

SUMARIO

EDITORIAL

99 **Inmigración y dermatología.** MONTSERRAT PÉREZ LÓPEZ.

TRABAJOS CIENTÍFICOS Y COLABORACIONES

101 **Alteraciones óseas en pacientes con lepra.** LUISA SUÁREZ ÁLVAREZ y JOSÉ RAMÓN GÓMEZ ECHEVARRÍA.

121 **Anergia en lepra. ¿Dónde está el defecto?.** ÓSCAR ROJAS-ESPINOSA.

143 **El ML Flow Test como técnica de diagnóstico inmediato para programas de control de la lepra: posible impacto sobre la clasificación de los pacientes.** Samira Bühler-Sékula, Jan Visschedijk, María Aparecida F. Grossi, Krishna P. Dhakal, Abdullahi U. Namadi, Paul R. Klatser y Linda Oskam.

NOTICIAS

155 **Cursos especializados de Leprología. Ediciones 2007 Médicos y Paramédicos.**

156 **Reunión Anual de la OMS sobre Úlcera de Buruli. Ginebra (Suiza). 2-4 abril 2007.**

ACTUALIDAD DE LOS PROYECTOS DE COOPERACIÓN FONTILLES

159 **Proyecto Honduras-Nicaragua.** MONTSERRAT PÉREZ LÓPEZ y PEDRO TORRES MUÑOZ.

FORMACIÓN CONTINUADA

163 **Bacteriología.** PEDRO TORRES MUÑOZ.

RESÚMENES SELECCIONADOS

Vol. XXVI
Núm. 2 - 2007

revista de LEPROLOGÍA





Fontilles informa sobre la úlcera de Buruli

Enfermedad que afecta sobre todo a niños de
áreas rurales extremadamente pobres.



Fontilles 100 años
LUCHA CONTRA LA LEPROSA



ILEP

Fédération Internationale des Associations contre la Lèpre
International Federation of Anti-Leprosy Associations

234 Blythe Road
London, W14 0HJ, UK

Tel: +44 (0)20 7602 6925

Fax: +44 (0)20 7371 1621

E-mail: ilep@ilep.org.uk

Web site: www.ilep.org.uk



TRABAJANDO JUNTOS POR UN MUNDO SIN LEPROSA

Aide aux Lépreux Emmaüs-Suisse • American Leprosy Missions • Association Française Raoul Follereau • Associazione Italiana Amici di Raoul Follereau • LEPROA, British Leprosy Relief Association • Fondation du CIOMAL • Damien Foundation Belgium • Deutsche Lepra und Tuberkulosehilfe • Fondation Luxembourgeoise Raoul Follereau • Fontilles Lucha contra la Lepra • Le Secours aux Lépreux, Canada • Netherlands Leprosy Relief • Sasakawa Memorial Health Foundation • The Leprosy Mission International •

Registered Charity No. 280676

revista de **LEPROLOGÍA**

EDITORA

Dra. Montserrat Pérez López

EDITORES ASOCIADOS

Dr. José Ramón Gómez Echevarría

Dr. Pedro Torres Muñoz

SECRETARIA

Verónica Mas Oliver

COMITÉ EDITORIAL

Bottasso, Óscar (Argentina)	Lorente Moltó, Francisco (Etiopía)
Caballero, Nelson (Nicaragua)	Martínez Morales, Elvia Urania (Nicaragua)
Capó, Virginia (Cuba)	Moll, Fátima (España)
Cuevas, Jesús (España)	Pérez Arroyo, Mariano (España)
Donoghue, Helen (Inglaterra)	Periche, Juan (República Dominicana)
Fafutis Morris, Mary (México)	Rodríguez, Gerzaín (Colombia)
Fuentes Morales, Lesny Ruth (Honduras)	Rojas-Espinosa, Óscar (México)
Hernández, José M.º (Brasil)	Souza Cunha, Maria da Graça (Brasil);
Lockwood, Diana (Inglaterra)	Stanford, John L. (Inglaterra)

PUBLICACIÓN INCLUIDA EN

IME (Índice Médico Español), IBECs (Índice Bibliográfico Español en Ciencias de la Salud), CHEMICAL ABSTRACTS, BIOLOGICAL ABSTRACTS, LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal)

IMPRIME

Federico Domenech, S. A. Valencia

Depósito Legal: V. 420-1958

SECRETARÍA

Biblioteca médica.

03791 Fontilles (Alicante)

España

biblioteca@fontilles.org

Publicación autorizada por el Ministerio de Sanidad como soporte válido. Ref. SVR N.º 126

PUBLICACIÓN DE TRABAJOS

NORMAS PARA LOS AUTORES

Revista de LEPROLOGÍA agradece la colaboración científica sobre el campo de la leprología y la dermatología, incluyendo investigaciones científicas, terapéuticas, epidemiológicas y sobre ciencias básicas en conexión con estas especialidades.

Los manuscritos remitidos deberán cumplir los siguientes requisitos:

a) Ser originales y no haber sido publicados anteriormente en ninguna otra revista.
b) Los textos se enviarán, preferiblemente, en soporte informático, bien por correo electrónico o en su defecto, se enviará un disquete, en formato Word, a doble espacio y con margen izquierdo de 2,5 cms. Pueden incluirse las fotografías y los gráficos que el autor crea pertinentes, aunque la dirección de la revista se reserva el derecho a introducir cualquier cambio en este aspecto.

c) Estarán escritos en castellano y llevarán un resumen (si es posible también traducido al francés y al inglés para mejor difusión del trabajo en el extranjero) que tendrá una extensión mínima aproximada de 100 palabras y máxima de 200 palabras; éste debe ser un artículo en miniatura. A continuación del resumen se escribirán las palabras claves con objeto de que reflejen los contenidos esenciales del artículo. No superarán el número de 5, para ello se recomienda hacer uso de los términos recogidos en el Índice Médico Español y el MeSH[®] (*Medical Subject Headings*) del *Index Medicus*.

d) El texto constará de las siguientes partes: Título. Autores. Nombres y apellidos de cada autor (es conveniente indicar: Servicio, Departamento o Centro en el que se hayan realizado). Resúmenes. Palabras Clave. Texto. Referencias bibliográficas, que sólo incluirá las referencias citadas en el texto y por orden de su aparición en el mismo, siguiendo los ***Requisitos de uniformidad para manuscritos enviados a revistas biomédicas*** (*Estilo Vancouver*) elaborados por el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas (<http://www.icmje.org>); para los títulos abreviados de las revistas se recomienda el *Index Medicus-MEDLINE*[®]. Fotos con sus pies y orden en que se han de imprimir. Dirección postal del autor a quien debe dirigirse la correspondencia relativa al artículo.

e) Los artículos se enviarán a la redacción de la Revista. Sanatorio San Francisco de Borja. 03791 FONTILLES (Alicante) España. Tel. +34 96 558 33 50 - Fax: +34 96 558 33 76. E-mail: **biblioteca@fontilles.org**

f) La dirección de la revista se reserva el derecho de no aceptar los originales y el hacer las correcciones de estilo necesarias. Si éstas fueran muy importantes, se hará previa consulta con el autor y preferentemente se indicará a éste la forma en que se debe someter de nuevo el manuscrito para su publicación.

g) Los trabajos serán publicados a medida que lo permita el espacio disponible de la revista, siguiendo orden riguroso de antigüedad en su recepción.

h) Después de publicado en *revista de LEPROLOGÍA* podrá ser transcrito total o parcialmente en cualquier revista, siempre que se haga expresa referencia a su procedencia.

i) La redacción de la revista no acepta la responsabilidad de los conceptos y criterios que publica, la cual es única y exclusivamente de los autores. Los volúmenes de esta revista están formados por 6 números cada uno.

INMIGRACIÓN Y DERMATOLOGÍA

La inmigración producida por causas económicas constituye una realidad desde finales de los años 90. La persona que inicia un proceso migratorio ha de afrontar diversos retos que representan un gran esfuerzo en todos los ámbitos de su vida; la inmigración llega a su destino con un patrimonio de salud que puede perder progresivamente en función de las situaciones que tenga que afrontar.

Los parámetros fundamentales a tener en cuenta en una primera etapa del proceso migratorio, se resumirían en tres situaciones relacionadas con el estado de salud:

- Las particularidades de la zona de origen (hábitos dietéticos, características fisiológicas, cultura, diferencias climatológicas) las cuales hay que entender más como diferencias que como desigualdades.
- Las consecuencias de las desigualdades sociales y económicas entre países (prevalencia de algunas enfermedades, déficits en algunos aspectos de la salud, pautas incompletas de vacunación, analfabetismo, etc.)
- Los trastornos vinculados al proceso migratorio (desnutrición, deshidratación, agotamiento físico y emocional, estrés, depresión, etc.)

En una segunda etapa en el proceso de adaptación a su nueva situación, pueden aparecer alteraciones relacionadas con diferencias sociales y económicas y limitaciones en el acceso o el uso de los servicios de salud (desarrollo de enfermedades infecciosas latentes, descompensaciones nutricionales, visitas de control del embarazo, trastornos psicoafectivos, etc.)

El inmigrante, una vez instalado en su nueva realidad, tiende poco a poco a igualarse en muchos aspectos a la población del país (utilización de recursos de salud, etc.)

Los inmigrantes que acuden a nuestro país proceden fundamentalmente de Latinoamérica, norte de África, África subsahariana, países del Este y de China. En las consultas de Atención Primaria, habitualmente masificadas aumentan día a día los pacientes con culturas diferentes, con maneras diferentes de entender la salud y la enfermedad, con lenguas diferentes y con un color de la piel, en ocasiones, diferente.

En dermatología, es básico reconocer la lesión elemental para poder identificar diferentes dermopatías. Si además añadimos la diferencia en la coloración de las lesiones el problema se acentúa, ya que el color rojo del eritema será, por ejemplo, difícil de interpretar.

En un estudio realizado en España en 1997 sobre la población marginal, se detectó que el 48% de los hombres inmigrantes y el 65.7% de las mujeres, decla-

raban un estado de salud regular, mala o muy mala, cifras superiores a las obtenidas en la población general, en el mismo territorio.

Debemos estar formados para el reconocimiento de las lesiones cutáneas sobre la piel de color y para identificar las diferentes enfermedades dermatológicas más comunes en este colectivo.

La definición entre piel pigmentada y piel de color es distinta incluso en diferentes razas y grupos étnicos y sus especies.

El término fototipo (SPT: skin phototype system) de piel, desarrollado por Fitzpatrick, es utilizado por los dermatólogos para catalogar a todo el mundo, según la reactividad y vulnerabilidad de la piel humana, a la radiación solar y la radiación ultravioleta (UVR). Correlaciona el color de la piel con la habilidad de responder a la luz UV con quemadura o bronceado.

Esta clasificación se desarrolló para catalogar a la piel negra; en un principio la piel de color se clasifica como tipo V, pero obviamente dentro de la piel de color existen diferentes matices en cuanto a gradación de color. Por ello la piel de color se divide en 3 grupos: IV, V y VI situando a la piel negra en este último.

No existen diferencias raciales en cuanto al número de melanocitos. Sin embargo, su número varía de un individuo a otro así como en las diferentes zonas del tegumento.

Las diferencias raciales y étnicas en el color de la piel, son debidas a variaciones en número, talla y agregación de los melanosomas entre los melanocitos y los queratinocitos.

Acostumbrémonos pues a identificar las múltiples lesiones elementales cutáneas sobre diferentes tipos de piel, sobre diferentes colores. Este es el futuro de la dermatología en particular y de parte de la medicina en general.

DRA. MONTSERRAT PÉREZ

ALTERACIONES ÓSEAS EN PACIENTES CON LEPROA

Luisa Suárez Álvarez¹ y José Ramón Gómez Echevarría²

RESUMEN

Con el fin de estudiar el tipo de lesiones óseas en pacientes con lepra de alta terapéutica, y su evolución, se ha estudiado a un grupo de 16 pacientes con antecedentes de lepra, mediante las radiografías realizadas a lo largo de su evolución. Las lesiones que se observaron con mayor frecuencia en los pies fueron las reabsorciones óseas en falanges (50% de los pacientes), osteoartritis infecciosa (43%), y pérdida o amputaciones de dedos, incluso en algunos casos con pérdida completa del antepié (5 pacientes). En las manos la lesión más frecuente en nuestra muestra fue el adelgazamiento de falanges con pérdida parcial de uno o más dedos. A lo largo de la evolución radiográfica se puede apreciar el empeoramiento progresivo de las reabsorciones óseas, con mayor adelgazamiento de falanges y metatarsianos a lo largo de los años hasta llegar a producir amputaciones.

Palabras clave: Lepra. Reabsorción ósea. Discapacidad.

SUMMARY

A study of 16 leprosy patients and their radiological files was carried out to evaluate the bone lesions in leprosy. The most frequent lesions were bone resorption in phalanges (50% of patients), infectious osteoarthritis (43%), and finger lose or amputation, even complete lose of phalanges and metatarsals (5 patients). The most frequent lesion in hands was the phalanx narrowing, with partial amputation of one or more. We can appreciate the progressive worsening of the lesions following the radiographic evolution: year-by-year the bone resorption became increasingly severe, and finally amputation appears.

Keywords: Leprosy. Bone resorption. Disability.

¹ *Máster en Medicina Tropical de Universidad Autónoma de Barcelona.*

² *Director Médico Lepra. Sanatorio San Francisco de Borja, Fontilles, Alicante.*

INTRODUCCIÓN

AGENTE CAUSAL

La lepra es causada por una bacteria llamada *Mycobacterium leprae*, del orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae. El bacilo de la lepra fue descubierto por Armauer Hansen en 1874. Es un bacilo Gram positivo y ácido-alcohol resistente, de 0,3-0,5 micras de diámetro y 4-7 micras de largo. Se divide lentamente por fisión binaria, cada 12-14 días.

Es un bacilo intracelular obligado con tropismo por células de la piel y el sistema nervioso periférico^(1,2).

Este microorganismo es difícil de cultivar. Se ha conseguido multiplicación limitada en almohadilla plantar de ratones y armadillos de nueve bandas, pero aún no se ha conseguido su replicación en medios artificiales^(3,4).

El estudio del genoma de *M. Leprae* ha mostrado que más de la mitad de su genoma está compuesto por genes no funcionales, lo cual podría explicar su largo tiempo de replicación y su incapacidad para crecer en cultivos al depender de productos metabólicos del huésped⁽⁵⁾.

La pared celular contiene importantes moléculas que determinan su patogenicidad y la respuesta inmune por parte del organismo. Gran parte de la pared celular de las micobacterias está formada por ácidos micólicos y otros lípidos, que determinan su ácido-alcohol resistencia. En concreto, *M. Leprae* posee un glicolípidos fenólico específico de especie (PGL-1) que estimula la respuesta antigénica⁽⁶⁾.

EPIDEMIOLOGÍA Y TRANSMISIÓN

La mayor parte de los casos de lepra se localizan en el Sudeste Asiático (India, Bangla-Desh y Nepal), África y Brasil. En 1982, la ONU recomendó la poliquimioterapia para su tratamiento y se propuso como meta la eliminación de la lepra (reducción de la prevalencia a < 1 caso/10.000 personas)⁽⁷⁾.

La fuente de contagio y reservorio de la enfermedad consiste fundamentalmente en pacientes con lepra multibacilar (elevada carga bacilar) y ocasionalmente pacientes con lepra paucibacilar. Se considera que el contagio de la lepra se produce a partir de las vías respiratorias, ya que se ha encontrado una elevada carga bacilar en las secreciones nasales de pacientes con lepra multibacilar; y posiblemente también pueda contagiarse a partir de úlceras o nódulos de pacientes con infección activa. El bacilo puede sobrevivir en tierra hasta 33 días, en condiciones óptimas de temperatura y humedad. También se han descrito reservorios no humanos como armadillos salvajes y primates mangabey⁽²⁾.

PATOGENIA

Las bacterias que invaden el organismo se diseminan a los ganglios linfáticos, donde el organismo intenta controlar la infección. En la mayoría de los casos lo

consigue; de hecho, se estima que el 90 % de las personas tiene defensas naturales contra el bacilo. En otros casos se produce la diseminación del bacilo a la sangre con posterior diseminación a piel, nervios y vísceras.

CLASIFICACIÓN

La lepra se ha clasificado en función de la carga bacilar y la clínica predominante.

Clasificación de Ridley y Jopling⁽⁸⁾

- *Lepra indeterminada*: Es la fase de comienzo. Si no recibe tratamiento puede evolucionar hacia el polo tuberculoide o hacia el lepromatoso, según el grado de inmunidad del paciente.
- *Lepra tuberculoide*: Se produce en pacientes con buena respuesta inmune, que da lugar a la formación de granulomas en la histología. El número de bacilos es escaso y la bacteriología produce resultados negativos. La respuesta inmune se acompaña de inflamación a nivel neural que da lugar a lesiones neurológicas localizadas e intensas.
- *Lepra lepromatosa*: se da en pacientes en los que la respuesta inmune es inadecuada, ya que la respuesta es de tipo humoral con producción de anticuerpos y no de tipo celular. Los anticuerpos no controlan la infección y el bacilo se disemina por el organismo. La baciloscopia por lo tanto es generalmente positiva. También es el tipo de lepra más contagioso.
- *Lepra dimorfa*: Surge en individuos portadores de lepra indeterminada cuya inmunidad es superior a los enfermos de lepra lepromatosa e inferior a los de lepra tuberculoide. Según hacia qué polo se oriente más se clasifica en lepra dimorfa dimorfa, lepra dimorfa tuberculoide y lepra dimorfa lepromatosa.

Clasificación de la OMS: Por motivos prácticos, la OMS ha realizado una clasificación más simple, basada en características clínicas y bacteriológicas:

- *Lepra paucibacilar*: pacientes con hasta 5 lesiones cutáneas, como máximo un tronco nervioso afectado y baciloscopia negativa.
- *Lepra multibacilar*: Pacientes con más de 5 lesiones cutáneas, más de un tronco nervioso afectado y baciloscopia positiva.

MANIFESTACIONES CUTÁNEAS

El tipo y aspecto de las lesiones cutáneas depende generalmente de si se trata de lepra multibacilar o paucibacilar.

Las lesiones más comunes en la lepra paucibacilar son máculas bien definidas en escaso número, con hipoestesia y asimétricas. Además, las lesiones son anhidróticas, y la inyección de pilocarpina o de histamina produce una respuesta anormal.

En cambio los pacientes con lepra lepromatosa suelen tener varias lesiones, a veces confluentes, y no siempre con pérdida de sensibilidad. Hay varios tipos de lesiones: pueden aparecer máculas múltiples, simétricas, y mal definidas. También pueden verse infiltraciones y lepromas. Se suelen acompañar de pérdida de vello y de sudoración. En todos los casos la bacteriología es positiva^(1, 9).

MANIFESTACIONES NEUROLÓGICAS

La lepra puede afectar tanto a los nervios periféricos como a los pequeños nervios de la dermis. Los nervios periféricos más afectados son el cubital, mediano, radial, ciático-poplíteo externo, tibial posterior y facial. Los nervios afectados muestran engrosamiento y con frecuencia son dolorosos a la palpación.

La afectación neurológica produce, en este orden, alteraciones sensitivas, motoras, y posteriormente tróficas. En la dermis se produce hipoestesia y anhidrosis^(10, 11).

ALTERACIONES ÓSEAS EN LEPPRA

Las lesiones óseas son uno de los principales factores pronósticos de la enfermedad, ya que pueden dar lugar a discapacidades en pacientes con lepra ya curada. La frecuencia de estas lesiones varía según autores, debido a la variabilidad de las poblaciones estudiadas.

Las lesiones osteoarticulares de la lepra se pueden clasificar de la siguiente manera:

Lesiones específicas (osteítis leprosa): Se deben a la colonización directa del bacilo en el hueso⁽¹²⁾.

- Granuloma lepromatoso típico. Se trata de una lesión producida por el bacilo que al crecer va destruyendo el hueso. Es poco frecuente en la actualidad. En las radiografías pueden verse como pseudoquistes y osteoclasias. Los pseudoquistes son cavidades líticas únicas y suelen verse en el extremo distal de las falanges^(13, 14). A veces aparecen también osteítis quísticas múltiples. Son geodas redondeadas que aparecen sobre hueso osteoporótico. Se ven en epífisis de huesos largos⁽¹³⁾.
- Periostitis de huesos largos
- Ensanchamiento de los agujeros nutricios de las falanges.
- En casos de leproreacciones puede aparecer artritis reactiva con derrame capsular y sinovitis de forma secundaria.

Lesiones inespecíficas: son aquellas que se dan en manos y pies con neuropatías, por lo que también se ven en la neuropatía diabética y la tabes dorsal. Pueden deberse a la propia neuropatía, a infecciones secundarias o a ambas.

1. Osteopatías neurotróficas: asociadas a la anestesia y a alteraciones de la vascularización (15).
 - Reabsorciones esqueléticas (acroosteolisis): son características, aunque no exclusivas, de la lepra. Se trata de reabsorciones a nivel sobre todo de falanges de manos y pies y de metatarsianos que producen un estrechamiento concéntrico de los mismos. Esto puede dar lugar a fracturas espontáneas y a amputaciones (14).
 - Osteoartritis: Las artritis de la lepra suelen producirse en pequeñas articulaciones y siguen un curso crónico (16). Aparecen principalmente en articulaciones metatarsofalángicas. En ocasiones se produce destrucción del hueso subarticular y de la cápsula articular con subluxaciones y luxaciones de las superficies articulares. En una fase más avanzada puede verse tanto separación entre los extremos óseos como anquilosis con obliteración completa del espacio articular (14). Son alteraciones debidas a anestesia y lesiones secundarias en el pie insensible que el paciente continúa utilizando (17).
 - Osteoporosis: las alteraciones en la inervación y la falta de uso dan lugar a disminución el número de trabéculas (14, 17). Puede provocar fracturas espontáneas debidas a osteoporosis localizada y adelgazamiento metafisario de las falanges, que finalmente da lugar a separaciones óseas.
 - Lesiones combinadas: pueden verse luxaciones articulares junto con osteoartritis que acaban dando lugar a anquilosis de la articulación.
2. Osteopatías infecciosas: Secundariamente a las lesiones neurológicas pueden aparecer lesiones tróficas y de partes blandas. La anestesia debida a la denervación da lugar a traumatismos que son inadvertidos por el paciente debido a su falta de sensibilidad. De esta manera pueden aparecer lesiones cutáneas abiertas que si no se tratan de manera adecuada dan lugar procesos infecciosos de partes blandas que llegan hasta el hueso (13, 18). En las radiografías puede apreciarse inflamación de partes blandas con edema en caso de úlceras e infecciones. En caso de afectación tendinosa o retracción de partes blandas, aparecen los dedos contraídos en las radiografías, por incapacidad para extender la mano (14).
 - Osteomielitis agudas y crónicas. La osteomielitis del pie son más frecuente en pacientes con lepra. Dan lugar a reacción subperióstica con osteítis y neoformación ósea (14, 15).

