – millennium resistant Leprosy control on the threshold of a new era. IN: Tropical Medicine and International Health.Vol.5, (6 june-2000); p.388–399.

VIJAYAKUMARAN P., *et al.* Does MDTarrest transmission of leprosy to household contacts?. IN: International Journal Leprosy Other Mycobact Disease. Vol 66 (1998); p.125–130.

YOON, et al., Evaluation of Polymerase Chain Reaction Amplification of *Mycobacterium leprae*-Specific Repetitive Sequence in Biopsy Specimens from Leprosy Patients IN:Journal of Clinical Microbiology, Vol 31, No.4,(Apr. 1993);p 895-899

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Independent evaluation of the global aliance for elimination of leprosy Genova (2004)

WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. (2008.) Disponible [On line]< <http://www.who.int/wer> ).

\_\_\_\_\_, Leprosy elimination campaigns: Impact on case detection. Weanasakly. Epidemiol. Rec. 78, (2003);p 9-16.

\_\_\_\_\_. Leprosy Today (2010) Disponible [On line]< URL: <http://http://www.w3.org/TR/xhtml1/DTD/xhtml1-transitional.dtd>>

WICHITWECHKARN, J. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* Infection by PCR. IN: Journal of clinical microbiology. Vol. 33, No.1. (jun-sep1995);p. 45 - 49.

WILLIAMS, D. *et al.* PCR-Based Diagnosis of Leprosy in the United States. In: Clinical Microbiology Newsletter .Vol. 25, No. 8,(abril -2003);p. 57-61.

WOODS, S. AND COLE. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. IN: FEMS\_ Microbiol. Lett. (1989);p 305-310.

YOON N, *et al.* Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *M.leprae* specific repetitive sequence in biopsy specimens form leprosy patients IN Journal of clinical microbiology. Vol. 33, No.1. Vol (1993);p. 895 - 899.

YOUNG, D. and COLE S. Leprosy Tuberculosis and the New Genetics. IN: Journal of Bacteriology. Vol. 175. No. 1(Jan- 1993); p. 17

## ANEXOS

### Anexo A. Consentimiento Informado

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

UNIVERSIDAD DEL CAUCA - FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DEPARTAMENTO DE MEDICINA INTERNA - "GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN INMUNOLOGIA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS"

Usted es invitado (a) a participar en un estudio llevado a cabo por los investigadores del laboratorio de Investigaciones Inmunológicas y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca., el cual tiene como objetivos principales implementar la técnica INS PCR para identificar *el bacilo de la* Enfermedad de Hansen y determinar la prevalencia de la bacteria en los contactos de pacientes diagnosticados con lepra en los municipios de alta prevalencia del Cauca.

Si usted acepta ser incluido en el estudio se le diligenciará el anexo con los datos clínicos y epidemiológicos, y se le solicitará una muestra de orina, moco nasal y sangre en el caso de que usted no tenga síntomas. En el caso contrario, es decir, si se le encuentra síntomas de la enfermedad se le incluirá en el programa para el control de la lepra, con el fin de confirmar la enfermedad y entonces se procederá a tomarle las muestras anteriormente mencionadas y el resto indicadas en las normas establecidas previamente para atención medica suya como si no estuviera en el proyecto de investigación. Las muestras serán tomadas por el Médico y serán transportadas al laboratorio y procesadas para Baciloscopia y PCR. Su nombre será codificado para que se mantengan su derecho fundamental a la confidencialidad y a la intimidad de manera que no permita acciones discriminatorias de ninguna índole.

Los exámenes de PCR son gratis como aporte de investigación y los resultados confidenciales con el propósito de los objetivos

El estudio no involucra riesgos y sus ventajas son muchas, debido a que usted se le asesorará acerca de la enfermedad y se establecerá si está enfermo. Por medio de exámenes de laboratorio se confirmará su estado, para que por medio del Plan Básico de Atención, Municipal o Departamental que esta encargado de la búsqueda de casos sospechosos, a través del control de convivientes, se canalice a su respectivo organismo de salud de acuerdo a su afiliación al sistema de seguridad social en salud y con el diagnostico confirmado para realizar el tratamiento y rehabilitación en el caso que se requiera.