- Periostitis: aparece en las radiografías como una imagen en catáfila de cebolla.
- Piorritis: suele ser secundaria a procesos infecciosos de partes blandas. Produce una imagen con pinzamiento articular, osteoporosis yuxtaarticular y tumefacción. La piorritis crónica produce deformidad articular en copa de champán.

3. Osteopatías no infecciosas:

- Articulación de Charcot: consiste en la fragmentación y colapso de uno o más huesos del tarso. La causa principal son los microtraumatismos repetidos. Como factores predisponentes actúan infecciones, osteoporosis, y sobre todo la pérdida de sensibilidad profunda^(18, 19). Las alteraciones neurotróficas alteran la articulación tibio-peroneo-astragalina que da lugar a desestructuración del arco plantar y los huesos del pie. Produce importantes alteraciones funcionales del pie y es difícil de tratar, por lo que las medidas terapéuticas deben ir encaminadas a su prevención⁽²⁰⁾. El tratamiento médico con inmovilización del pie y tratamiento ortopédico puede detener el proceso⁽²¹⁾.

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

El diagnóstico de la lepra es clínico y bacteriológico, y se basa en la existencia de al menos un criterio de los tres siguientes⁽²²⁾:

- Máculas hipopigmentadas o eritematosas, con disminución objetiva de la sensibilidad
- Engrosamiento de nervios periféricos
- Bacilos ácido-alcohol resistentes en frotis o biopsias de piel

Este último criterio es el más específico pero tiene baja sensibilidad. Sin embargo, resulta útil para identificar a los pacientes con mayor carga bacilar⁽²³⁾. El primer criterio es el más inespecífico, Además, en un 30% de los pacientes las lesiones cutáneas no se acompañan de hipoestesia; éstos suelen ser pacientes con lepra multibacilar. Por ello se recomienda buscar también los otros criterios para realizar el diagnóstico de lepra⁽²⁴⁾.

TRATAMIENTO GENERAL

Todos los pacientes con lepra deben recibir poliquimioterapia durante varios meses, a ser posible con supervisión. Los fármacos de primera línea son rifampicina, clofazimina y dapsona. También son activos contra *M. leprae* los fármacos minociclina, ofloxacino y claritromicina. Sin embargo, son de mayor coste que los anteriores, y suelen usarse como fármacos de segunda línea.

La lepra debe tratarse con tres fármacos, habitualmente los de primera línea. La pauta de tratamiento para lepra paucibacilar es de 600 mg de rifampicina mensual y 100 mg de dapsona al día. En caso de lepra multibacilar se añade a este tratamiento 300 mg de clofazimina mensual, y 50 mg a diario. La OMS recomienda tratamiento durante 12 meses en caso de lepra multibacilar, y 6 meses en pacientes con lepra paucibacilar⁽²²⁾.

En las zonas con alta prevalencia la OMS recomienda la vacunación sistemática con BCG de la población no afectada⁽²⁶⁾.

TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DE LAS LESIONES OSTEOARTICULARES

El agente de salud debe determinar cuáles son los pacientes de riesgo que requieren un seguimiento más estrecho. Se trata principalmente de los pacientes con lepra multibacilar, con presencia o antecedentes de reacciones o pacientes con dolor importante a la palpación de un tronco nervioso. En estos casos hay que evaluar al enfermo periódicamente y determinar el riesgo individual de discapacidad. Debe realizarse una exploración sistemática de los troncos nerviosos y buscar las deformidades típicas y pérdidas de sensibilidad. Además, el agente de salud deberá adiestrar y educar a los enfermos para que protejan adecuadamente las extremidades con pérdidas de sensibilidad.

El paciente debe comprender la importancia del cuidado de manos y pies que han perdido la sensibilidad para prevenir discapacidades, secundarias al daño nervioso. Por ello es importante la educación del paciente para que realice una serie de medidas generales encaminadas a prevenir y/o tratar precozmente las lesiones: examinar a diario las extremidades en busca de lesiones o signos inflamatorios, evitar las marchas prolongadas, proteger las extremidades insensibles (uso de calzado apropiado para los pies, y de guantes y herramientas adecuadas para las manos), ejercicios y masajes especiales y conocer cómo curarse las úlceras o grietas de manos y pies y ante qué tipo de lesiones deberá acudir de forma precoz al especialista.

El pie insensible está expuesto a dos mecanismos traumáticos: interno (durante la marcha) y externo (por contacto con objetos punzantes y calientes). En la osteopatía neurotrófica el uso de suelas rígidas para evitar los traumatismos externos y una plantilla almohadillada para evitar lesiones internas son importantes para prevenir la aparición de lesiones. En caso de pies ya lesionados o con deformidades será necesario un calzado ortopédico a la medida del paciente. El cuidado adecuado del pie para evitar lesiones y el tratamiento precoz de pequeños traumatismos puede evitar la progresión de la reabsorción ósea.

Las contracturas de la mano se pueden evitar con fisioterapia y férulas, y a veces con cirugía en centros especializados⁽²⁵⁾.

Es importante tratar de forma precoz las lesiones potencialmente peligrosas como úlceras, grietas, etc., mediante la limpieza y desinfección de las mismas tras lo cual debe vendarse de forma adecuada y advertir al paciente de la importancia de mantener una higiene correcta^(28, 29, 30).

ANTECEDENTES DEL TEMA

Existen diversos trabajos en la bibliografía que estudian los hallazgos radiográficos en pacientes con lepra y su correlación con la clínica, en ocasiones con diferentes resultados probablemente debido a la procedencia geográfica diversa y las diferentes poblaciones estudiadas.

En todos los estudios analizados hay una mayor proporción de varones. Las edades estudiadas son variables ^(12, 14, 31-34). Aunque la mayoría de los estudios incluye pacientes de edad avanzada, Paterson ⁽¹⁴⁾ estudió 894 pacientes de edades entre 20 y 40 años procedentes del leprosario de Hong-Kong. Se trata también del estudio con la mayor muestra de pacientes, de los estudios hallados en la literatura. En este estudio se obtuvo alrededor de un 14 % de lesiones específicas. La proporción de lesiones inespecíficas fue mayor: 66% en la lepra tuberculoides, 43 % en la lepromatosa y 32 % en la dimorfa. En cambio la proporción de osteoporosis fue mayor en la lepromatosa (11 %) frente a los otros tipos de lepra (8 %). En el resto de los estudios las lesiones inespecíficas son también las más frecuentes, sobre todo acroosteolisis: entre 19,2 % hasta un 84 % ⁽³¹⁻³⁴⁾. La reabsorción concéntrica de falanges también aparece en una proporción variable, entre un 32,7 % ⁽³⁴⁾ y un 68 % ⁽³¹⁾. La osteomielitis se vio entre un 7,6 % ⁽³²⁾ y un 14 % ⁽³¹⁾.

Los cambios inespecíficos aumentan con la edad y la duración de la enfermedad, y con el tratamiento disminuye el número de cambios específicos ⁽¹⁴⁾. Esto puede explicar en parte la variabilidad entre los estudios ^(12, 31, 34).

OBJETIVOS

- Analizar las alteraciones osteoarticulares en pacientes con lepra de alta terapéutica.
- Conocer la evolución de estas lesiones y sus secuelas.
- Enumerar las lesiones más frecuentes en nuestro medio.

MATERIAL Y MÉTODOS

- Diseño del estudio: estudio descriptivo y retrospectivo
- Población de estudio: pacientes con antecedentes de lepra ya tratada y con patología osteoarticular secundaria a la misma
- Muestra de pacientes: pacientes ingresados o en seguimiento ambulatorio por el Sanatorio San Francisco de Borja (Fontilles), con lepra tratada y lesiones osteoarticulares. Se han seleccionado los 16 pacientes con lesiones de mayor gravedad.
- Fuentes de información a utilizar: historias clínicas de los pacientes, series de radiografías simples y fotografías de las extremidades de dichos pacien-

tes. Se han estudiado todas las radiografías de manos, piernas y pies realizadas a los pacientes seleccionados y que se encuentran en el Sanatorio San Francisco de Borja. Para describir las lesiones más frecuentes se han tenido en cuenta las últimas radiografías de cada paciente.

- Se ha utilizado el programa SPSS para la realización de pruebas estadísticas.

EVOLUCIÓN DE LAS LESIONES: CASOS CLÍNICOS

Caso clínico N.º 1

Se trata de una mujer con lepra paucibacilar que ingresó en el Sanatorio, con lepra ya inactiva, a los 45 años de edad. La enfermedad había comenzado 5 años antes. Actualmente tiene 80 años. Tiene antecedentes además de diabetes mellitus tipo 2.



Radiografía del pie derecho realizada con 69 años de edad. La paciente ya mostraba inactividad clínica y bacteriológica.

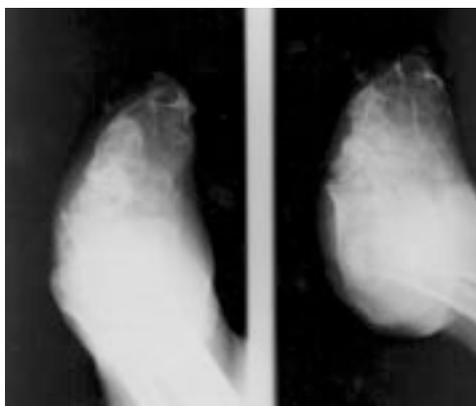
Se observa reabsorción de todas las falanges y afilamiento de los metatarsianos. Hay un aumento de densidad en la zona distal de primer metatarsiano, en probable relación con infección.

Se aprecia una anquilosis de la articulación tibio-peroneo-astragalina.

Radiografía del pie derecho nueve años después

Se aprecia una reabsorción de los metatarsianos con pérdida casi completa de los mismos y amputación parcial del pie.

La anquilosis y deformidad de la articulación tibio-peroneo-astragalina, con pérdida de la estructura normal del tarso, está conllevando la aparición de una articulación de Charcot.



Caso clínico N.º 2

Paciente que fue diagnosticado de lepra multibacilar y cuya clínica apareció a los 17 años de edad. No se conoce la fecha de inactividad pues ingresó ya inactivo, a los 54 años de edad.



*Radiografía del pie derecho
a los 54 años de edad*

En la radiografía del pie derecho se aprecia estrechamiento de las falanges proximales por reabsorción ósea y angulación de las articulaciones metatarso-falángicas de 2.º a 5.º dedos, junto con la reabsorción de la falange proximal y distal del primer dedo y aparición de dedos en garra por afectación del músculo tibial posterior.

*Radiografía del pie derecho
a los 56 años de edad*

Tras dos años la reabsorción ósea de falanges se ha acentuado, con estrechamiento de las falanges proximales que en el primer dedo ha provocado una fractura espontánea. Además aparece una desestructuración de las falanges distales con presencia de dedos en garra y anquilosis de las articulaciones interfalángicas.



Caso clínico N.º 3

Mujer con lepra multibacilar que apareció a la edad de 10 años. Durante su evolución sufrió una recaída. No se demostró la inactividad clínica y bacteriológica hasta que contaba con 29 años. Se le ha diagnosticado además Diabetes Mellitus.

*Radiografía del pie derecho
realizada a los 41 años de edad*

Presenta desviación externa y reabsorción ósea de las falanges, con adelgazamiento epifisario y acortamiento de falanges distales y aparición de dedos en garra. Se observa además osteopenia de la cabeza de los metatarsianos.



*Radiografía del pie izquierdo realizada con
45 años*

Muestra reabsorción ósea de falanges con adelgazamiento epifisario y acortamiento de falanges distales. Se aprecia una disminución de tamaño del 5º dedo por pérdida ósea de las falanges con desaparición casi completa de las mismas.

*Radiografía realizada
a los 55 años de edad*

En el pie derecho destaca la pérdida completa de falanges y de gran parte de metatarsianos, con amputación del antepié. El tarso está desorganizado, con osteopenia y con disminución marcada de los espacios articulares.

En el pie izquierdo se aprecia reabsorción ósea con disminución de tamaño de las falanges distales yafilamiento de las proximales y de los metatarsianos. Se aprecia la existencia de dedos en garra. El tarso ha perdido su forma, con hundimiento de sus estructuras óseas, y osteopenia.



Pie de la paciente en la actualidad

Se puede apreciar una úlcera neuropática sobre maléolo externo.

Caso clínico N.º 4

Paciente varón con lepra multibacilar desde los 30 años, con inactividad clínica y bacteriológica a los 49 años de edad.



Mano izquierda del paciente a los 45 años



La misma mano a los 49 años

La primera imagen muestra reabsorción ósea con pérdida completa del 5.º dedo y afilamiento del mismo metatarsiano; además hay una pérdida parcial del 4.º dedo. Las articulaciones interfalángicas proximales de 2.º y 3.º dedos están distorsionadas, probablemente debido a una osteoartritis. Se observa osteopenia generalizada.

En la siguiente radiografía se aprecia reabsorción ósea con pérdida completa del 5.º dedo y afilamiento del mismo metatarsiano y pérdida parcial de las falanges media y distal del 4.º dedo, al igual que en la radiografía anterior. Además aparece una anquilosis de las articulaciones interfalángicas proximales y distales de 3.º y 4.º dedos que ya se intuía en la imagen anterior, y angulación de la falange distal del primer dedo.



Radiografía simple del pie derecho a los 47 años



Pie izquierdo a la misma edad

En el pie derecho aparece únicamente reabsorción ósea moderada en las falanges distales de 4.º y 5.º dedo, con adelgazamiento epifisario, y anquilosis de la articulación interfalángica distal de 4.º y 5.º dedos.

En el pie izquierdo observamos estrechamiento del espacio articular de las articulaciones interfalángicas distales y reabsorción ósea leve de falanges distales.



Radiografía del pie izquierdo un año después

Ha aumentado la reabsorción ósea de falanges, con pérdida de la falange distal del primer dedo (probablemente tras precisar una intervención quirúrgica tras sobreinfección, que es una complicación frecuente) Se aprecia un adelgazamiento de las epífisis de las falanges proximales. Hay una subluxación de las falanges del 4.º dedo debido a la reabsorción ósea.

Radiografía del pie izquierdo 4 años después de la anterior, a los 53 años de edad

Destaca la reabsorción ósea de las falanges con pérdida del 1.º y 3.º dedo y estrechamiento del resto de falanges, angulación del primer metatarsiano y anquilosis de la primera articulación metatarso-falángica.



Radiografía de ambos pies realizada a los 55 años de edad



En el *pie derecho* (arriba) se observa reabsorción ósea con adelgazamiento importante de todas las falanges, pérdida de las falanges distales y parte de las proximales en los dedos 3.º, 4.º y 5.º, y pérdida completa del 2.º dedo.

En el *pie izquierdo (abajo)* se puede observar la reabsorción ósea importante a nivel de falanges, con pérdida de falanges distales y parte de proximales de los dedos con pérdida completa del 5.º dedo y angulación del 4.º dedo.



Radiografía de ambos pies, a los 58 años de edad y tres años después de la anterior

Además de las lesiones anteriores se puede apreciar en el pie derecho aumento del estrechamiento de los metatarsianos. En el pie izquierdo destaca aumento de densidad en la cara inferior del tarso y bajo el primer metatarsiano, compatible con mal perforante plantar.



Aspecto de las manos y pies en la actualidad

El paciente tiene 61 años y lleva más de 10 años inactivo.

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

La muestra se compone de 16 pacientes que fueron ingresados en el sanatorio de Fontilles entre 1946 y 2001, y que actualmente continúan ingresados o se controlan ambulatoriamente en el Sanatorio. Todos los pacientes excepto uno son de origen español.

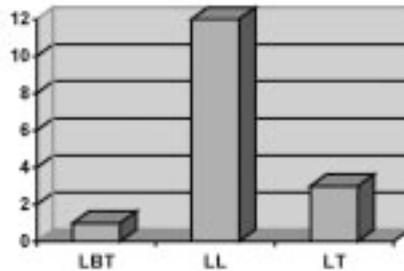
La edad de comienzo de los síntomas oscilaba entre los 10 y los 42 años, pero la mayoría de los pacientes ingresó en el sanatorio varios años después. La

edad media al ingreso era de 41,2 años (mínimo 17 y máximo 72 años). La mediana de la duración de la enfermedad hasta su inactividad clínica y bacteriológica era de 8 años, y la media de 41,2 años (2- 33 años).

El 25 % (4 de los pacientes) padece diabetes mellitus. La diabetes no se asoció a infección en estadios precoces de la enfermedad ($p=0,76$), aunque sí en fases tardías ($p=0,024$).

En cuanto a la distribución por sexos, 10 de los pacientes de nuestra muestra son mujeres (62,5%) y 6 varones (37,5 %).

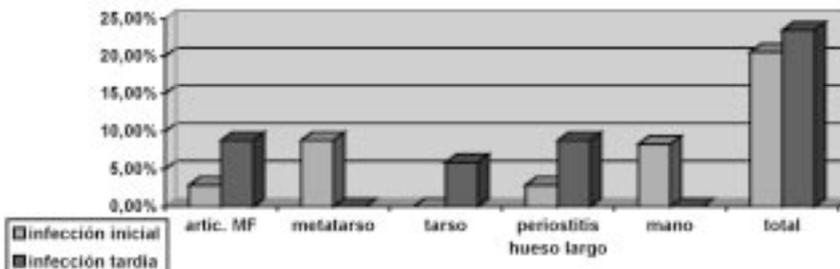
El tipo de lepra más frecuente en la muestra fue la lepra lepromatosa (LL), que se había diagnosticado en 12 pacientes (75 %), seguido de la lepra tuberculoide (LT) en 3 pacientes (18,8 %) y por último lepra borderline tuberculoide (LBT) en 1 paciente (6,3 %). No se diagnosticaron los otros tipos de lepra en nuestra muestra.



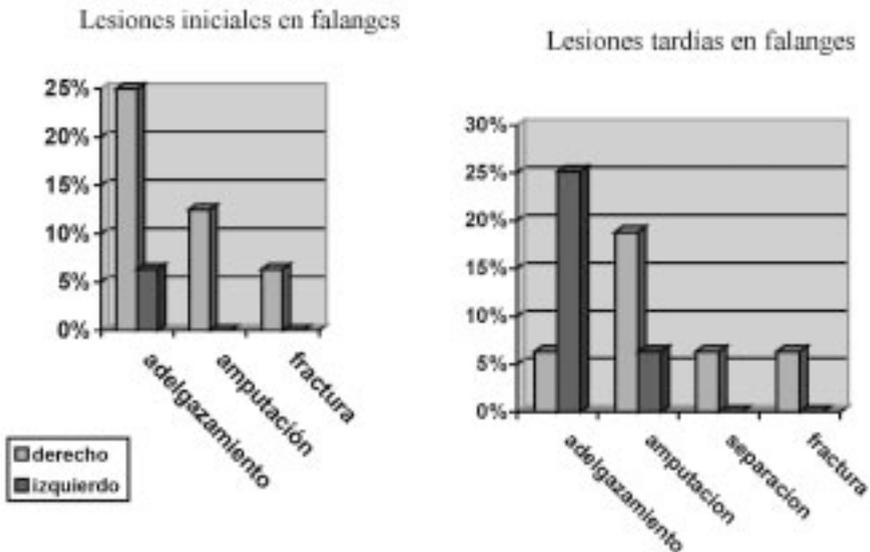
LESIONES OBSERVADAS EN PIES

Las lesiones que se observaron con mayor frecuencia en las últimas radiografías son las siguientes:

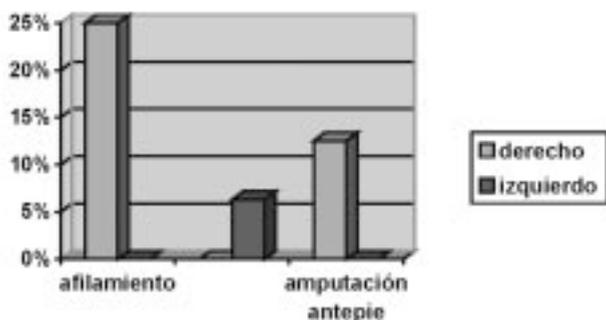
- Reabsorción de las falanges de los pies en el 50 % de los casos.
- Signos de infección osteoarticular crónica o pasada: 7 casos (43 %). Las localizaciones fueron las siguientes: la artritis de alguna articulación metatarso-falángica (artic MF), mal perforante plantar en el tarso y periostitis en tibia o en peroné. Las frecuencias de cada localización no presentan diferencias significativas.



- En las primeras radiografías realizadas a los pacientes no se habían observado casos de mal perforante plantar, aunque sí se observaron en estas radiografías iniciales signos de infección en metatarsianos. En cambio en las radiografías realizadas varios años más tarde fueron más frecuentes la artritis de artic MF, signos de periostitis y mal perforante plantar.
- En el pie derecho la lesión observada con mayor frecuencia es el adelgazamiento de las falanges de los dedos 2.º a 5.º de forma simultánea (en 4 pacientes), y en el izquierdo el adelgazamiento de las falanges proximales (3 pacientes). Además, en cuatro casos hay afilamiento o incluso acortamiento de las falanges distales. En 5 pacientes hay pérdida parcial de falanges con acortamiento de algún dedo, y en 3 casos pérdida aislada de un dedo del pie.



- Cinco pacientes presentaban amputación del antepié al menos en uno de los dos pies (uno de los pacientes en los dos pies). El pie derecho se ve afectado con mayor frecuencia que el izquierdo (4/1). En dos de los casos las amputaciones se hallaban presentes desde las primeras radiografías, mientras que en el resto han ido apareciendo a lo largo del curso evolutivo.
- En los metatarsianos la lesión más frecuente es el estrechamiento o afilamiento de algún metatarsiano (esta lesión se ve en el 50 % de nuestros pacientes) y en algún caso (en 3 pacientes) de todos los metatarsianos.



- En el tarso hay afectación importante en 3 pacientes, con anquilosis de las articulaciones, pérdida de la estructura normal y colapso articular. Hay un 12,5 % de pacientes con anquilosis de las articulaciones del tarso y un 6,3 % con articulación de Charcot.

LESIONES OBSERVADAS EN MANOS

- Cuatro pacientes tienen afectación en manos.
- La lesión más frecuente fue la pérdida parcial del 2.º al 5.º dedo, generalmente con pérdida de la falange distal o de las falanges distal y media. Los dedos afectados con mayor frecuencia fueron el 2.º y el 3.º en la mano derecha y el 2.º en la mano izquierda.
- Otras lesiones observadas fueron el pinzamiento y/o la anquilosis de las articulaciones interfalángicas, sobre todo en los dedos 5.º y 4.º, y las angulaciones-subluxaciones de los dedos, sobre todo del 5.º.

CONCLUSIONES

La afectación ósea es una complicación frecuente en los pacientes con lepra. La lesión más frecuente son las reabsorciones óseas, especialmente en falanges de pies y manos, y en metatarsianos. Este tipo de lesión no es específica de la lepra y se asocia a anestesia de manos y pies. Las reabsorciones óseas tienden a empeorar a lo largo de los años, con aumento progresivo que finalmente dará lugar al acortamiento o pérdida de dedos de pies y manos. También se pueden encontrar osteoartritis, lesiones de mal perforante plantar, y articulación de Charcot, de forma secundaria a la anestesia de las extremidades que favorece la existencia de microtraumatismos e infecciones. Estas lesiones aparecen muchas veces tras haberse producido la curación de la infección por lepra, debido a la existencia de lesión neurológica permanente.

Las lesiones óseas pueden dar lugar a incapacidades importantes debido a la pérdida de dedos de manos y pies e incluso a la amputación completa del ante-

pié. Son estas lesiones las que van a determinar la calidad de vida del paciente y su funcionalidad.

Estas lesiones se pueden prevenir con el adecuado manejo ortopédico y el tratamiento precoz de infecciones y úlceras secundarias. Es importante continuar con el seguimiento clínico del paciente aunque éste ya haya completado la poliquimioterapia antimicrobiana, sobre todo si sufre neuropatía. Independientemente del alta terapéutica sin una buena educación sanitaria y un tratamiento ortopédico correcto las lesiones pueden ser progresivas y muy incapacitantes.

REFERENCIAS

1. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 2004; **363**:1209-19.
2. Hastings RC, ed. Leprosy. 2nd ed. *Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994.*
3. Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of the human leprosy bacilli into the footpads of mice. *J Exp Med* 1960; **112**:445-451.
4. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy: I, report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr* 1971; **39**:693-701.
5. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001; **409**:1007-1011.
6. Cho SN, Cellona RV, Villahermosa LG, et al. Detection of phenolic glycolipid I of *Mycobacterium leprae* in sera from leprosy patients before and after start of multidrug therapy. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; **8**:138-142.
7. Levis WR, Ernst JD. *Mycobacterium Leprae*. In Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. Mandell's, Douglas' and Benett's principles and practice of infectious diseases 2005.
8. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int J Lepr* 1966; **34**:255-273.
9. Britton WJ. Leprosy In: Cohen J, Powerly WG, eds. Infectious diseases. *London: Mosby, 2004*: 1507-1513.
10. Croft RP, Richardus JH, Nicholls PG, Smith WC. Nerve function impairment in leprosy: design, methodology, and intake status of a prospective cohort study of 2664 new leprosy cases in Bangladesh: the Bangladesh Acute Nerve Damage Study. *Lepr Rev* 1999; **70**:140-159.
11. Saunderson P, Gebre S, Desta K, Byass P, Lockwood DN. The pattern of leprosy-related neuropathy in the AMFES patients in Ethiopia: definitions, incidence, risk factors and outcome. *Lepr Rev* 2000; **71**:285-308.
12. Gomez Echevarría JR, Gimeno Ochoa V, Díez Orive MO. Manifestaciones radiológicas en enfermos de lepra inactivos clínica y bacteriológicamente hace más de diez años. *Rev Lepr Fontilles* 1999; **22**:241-255.
13. Cardama JE, Gatti JC, Charosky CB, Gatti F, Selva JS. Alteraciones óseas en la enfermedad de Hansen. *Rev argentina de dermatología* 1961; **62**:95-101.
14. Paterson DE, Rad M. Bone changes in leprosy. Their incidence, progress, prevention and arrest. *Int J Lepr* 1961; **29**:393-422.

15. Lechat. Bone lesions in leprosy. *Int J Lepr* 1962; **30**:125-136.
16. Cossermelli-Messina W, Festa Neto C, Cossermelli W. Articular inflammatory manifestations in patients with different forms of leprosy. *J Rheum* 1998; **25**: 111-9.
17. Gómez Echevarría JR, Moll Cervera F, Díez Orive MO. Evolución de las lesiones óseas en enfermos de Hansen de alta terapéutica: a propósito de tres casos. *Rev Leprológica Fontilles* 2004; **24**:415-422.
18. Klenerman P, Hammond C, Kulkarni VN, Medta JM. Vibration sense and tarsal disintegration. *Indian J Lepr* 1990; **62**:422-428.
19. Kulkarni VN, Mehta JM. Tarsal disintegration in leprosy. *Lepr in India* 1983; **55**:338-370.
20. Haverson G, Warren AG. Tarsal bone desintegration in leprosy. *Chainat Tha Clin Radiol* 1979; **30**:317-322.
21. Manzi R, Marzatti A, Rozenwurcel H, Baudino R, Li Mau L. Osteoartropatía destructiva del tarso. *Temas de leprología* 1974; **54**:13-27.
22. WHO. *Expert Committee on Leprosy*, 7th Report, 1998: 1-43.
23. Report of the International Leprosy Association Technical Forum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2002; **70** (suppl): S1-S62.
24. Saunderson P, Groenen G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. *Lepr Rev* 2000; **71**:34-42.
25. Miko TL. Damage and regeneration of peripheral nerves in advanced treated leprosy. *Lancet* 1993; **342**:521-525.
26. Gómez Echevarría JR, Hernández Ramos JM. Diagnóstico y tratamiento de la lepra. Experiencia en Brasil. *Piel* 2001; **16**:238-247.
27. Setia MS, Steinmans C, Ho CS, Rutherford GW. The role of BCG in prevention of leprosy: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2006; **6**:162-170.
28. Srivinisán H. Prevención de discapacidades en enfermos de lepra. Biblioteca de la Organización Mundial de la Salud, 1994.
29. Grauwin MY, Cartel JL, Lepers JP. Comment guérir les ostéites et oséo-arthrites des extrémités des anciens malades de la lépre par le sucre cristallisé alimentaire ? *Acta leprolog* 1999; **11**:147-152.
30. Chirife J, Scarmato G, Herszage L. Scientific basis for use of granulated sugar in treatment of infected wounds. *Lancet* 1982; **1**:560-561.
31. Chhabriya BD, Sharma NC, Bausal NK, Agrawal GR. Bone changes in leprosy: a study of 50 cases. *Indian Lepr* 1985; **57**:632-639.
32. Carpintero P, Logroño C, Carreto A, Carrascal A, Lluch C. Progression of bone lesions in cured leprosy patients. *Acta leprolog* 1998; **11**:21-24.
33. Ilarramendi X, Carregal E, Nery JAC, Sarno EN. Progression of acral bone resorption in multibacillary patients. *Acta leprolog* 2000-2001; **12**:29-37.
34. Choudhuri H, Theppa DM, Kamar RH, Elangovan S. Bone changes in leprosy patients with disabilities/deformities: a clinico-radiological correlation. *Indian J lepr* 1999; **71**:203-215.

ANERGIA EN LEPROSIS ¿DONDE ESTÁ EL DEFECTO?

* Óscar Rojas Espinosa

RESUMEN

Hay quienes piensan, erróneamente, que actualmente el estudio de la lepra es una actividad irrelevante porque la enfermedad es un mal del pasado. Efectivamente la lepra es una enfermedad antigua, la primera referencia sobre la misma se hizo en el año 1500 AC en la India, pero como la tuberculosis, que también es una enfermedad antigua, sigue siendo un problema importante de salud pública (1.15 millones de casos registrados en 1998, en más de 80 países) y la causa de deformidad incapacitante de una parte significativa de la población enferma, si bien la enfermedad es más frecuente en algunas regiones que en otras, siendo el Sudeste Asiático, África y las Américas las regiones más afectadas, con prevalencias (casos por 10,000 habitantes) de 0.81, 0.56 y 0.39, respectivamente. En México la incidencia de la enfermedad se ha reducido de 16,694 casos en 1990 a 820 casos a principios del 2006, aunque el número de casos nuevos detectados en 2005 fue de 289. La situación global de la lepra, según la OMS, es actualmente de 219,826 casos registrados (WHO: World Health Organization, 2006).⁽¹⁾ Es claro que la poliquimioterapia recomendada por la OMS está influyendo positivamente en la erradicación de la enfermedad, y aunque no se logró el objetivo de alcanzar la tasa de morbilidad de ≤ 1 por 10,000 habitantes para el año 2005 en todos los países con lepra endémica, el programa sigue vigente y se espera lograr este objetivo para el año 2010.

En cuanto a la enfermedad en sí, este es un padecimiento sumamente interesante por varias razones pero particularmente por su expresión espectral que incluye las formas polares tuberculoide y lepromatosa y un *continuum* de formas intermedias, y por el desarrollo de anergia hacia *Mycobacterium leprae* en la forma lepromatosa de la enfermedad. Sin pretender hacer una revisión exhaustiva, en este artículo se revisan varias anomalías inmunológicas que podrían explicar la anergia en la lepra lepromatosa.

* *Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F., México.*

Correspondencia a:

*Dr. Oscar Rojas-Espinosa, Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN Carpio y Plan de Ayala, Colonia Santo Tomás, 11340 México, D.F., México.
rojas_espinosa@hotmail.com
rojasespinosa@yahoo.com.mx*

Palabras clave: Lepra, Inmunología, Anergia.

SUMMARY

There is who erroneously think that at this time the study of leprosy is an irrelevant activity because leprosy is a disease of the past. Certainly, leprosy is an antique disease (the first reference on it comes from India around the year 1500 BC) but like tuberculosis, also an antique disease, it continues to be a persistent public health problem (around 1.15 million cases registered in 1998 in over 80 countries) and the cause of disability in a significant part of the sick population. As it was in the past, nowadays leprosy is more frequent in some regions than in others, being South-East Asia, Africa, and the Americas the more affected regions, with a prevalence (cases per 10,000 inhabitants) of 0.81, 0.56, and 0.39, respectively. In Mexico the incidence of leprosy has dropped from 16,694 cases in 1990 to 820 cases at the beginning of 2006, with 289 new cases in 2005. At present, the global situation of leprosy is close to 219, 826 cases (WHO, 2006)⁽¹⁾. Clearly, the WHO-recommended multidrug therapy is positively contributing to eradication of the disease, and although the goal of lowering the incidence of leprosy to ≤ 1 case per 10,000 inhabitants in the period 2000-2005 was not reached in all of the endemic countries, the WHO efforts continue expecting to reach this objective now by the year 2010.

With regard to the disease itself, it is an extremely interesting illness for several reasons but particularly for its spectrum expression including two polar forms and a continuum of intermediate forms, and for the development of anergy to *Mycobacterium leprae* in the lepromatous form of the disease. In this article a revision is made of several reports on immunological anomalies in leprosy that might explain anergy.

Keywords: Leprosy, Immunology, Anergia.

RÉSUMÉ

Certains pensent que l'étude de la lèpre de nos jours est une activité vaine, car il s'agirait d'un mal du passé. Effectivement, la lèpre est une maladie ancienne (sa première description remonte à 1500 avant JC, en Inde), mais comme la tuberculose (elle aussi maladie antique, mais toujours sujet d'actualité), elle continue d'être un problème de santé publique : 1,15 millions de cas ont été recensés en 1998 dans plus de 80 pays. Parmi la population malade, une grande partie est touchée par des déformations, entraînant une incapacité à travailler, et de manière plus générale à se « débrouiller » seul. Comme dans le passé, la lèpre est aujourd'hui plus fréquente dans certaines régions. L'Asie du Sud-Est, l'Afrique et les Amériques sont les régions les plus affectées, avec des taux de, respectivement, 0,81, 0,56 et 0,39 cas pour 10 000 habitants. Au Mexique, le nombre de malade est passé de 16 694 en 1990 à 820 au début de l'année 2006, baisse im-

portante, malgré l'apparition de 289 nouveaux cas en 2005. L'OMS enregistre actuellement pour sa part le nombre de 219 826 malades à l'échelle mondiale (WHO, 2006)⁽¹⁾. Même si la polychimiothérapie est un traitement efficace pour réduire la maladie, l'objectif d'éradication de l'OMS pour l'année 2005 (avec un taux fixé à ≤ 1 cas pour 10 000 habitants) n'a pas réussi dans tous les pays endémiques. L'OMS continue donc son programme afin d'atteindre ce but en 2010.

Plusieurs raisons rendent la lèpre extrêmement intéressante d'un point de vue scientifique, en particulier pour son expression spectrale (formée d'un continuum de formes intermédiaires comprises entre les pôles tuberculoïde et lepromateuse). En outre, le développement d'anergie contre la *Mycobacterium leprae* dans la forme lépromateuse de la maladie est un autre aspect remarquable. Ainsi, sans prétendre à la révision exhaustive, l'article présente une synthèse de la littérature sur les diverses anomalies immunologiques qui pourraient expliquer le développement d'anergie dans la lèpre lépromateuse.

Mots clés: Lèpre, Immunologie, Anergie.

INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento, la lepra ha sido una enfermedad cuyas manifestaciones clínicas peculiares han atraído mucho la atención de la población en general, y de los médicos y especialistas en particular. Sin embargo, las dos características principales que la hacen ser una enfermedad particularmente interesante son, primero, su manifestación multivariada que incluye dos formas polares (tuberculoide y lepromatosa) y un espectro de formas intermedias, y segundo, la pérdida selectiva de la inmunidad celular contra el bacilo de la lepra en la forma lepromatosa de la enfermedad (estado referido como anergia celular). Otras características del padecimiento son su evolución crónica, su predilección por piel y nervios, y su naturaleza infecciosa relativamente poco contagiosa.

La enfermedad es causada por *Mycobacterium leprae*. La manifestación multivariada de la enfermedad parece depender más de las características del huésped que del microorganismo, aunque esto no es definitivo ya que la incapacidad de los microbiólogos para cultivar *in vitro* a *M. leprae*, ha dificultado el estudio de la biología del microorganismo y el conocimiento sobre la existencia de cepas con distinta virulencia. Los factores inherentes al huésped que le confieren resistencia o susceptibilidad a la enfermedad tampoco son bien conocidos pero dentro de ellos se han considerado desde antígenos de histocompatibilidad, hasta genes de supuesta resistencia como Nramp-1 (Canonne-Hergaux *et al*, 1999)⁽²⁾ y otros. En cuanto a los factores genéticos de susceptibilidad a la lepra, éstos se han buscado desde hace mucho tiempo, sobre todo los asociados a antígenos de histocompatibilidad, pero hasta ahora no se ha encontrado un gene HLA de susceptibilidad o resistencia a la enfermedad, y aunque algunos han notado una asociación significativa entre ciertos genes y el tipo de lepra desarrollado (HLA-DR2 en la lepra TT y HLA-DQ1 en la lepra LL) (van Eden *et al*, 1980, 1985)^(3, 4), otros no han confirmado

esta asociación, aunque si han observado la alta frecuencia de HLA-DR2 y HLA-DQ1 entre los pacientes con lepra en general (Todd *et al*, 1990)⁽⁵⁾. Por otro lado, la susceptibilidad o resistencia a la lepra y el tipo de lepra resultante pueden estar asociadas a otros factores genéticos que pueden estar ligados o no a los genes del complejo HLA. Uno de los genes considerados es *Nramp*-(*natural-resistance-associated macrophage protein 1*) cuyo papel se ha relacionado con el transporte de hierro y magnesio en macrófagos y otras células (Forbes y Gros, 2001; Mulero *et al*, 2002)^(6, 7). Algunos estudios han mostrado que los monocitos de pacientes con LL exhiben niveles disminuidos de *Nramp*-1 (Canonne-Hergaux, 1999)⁽²⁾ sugiriendo que esta disminución puede estar relacionada con el desarrollo de la enfermedad, y también se ha sugerido que la baja expresión de *Nramp*-1 puede deberse, a su vez, a la baja expresión de IRF-8, un factor de transcripción específico de macrófagos (Alter-Koltunoff *et al*, 2003)⁽⁸⁾ que participa en la expresión regulada de las citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-18, e IL-1 β , además de gp91^{phox} y p67^{phox} (componentes del sistema de la NADPH oxidasa), iNOS, y *Nramp*1 (los ratones KO para IRF-8 no expresan cantidades detectables de *Nramp*-1).

Paradójicamente, mientras que se tiene abundante información sobre los mecanismos de la inmunidad en la lepra, prácticamente se desconocen los mecanismos de la anergia en esta enfermedad. Es por esto que en este artículo revisaremos algunos de los mecanismos inmunológicos asociados con la lepra, pero sobre todo de aquellos que podrían ser causa de la anergia celular.

LA ENFERMEDAD

La lepra en los humanos exhibe dos formas polares y un espectro de formas intermedias; las formas polares de la enfermedad son la lepra tuberculoide (TT) y la lepra lepromatosa (LL). La lepra TT es la forma benigna de la enfermedad, mientras que la lepra LL es la forma maligna de la misma. Las características clínicas, histológicas, bacteriológicas e inmunológicas de la lepra TT y LL, son tan diferentes que si no se conociera al agente causal, se pensaría que se trata de entidades clínicas diferentes. Las características más relevantes de las formas polares de la lepra se mencionan enseguida; la descripción clínica detallada de éstas y de las formas intermedias de la enfermedad, se pueden revisar en diferentes excelentes libros sobre leprología y dermatología. Nosotros hemos tomado como referencia el libro de Hastings (1985)⁽⁹⁾.

La lepra tuberculoide (TT)

Los pacientes con lepra TT muestran en la piel, lesiones únicas o escasas y asimétricas, ovales o redondas, rojizas o hipopigmentadas, reseca o anhidróticas, frecuentemente alopecicas, variablemente anestésicas en su centro, casi nunca mayores de 10 cm de diámetro, y claramente delimitadas por un borde elevado. Cuando las lesiones están en el trayecto de un nervio periférico, éste puede presentar inflamación y a veces necrosis; los nervios más frecuentemente afectados

son el ulnar, el tibial posterior, el poplíteo lateral, y luego otros. La histología de las lesiones muestra la presencia de granulomas formados por abundantes linfocitos, macrófagos, células epitelioides, células multinucleadas gigantes, y ausencia de bacilos o, cuando mucho, sólo algunos bacilos aislados. Los pacientes con lepra TT dan reacciones fuertemente positivas a la lepromina pero no tienen niveles elevados de anticuerpos contra *M. leprae*, lo que indica, que en estos pacientes, la inmunidad celular es preponderante.

La lepra lepromatosa

Los pacientes con la enfermedad lepromatosa temprana muestran máculas pequeñas, eritematosas, múltiples y simétricas, que con el tiempo se transforman en placas infiltradas y luego en nódulos de superficie brillante, altamente bacilíferos. Las lesiones aparecen en orejas, cara, tronco y extremidades, pero son raras en las superficies calientes del cuerpo como las axilas y las ingles; generalmente no son anestésicas. La acumulación de nódulos múltiples en la cara origina la llamada “facies leonina”; los pacientes con esta forma de la enfermedad desarrollan alopecia en cejas y pestañas, y ulceración frecuente de la mucosa nasal; los nervios periféricos aparecen inflamados y contienen numerosos bacilos; la afección de nervios es causa de parálisis y anestesia tanto de las extremidades superiores como de las inferiores. Las lesiones maculares y nodulares muestran infiltrados mononucleares con abundantes macrófagos y escasos linfocitos; los macrófagos aparecen “espumosos” y repletos de bacilos; inmunológicamente, los granulomas de este tipo se describen como no reactivos.

En estos pacientes, la lepromino-reacción y la linfoproliferación inducida por *M. leprae* son negativas, pero la producción de anticuerpos antimicobacterianos es abundante, lo que sugiere un defecto profundo y selectivo al nivel de la respuesta inmune celular.

Las reacciones leprosas

No obstante sus características más o menos estables, las lesiones de las diferentes formas de la lepra frecuentemente se modifican por efecto de cambios inmunológicos que ocurren en los pacientes y que originan las llamadas reacciones leprosas. Se reconocen dos tipos de reacción leprosa y algunas variantes dentro de ellas. Las reacciones de tipo 1 aparecen en los pacientes con lepra tuberculoides (TT) y tuberculoides subpolares (BT), y reflejan hiperactividad de la inmunidad celular del individuo; los pacientes muestran incremento en la cantidad y actividad de las células Th1CD4⁺, sobreproducción de citocinas proinflamatorias que activan la función de los macrófagos y la inmunidad protectora pero también las consecuencias de la hipersensibilidad. El daño inflamatorio de los nervios (neuritis) de las regiones afectadas, es la manifestación más común de la reacción leprosa de tipo 1, también llamada reacción reversa.