Derecho a retirarse: Si usted decide entrar y luego retirarse del estudio puede hacerlo sin ninguna explicación y no recibirá ninguna actitud discriminatoria para cualquier requerimiento de atención en salud establecida para los pacientes en el Sistema Nacional de Salud ni de ninguna índole, durante o después del proyecto con todas la garantías de tratamiento establecidas para esta enfermedad

Si usted firma este consentimiento esta reconociendo que tiene toda la información relacionada con el estudio y se han respondido todas las preguntas referentes en su participación. Además puede solicitar más información durante el curso de la investigación

Yo reconozco que mi participación es voluntario y que soy libre de participar. Certifico que los investigadores han respondido claramente a todas las preguntas.

\_\_\_\_\_  
Firma del paciente

c.c      c.c

\_\_\_\_\_  
Firma del Medico



Compromiso testicular			
Compromiso anexos oculares o globo ocular			
Reflejos normales			.

# Lesión hipocrómica / eritematohipocrómica / eritematoferruginosa con alteración de la sensibilidad a dolor / temperatura / tacto superficial.

Numero de lesiones cutáneas compatibles con lepra \_\_\_\_\_

Lesión de Tronco Nervioso:

	Trigémino		Facial		Auricular		Cubital		Mediano		Radia	
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
Engrosamiento												
Dolor												
Sensibilidad												
Fuerza												

	C.P.E		Tibial Post.	
	D	I	D	I
Engrosamiento				
Dolor				
Sensibilidad				
Fuerza				

**Clasificación Clínica:**

TT ( ) TB ( ) LB ( ) LL ( ) LI ( )

Paraclínicos

Muestra	Procedimiento	Fecha	Responsable	PCR	PGL-1	IB

**Índice Bacilar** \_\_\_\_\_

Clasificación final:

Enfermo \_\_\_ Tratado asintomático: \_\_\_ Recaída \_\_\_ Paciente en tratamiento \_\_\_



**Anexo C. Formato Historia Clínica de contactos**

Código: \_\_\_\_ L Fecha\_\_\_\_\_

Nombre del Caso Índice \_\_\_\_\_

Nombre y Apellido:\_\_\_\_\_

Fecha de nacimiento:(d/m/a) \_\_\_\_\_ Lugar de Nacimiento\_\_\_\_\_

Sexo: M  F  Teléfono: \_\_\_\_\_

Lugar de Residencia Municipio: \_\_\_\_\_ Vereda \_\_\_\_\_

Barrio\_\_\_\_\_

No. Historia Clínica:\_\_\_\_\_ E.P.S: \_\_\_\_\_ ARS\_\_\_\_\_

Ocupación:\_\_\_\_\_

Zona Urbana \_\_\_\_\_ Rural \_\_\_\_\_

Antecedentes epidemiológicos:

Parentesco con el Caso Índice:\_\_\_\_\_

Tiempo de Convivencia \_\_\_\_\_ meses

Comparte habitación con el caso índice: Si\_\_ No\_\_

Aplicación de la BCG: Confirmado\_\_\_\_Dudoso\_\_\_\_ Negativo\_\_\_\_

Signos	SI	NO	Síndrome topográfico
Lesión cutánea con alteración de la sensibilidad #			
Pérdida de los anexos cutáneos en cualquier lesión #			
Lesiones secundarias a anestesia			
<i>Compromiso mucoso</i>			
Compromiso visceral			
Compromiso testicular			
Compromiso anexos oculares o globo ocular			
Reflejos normales			

# Lesión hipocrómica / eritematohipocrómica / eritematoferruginosa con alteración de la sensibilidad a dolor / temperatura / tacto superficial.

Numero de lesiones cutáneas compatibles con lepra \_\_\_\_\_

Lesión de Tronco Nervioso:

	Trigémico		Facial		Auricular		Cubital		Mediano		Radial	
	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I	D	I
Engrosamiento												
Dolor												
Sensibilidad												
Fuerza												

	C.P.E		Tibial Post.	
	D	I	D	I
Engrosamiento				
Dolor				
Sensibilidad				
Fuerza				

Clasificación Clínica:

TT ( ) TB ( ) LB ( ) LL ( ) LI ( )

Paraclínicos

Muestra	Procedimiento	Fecha	Responsable	PCR	PGL-1	BCL

Índice Bacilar \_\_\_\_\_

Clasificación Final:

Conviviente Asintomático \_\_\_ Conviviente Sintomático\_\_

**Anexo D. Formato historia clínica en el momento del diagnóstico del caso índice**