Las reacciones leprosas del tipo 2, son frecuentes en los pacientes multibacilares (LL/BL) y son el resultado de la hipersensibilidad humoral donde participan,

en grado variable, complejos inmunes solubles, complemento y leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Se reconocen dos variedades de este tipo de reacción: el eritema nodoso leproso y la vasculitis necrosante o Fenómeno de Lucio. En ambos casos, el compromiso vascular (vasculitis) es una manifestación común.

LA ANERGIA EN LA LEPROA

Ya hemos comentado que la respuesta inmunitaria celular es funcional y operante en las formas paucibacilares de la enfermedad, la lepra tuberculoide (TT) y tuberculoide subpolar (BT), y que esta forma de respuesta inmunitaria es deficiente en los pacientes con las formas multibacilares, lepromatosa y lepromatosa subpolar, de la misma (LL/BL). También hemos señalado que la ausente respuesta inmunitaria celular en los pacientes LL es responsable de la anergia que impide a estos pacientes destruir al microorganismo y controlar la enfermedad. La anergia celular en los pacientes LL no es un defecto fácil de explicar ya que depende de alteraciones a muy diversos niveles en la red de interacciones celulares y moleculares que componen la respuesta inmunitaria. En la práctica, la anergia celular se pone de manifiesto por la prueba de la lepromina, que en los pacientes lepromatosos es negativa, y cuando ésta es positiva aparece como una reacción inflamatoria conocida como reacción de Mitsuda. La prueba de la lepromina se hace inoculando intradérmicamente una suspensión de tejido bacilífero inactivado por calor, preparada a partir de nódulos lepromatosos. Una prueba positiva aparece como una reacción inflamatoria indurada mayor de 5 mm de diámetro, que alcanza su máximo desarrollo entre 3 y 4 semanas después de aplicar la lepromina y es indicativa de la capacidad del individuo para responder, con una respuesta inmune protectora (dependiente de las células Th1) contra los antígenos de *M. leprae*. La prueba de la lepromina es positiva en los pacientes del extremo tuberculoide (TT) del espectro de la lepra, y negativa en los pacientes del extremo lepromatoso (LL). Dado que la lepra tuberculoide representa la forma benigna de la enfermedad, que incluso puede curar espontáneamente, en este artículo sólo haremos referencia a la forma maligna de la misma (LL) donde la anergia celular incapacita al individuo para controlar la enfermedad.

MECANISMOS DE LA ANERGIA

Entendida como la incapacidad de un individuo para responder específicamente contra los antígenos del agente infectante, la anergia celular en la lepra lepromatosa se ha tratado de explicar de diversas maneras, y se ha sugerido que podría deberse a una o más de las siguientes causas: (a) carencia de células reactivas con *M. leprae*, (b) sobre-activación de células supresoras, (c) defectuosa presentación de antígeno por las células APC, (d) deficiente expresión de moléculas coestimuladoras, (e) falla en la producción de citocinas proinflamatorias o de sus receptores, y (g) actividad excesiva de células productoras de citocinas anti-

inflamatorias. Algunos de los hallazgos que llevaron a proponer estas posibilidades se describen enseguida.

Carencia de linfocitos reactivos con *M. leprae*

Esta es una proposición de Kaplan y Cohn (1985)⁽¹⁰⁾ quienes encuentran que los leucocitos de los pacientes con lepra lepromatosa no responden proliferativamente al estímulo con *M. leprae* ni cuando se suplementan con IL-2 exógena ni cuando se liberan de monocitos, que podrían tener actividad supresora (ver supresión y citocinas en los párrafos siguientes). Aunque hay varios estudios de este tipo, no son muchos los autores que apoyan esta posibilidad.

Linfocitos supresores

El estudio de la inmunología de la lepra ha estado orientado, sobre todo, a entender cuales son los mecanismos que conducen a la anergia en la lepra lepromatosa. Aunque hubo algunas comunicaciones previas, los primeros estudios sistemáticos sobre la inmunología de la lepra fueron publicados en 1977 por Nath *et al*⁽¹¹⁾, quienes encontraron que los pacientes con lepra lepromatosa sin tratamiento mostraban números disminuidos de linfocitos T y respuestas linfoproliferativas muy reducidas ante el estímulo de la lepromina, la fitohemaglutinina (PHA) y la concanavalina A (Con-A). Básicamente los mismos resultados fueron encontrados por Mehra *et al* (1979)⁽¹²⁾, quienes además encontraron que la lepromina inducía mayor actividad supresora en los leucocitos de los pacientes lepromatosos (90-100%) que en los leucocitos de los pacientes tuberculoides (13%), y que aunque el tratamiento anti-leproso restablecía la capacidad de respuesta no específica, no modificaba la anergia hacia *M. leprae*. Contrariamente a esta observación, Nath *et al* (1979)⁽¹³⁾ comunican sus hallazgos sobre la inducción de actividad supresora por la Con-A en los leucocitos de los pacientes TT, pero no en los leucocitos de los pacientes LL.

La existencia de células supresoras en la lepra fue otra vez sugerida por Bjune (1979)⁽¹⁴⁾, quien encuentra que la estimulación de los leucocitos de pacientes LL con lepromina, deprime todavía más su ya reducida capacidad de proliferar en respuesta a la Con-A, mientras que los leucocitos de los pacientes con lepra tuberculoides subpolar (BT) convalecientes de una reacción leprosa de tipo 1 (inmunológicamente parecidos a los pacientes TT), incrementan su respuesta hacia la Con-A, aun en presencia de lepromina. Bjune sugiere que la inhibición de la linfoproliferación inducida por Con-A se debe a que la lepromina estimula a una población de células supresoras y que estas células predominan en los pacientes LL. Otra vez, un hallazgo contradictorio a éste es el aportado por Nath y Singh (1980)⁽¹⁵⁾ quienes señalan que *M. leprae* suprime la linfoproliferación inducida por Con-A en el 80% de los pacientes TT y sólo en el 35% de los pacientes LL, sugiriendo que los pacientes TT tienen más células supresoras circulantes que los pacientes LL.

Como éstos, hubo otros estudios sobre la presencia y función de células supresoras en la lepra, pero globalmente los resultados no fueron concluyentes ya que mientras algunos señalaban un exceso de supresión en la lepra LL, otros indicaban carencia de supresión en esta forma de la enfermedad. Esto hizo que algunos investigadores decidieran medir los niveles de células supresoras, ya no en la sangre, sino en las lesiones de la lepra. La existencia de anticuerpos monoclonales contra células supresoras (OKT8⁺/Leu2a⁺) y contra células cooperadoras (OKT4⁺/Leu3a⁺), permitió a van Voorhis *et al*, en 1982⁽¹⁶⁾, establecer que en las lesiones LL, los linfocitos son casi exclusivamente OKT8⁺ (supresoras), en tanto que en las lesiones de la lepra TT predominan las células OKT4⁺. Modlin *et al* (1983)⁽¹⁷⁾, por su parte, confirman los hallazgos anteriores y encuentran que en las lesiones TT, las células CD4⁺ (OKT4⁺) se localizan entre los agregados de células epitelioides, mientras que las células CD8⁺ (OKT8⁺) se encuentran formando un manto periférico en el borde de la lesión. También encuentran que en las lesiones de la lepra LL predominan las células CD8⁺, y que éstas y las células CD4⁺ se encuentran entremezcladas con los macrófagos en toda la lesión. Los autores no ofrecen ninguna explicación a esta particular distribución de las células CD4⁺ y CD8⁺ en cada caso. En esta época, las células CD8⁺ se reconocen como células supresoras, concepto que se refuerza cuando Modlin *et al* (1986a, 1986b)^(18, 19) aíslan células OKT4⁺ y OKT8⁺ de las lesiones de la lepra y con ellas producen clonas en presencia de IL-2 y de células alimentadoras irradiadas. Trece de las 32 clonas (40%) OKT8⁺ obtenidas de 6 pacientes LL mostraron actividad supresora inducida con Con-A, mientras que ninguna de 9 clonas aisladas de 6 pacientes TT fueron supresoras. Por otro lado, en este mismo año, Ottenhoff *et al* (1986)⁽²⁰⁾ logran aislar y clonar, células T cooperadoras (Th) y T supresoras (Ts) de las lesiones de un paciente con lepra lepromatosa subpolar (BL). Las células Ts suprimieron específicamente la respuesta proliferativa de las células Th inducida por una proteína de 36 kD de *M. leprae*. Los autores sugirieron la posibilidad de que este antígeno podría portar un determinante antigénico inductor de supresión.

Macrófagos supresores

Simultáneamente a los estudios sobre la función de las células T en la lepra, se iniciaron los estudios sobre la función de los macrófagos en esa enfermedad. Trabajando con leucocitos de personas idénticas en HLA-D, Nath *et al* (1980)⁽²¹⁾ encontraron que los macrófagos derivados de pacientes con lepra TT aumentaron la respuesta linfoproliferativa estimulada por *M. leprae*, en tanto que los macrófagos derivados de pacientes con lepra LL la inhibieron. Después, Salgame *et al* (1983)⁽²²⁾ encontraron que los lisados de macrófagos de pacientes con lepra LL, eran capaces de inhibir la proliferación de las células T inducida por *M. leprae*, y que la capacidad inhibidora era mediada por un factor termolabile no dializable. Por el contrario, los lisados de los macrófagos de personas sanas y de pacientes con lepra TT no contuvieron el factor supresor. Un ha-

hallazgo similar fue publicado en ese mismo año por Sathish *et al* (1983)⁽²³⁾, quienes encontraron que los monocitos de los pacientes con lepra LL no permitieron la proliferación de los linfocitos de individuos con lepra TT idénticos en HLA-D, en respuesta a *M. leprae*, en tanto que los macrófagos de individuos TT sí lo hicieron. Los macrófagos derivados de los monocitos de pacientes LL, pero no los de los pacientes TT, liberaron factores solubles con actividad supresora (MoFs) de alto peso molecular (>25,000 Da) que fueron resistentes a indometacina, lo que eliminó la posibilidad de que pudiera haberse tratado de prostaglandinas. Años más tarde, Misra y su grupo (1985)⁽²⁴⁾ también encuentran que los monocitos de los pacientes LL, pero no los de los pacientes TT, secretan factores capaces de inhibir la proliferación (y la síntesis de IL-2) de los linfocitos de individuos sanos lepromino-positivos o de pacientes con lepra TT, inducida por *M. leprae*. Contrariamente a Sathish, los autores encuentran que estos factores contienen IL-10 y PGE2, ambos reconocidos inhibidores de la síntesis de citocinas proinflamatorias.

Defectos en la expresión de receptores tipo Toll (TLRs)

Dentro de los múltiples receptores para PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos) presentes en los macrófagos y células dendríticas, los receptores TLR (Toll-like receptors) juegan un papel importante en el reconocimiento de microorganismos. Aunque existe una variedad de ellos (TLR1 a TLR11), TLR2, asociado a TLR1 o a CD14, se ha descubierto como un receptor implicado en la activación de macrófagos por *M. leprae*. Krutzik *et al.* (2003)⁽²⁵⁾ encontraron que los heterodímeros formados por TLR1-TLR2 son capaces de inducir la activación de macrófagos y células dendríticas por *M. leprae* muerto por calor, y que la expresión de TLR1 y TLR2 fue más marcada en las lesiones de la lepra tuberculoide (TT) que en las de la lepra lepromatosa (LL). Encontraron también que la activación de las células se incrementa por efecto de citocinas tipo Th1 y se abate por citocinas Th2; las citocinas de tipo Th1 incrementan la expresión de TLR1 mientras que las citocinas tipo Th2 deprimen la expresión de TLR2. Con estos datos los autores concluyen que la expresión regulada de TLRs en el sitio de la enfermedad contribuye a la defensa del hospedero contra el bacilo de la lepra. En otro estudio, Bochud *et al* (2003)⁽²⁶⁾ encontraron que los pacientes con lepra lepromatosa muestran una alta frecuencia de expresión de la variante TLR2Arg (677)Trp y que la presencia de este polimorfismo de TLR2 suprime, en los macrófagos, la activación de NFκB y la síntesis de TNFα en presencia de *M. leprae* y *M. tuberculosis*. Concluyen que esta variante de TLR2 constituye un mecanismo molecular por el cual se puede explicar la pobre respuesta celular característica de la lepra lepromatosa. Congruente con este hallazgo, otros investigadores encontraron que la mutación TLR2Arg (677)Trp está asociada con una baja expresión de IL-12 en los pacientes con lepra LL (Kang *et al.* 2002)⁽²⁷⁾. TNFα e IL-12 son dos citocinas proinflamatorias activadoras de células T mediadoras de la inmunidad celular.

Defectos en la presentación de antígeno

La proposición de que la anergia en la lepra lepromatosa podría deberse a una defectuosa presentación de antígeno por las APC, deriva de los trabajos de Desai *et al* en 1989⁽²⁸⁾. Estos autores, como lo habían hecho Sathish *et al* en 1983⁽²³⁾, encontraron que los macrófagos de los pacientes con lepra TT activados con IFN γ permitieron la proliferación de células T compatibles en HLA-D inducida por *M. leprae* y fueron capaces de destruir *in vitro* al microorganismo. También encontraron que aunque los macrófagos de los pacientes con lepra LL activados con IFN γ llegaron a ser microbicidas, estas células no favorecieron la linfoproliferación inducida por *M. leprae* de los linfocitos homólogos. Estos resultados sugirieron una defectuosa actividad presentadora de antígeno por los macrófagos de los pacientes LL pero no un defecto microbicida intrínseco en estas células.

Defectos en la expresión de CD40

Sabiendo que la interacción de CD40 sobre las células APC con su ligando CD40L sobre las células T es un potente estímulo para la producción de IL-12, y que ésta es una señal obligada para la producción de citocinas proinflamatorias, Yamauchi *et al* (2000)⁽²⁹⁾ estudiaron la expresión de la molécula CD40 y de su ligando CD40L en las células de las lesiones de la lepra tuberculoide y lepromatosa, y encontraron que tanto los mRNAs como las proteínas CD40 y CD40L se expresan predominantemente en las lesiones de la lepra TT y solo escasamente en las lesiones LL. Observaron además que la estimulación *in vitro* de las células mononucleares de sangre periférica con un sonicado de *M. leprae*, aumentó la expresión de CD40L, CD40 e IL-12, sólo en las células de los pacientes con lepra TT pero no en las células de los pacientes LL.

Los datos sugirieron que en la lepra tuberculoide, pero no en la lepra lepromatosa, *M. leprae* activa a las células T y las induce a expresar la molécula CD40L, evento que favorece en los macrófagos la síntesis de IL-12 dependiente de CD40. La interacción CD40-CD40L, la cual no se observa en la LL, es necesaria para la expresión de la inmunidad anti-micobacteriana.

Defectos en la expresión de B7-1 y CD28

Además de las señales de coestimulación derivadas del contacto entre CD40 y CD40L, la activación de las células T requiere de la interacción entre las moléculas B7-1 en las células presentadoras de antígeno y su receptor CD28 en las células T. La defectuosa respuesta inmunitaria en la lepra lepromatosa parece depender, en parte, de la insuficiente expresión de estas moléculas en las células de los pacientes. Lo anterior se sugiere de un estudio realizado por Agrewala *et al*, en 1998⁽³⁰⁾, quienes encontraron que la expresión de B7-1 y CD28 inducida por un sonicado de *M. leprae* estuvo significativamente disminuida en los leucocitos de los pacientes LL no tratados, mientras que la expresión de las moléculas

ICAM-1 y LFA-1 α se mostró aumentada. Por el contrario, no se observaron cambios significativos en la expresión de estas moléculas en los pacientes con lepra BT, ni en los pacientes LL exitosamente tratados. También encontraron, de manera sorprendente, que el cultivo de leucocitos de personas sanas con dosis elevadas del extracto de *M. leprae*, redujo la expresión de B7-1 y CD28, y aumentó la expresión de ICAM-1 y LFA-1 α . In vivo, la presencia de *M. leprae* en los pacientes no tratados podría promover la anergia celular, al inhibir la expresión de B7-1 y CD28 en las clonas de células reactivas a *M. leprae*.

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

Sullivan *et al* (1991)⁽³¹⁾ estudiaron la expresión de ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) y de su ligando LFA-1 en las lesiones de la lepra. Encontraron una alta expresión de ICAM-1 y LAF-1 en las células de la piel adyacente a los granulomas de la lepra tuberculoide y una baja expresión de estas moléculas en las lesiones de la lepra lepromatosa. Encontraron además que la expresión de ICAM-1 fue paralela a la expresión de los RNA mensajeros para IFN γ y TNF α . Sin embargo no encontraron diferencias en la expresión de estas moléculas en las células de los granulomas de los tipos de lepra a lo largo del espectro.

CITOCINAS

A principios de la década 1980-1990 los investigadores de la lepra comenzaron a buscar defectos en la producción de citocinas proinflamatorias por los leucocitos de los pacientes con lepra, particularmente en aquellos con lepra lepromatosa. El trabajo se realizó inicialmente en los leucocitos circulantes de la sangre periférica y luego se extendió a las lesiones de la lepra. Algunos de los hallazgos se describen enseguida:

Citocinas de macrófagos

Interleucina-1 (IL-1)

Watson *et al* (1984)⁽³²⁾ encontraron que los leucocitos de los pacientes con lepra TT secretaron niveles de IL-1 dentro del rango normal cuando fueron estimulados in vitro, con lipopolisacárido (LPS). Por el contrario, 5 de 13 pacientes con lepra lepromatosa (38%) no respondieron al mismo estímulo. Un resultado similar al anterior fue encontrado por Makonkawkeyoon *et al* en 1990⁽³³⁾; La producción de IL-1 en respuesta al estímulo con LPS estuvo significativamente disminuida en los pacientes LL/BL pero fue normal en los pacientes TT. Otros autores (Ridel *et al*, 1986)⁽³⁴⁾, sin embargo, no encontraron diferencias en la producción de IL-1 cuando los leucocitos de los pacientes TT o LL se estimularon con *M. leprae* o con BCG. Esto se observó también en el estudio realizado por Choi *et al* (1990)⁽³⁵⁾ con monocitos (MN) de sangre periférica; los MN de los pacientes con lepra TT

o con lepra LL, respondieron de manera similar cuando se estimularon con ML o con LPS. No obstante, mientras que los leucocitos de los pacientes TT proliferaron activamente en presencia de *M. leprae*, los leucocitos de los pacientes LL no lo hicieron, o lo hicieron pobremente. Lo que indican los resultados de Ridell y col, Choi y col, y otros, es que la incapacidad de los leucocitos de los pacientes LL de proliferar en respuesta a *M. leprae*, no se debe a un defecto en la producción de IL-1 por los monocitos de los pacientes, sino a algún defecto a otro nivel. Un resultado interesante de Fafutis-Morris *et al* (1999)⁽³⁶⁾ que concuerda con la observación de Ridell *et al* (1986)⁽³⁴⁾ que señalan que los niveles de IL-1 en el suero de los pacientes LL son comparables a los de los pacientes TT, es el hallazgo de que los pacientes LL muestran, en su suero, niveles elevados del receptor para IL-1 en estado soluble (sIL-1R), mientras que en los pacientes TT los niveles de sIL-1R son apenas detectables. Los niveles elevados de IL-1R en los pacientes LL podrían neutralizar a la IL-1, impidiendo así su efecto sobre las células T. Por su parte, Munk *et al* (1999)⁽³⁷⁾ encuentran niveles elevados de receptor soluble para TNF α (sTNF α R) en la sangre de los pacientes LL y sugieren que esto podría neutralizar al TNF α liberado por los macrófagos, bloqueando su acción sobre las células T.

Interleucina 12

Sobre la base de que las lesiones de la lepra TT tienen un predominio de células CD4⁺ y un patrón de citocinas tipo 1 (IL-2⁺, IFN γ ⁺) mientras que las lesiones de la lepra LL muestran un predominio de células CD8⁺ y citocinas tipo 2 (IL-4⁺, IL-10⁺, TGF β ⁺) Modlin, en 1994⁽³⁸⁾, propone que la anergia en la lepra lepromatosa pudiera deberse a un defecto en la expresión de IL-12, ya que esta citocina es un factor requerido para la expresión de las citocinas tipo 1 por las células T. Esta proposición recibe apoyo experimental en ese mismo año, cuando Sieling *et al* (1994)⁽³⁹⁾ encuentran que las lesiones de los pacientes con lepra tuberculoide expresan una cantidad 10 veces mayor de IL-12 que la encontrada en las lesiones de la lepra lepromatosa. Sieling *et al* también observan que *in vitro*, la IL-12 recombinante favorece la proliferación de las células T de los pacientes con lepra LL inducida con *M. leprae* así como la liberación de IFN γ por estas células. Sin embargo, contrario a estos hallazgos, Kim *et al* (2001)⁽⁴⁰⁾ encuentran que mientras que las células T de los pacientes TT responden bien cuando se estimulan con *M. leprae* en presencia de IL-12 exógena con la producción de IFN γ , las células T de los pacientes LL no lo hacen. Sus estudios inmunohistoquímicos ofrecen una explicación a estos resultados al observar que las lesiones TT expresan una mayor cantidad de la cadena beta-2 del receptor para IL-12 (IL-12R β 2) que las lesiones LL, aunque ambas lesiones expresan niveles comparables de la cadena beta-1 (IL-12R β 1). El receptor para IL-12 está constituido por un heterodímero formado por las cadenas IL-12R β 1 e IL-12R β 2, y la presencia del heterodímero completo es necesaria para que se produzcan las señales de transducción que culminan con la síntesis y secreción de IFN γ por las células T (Figura sobre IL-12R). Los resultados contradictorios en cuanto el efecto de la IL-12 sobre la producción de IFN γ inducida por *M. le-*

prae, son difíciles de interpretar, pero la variable más importante en cada caso, es el origen de los pacientes.

Citocinas de linfocitos

Interleucina 2

Algunos autores sugieren que anergia celular en los pacientes con lepra lepromatosa pudiera deberse a la falta de producción de IL-2 por los linfocitos de los pacientes. Haregewoin *et al* (1984)⁽⁴¹⁾, por ejemplo, encontraron que los linfocitos de los pacientes con lepra LL no secretan IL-2 cuando se estimulan *in vitro* con *M. leprae*, aunque sí lo hacen en respuesta a otros antígenos. Observaron además, que la adición de IL-2 exógena es capaz de revertir el defecto de los leucocitos en la mayoría de los casos, y propusieron que la anergia celular hacia *M. leprae* podría deberse a una falla en la producción de IL-2 en estos pacientes. A una conclusión similar llegaron Nogueira *et al* en 1983⁽⁴²⁾ (ver interferón gamma), y más recientemente Makonkawkeyoon *et al* (1990)⁽³³⁾ quienes encontraron que los leucocitos de los pacientes con lepra LL producen niveles normales de IL-2 en respuesta al estímulo con Con-A o PHA, pero muestran respuestas disminuidas cuando se estimulan con PPD. La falta de producción de IL-2 en los pacientes lepromatosos, sin embargo, no es un consenso general ya que otros autores como Kaplan y Cohn (1985)⁽¹⁰⁾ y Mohaghehpour *et al* (1985)⁽⁴³⁾ encuentran que la adición de IL-2 exógena no revierte la incapacidad de los leucocitos de los pacientes LL para proliferar en respuesta a *M. leprae*. Mohaghehpour *et al* encuentran además, que los leucocitos de los pacientes LL no expresan niveles significativos del receptor para esta citocina (IL-2R), y proponen que la deficiente expresión del receptor IL-2R, podría explicar tanto la falta de proliferación en respuesta a *M. leprae*, como la falla de la IL-2 exógena para reconstituir la respuesta *in vitro*.

Interferón gamma.

Uno de los primeros estudios sobre la producción de IFN γ en la lepra, es el publicado por Nogueira *et al* en 1983⁽⁴²⁾. Estos autores encontraron que en 17 de 18 casos, los leucocitos de los pacientes con lepra LL/BL no secretaron interferón gamma (IFN γ) cuando se estimularon con *M. leprae*, aunque produjeron niveles disminuidos de esta citocina en respuesta a la Con-A. En contraste, los leucocitos de 6 de 6 pacientes con lepra tuberculoide, produjeron niveles elevados de IFN γ bajo las mismas condiciones. También encontraron que la adición de IL-2 exógena, junto con *M. leprae*, restauró la capacidad de los leucocitos de los pacientes LL/BL para producir IFN γ ; como Haregewoin *et al* (1984)⁽⁴¹⁾, Nogueira *et al* propusieron que la anergia a *M. leprae* podría deberse a un defecto en la producción de IL-2.

La falta de producción de citocinas activadoras de monocitos por los linfocitos de los pacientes LL estimulados con *M. leprae* o con Con-A ha sido observada por

diversos autores, quienes también han encontrado que los linfocitos de los pacientes con lepra TT o BT sí responden al estímulo con *M. leprae* o Con-A, produciendo altos niveles de citocinas activadoras de monocitos (Horwitz *et al*, 1984)⁽⁴⁴⁾.

Podemos concluir que, en general, el estudio inmunohistoquímico de citocinas en las lesiones de la lepra ha dado resultados comparables entre todos los grupos de investigación participantes y que el patrón de citocinas depende del tipo de lepra estudiado. Las lesiones de los pacientes con lepra tuberculoide expresan niveles elevados de IL-1 β , TNF α , IFN γ e IL-2 (citocinas pro-inflamatorias) en tanto que las lesiones de los pacientes lepromatosos muestran una marcada reducción en los niveles de estas citocinas al mismo tiempo que expresan niveles elevados de las citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-6, IL-10 y TGF β (Arnoldi *et al*, 1990)⁽⁴⁵⁾, lo que sugiere una activación diferencial de las células Th1 en la lepra tuberculoide y Th2 en la lepra lepromatosa. Los factores que determinan esta polarización de la respuesta inmunitaria permanecen por ser dilucidados.

Expresión de genes para citocinas pro- y anti-inflamatorias

Básicamente los mismos resultados señalados hasta ahora en cuanto a la producción y secreción de citocinas en las distintas formas de la lepra, se han encontrado al nivel de la expresión de los RNA mensajeros (mRNAs) para esas citocinas. Dos estudios ilustran particularmente este punto. Por un lado, el grupo de Modlin (Yamamura *et al*, 1991)⁽⁴⁶⁾ analiza el mRNA extraído de las lesiones de pacientes con las diferentes formas de la lepra y encuentra que en las lesiones de los pacientes con la forma resistente de la enfermedad (TT/BT) predomina la expresión de los mRNAs para IL-2 y para IFN γ , mientras que en la forma susceptible (LL/BL) predominan los mRNAs para IL-4, IL-5 e IL-10. En otra publicación, este mismo grupo encuentra que los mRNAs para las citocinas proinflamatorias IL-2 e IFN γ , además de TNF α e IL-1, se sobre-expresan en las lesiones de la reacción reversa, una complicación de la lepra paucibacilar (TT/BT), mientras que los mRNAs para las citocinas anti-inflamatorias (IL-4, IL-6, IL-5 e IL-10) se sobre-expresan en las lesiones reaccionales (eritema nudoso leproso) de la lepra multibacilar (LL/BL) (Yamamura *et al*, 1992)⁽⁴⁷⁾.

PARTICIPACIÓN DE OTRAS CÉLULAS EN LA ANERGIA CELULAR

Prácticamente todo el trabajo comentado anteriormente se refiere al estudio de la función de los macrófagos y las células Th1 (CD4⁺) tratando de encontrar carencias o deficiencias en estas células que pudieran explicar la anergia de la lepra multibacilar. Sin embargo, y no obstante las múltiples alteraciones encontradas en las células de los pacientes multibacilares, también cabe la posibilidad de que la función de estas células sea intrínsecamente normal pero que su expresión pudiera verse alterada por la actividad de otras células con función reguladora estimuladas de manera preferencial o excesiva por algunos antígenos de *Mycobacterium leprae*. Dentro de las células T con función reguladora descritas a la fecha

están las células TCD4⁺CD25⁺, las TCD8⁺CD28⁻, las T NK1.1 (CD4⁻CD8⁻), las Tr1 (CD4⁺), y las células Th3 (CD4⁺). La mayoría de estas células ejercen su acción reguladora a través de la abundante secreción de las citocinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10 y TGFβ. La participación de estas células en la patología de la lepra es un aspecto que no se ha explorado a profundidad.

Lo que sí se ha analizado es la actividad de otras células mediadoras de la inmunidad antibacteriana distintas a las células Th1 clásicas que incluyen a las células NK, a las células Tγδ y a las células CD4⁺ restringidas por CD1.

Las células NK

La participación de estas células en la inmunología de la lepra se ha estudiado por varios grupos de investigadores, con resultados contradictorios. Chiplunkar *et al* (1990)⁽⁴⁸⁾ por ejemplo, estudiaron la actividad citolítica y la actividad citotóxica dependiente de anticuerpo (ADCC) de las células NK obtenidas de la sangre periférica de pacientes con lepra lepromatosa no tratada, de pacientes con lepra tuberculoide, y de personas sanas. Encontraron que el porcentaje promedio de citotoxicidad mediada por NK estuvo disminuida en los pacientes LL (15 ± 3%), en comparación con los pacientes TT (39±4%) y los controles sanos (37±5%). También encontraron que el defecto de las células NK en los pacientes LL no era intrínseco ya que pudo revertirse por la adición de IL-2 e IFNγ exógenos en 5 de 6 pacientes LL. Este hallazgo estuvo parcialmente en concordancia con el publicado por Converse y Bjune en 1986⁽⁴⁹⁾, quienes habían encontrado una disminuida actividad NK en la sangre periférica no solo de los pacientes LL sino también de los pacientes con lepra BT no reaccionales. Además, Converse y Bjune observaron, interesantemente, que la actividad citotóxica (NK) de las células de sangre periférica de los pacientes BT se incrementaba a valores normales durante los episodios de reacción reversa. Esta observación, y la de Chiplunkar *et al* (1990)⁽⁴⁸⁾, sobre el incremento en la actividad NK por efecto de la adición de IL-2 e IFNγ, refuerzan el conocimiento que la reacción reversa ocurre concomitantemente al aumento en la concentración de citocinas proinflamatorias en el sitio de reacción. Pero el hallazgo de una disminuida actividad en LL no fue una observación de consenso ya que otros investigadores (Humphres *et al*, 1982)⁽⁵⁰⁾ no encontraron alteraciones en la actividad NK en la sangre periférica de los pacientes LL o BT, pero observaron que la actividad NK en los pacientes con LL disminuía hasta abolirse en los pacientes LL en reacción leprosa tipo eritema nodoso leproso (ENL) donde predomina un ambiente tipo Th2.

Las células NKT

Sobre el papel de las células NKT1.1. en la lepra prácticamente no hay información. En un estudio realizado por Mempel *et al* (2000)⁽⁵¹⁾, los autores encuentran que estas células tienen alta expresión en las lesiones de la lepra tuberculoide pero no hacen referencia a su expresión en la lepra lepromatosa.

Las células T $\gamma\delta$

Más del 95% de las células T exhiben el receptor TCR $\alpha\beta$ y las restantes (3-5%), el receptor TCR $\gamma\delta$. Ya hemos mencionado que estas células parecen jugar un papel protector preponderante en las enfermedades causadas por micobacterias. En la tuberculosis, por ejemplo, las células T $\gamma\delta$ se expanden considerablemente durante la fase aguda de la enfermedad como resultado de su interacción con antígenos micobacterianos fosforilados de bajo peso molecular (Schoel *et al*, 1994; Tsukaguchi *et al*, 1995)^(52, 53). Al activarse, las células T $\gamma\delta$ liberan citocinas pro-inflamatorias (IFN γ , GMCSF, IL-3, and TNF α) que proveen al huésped de inmunidad protectora adicional (Barnes *et al*, 1992)⁽⁵⁴⁾. En la lepra también se han hecho observaciones que sugieren un papel protector de las células T $\gamma\delta$: la piel de los pacientes con lepra BL contiene un mayor número de células T $\gamma\delta$ que la piel de los pacientes LL (Fujita *et al*, 1993a)⁽⁵⁵⁾; los pacientes TT contienen un mayor número de precursores T $\gamma\delta$ circulantes que los pacientes LL (Barnes *et al*, 1992)⁽⁵⁴⁾; la estimulación de las células mononucleares de la sangre con antígenos micobacterianos incrementa el número de células T $\gamma\delta$ más en los pacientes TT (32%) que en los pacientes LL (9%) (Barnes *et al*, 1992; González-Amaro *et al*, 2000)^(54, 56); las intradermorreacciones tempranas (2 días) a la lepromina en los pacientes BL contienen números bajos de células T $\gamma\delta$ (\pm .4%) que se incrementan más de 3 veces (a \pm 16%) en el tiempo de máxima reactividad en piel (21 días) (Uyemura *et al* 1992; Fujita *et al*, 1993b; Modlin *et al*, 1989)^(57, 58, 59). Siendo las células T $\gamma\delta$ mediadoras de inmunidad protectora, su carencia o disfunción puede contribuir a la anergia observada en los pacientes lepromatosos.

Las células T restringidas por CD1

Las células T CD4⁺ restringidas por CD1, reconocen antígenos lipídicos presentados por las células presentadoras de antígeno (principalmente células dendríticas) en asociación con moléculas CD1. Las moléculas CD1 (a, b y c) se expresan marcadamente en las lesiones de la lepra TT y escasamente en las lesiones de la lepra LL, correlacionando así con la inmunidad protectora. Como en la sangre de ambos grupos de pacientes se encuentran números equivalentes de los precursores de estas células, se ha sugerido que la ausencia de expresión de CD1 en las lesiones de la lepra LL se debe más al efecto de factores locales en el sitio de infección que a defectos en el sistema CD1 en sí (Sieling *et al*, 1999)⁽⁶⁰⁾.

Células de Langerhans y Células dendríticas

Por su localización epidérmica, se ha pensado que las células de Langerhans y las dendríticas, podrían jugar un papel particularmente importante en la protección contra la lepra. Por un lado, la piel es una de las vías de entrada de *M. leprae* y por el otro, el bacilo tiene un marcado tropismo por este órgano. Sobre esta base, algunos autores han medido la cantidad de células de Langerhans (LC)

presentes en la piel de los enfermos con lepra lepromatosa (LL) y en la piel de los enfermos con lepra tuberculoide (TT). Mathur *et al* (1983)⁽⁶¹⁾, por ejemplo, contaron las células de Langerhans (OKT6+) contenidas en las lesiones de 44 pacientes con diferentes tipos de lepra y en 12 controles sanos. Observaron una significativa reducción en el número de LC en los pacientes LL ($253 \pm 136/\text{mm}^2$) y en los pacientes BL (349 ± 121), mientras que en los pacientes TT y BT las cuentas fueron altas (854 ± 332 y 715 ± 235 , respectivamente) y comparables a las encontradas en los controles sanos (927 ± 103). Seis años más tarde, Giménez *et al* (1989)⁽⁶²⁾ confirmaron estos resultados al encontrar que comparados con los pacientes tuberculoideos (993 ± 206), los pacientes LL mostraron una reducción muy significativa en el número de LC (398 ± 186) mientras que los controles sanos mostraron números intermedios de estas células (632 ± 138). Concluyeron que el bajo número de LC podría alterar la adecuada presentación de antígenos y promover la generación de tolerancia contra el microorganismo.

Aunque lo expuesto aquí no cubre todos los estudios relativos a las anomalías en los mecanismos inmunológicos en la lepra, la información contenida nos da una idea de lo complejo que es este campo y lo difícil que es identificar un defecto fundamental. El origen de la anergia en lepra es claramente multifactorial y depende no solo de las características inherentes del hospedero, sino también de los cambios tisulares promovidos por la infección y dependientes de la fisiología y metabolismo de *Mycobacterium leprae*. Es claro, por estas y otras razones, que la lepra sigue siendo un tema de interés actual no solo desde el punto de vista de la enfermedad en sí, sino también en cuanto al agente etiológico y a la relación que éste establece con su huésped para producir o no enfermedad y para generar inmunidad o anergia. Estos aspectos son revisados por Grange y Lethaby (2004)⁽⁶³⁾ y Scollard *et al* (2006)⁽⁶⁴⁾, entre otros autores.

RECONOCIMIENTOS

O. Rojas-Espinosa es becario de la Comisión de Operación y Fomento de las Actividades Académicas del IPN (COFAA-SIBE-IPN), del Sistema de Becas al Desempeño en Investigación del IPN (BDI-IPN), y del Sistema Nacional de Investigadores del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (SNI-CONACyT), México. Este artículo es un producto del proyecto de Investigación CGPI: 20060318.

REFERENCIAS

1. World Health Organization (Geneva). *Weekly epidemiological record* No. 32, 81, 309-316: 2006 (<http://www.who.int/wer>).
2. Canonne-Hergaux F, Gruenheid S, Govoni G, Gros P: The Nrap-1 protein and its role in resistance to infection and macrophage function. *Proc Assoc Am Physicians*, 1999; **111**: 283-289.
3. van Eden W, de Vries RR, Mehra NK *et al.*: HLA segregation of tuberculoid leprosy: confirmation of the DR2 marker. *J Infect Dis*, 1980; **141**: 693-701.

4. van Eden W, González NM, de Vries RR, *et al.*: HLA-linked control of predisposition to lepromatous leprosy. *J Infect Dis*, 1985; **151**: 9-14.
5. Todd JR, West BC, McDonald JC: Human leukocyte antigen and leprosy: study in northern Louisiana and review. *Rev Infect Dis*, 1990; **12**: 63-74.
6. Forbes JR, Gros P: Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol*, 2001; **9/8**: 397-403.
7. Mulero V, Searle S, Blackwell JM, Brock JH: Solute carrier 11a1 (Slc11a1; formerly Nramp1) regulates metabolism and release of iron acquired by phagocytic, but not transferrin-receptor-mediated, iron uptake. *Biochem J*, 2002; **363**: 89-94.
8. Alter-Koltunoff M, Ehrich S, Dror N *et al.*: Nramp1-mediated innate resistance to intraphagosomal pathogens is regulated by IRF-8, PU.1, and Miz-1. *J Biol Chem*, 2003; **278**: 44025-44032.
9. Hastings RC: Leprosy. Churchill Livingstone, Edinburgh, New York, 1985.
10. Kaplan G, Cohn ZA: Cellular immunity in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Immunol Lett*, 1985; **11**: 205-209.
11. Nath I, Curtis J, Sharma AK, Talwar GP: Circulating T-cell numbers and their mitogenic potential in leprosy-correlation with mycobacterial load. *Clin Exp Immunol*, 1977; **29**: 393-400.
12. Mehra V, Mason LH, Fields JP, Bloom BR: Lepromin-induced suppressor cells in patients with leprosy. *J Immunol*, 1979; **123**: 1813-1817.
13. Nath I, Narayanan RB, Mehra NK *et al.*: Concanavalin A induced suppressor activity in human leprosy. *J Clin Lab Immunol*, 1979; **2**: 319-324.
14. Bjune G: In vitro lymphocyte stimulation in leprosy; simultaneous stimulation with *Mycobacterium leprae* antigens and phytohaemagglutinin. *Clin Exp Immunol*, 1979; **36**: 479-87.
15. Nath I, Singh R: The suppressive effect of *M. leprae* on the in vitro proliferative responses of lymphocytes from patients with leprosy. *Clin Exp Immunol*, 1980; **41**: 406-414.
16. van Voorhis WC, Kaplan G, Sarno EN *et al.*: The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. *N Engl J Med*, 1982; **307**: 1593-1597.
17. Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH: T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol*, 1983; **8**: 182-189.
18. Modlin RL, Kato H, Mehra V *et al.*: Genetically restricted suppressor T-cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. *Nature*, 1986a; **322**: 459-461.
19. Modlin RL, Mehra V, Wong L *et al.*: Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin. *J Immunol*, 1986b; **137**: 2831-2834.
20. Ottenhoff TH, Elferink DG, Klatser PR, de Vries RR: Cloned suppressor T cells from a lepromatous leprosy patient suppress *Mycobacterium leprae*-reactive helper T cells. *Nature*, 1986; **322**: 462-464.
21. Nath I, Van Rood JJ, Mehra NK, Vaidya MC: Natural suppressor cells in human leprosy: the role of HLA-D-identical peripheral lymphocytes and

- macrophages in the in vitro modulation of lymphoproliferative responses. *Clin Exp Immunol*, 1980; **42**: 203-210.
22. Salgame PR, Madhadevan PR, Antia NH: Mechanism of immunosuppression in leprosy: presence of suppressor factor(s) from macrophages of lepromatous patients. *Infect Immun*, 1983; **40**: 1119-1126.
 23. Sathish M, Bhutani LK, Sharma AK, Nath I: Monocyte derived soluble suppressor factor(s) in patients with lepromatous leprosy. *Infect Immun*, 1983; **42**: 890-899.
 24. Misra N, Selvakumar M, Singh S *et al.*: Monocyte derived IL-10 and PGE2 are associated with the absence of Th1 cells and in vitro T cell suppression in lepromatous leprosy. *Immunol Lett*. 1995; **48**, **123-128**.
 25. Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA *et al.*: Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med*, 2003; **9**: 525-532.
 26. Bochud PY, Hawn TR, Aderem A: Cutting edge: a Toll-like receptor 2 polymorphism that is associated with lepromatous leprosy is unable to mediate mycobacterial signalling. *J Immunol*, 2003; **170**: 3451-3454.
 27. Kang T, Lee SB, Chae GT: A polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with IL-12 production from monocyte in lepromatous leprosy. *Cytokine*, 2002; **20**: 56-62.
 28. Desai SD, Birdi TJ, Antia NH. Correlation between macrophage activation and bactericidal function and *Mycobacterium leprae* presentation in macrophages of leprosy patients and normal individuals. *Infect Immun*, 1989; **57**: 1311-1317.
 29. Yamauchi PS, Bleharski JR, Uyemura K, *et al.*: A role for CD40-CD40 ligand interactions in the generation of type 1 cytokine responses in human leprosy. *J Immunol*, 2000; **165**: 1506-1512.
 30. Agrewala JN, Kumar B, Vohra H: Potential role of B7-1 and CD28 molecules in immunosuppression in leprosy. *Clin Exp Immunol*, 1998; **111**: 56-63.
 31. Sullivan L, Sano S, Pirmez C *et al.*: Expression of adhesion molecules in leprosy lesions. *Infect Immun*, 1991; **59**: 4154-4160.
 32. Watson S, Bullock W, Nelson K *et al.*: Interleukin 1 production by peripheral blood mononuclear cells from leprosy patients. *Infect Immun*, 1984; **45**: 787-789.
 33. Makonkawkeyoon S, Kasinrerak W, Supajatura V *et al.*: Immunological defects in leprosy patients. II. Interleukin 1, interleukin 2, and interferon production in leprosy patients. *Int J Lepr*, 1990; **58**: 311-318.
 34. Ridell PR, Jamet P, Robin Y, Bach MA: Interleukin-1 released by blood-monocyte-derived macrophages from patients with leprosy. *Infect Immun*, 1986; **52**: 303-308.
 35. Choi IH, Shin JS, Park SK, *et al.*: Interleukin-1b production by monocytes from leprosy patients. *Yonsei Med J*. 1990; **31**, **301-307**.
 36. Fafutis-Morris M, Guillen-Vargas CM, Navarro-Fierro S, *et al.*: Serum IL-1ra is elevated in lepromatous leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1999; **67**: 287-291.

37. Munk ME, Anding P, Schettini AP, *et al.*: Soluble tumor necrosis factor alpha receptors in sera from leprosy patients. *Infect Immun*, 1999; **67**: 423-425.
38. Modlin RL: Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol*, 1994; **102**: 828-832.
39. Sieling PA, Wang XH, Gately MK, *et al.*: IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious diseases. *J Immunol*, 1994; **153**: 3639-3647.
40. Kim J, Uyemura K, Van Dyke MK, *et al.*: A role for IL-12 receptor expression and signal transduction in host defense in leprosy. *J Immunol*, 167, 2001; **167**, 779-786.
41. Haregewoin A, Mustafa AS, Helle I, *et al.*: Reversal by interleukin-2 of the T cell unresponsiveness of lepromatous leprosy to *Mycobacterium leprae*. *Immunol Rev*, 1984; **80**, 77-86.
42. Nogueira N, Kaplan G, Levy E, *et al.*: Defective gamma interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin 2. *J Exp Med*, 1983; **158**: 2165-2170.
43. Mohagheghpour N, Gelber RH, Larrick JW, *et al.* Defective cell-mediated immunity in leprosy: failure of T cells from lepromatous leprosy patients to respond to *Mycobacterium leprae* is associated with defective expression of interleukin 2 receptors and is not reconstituted by interleukin 2. *J Immunol*, 1985; **135**: 1443-1449.
44. Horwitz MA, Levis WR, Cohn ZA: Defective production of monocyte-activating cytokines in lepromatous leprosy. *J Exp Med*, 1984; **159**: 666-678.
45. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol*, 1990; **137**: 749-753.
46. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, *et al.*: Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science*, 1991; **254**: 277-279.
47. Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, *et al.*: Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol*, 1992; **149**: 1470-1475.
48. Chiplunkar SV, Deshmukh MV, Samson PD, *et al.*: Natural killer cell-mediated and antibody-dependent cellular cytotoxicity in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1990; **58**: 334-341.
49. Converse PJ, Bjune G: Natural killer (NK) cell activity and reversal reaction in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1986; **54**: 503-509.
50. Humphres RC, Gelber RH, Krahenbuhl JL: Suppressed natural killer cell activity during episodes of erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol*, 1982; **49**: 500-508.
51. Mempel M, Flageul B, Suárez F, *et al.*: Comparison of the T cell patterns in leprosy and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire. *Amer J Pathol*, 2000; **157**: 509-523.
52. Schoel B, Sprenger S, Kaufmann SH. Phosphate is essential for stimulation of V gamma 9V delta 2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand. *Eur J Immunol*, 1994; **24**: 1886-1892.

53. Tsukaguchi K, Balaji KN, Boom WH: CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J Immunol*, 1995 ; **154**: 1786-1796.
54. Barnes PF, Grisso CL, Abrams JS, *et al.*: Gamma delta T lymphocytes in human tuberculosis. *J Infect Dis*, 1992; **165**: 506-512.
55. Fujita M, Miyachi Y, Nakata K, Imamura S: Appearance of gamma delta T cell receptor-positive cells following alpha beta T cell receptor-positive cells in the lepromin reaction of human skin. *Immunol Lett*, 1993a; **35**: 39-44.
56. González-Amaro R, Portales-Pérez DP, Baranda L, *et al.*: Co-stimulatory signals increase the reactivity of gammadelta T cells towards mycobacterial antigens. *Clin exp. Immunol*, 2000; **120**: 468-475.
57. Uyemura K, Ho CT, Ohmen JD, *et al.*: Selective expansion of V delta 1+ T cells from leprosy skin lesions. *J Invest Dermatol*, 1992; **99**: 848-852.
58. Fujita M, Miyachi Y, Nakata K, Imamura S: Gamma delta T-cell receptor-positive cells in human skin. I. Incidence and V-region gene expression in granulomatous skin lesions. *J Am Acad Dermatol*, 1993b; **28**: 46-50.
59. Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, *et al.*: Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature*, 1989; **339**: 544-548.
60. Sieling PA, Jullien D, Dahlem M, *et al.*: CD1 expression by dendritic cells in human leprosy lesions: correlation with effective host immunity. *J Immunol*, 1999; **162**: 1851-1858.
61. Mathur NK, Mangal HN, Mathur D, *et al.*: Langerhans cell and leprosy. *Lepr India*, 1983; **55**: 22-8.
62. Gimenez MF, Gigli I, Tausk FA: Differential expression of Langerhans cells in the epidermis of patients with leprosy. *Br J Dermatol*, 1989; **121**: 19-26.
63. Grange JM, Lethaby JI: Leprosy of the past and today. *Semin Respir Crit Care Med*, 2004; **25**: 271-281.
64. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, *et al.*: The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*, 2006; **19**: 338-381.

EL ML FLOW TEST COMO TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO INMEDIATO PARA PROGRAMAS DE CONTROL DE LA LEPRO: POSIBLE IMPACTO SOBRE LA CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES

Samira Bühner-Sékula*, Jan Visschedijk*, Maria Aparecida F. Grossi**, Krishna P. Dhakal***, Abdullahi U. Namadi +, Paul R. Klatser* & Linda Oskam*

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la utilidad de la técnica ML Flow como un instrumento adicional, de tipo serológico, para la clasificación de los nuevos pacientes de lepra.

Método: Se clasificaron en Brasil, Nepal y Nigeria, 2.632 pacientes de lepra mediante tres métodos: (1) como pacientes multibacilares (MB) o paucibacilares (PB) de acuerdo al número de lesiones (clasificación OMS), (2) mediante la baciloscopia y (3) con serología utilizando el ML Flow Test que detecta anticuerpos IgM específicos frente al *Mycobacterium leprae*-PGL-1.

Resultados: La proporción de pacientes MB era del 39.5, 35.6 y 19.4 % en Brasil, Nepal y Nigeria, respectivamente. La seropositividad mayor fue observada en los pacientes de Nigeria (62.9 %), seguido por Brasil (50.8 %) y Nepal (35.6 %). Los resultados del ML Flow Test y baciloscopia resultaron negativos en el 69.1 y 82.7 % de los pacientes PB, mientras que fueron positivos en el 58.6 % de los pacientes MB de Brasil y 28.3 % de Nepal. En los pacientes MB, tanto los frotis como el ML Flow Test resultaron negativos en el 15.6% de los pacientes de Brasil y 38.3 % en Nepal. La evaluación de todos los pacientes PB con el ML Flow para prevenir un posible sub-tratamiento podría incrementar el grupo MB un 18, 11 y 46.2 % para Brasil, Nepal y Nigeria, respectivamente. Con el ML Flow Test como único criterio para la clasificación, el incremento resultante sería del 11.3 y 43.5 % de pacientes que requerirían tratamiento para la lepra MB en Brasil y Nigeria, respectivamente y una disminución del 3.7 % en Nepal.

Conclusiones: El test ML Flow puede ser útil para mejorar la clasificación, reducir el riesgo de sub-tratamiento con el consiguiente fracaso terapéutico y minimizar la necesidad de frotis cutáneos.

* KIT (Royal Tropical Institute), KIT Biomedical Research, Amsterdam, The Netherlands.

** Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*** Netherlands Leprosy Relief (NLR), Biratnagar, Nepal.

+ Netherlands Leprosy Relief (NLR), Jos, Nigeria.

Correspondencia a: S. Bühner-Sékula (Tel: +31 20 5665449; Fax: +31 20 6971841; e-mail: samira@buhner.net y l.oskam@kit.nl).

Este trabajo es una reproducción de *Lepr Rev* 2007; 78(1):70-79.

SUMMARY

Objective: To evaluate the use of the ML Flow test as an additional, serological, tool for the classification of new leprosy patients.

Design: In Brazil, Nepal and Nigeria, 2632 leprosy patients were classified by three methods: (1) as multibacillary (MB) or paucibacillary (PB) according to the number of lesions (WHO classification), (2) by slit skin smear examination, and (3) by serology using the ML Flow test detecting IgM antibodies to *Mycobacterium leprae*-specific phenolic glycolipid-I.

Results: The proportion of MB leprosy patients was 39.5, 35.6 and 19.4 % in Brazil, Nepal and Nigeria, respectively. The highest seropositivity in patients was observed in Nigeria (62.9 %), followed by Brazil (50.8 %) and Nepal (35.6%). ML Flow test results and smears were negative in 69.1 and 82.7 % of PB patients, while smears were positive in 58.6 % of MB patients in Brazil and 28.3 % in Nepal. In MB patients, both smears and ML Flow tests were negative in 15.6 % in Brazil and 38.3 %, in Nepal. Testing all PB patients with the ML Flow test to prevent under-treatment would increase the MB group by 18, 11 and 46.2 % for Brazil, Nepal and Nigeria, respectively. Using the ML Flow test as the sole criterion for classification would result in an increase of 11.3 and 43.5 % of patients requiring treatment for MB leprosy in Brazil and Nigeria, respectively, and a decrease of 3.7 % for Nepal.

Conclusions: The ML Flow test could be used to strengthen classification, reduce the risk of under-treatment and minimize the need for slit skin smears.

INTRODUCCIÓN

Debido al largo período de incubación y al mismo tiempo insidiosa transmisión de la lepra, los esfuerzos para reducir y eventualmente eliminar la enfermedad requieren planificaciones y compromisos a largo plazo. Los programas de control de la lepra están siendo integrados en el sistema sanitario general y uno de sus mayores desafíos es conseguir mantener unos cuidados sostenibles y de calidad para los pacientes de lepra.⁽¹⁾ Para prevenir deformidades e interrumpir la transmisión, los programas de control se concentran en el diagnóstico precoz y tratamiento farmacológico efectivo de los pacientes. Por tanto, el diagnóstico y la clasificación son importantes y disponer de instrumentos sencillos para ayudar al diagnóstico y clasificación de los pacientes sería muy deseable.

El diagnóstico de la lepra se basa en una o más de las siguientes características: lesiones hipopigmentadas o eritematosas con pérdida de la sensibilidad, engrosamiento de los nervios periféricos con o sin pérdida de la sensibilidad o baciloscopia positiva para bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR). Para administrar tratamiento farmacológico se clasifican los pacientes en: los que presentan cinco o menos lesiones y reciben multiterapia (MDT) para paucibacilares (PB) y los que presentan seis o más lesiones y se les administra MDT para multibacilares (MB)⁽²⁾.

Un sistema de clasificación basado solamente en el número de lesiones cutáneas está potencialmente expuesto a obviar casos de lepra y de lepra MB en

particular. En los casos MB en estado precoz, las lesiones cutáneas frecuentemente son escasas, difíciles de observar o incluso no visibles. El punto débil del sistema de clasificación solamente clínico es que los casos frotis positivo con pocas lesiones serán mal clasificados como PB y no recibirán el tratamiento adecuado⁽³⁾ con el consiguiente riesgo de recidivas. Determinar la carga bacilar mediante frotis cutáneos incrementa considerablemente la fiabilidad de la clasificación⁽⁴⁾, pero frecuentemente no está disponible en las zonas donde hay más incidencia de lepra.

Diversos estudios han demostrado que la prevalencia de anticuerpos IgM glicolípido-I (PGL-I) *Mycobacterium leprae*-específico se correlaciona con la carga bacteriana del paciente de lepra: 15-40 % de pacientes PB son seropositivos, comparado con el 80-100 % de los pacientes MB⁽⁵⁾. Por tanto la detección de estos anticuerpos puede ser un método alternativo útil para la clasificación de las distintas formas de lepra.

El test ML Flow es una prueba inmunocromatográfica en placa, sencilla y rápida para la detección de IgM frente al PGL-I. Es una prueba de diagnóstico inmediato; una técnica que se puede realizar cuando se diagnostica al paciente sin necesidad de tener que desplazarse a un laboratorio especializado o regresar para recoger sus resultados. El test permite su implementación de la técnica serológica en los programas de control para lepra. En una evaluación anterior con un grupo bien caracterizado de pacientes, el test ML Flow clasificó correctamente a pacientes MB con una sensibilidad del 97.4 % mediante una combinación de síntomas clínicos, positividad de frotis e histopatología como estándar de oro⁽⁶⁾.

Hemos estudiado la implementación del test ML Flow en los programas de control de la lepra en tres países, Brasil, Nepal y Nigeria,⁽⁷⁾ y se ha evaluado su aceptación y fiabilidad como: (1) un instrumento adicional y sencillo para la clasificación de los nuevos pacientes de lepra y (2) como instrumento para identificar los contactos de pacientes de lepra en mayor riesgo de desarrollar la enfermedad en el futuro. Un sistema de clasificación que incluye el ML Flow puede afectar la distribución de los pacientes clasificados anteriormente como PB y MB.

MATERIALES Y MÉTODOS

ÁREAS DE ESTUDIO

El trabajo se llevó a cabo entre octubre del 2002 y marzo del 2004 en Brasil y Nepal y desde noviembre 2002 a abril 2004 en Nigeria. Los programas del control de la lepra en que hemos intervenido están muy bien constituidos y tienen una constante supervisión. Participaron cuarenta y nueve centros sanitarios: 14 (8 centros sanitarios, 4 hospitales y 2 centros de referencia) en Brasil, 7 (4 centros sanitarios, 2 hospitales y 1 centro de referencia) en Nepal y 28 (23 centros sanitarios y 5 hospitales) en Nigeria. Durante el período de 1999-2003, el promedio de detección de nuevos casos fue del 6.2, 16.2 y 1.9 por 10,000 habitantes y el promedio de porcentaje de pacientes tratados como MB fue del 71, 44 y 96 % para los centros mencionados de Brasil, Nepal y Nigeria, respectivamente.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

Durante el periodo de estudio los pacientes recién diagnosticados fueron animados a participar. Todos ellos dieron su consentimiento por escrito. Se incluyeron un total de 2.632 pacientes de lepra en el estudio: 1.070 de Brasil, 1.066 de Nepal y 186 de Nigeria. En Nepal, sólo se incluyeron pacientes del centro de referencia en el análisis final porque sólo este centro efectúa baciloscopias. No había diferencias entre las características demográficas y clínicas entre estos pacientes y los pacientes de otros centros (datos no presentados).

DEFINICIÓN DE CASO/CRITERIOS DE CLASIFICACIÓN

En los tres países, la clasificación estuvo basada en las lesiones cutáneas compatibles con lepra, con pérdida de sensibilidad con o sin engrosamiento neural. En Brasil y Nepal, el diagnóstico de lepra fue confirmado por el servicio médico.

En Brasil y el centro de referencia de Nepal, la presencia de BAAR en los frotis cutáneos también contribuyó a la clasificación. El criterio para la clasificación en el campo varía entre los distintos países. Para poder comparar el efecto de la serología al clasificar pacientes en situaciones de campo, utilizamos la clasificación operativa de la OMS para nuestros análisis⁽²⁾. Por tanto, los pacientes de lepra se clasificaron de acuerdo a su número de lesiones cutáneas: personas con seis o más lesiones se clasificaron como MB y los de cinco o menos como PB. La presencia de nervios engrosados no afectó la clasificación.

CAPACITACIÓN DEL PERSONAL SANITARIO

En cada país se llevó a cabo un taller de formación en el que se explicó al personal sanitario comprometido en el trabajo con los antecedentes técnicos y teóricos más relevantes. Se evaluó su comprensión de la enfermedad, su capacitación para obtener sangre, efectuar la técnica, interpretar los resultados, rellenar los ficheros para recoger datos y facilitar la correcta información a pacientes y contactos.

SEROLOGÍA

Se realiza la técnica ML Flow de acuerdo a la técnica descrita por Bühner-Sékula *et al*⁽⁶⁾. Se deposita una gota de sangre, obtenida mediante punción digital con lanceta en la pulpa del dedo, en el orificio para muestras y a continuación se añade el tampón de dilución. La sangre diluida se desplaza sobre una línea marcada con antígenos y otra de control. El resultado se interpretó a los cinco minutos y él se considera válido si la línea control (IgM anti-humana) está claramente visible. Si los antígenos IgM *M. leprae*-específico están presentes se adhieren al antígeno (derivado semi-sintético del PGL-I) y una línea roja aparece en la zona de test. Cuando la coloración es (-) o muy débil (+/-) el resultado se considera ne-

gativo. Se controló la calidad de todos los lotes de ML Flow enviado a los tres países frente a la sensibilidad y especificidad del lote de referencia para evaluación⁽⁶⁾. Resultados incorrectos por defectos del test son muy infrecuentes y no se detectó ningún caso durante el estudio. Sin embargo, se aconsejó al personal sanitario la realización de un segundo test si la línea de control no era visible. Un 20 % de los resultados fueron re-evaluados por los supervisores locales que confirmaban de forma ciega la lectura del primer resultado.

EXAMEN MICROSCÓPICO DEL FROTIS CUTÁNEO

En todos los centros sanitarios de Brasil y el centro de referencia de Nepal se efectúa microscopía para la presencia de BAAR en los frotis cutáneos y se dispone de un sistema de control de calidad. Se efectúan cuatro frotis cutáneos, uno en cada lóbulo de la oreja, uno del codo y otro de una lesión cutánea. Cuando era imposible obtener una muestra de una lesión, se obtuvo del otro codo. Los frotis se tiñeron mediante BAAR por el método Ziehl-Neelsen y se examinaron 100 campos mediante técnica de inmersión en aceite. Aunque los laboratorios de forma rutinaria registran el índice bacteriológico (IB), anotamos para este estudio los resultados como negativos o positivos.

PERMISO ÉTICO Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se obtuvo permiso ético por el Comité Ético para la Investigación de Santa Casa, Belo Horizonte, Brasil, del Comité para la Investigación en la Salud de Nepal y del Comité Ético del Ministerio de Salud Federal de Lagos, Nigeria. El consentimiento informado se obtuvo en lengua local expresado de forma clara y sencilla. En el caso de menores de edad se obtuvo permiso de alguno de los padres o responsables del niño.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se efectuó con el Epi Info versión 6.04.d. Al comparar diferencias entre grupos se utilizó el Chi-cuadrado.

RESULTADOS

CLASIFICACIÓN DE LOS PACIENTES BASADA EN EL NÚMERO DE LESIONES Y RESULTADOS ML FLOW

Se presenta en la Tabla 1 la clasificación de los pacientes de acuerdo con la clasificación operativa de la OMS en relación con los resultados ML Flow para el grupo de estudio en los tres países. La menor proporción de pacientes MB se obtuvo en Nigeria (19.4 %) ($P < 0.01$). Así hay diferencia significativa entre la proporción de pacientes MB en Brasil (39.5%) y Nepal (35.6%) ($P = 0.06$). La mayor seropositivi-

Tabla 1. Positividad con la técnica ML Flow para los grupos de pacientes PB y MB clasificados mediante el sistema OMS por el número de lesiones cutáneas

	Brasil			Nepal			Nigeria		
	ML Flow			ML Flow			ML Flow		
	POS	NEG	Total	POS	NEG	Total	POS	NEG	Total
OMS PB (%)	192 (17.9)	456 (42.6)	648 (60.5)	118 (11.1)	569 (53.4)	687 (64.4)	86 (46.2)	64 (34.4)	150 (80.6)
OMS MB	352 (32.9)	71 (6.6)	423 (39.5)	222 (20.8)	157 (14.7)	379 (35.6)	31 (16.7)	5 (2.7)	36 (19.4)
Total	544 (50.8)	527 (49.2)	1071	340 (31.9)	726 (68.1)	1066	117 (62.9)	69 (37.1)	186

dad se observó en Nigeria (62.9 %), seguido por Brasil (50.8 %) y Nepal (35.6 %). De los pacientes clasificados como PB basados en el número de lesiones cutáneas 29.6 % (192/648), 17.2 % (118/687) y 57.3 % (86/150) eran positivos por el test ML Flow en Brasil, Nepal y Nigeria, respectivamente. De los pacientes MB 16.8 % (71/423), 41.4 % (157/379) y 13.9 % (5/36) eran negativos para el ML Flow.

DISTRIBUCIÓN DE LOS PACIENTES DE ACUERDO AL NÚMERO DE LESIONES, ML FLOW Y RESULTADOS IB

La Figura 1 indica que sólo un 22.7 % (243/1071) y el 8.9 % (95/1066) de todos los pacientes de Brasil y Nepal, respectivamente, presentaban seis o más lesiones y eran positivos para la ML Flow y el examen de frotis para la detección de BAAR. La positividad total de los frotis fue más elevada en Brasil (27.1 %) que en Nepal (11.6 %).

PROBABILIDAD QUE LA CLASIFICACIÓN MEDIANTE EL NÚMERO DE LESIONES CUTÁNEAS SE CORRELACIONE CON EL RESULTADO ML FLOW O EXAMEN MICROSCÓPICO DE FROTIS

La Tabla 2 presenta la proporción de pacientes para los que se confirma la clasificación OMS mediante el examen de frotis y/o resultados ML Flow. El test ML Flow y el examen de frotis cutáneo para la presencia de BAAR resultó negativo en 69.1 y 82.7 % de los pacientes PB y positivo para 57.4 y 25.1 % de los pacientes MB de Brasil y Nepal, respectivamente.

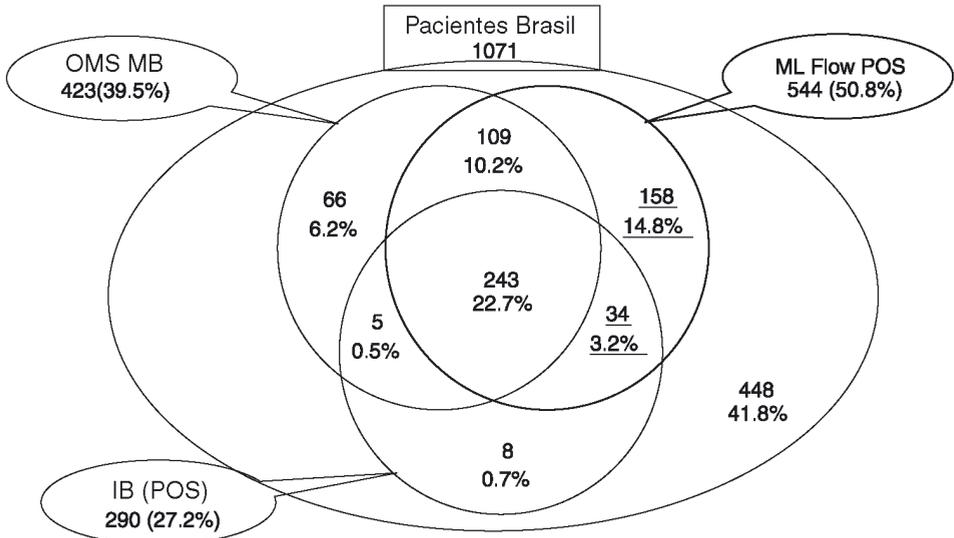
Un 6.4 y 2 % de los pacientes PB de Brasil y Nepal, respectivamente, resultaron BAAR positivos. Tanto el examen de frotis como el test ML Flow resultaron negativos para el 15.6 y 38.3 % de los pacientes MB de Brasil y Nepal, respectivamente.

DISCUSIÓN

Aunque los test serológicos no pueden ser utilizados como criterio único para el diagnóstico de la lepra,⁽⁵⁾ si pueden emplearse para la clasificación de los pacientes y la administración por tanto del tratamiento farmacológico más adecuado⁽⁶⁾. Para comprobar esta posible aplicación, hemos evaluado el ML Flow como técnica de diagnóstico inmediato en tres programas de control de la lepra y su posible impacto sobre la clasificación de los pacientes.

La proporción de pacientes PB y MB en la población afectará la efectividad de cualquier método de clasificación, incluyendo el ML Flow Test. La clasificación basada en la baciloscopia resulta muy específica, pero poco sensible. Por tanto, si se considera la presencia de BAAR como el estándar de oro, cualquier otra prueba presentará una sensibilidad mayor y especificidad menor. Como se observa en la Fig. 1, un elevado número de pacientes frotis negativos (109 en Brasil y 127 en Nepal) fueron clasificados como MB mediante la ML Flow, y el sistema OMS. La observación de que la presencia de BAAR se correlaciona bien con la

(A)



(B)

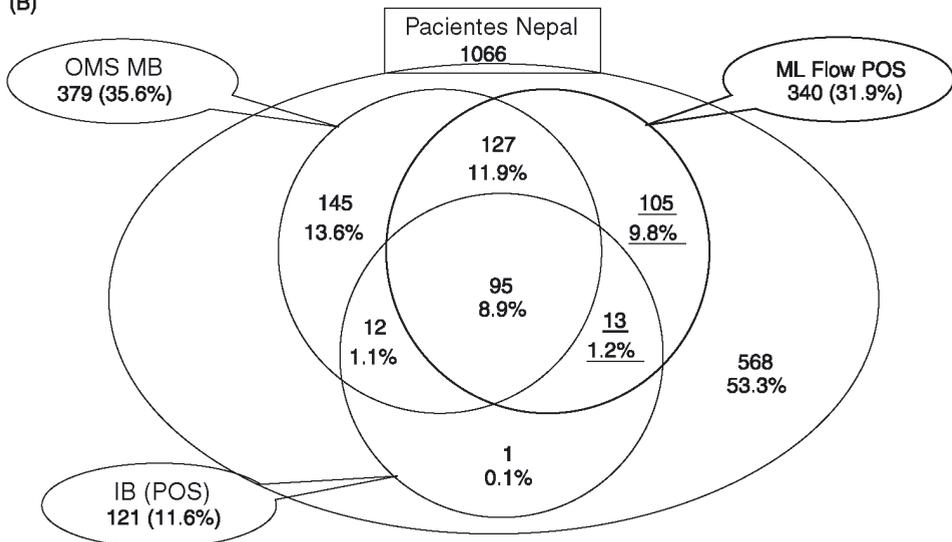


Figura 1. Distribución de resultados (ML Flow, IB y clasificación basada en el número de lesiones cutáneas) de los pacientes (A) de Brasil y (B) del centro de referencia de Nepal. En cada figura, se distribuye el número de pacientes ML Flow positivos (ML Flow POS) en el círculo más oscuro de acuerdo con los otros resultados, en el círculo de la izquierda, está el número de pacientes con seis o más lesiones cutáneas (OMS MB) y en el círculo inferior el número de pacientes IB positivos (IB POS). Los números entre paréntesis representan el número de lesiones para ML Flow negativo. Los números subrayados representan el número de pacientes que son ML Flow positivos, pero clasificados como PB de acuerdo al número de lesiones.

positividad ML Flow y al mismo tiempo muchos ML Flow positivos son frotis negativos, sugiere que el ML Flow es un indicador más sensible de la carga bacteriana que el examen del frotis. Esta hipótesis se apoya en la observación de que los pacientes IB positivos sin niveles detectables de anticuerpos frente al PGL-I y que ya habían completado el tratamiento farmacológico MDT mas corto no presentaron recidivas durante los 5 años de seguimiento⁽⁸⁾. Los resultados de los frotis cutáneos dependen del punto de toma de la muestra y la calidad del frotis junto al tamaño de la muestra obtenida mientras que el resultado ML Flow representa mejor la carga bacteriana. Consideramos que la serología es más sensible que el frotis cutáneo para detectar pacientes MB.

En Brasil y Nepal, la mayoría de pacientes MB (69.1 y 82.7 %) estaban clasificados correctamente por el sistema de clasificación de la OMS, como revela la ausencia de BAAR y los resultados ML Flow negativos (Tabla 2). La positividad de los frotis confirmaba que sólo había mala clasificación en 6.4 (34 + 8/648) y 2 % (13 + 1/687) de pacientes PB en Brasil y Nepal, respectivamente.

Tabla 2. Comparación entre las clasificaciones basadas en el número de lesiones cutáneas y resultados ML Flow e IB en Brasil y Nepal

Clasificación OMS basada en el recuento de lesiones	Pruebas confirmativas		Brasil		Nepal		
	ML Flow	IB	n	%	n	%	
Pacientes PB	POS	POS	34	5.2	13	1.9	Mal clasificado* Dudoso Confirmado PB
	NEG	POS	8	1.2	1	0.1	
	POS	NEG	158	24.4	105	15.3	
	NEG	NEG	448	69.1	568	82.7	
Total			648	100	687	100	
Pacientes MB	POS	POS	243	57.4	95	25.1	Confirmado MB*
	NEG	POS	5	1.2	12	3.2	
	POS	POS	109	25.8	127	33.5	
	NEG	NEG	66	15.6	145	38.3	
Total			423	100	379	100	

* Basado en resultados IB.

Se detectaron diferencias significativas en Brasil y Nepal en cuanto a la clasificación MB confirmada por la presencia de BAAR en el 59% (243 + 5/423) de los pacientes MB brasileños, pero sólo en el 28 % (95 + 12/379) de los pacientes de Nepal (tabla 2). El método utilizado en ambos países para la baciloscopia es el mismo y ambos disponen de un sistema de control de la calidad. Sin embargo,

aun así la calidad de la baciloscopia puede variar entre los dos países. La proporción de casos MB frotis positivos es significativamente menor en Nepal que en Brasil ($P < 0.001$). El gran grupo de pacientes MB con un resultado ML Flow positivo y frotis negativo (25.8 y 33.5 % de los pacientes MB en Brasil y Nepal, respectivamente) es otro indicador de que el frotis cutáneo no es lo suficientemente sensible. Estos casos frotis negativos pero seropositivos pueden representar casos MB adicionales. La proporción de pacientes MB, tanto ML Flow como baciloscopia negativos, es sorprendentemente elevada en Brasil ($66/423 = 15.6\%$) y todavía mayor en Nepal ($145/379 = 38.3\%$) (Tabla 2). Suponemos que son pacientes mal clasificados por el sistema OMS. Estos distintos porcentajes pueden estar influenciadas por las diferencias en la respuesta inmunológica entre las dos poblaciones y/o diferencias en la gravedad de la infección. También puede ser posible que el punto ideal de corte para el número de lesiones que clasifica a los pacientes como MB pueda ser distinto entre países.

En Nigeria, sólo se compara el ML Flow con la clasificación OMS, ya que el frotis cutáneo no es una prueba rutinaria de las instituciones implicadas en el estudio. Los datos presentados aquí de Nigeria presentan el uso del criterio OMS para definir la lepra MB, pero en el campo hay una mayor tendencia a clasificar los pacientes como MB, ya que se emplea un criterio de menos de cinco lesiones más los nervios afectados. De acuerdo con las evaluaciones del personal sanitario, el 55.9 % (104/186) de pacientes presentaban cinco o más lesiones y el 73.1 % (136/186) compromiso neural múltiple. Esto hizo que el 95.7 % de los pacientes fueran tratados como MB, frente al 19 % si se aplica estrictamente el criterio OMS (datos no presentados). Esto apoya la observación (datos no presentados) que el personal sanitario sobre-diagnostica la lepra MB en un intento de evitar pautas farmacológicas demasiado cortas. Se dispone de resultados del frotis tanto de Brasil como de Nepal y no había diferencia significativa en el grado de sobre-diagnóstico MB. Mientras que en Nigeria no se dispone de resultados de frotis cutáneos y esto probablemente afecta negativamente la confianza del personal sanitario en el diagnóstico y se produce como consecuencia un sobre-diagnóstico de lepra MB.

En nuestro análisis de los datos hemos utilizado sólo el número de lesiones cutáneas para clasificar a los pacientes, pero esto no es lo que ocurre en la práctica. En los tres países, aparte de la clasificación recomendada por la OMS, también se considera la afectación neural. Nuestros resultados ponen de manifiesto que la clasificación OMS es un instrumento operativo adecuado, pero mal aplicado en la práctica y probablemente muy difícil de implantar adecuadamente. En la rutina diaria el ML Flow será al menos igual de fiable, porque es un instrumento objetivo y le proporcionará al personal sanitario más confianza en la clasificación, sobre todo de pacientes PB. La solución propuesta por la OMS a los problemas operativos es evitar completamente el tema de clasificación mediante una multiterapia uniforme MDT (UMDT), mediante el cual todos los pacientes recibirían el mismo tratamiento durante el mismo período de tiempo. Sin embargo, la UMDT puede no ser suficiente para los casos más bacilíferos, mientras que se so-

bre-trataría a los pacientes PB y por tanto requiere más tiempo y estudio su implementación. A parte del tema del tratamiento, la distinción entre pacientes MB y PB es importante por el riesgo de padecer reacciones y afectación neural y la necesidad de una estrecha supervisión durante y después de la MDT. Por tanto, sugerimos que el ML Flow sería una prueba que proporcionaría un medio de clasificación que sería aceptable y aplicable en el campo para todos estos objetivos.

Si hay que evitar un tratamiento farmacológico no adecuado entonces sólo habría que analizar a los pacientes PB mediante el ML Flow y los pacientes positivos serían tratados como MB. Utilizado de esta manera, el ML Flow también podría detectar la mayoría de pacientes que son frotis positivos, pero han sido mal clasificados como PB, porque sus lesiones son escasas o difíciles de ver: 81 % (34/42) en Brasil y 93 % (13/14) en Nepal (Fig. 1).

Otra posibilidad sería utilizar el resultado del ML Flow como criterio único de clasificación de pacientes para administrar tratamiento. Con este criterio, todos los pacientes ML Flow positivos serían considerados como MB y todos los ML Flow negativos como PB. Como resultado, en Brasil, Nepal y Nigeria respectivamente 25 % (192 + 71/1071), 26 % (118 + 157/1066) y 48.9 % (86 + 5/186) de los pacientes recibirían una pauta farmacológica diferente de la determinada por la clasificación OMS (Tabla 1). Representaría un incremento del 11.3 % y 43.5 % de pacientes tratados como MB en Brasil y Nigeria, respectivamente y esto representaría una disminución del 3.7 % en Nepal. Del grupo de pacientes frotis positivos, 4.5 % (5 + 8/290) y 10.7 % (12 + 1/121) estarían mal clasificados por el ML Flow en Brasil y Nepal, respectivamente y tratados como PB, en comparación al 2.8 % (8/290) y 0.8 % (1/121) que serían omitidos por la clasificación OMS (Fig. 1). Se requiere más estudios para investigar si este grupo de pacientes mal clasificados como PB presentan un mayor riesgo de recidivas y/o reacciones.

Actualmente, hay estudios en marcha para evaluar la eficacia de 6 meses de UMDT para todos los pacientes. La UMDT presenta la ventaja de facilitar la administración del tratamiento, pero la desventaja de que la pauta puede ser demasiado corta para los pacientes MB muy bacilíferos⁽⁸⁾. Sería muy útil una técnica para determinar los pacientes MB muy infectados que necesitarían más tratamiento y daría más confianza al personal sanitario para que aceptaran pautas más cortas para los demás. De momento, el ML Flow es demasiado sensible para esta labor, ya que muchos PB y casos frotis negativos fueron seropositivos. La sensibilidad de la técnica sí que se podría ajustar para este punto en particular.

En conclusión, en los programas de control de la lepra en que no hay disponibilidad de baciloscopia, el ML Flow podría ser utilizado para mejorar las decisiones sobre el tratamiento a administrar. Puede reducir la necesidad de efectuar baciloscopias que son invasivas y con riesgo de infección por el personal sanitario. Incluso si todos estos planteamientos consiguieran poder definir un tratamiento uniforme para todos los pacientes, hay que recordar que los pacientes PB y MB presentan distintos niveles de riesgo para padecer leprorreacciones, afectación neural, recidivas y discapacidad. Distinguir entre pacientes con cargas bacterianas bajas o elevadas seguirá por tanto siendo importante para un correcto control clínico⁽⁹⁾.

AGRADECIMIENTOS

La Netherlands Leprosy Relief (NLR) financió y facilitó apoyo logístico al proyecto. El NT-P-BSA usado para la producción del ML Flow fue proporcionado por el Dr. Fujiwara, del Instituto de Ciencias Naturales, Universidad de Nara, Nara, Japón. Agradecemos a todos los participantes por su información y apoyo. También, agradecemos a los autores de las dos revisiones anónimas y especialmente al Dr. Anthony Bryceson, sub-editor, por sus comentarios críticos pero siempre constructivos.

CONTRIBUCIONES DE LOS AUTORES

S. B. S. participó en el diseño del estudio, capacitación de los participantes, supervisión del estudio, efectuó el análisis de los datos operativos y el borrador del trabajo. J. V. participó en el diseño y supervisión del estudio. M. A. G. K. P. D. y A. U. N. supervisaron el estudio y recogieron datos en sus respectivos países. P. K. y L. O. participaron en el diseño del estudio. Todos los autores participaron en la interpretación de los datos, lectura y aprobación del trabajo final.

REFERENCIAS

1. Lockwood DN, Suneetha S. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bull World Health Org*, 2005; 83: 230-235.
2. WHO. Expert Committee on Leprosy, Seventh Report. World Health Organization. Geneva, 1998 Report No. 874.
3. Croft RP, Smith WC, Nicholls P, Richardus JH. Sensitivity and specificity of methods of classification of leprosy without use of skin-smear examination. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1998; **66**:445-450.
4. Groenen G, Saha NG, Rashid MA et al. Classification of leprosy cases under field conditions in Bangladesh. I. Reliability of clinical criteria. *Lepr Rev*, 1995; **66**:134-143.
5. Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev*, 2003; **74**:196-205.
6. Bühner-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC et al. Simple and fast flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *Clin Microbiol*, 2003; **41**:1991-1995.
7. Bühner-Sékula S, Visschedijk J, Grossi MAF et al. Combining operational and anthropological studies; experience with a point of care test for leprosy in Brazil, Nepal and Nigeria. Unpublished data.
8. Bühner-Sékula S, Cunha MG, Foss NT et al. Dipstick assay to identify leprosy patients who have an increased risk of relapse. *Trop Med Int Health*, 2001; **6**: 317-323.
9. Report of the International Leprosy Association Technical Forum Paris FFF2. The Diagnosis and Classification of Leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 2002; **70**(suppl.): S23-S31.

CURSOS INTERNACIONALES DE ESPECIALIZACIÓN EN LEPROA

Edición Personal Sanitario

L CURSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGÍA.

Curso especializado para personas que vayan a trabajar en el campo de la erradicación de la lepra

Fecha y lugar:

Del 1 al 5 de octubre de 2007

Sanatorio San Francisco de Borja, Fontilles.

Alicante (España)

Edición Médicos

XLIV CURSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGÍA.

Fecha y lugar:

Del 19 al 23 de noviembre de 2007

Sanatorio San Francisco de Borja, Fontilles.

Alicante (España)

Información y secretaría:

Sanatorio San Francisco de Borja.

03791 Fontilles

(Alicante) ESPAÑA

Tel.: 00 34 96 558 33 50

Fax: 00 34 96 558 33 76

e-mail: rosana@fontilles.org

FE DE ERRATAS/CORRIGENDUM:

En nuestro anterior número aparece incompleta la siguiente noticia, que reproducimos nuevamente en su totalidad.

REUNIÓN ANUAL DE OMS SOBRE ÚLCERA DE BURULI Ginebra (Suiza) 2-4 abril 2007

En el mes de abril ha tenido lugar en Ginebra en la sede de OMS la Reunión anual sobre úlcera de Buruli. En ella han participado científicos que trabajan en dicha enfermedad, representantes de los Ministerios de Salud de los países más afectados por la misma y miembros de ONGs que apoyan la lucha.

Los representantes de los países más afectados hicieron una exposición de las casuísticas y trabajo realizado durante el año 2006. La enfermedad sigue siendo un problema de Salud Pública importante en numerosos países africanos entre los que destacamos Ghana, Togo, Benin, Costa de Marfil, Uganda, República Democrática de Congo, Guinea Konakry, Nigeria, Gabón, Camerún. También destacamos la presencia de representantes de los Programas de Salud sobre esta enfermedad de Australia y Papúa Nueva Guinea.

En los últimos años ha habido importantes avances en la lucha contra esta enfermedad trabajándose con antibióticos (Rifampicina, Estreptomina, Amikacina, Claritromicina, Rifapentina, Moxifloxacino) que junto al tratamiento quirúrgico han hecho que su pronóstico sea mucho más favorable. Se está trabajando experimentalmente con pautas terapéuticas más cortas y de más fácil aplicación sobre el terreno que hacen que el futuro de esta enfermedad sea más esperanzador. En algunos de los países sus representantes comentaron todavía la dificultad para que esta medicación se pueda utilizar de forma regular.

Se observa también avances en el diagnóstico precoz de la misma, campañas de educación sanitaria y de rehabilitación que tanta importancia tiene a la hora de prevenir las discapacidades y secuelas que esta enfermedad puede ocasionar.

En cuanto a la investigación sobre esta enfermedad sigue centrada en cuatro áreas básicas y fundamentales: medio ambiente, transmisión, diagnóstico y variación de cepas, inmunología y tratamiento, habiéndose producido avances que, aunque se podrían denominar actualmente como pequeñas, pueden resultar fundamentales en el futuro.

En cuanto a su transmisión y medio ambiente, se han identificado distintos animales en Australia como infectados (caballos, gatos, marsupiales) pudiendo ser reservorio del *Mycobacterium ulcerans*. En este país también contaron los estudios sobre la implicación de los mosquitos en la transmisión por picadura. Se ha detectado en alguna zona con episodios de úlcera de Buruli, DNA *M. ulcerans* en un pequeño porcentaje de mosquitos mediante PCR. Se insistió en la necesidad

de establecer directrices para el análisis mediante PCR de muestras medioambientales. Mientras tanto en África, los estudios pretenden demostrar la transmisión por picadura de insectos de tipo acuático, principalmente de los Belastomátides.

En el apartado de diagnóstico sigue faltando un test serológico rápido y económico y se recomienda al menos dos pruebas de laboratorio para continuar el diagnóstico: tinción, histopatología, PCR o cultivo. Parece prometedor el empleo del aspirado de la lesión mediante aguja fina como muestra fácilmente conservable y transportable, y se cuestiona si un cultivo negativo significa esterilidad de la lesión o infección por debajo del límite de detección del medio de cultivo.

Hay dudas sobre la eficacia en un porcentaje significativo de los casos con un tratamiento antibiótico de ocho semanas con rifampicina y estreptomycinina i. m. diaria. En Australia, al cabo de un año, la cantidad de recidivas es mínima. Ante las dificultades de administrar puntualmente la estreptomycinina, se estudiaron pautas alternativas, de momento en ratones, sustituyendo la estreptomycinina por claritromycinina.

La inmunología de la infección parece determinada por la reacción del huésped frente a la toxina micolactona, como quedó demostrado en un estudio donde se demuestra que esta toxina afecta la producción de chemocinas por las células dendríticas. La toxina también puede inducir deterioro neural reversible.

La OMS destaca la importancia de esta reunión anual en su sede de Ginebra para conseguir más participación e implicación de los gobiernos y la comunidad científica para afrontar esta enfermedad que ya forma parte del grupo de enfermedades tropicales olvidadas.

PROYECTO HONDURAS – NICARAGUA

* Montserrat Pérez López y ** Pedro Torres Muñoz

Choluteca, ciudad hondureña capital del departamento que lleva el mismo nombre, localizada al sur del país en el valle del río Choluteca, próximo a la costa del golfo de Fonseca. Se encuentra a cien kilómetros al sur de la capital nacional Tegucigalpa. Ocupa un extenso y hermoso valle, casi en el centro del departamento, con una elevación de 47.5 m. sobre el nivel del mar. Es cruzada por la carretera panamericana y otra internacional que, pasando por Guasaule, conduce a Nicaragua. En la ribera izquierda del río Choluteca está situada la ciudad. Al norte, los municipios de Pespíres, Orocuina y Apacilagua, al sur la república de Nicaragua, al este los municipios de Santa Ana de Yusguare y Namasigüe y al oeste los municipios de San Lorenzo, Marcovia y Golfo de Fonseca. En esta zona destaca el Golfo de Fonseca, una enorme bahía compartida entre El Salvador, Honduras y Nicaragua. El clima del sur es cálido y seco, contrastando con la gran humedad de la costa norte.

Choluteca es la cabecera municipal del departamento de Choluteca. Está situado en la zona sur de la república de Honduras, en el valle del río Choluteca, próximo a la costa del golfo de Fonseca y se encuentra a 100 KMS al sur de la capital, Tegucigalpa. Posee clima cálido, beneficiándose de una buena infraestructura viaria por el cruce de la carretera panamericana; tiene una extensión territorial de 1,159.10 Kms² (105.900 hectáreas), una elevación de 4.715 metros sobre el nivel del mar y está dividido en zona urbana = 49% y zona rural = 51% conformado por 26 aldeas, 372 caseríos, 29.221 viviendas y 17.128 habitantes, con una tasa de analfabetismo del 25% en el área rural y del 13.5% a nivel urbano.

Cuenta con 133 escuelas (26 urbanas y 107 rurales), 12 institutos de educación media (8 privados y 3 oficiales o públicos) y tres universidades (2 públicas y una privada) y en el área sanitaria existe un hospital regional con 5 especialidades y 32 centros de salud: 9 CESAMOS (Centro de Salud con Médico) en el área urbana y 23 CESAR (Centro de Salud con Auxiliar de Enfermería) en el área rural; a nivel privado cuenta con 5 policlínicas. Es un importante centro agrícola, ganadero y camaricultor, que se ha configurado en los últimos tiempos como el polo de desarrollo económico de la zona sur de Honduras.

* *Asesora científica, Fontilles.*

** *Jefe Laboratorio Sanatorio San Francisco de Borja, Fontilles.*

El presente estudio se realizará en la unidad de salud “El Porvenir”, que tiene una superficie territorial de 238 manzanas, 19 Kms, 2.501 viviendas y 12.624 habitantes; de estos 3.206 son mujeres en edad fértil. Tiene 27 áreas de influencia, 10 en área urbana y 17 en el área rural. Sus hogares están caracterizados por 2 o más NBI lo que los ubica por debajo de la línea de pobreza, haciéndolos vulnerables a padecer diversas enfermedades relacionadas con sus condiciones de vida y que pueden ser prevenibles.

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Ante el notable incremento de los casos diagnosticados de lepra paucibacilar (PB), especialmente en niños menores de 14 años, por los médicos nicaragüenses de la Asociación para el Desarrollo de los Pueblos (ADP) en el Departamento de Chinandenga (Nicaragua), y ser esta forma de difícil diagnóstico diferencial con la leishmaniasis atípica, también endémica en esta zona, la Asociación Fontilles decide confirmar la presencia de este fenómeno.

En abril del año 2002 se diseña un proyecto conjunto de colaboración entre la Universidad Miguel Hernández de Alicante y la University College de Londres con la Asociación Fontilles, que se presenta y es aprobado en una convocatoria de ayudas por la Generalitat Valenciana.

El equipo de investigación formado visita la zona, examina clínicamente los casos y obtiene muestras biológicas que son transportadas y procesadas en Inglaterra y España. El análisis empleando técnicas de última generación confirma que las lesiones observadas corresponden a casos de leishmaniasis atípica en su mayoría, pero se confirman casos de lepra de tipo PB infantil e incluso tres casos de coinfección con ambos patógenos. También se constata la presencia de portadores aparentemente sanos de DNA *M. leprae* nasal en la comunidad y la presencia del bacilo en muestras medioambientales de tierras.

El Departamento de Chinandenga limita al norte con el Departamento de Choluteca (Honduras) y la similitud, tanto geográfica como de población, entre las dos zonas hizo presuponer la posibilidad de la existencia de este mismo fenómeno en el lado hondureño. Esto fue confirmado por el Dr. Nelson Caballero (ADP) durante una visita de cribaje y búsqueda activa de casos por diversos municipios de Choluteca, al mismo tiempo que impartió un curso de formación y detección de lepra para el personal sanitario, tanto médico como paramédico, de la zona.

El equipo sanitario de Fontilles, de acuerdo con la Dra. Lesny Ruth Fuentes, encargada del programa de lucha contra la lepra del sur de Honduras, decide visitar este departamento y elabora un programa de trabajo con los siguientes objetivos:

- Confirmación del diagnóstico clínico de Hansen y su diagnóstico diferencial con leishmaniasis mediante la obtención de biopsias de las lesiones más características y su análisis con técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- Toma de muestras nasales con torundas para evaluar el posible papel de los portadores sanos en la transmisión y mantenimiento de la infección en la comunidad.
- Obtener muestras de tierra de la zona para intentar detectar DNA *M. leprae* y confirmar su presencia medioambiental.

ACTIVIDADES REALIZADAS

Se visitaron los tres municipios del Departamento de Choluteca mencionados anteriormente y se incluyeron en el estudio 111 personas clasificadas en los siguientes grupos:

- 24 posibles nuevos casos de lepra (13 ≤ 15 años)
- 32 familiares convivientes de estos pacientes
- 55 controles (personas sin lesiones que conviven en la misma zona)

Todos los casos sospechosos clínicamente de ser lepra fueron biopsiados y la muestra llevada a Londres para su posterior análisis mediante Biología Molecular. Al mismo tiempo durante la visita, el equipo de Fontilles impartió un seminario de actualización sobre la enfermedad de Hansen; primero en Choluteca, al que asistieron 41 personas entre médicos y personal sanitario y, posteriormente, en Managua con 24 cursillistas y con una jornada práctica en el Laboratorio de Biología Molecular del Prof. Huete de la Universidad Centroamericana de Managua, sobre la aplicación de la técnica PCR para el diagnóstico diferencial entre lepra y leishmania.

El estudio queda pendiente del análisis y los resultados de las muestras obtenidas, además del apoyo a las autoridades sanitarias de Choluteca, para que puedan ir implementando el programa de detección activa de la lepra en el departamento.

FORMACIÓN CONTINUADA

BACTERIOLOGÍA

*Pedro Torres Muñoz

INTRODUCCIÓN

La lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium leprae*, un bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR), caracterizada por un largo período de incubación de generalmente años y que se manifiesta sobre todo al sistema nervioso periférico y piel. Afecta solamente a una reducida proporción de individuos "susceptibles" y presenta un espectro clínico muy amplio de acuerdo con la respuesta inmunológica del huésped.

Aunque *M. leprae* fue el primer patógeno bacteriano humano identificado en 1873 por G. H. Armauer Hansen, todavía no ha podido ser cultivado en medios sintéticos ni existe una vacuna eficaz para su prevención. Considerado castigo divino desde tiempos bíblicos, ha sido motivo de rechazo y aislamiento social para millones de individuos que la han padecido y que todavía persiste en nuestros días.

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

a) Aspectos microbiológicos

M. leprae fue descubierto por el Dr. Gerhard Armauer Hansen en Noruega en 1873, siendo la primera bacteria patógena descubierta. Se trata de un bacilo intracelular obligado, inmóvil y no esporulado, de 0.3 – 0.5 mm. de diámetro por 4.0 – 7.0 mm. de largo, incluido dentro del Orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae, Gram positivo débil y ácido-resistente. Tanto el método clásico de tinción de Ziehl-Neelsen como las técnicas de fluorocromos se basan en la propiedad que poseen de retener colorante después de su exposición a ácido-alcohol (ácido clorhídrico-etanol) propiedad atribuida a los ácidos micólicos de su pared celular. La pared es el componente más importante. Contiene peptidoglicano compuesto por cadenas alternantes de N-acetilglucosamina y N- glicosilmurámico uni-

* Jefe Laboratorio Sanatorio San Francisco de Borja, Fontilles.

das por puentes peptídicos que están unidas a la capa de galactano por el arabino-galactano. Los ácidos micólicos, el elemento más abundante de la pared, se encuentran esterificados con las unidades arabinosas. El lípido más dominante de la pared celular y que confiere especificidad inmunológica al *M. leprae* es el glicolípido fenólico en concreto el de la familia 1 (PGL-1). Estudios recientes revelan que el PGL-1 esta comprometido en la interacción del *M. leprae* con la laminina de la célula de Schwann, es decir parece ser que desempeña un papel importante en la interacción nervio periférico-célula de Schwann. Estudios del genoma del *Mycobacterium leprae* y sobre todo de tipo genómico comparativo con otros patógenos bacterianos revelan que el genoma del *M. leprae* contiene la mayoría de genes necesarios para la formación de este complejo polímero peptidoglicano-arabinogalactano-micolato con algunas excepciones como son la ausencia de dos genes comprometidos en la síntesis de poliprenil-fosfato (*dxs-II* y *idi*), un gen (*fabH*) implicado en la síntesis del meromicolato y un gen glicosiltransferasa (*pimB*) comprometido en la biosíntesis del fosfatidilinositol, fosfatidilinositol manósido, lipomanano y lipoarabinomanano.

b) Crecimiento

Se divide por fisión binaria cada 12-14 días (tiempo de generación muy prolongado). No se ha conseguido que crezca en medios artificiales pero se puede mantener viable y metabólicamente estable a 33°C en medio 7H12 durante varias semanas, en armadillos muertos durante 21 días y en tierra con temperatura óptima de 30°C durante 45 días. Su propagación ha quedado limitada al empleo de modelos animales incluyendo el armadillo y ratones normales atómicos y de tipo knock-out. *M. leprae* se destruye en autoclave tras 20 minutos a 121°C y por irradiación gamma de 2.5 Mrad (2.5×10^4 Gy) de una fuente de Co⁶⁰.

c) Metabolismo

Uno de los principales motivos por los que resulta tan interesante investigar los aspectos metabólicos del *M. leprae* es poder determinar si se puede formular algún medio que consiga su crecimiento *in vitro* y conocer rutas metabólicas que permitan desarrollar nuevos principios activos contra el *M. leprae*. La secuenciación del genoma ha mejorado los conocimientos sobre las capacidades metabólicas del *M. leprae*. Se han identificado genes que revelan la capacidad del *M. leprae* de generar energía oxidando la glucosa a piruvato mediante ruta Embden-Meyerhof-Parnas. En cuanto a la degradación de lípidos *M. leprae* presenta genes para la B oxidación, pero comparado con *M. tuberculosis* muy pocos genes para la lipólisis. No puede utilizar el acetato como fuente de carbono ya que sólo presenta pseudogenes para los enzimas necesarios para este proceso. En resumen *M. leprae* presenta menos enzimas que intervienen en las rutas de degradación de

compuestos para la obtención de carbono y nitrógeno que *M. tuberculosis*. Otro inconveniente asociado con el metabolismo del *M. leprae* es que el bacilo ha perdido los sistemas de transferencia anaeróbicos y microaerófilicos de electrones y que la cadena respiratoria aeróbica esta severamente dañada imposibilitando que el *M. leprae* genere ATP de la oxidación del NADH.

En contraste con la reducción de las rutas catabólicas las capacidades anabólicas del *M. leprae* parecen estar al completo (síntesis de purinas, pirimidinas, nucleósidos, nucleótido y la mayoría de vitaminas y cofactores).

d) Genoma, transcriptoma y proteoma

Genoma

Se empleó para la secuenciación del genoma del *M. leprae*, DNA procedente de bacilos obtenidos de la piel de un paciente multibacilar de Tamil Nadu (cepa TN) inoculados y purificados del hígado de un armadillo de nueve bandas.

De la comparación de los genomas del *M. leprae* y *M. Tuberculosis* se deduce que el *M. leprae* ha padecido un caso extremo de evolución reductiva que se refleja en un genoma mucho menor (3.3 Mb *M. leprae* versus 4.4 Mb *M. Tuberculosis*) y una mayor reducción de su contenido G+C (58% *M. leprae* versus 66% *M. Tuberculosis*). *M. leprae* presenta 1.614 marcos abiertos de lectura comparado con los 3.993 de *M. Tuberculosis*. También, destacan los 1.133 genes inactivados (genes perdidos por mutaciones o pseudogenes) comparado con 6 pseudogenes de *M. Tuberculosis*. Como resultado de todo esto, menos del 50% del genoma del *M. leprae* codifica genes funcionales y esta reducción del genoma ha llevado consigo la eliminación de varias rutas metabólicas con el resultado final de un bacilo con unos requerimientos muy específicos para su desarrollo y crecimiento que revelan porqué es un parásito intracelular obligado.

Transcriptoma

El análisis transcripcional de los genes del *M. leprae* permite identificar genes que se transcriben de manera activa durante la infección y que quizás pasen inadvertidos al estudiar sólo el proteoma del *M. leprae*. Para identificar los genes transcritos durante la infección, los transcritos que se desarrollan en ratones desnudos atímicos se han evaluado con PCR–transcripción reversa y tecnologías DNA microarray de especies cruzadas con un microarray *M. Tuberculosis*. Se detectaron transcritos para 221 marcos abiertos de lectura que incluyen genes comprometidos en la replicación DNA, división celular, secreción proteica SecA-dependiente, producción de energía y transporte de hierro y almacenamiento, así como genes comprometidos en la virulencia.

Estos resultados indican que *M. leprae* cataboliza ácidos grasos para obtener energía, produce proteínas secretoras, produce proteínas comprometidas en el transporte, almacenamiento y regulación del hierro y también se transcriben algunos genes comprometidos en virulencia en *M. Tuberculosis*.

El poder identificar genes asociados con el crecimiento y supervivencia durante la infección nos puede conducir a una mejor comprensión de la capacidad del *M. leprae* para causar infección.

Proteoma

El proteoma son las proteínas expresados por organismo en unas condiciones determinadas, es el complemento funcional de cualquier genoma. Comprender la base del crecimiento del *M. leprae*, su virulencia e inmunogenicidad es el objetivo de los estudios proteómicos para mejorar el tratamiento farmacológico y control de la lepra. Antes de la secuenciación del genoma del *M. leprae* en 2001 el análisis de proteínas dependía del fraccionamiento subcelular de bacilos purificados y del cribaje de genotecas con preparados o reactivos inmunológicos. Esta última técnica resultó ser la más útil e incrementó a más de 40 el número de proteínas purificadas y caracterizadas. El gran inconveniente de esta técnica es que no se detectan las proteínas no inmunogénicas. Brennan *et al.* han combinado la técnica de fraccionamiento subcelular con cribaje inmunológico y el análisis químico de las proteínas purificadas con microsecuenciación y espectrometría de masas consiguiendo identificar proteínas de los principales compartimentos celulares, incluyendo el citosol, membrana y pared celular. Mediante el análisis genómico comparativo con *M. Tuberculosis* parece ser que aproximadamente al 50% de los marcos abiertos de lectura del *M. leprae* se les puede asignar funciones de tipo putativo y la otra mitad aparentemente codifica proteínas hipotéticas. Con todo esto se intenta determinar lo que esta bacteria puede y no puede hacer y aplicarlo para evaluar las condiciones que incrementan o suprimen la viabilidad del *M. leprae* cuando se intenta cultivar en medios artificiales, identificar proteínas útiles para el diagnóstico o potenciales vacunas. Las proteínas purificadas de armadillos, ratones y tejidos humanos por definición adolecen de proteínas secretadas. Mediante planteamientos bioinformáticos se han identificado los genes básicos necesarios para un sistema secretor SecA dependiente funcional y Williams *et al.* han demostrado que todos los genes del sistema SecA dependiente se transcriben durante el crecimiento del *M. leprae* en la almohadilla plantar del ratón desnudo y que se transcriben algunas 25 proteínas de carácter secretoria. Por tanto el *M. leprae* tiene potencial de secretar proteínas, algunas de las cuales no han sido evaluadas inmunológicamente.

Por su relativamente pequeño genoma y todavía menor proteoma, el *M. leprae* constituye un importante modelo para evaluar el número mínimo de genes que requiere un parásito intracelular obligado.

e) Epidemiología y diferenciación de cepas

El período de incubación, observado en veteranos de guerras en zonas endémicas, es entre 2-5 años para las formas paucibacilares y de 8-12 años para las multibacilares. Sin embargo en nativos de zonas endémicas se han diagnosticado casos de lepra documentados hasta en un niño de 3 semanas en Martinique, situándose el máximo de incidencia entre 10-20 años.

Al contrario que en otras enfermedades en la lepra es difícil identificar los 3 puntos de referencia comprometidos en la transmisión es decir, exposición, infección y enfermedad. La exposición presenta el problema de identificar de manera clara y definida la fuente de infección en muchos casos confusa, debido al generalmente largo período de incubación. El principal reservorio del *M. leprae* lo constituyen los pacientes lepromatosos con elevada carga bacilar, ocasionalmente los tuberculoides y recientemente ha adquirido interés el posible papel de los portadores sanos que sin padecer la enfermedad pueden transmitirla. Reservorios no humanos de bacilos pueden ser armadillos salvajes del Sur de Estados Unidos y Centro América, incluso primates de la especie mangabey o vectores de tipo artrópodo.

Los recientes descubrimientos sobre la viabilidad del *M. leprae*, hasta de 21 días en armadillos muertos y 45 días sobre tierra en condiciones óptimas de temperatura y humedad, han puesto de relieve la posible intervención de objetos inanimados como posible fuente de infección. El organismo puede propagarse a través del aire, agua o alimentos, vectores (insectos, etc.) y penetra en el cuerpo humano por la piel alterada, vía oral, vía respiratoria, membranas mucosas o inoculaciones (insectos, transfusiones, etc...). La vía más probable parece ser la respiratoria al inhalar gotitas de Pflügger, sin descartar úlceras o nódulos abiertos de un paciente multibacilar sin tratar, donde por estimaciones a partir de su Índice Bacteriológico (IB) puede albergar hasta 11 trillones de bacilos en su organismo y aproximadamente 10^5 microorganismos en mucosa nasal.

El inicio de la enfermedad está influenciada por una serie de factores que afectan al huésped, geográficos, genéticos, socio-económicos, edad, sexo, vacunaciones previas, etc. Tampoco resulta claramente definido debido a la naturaleza insidiosa de la enfermedad y a su largo período de incubación.

Al completarse la secuenciación del genoma del *M. leprae* se han identificado una serie de repeticiones en tándem con potencial para distinguir diferentes cepas de *M. leprae*. Así Shin *et al.* demuestran diversidad en muestras de biopsias obtenidas en pacientes de Filipinas basadas en la frecuencia de repeticiones TTC.

Los polimorfismos tipo nucleótido único (SNP) presentan mucha menos diversidad (frecuencia: ~1 por 28kb); de las más bajas detectadas en patógenos humanos. Solo se han identificado 3 SNPs. La variación en SNPs se correlaciona con el origen geográfico de la cepa y el análisis de cepas de distintos continentes ha permitido predecir la evolución y diseminación global de la enfermedad. Apa-

rentemente es originaria del este de África u Oriente Próximo. Los europeos y africanos del norte introdujeron la enfermedad en las Américas durante los últimos 500 años.

f) Cultivo del *Mycobacterium leprae*

No se ha podido cultivar en medios sintéticos, pero se consigue mantener en medios axénicos en un estado metabólico estable durante algunas semanas. Algunas prácticas corrientes del laboratorio como incubaciones a 37°C, reducen mucho su viabilidad pero esta se mantiene estable durante varias semanas en medio 7H12 a 33°C. Por este motivo su crecimiento y propagación ha quedado restringido a modelos animales, incluyendo armadillos, ratones inmunocompetentes y atímicos y ratones knock-out.

g) Vacuna contra la lepra

Aunque la multiterapia farmacológica (MDT) ha sido muy eficaz disminuyendo desde 1982 el número de países que han conseguido la meta de eliminación de la OMS (menos de un caso por 10.000 habitantes) de 122 países hasta 15 al final del año 2000, todavía se registraron durante ese año 719.930 casos. La mayoría de expertos opinan que una disminución significativa de la incidencia anual sólo se conseguirá con una vacuna eficaz, ya que generalmente, cuando se diagnostica la enfermedad y se administra la MDT sobre todo en los casos multibacilares, el largo período de incubación posibilita se hayan infectado otros individuos.

El primer intento de inmunoprofilaxis contra la lepra data de 1890 con los experimentos de Robert Koch, quien empleó su "líquido marrón" para tratar la tuberculosis y pocos meses después utilizó la misma sustancia para el tratamiento de la lepra. Los intentos de desarrollar una inmunoprofilaxis efectiva contra la lepra son más recientes siendo la BCG (bacilo Calmette-Guérin) el primer preparado empleado como potencial vacuna contra la lepra, en el ensayo de Fernández en 1939. La BCG ha demostrado ser eficaz en algunos ensayos como inmunoprofilaxis frente a la lepra incluso con más eficacia que contra la tuberculosis. Así en distintos ensayos clínicos iniciados alrededor de 1960 la eficacia protectora de la BCG frente a la lepra variaba desde un 80% en Uganda hasta el 20% en Myanmar, siendo en general la protección total deficiente, excepto en el estudio de Uganda. El Consejo para la Investigación Médica de la India llevó a cabo un ensayo de campo en que comparaba dos vacunas indias obtenidas de distintas micobacterias (*M. w* e ICRC) y los dos preparados de la OMS (BCG y BCG con *M. leprae* inactivado) con un grupo placebo en un ensayo controlado a doble ciego y aleatorio en Chennai al sur de la India en enero de 1991. Participaron 171.400 individuos de ambos sexos con edades comprendidas entre 1-65 años y no hubo ninguna incidencia de efectos adversos después de las vacunaciones que obligaran a suspender

o detener el estudio. Los códigos se descifraron en 1998 y, aunque la incidencia en la zona no era muy elevada para verificar la eficacia protectora de los candidatos a vacunas contra las formas progresivas y graves de la lepra, sí fue posible evaluar la eficacia protectora total para cada preparado candidato:

Preparado	Eficacia protectora total
ICRC	65.5%
BCG + <i>M. leprae</i> inactivado	64.0%
BCG	34.1%
<i>Mycobacterium w</i>	25.7%

Los resultados del ensayevidencian que tanto el ICRC como los dos preparados OMS consiguen niveles de protección aceptables para la salud pública y merecerían más estudios para confirmar su posible aplicación como inmunoprolifaxis contra la lepra. El planteamiento de la OMS afirmando que la situación de la lepra como problema de salud público está bajo control con la administración de la MDT y los inconvenientes de emplear vacunas vivas como BCG en individuos HIV infectados en los que podría ser causa misma de enfermedad, han contribuido a que no se hayan llevado a cabo más estudios inmunoprolifáticos controlados a gran escala con estos preparados.

Ante los problemas mencionados anteriormente con el empleo de vacunas vivas atenuadas y la ineficacia que presentan algunas vacunas inactivadas, porque quizás no contengan suficiente cantidad de antígenos protectores o presenten antígenos con actividad inmunosupresora, se tiende actualmente a intentar desarrollar vacunas formadas por un número reducido de antígenos proteicos específicos, obtenidos y purificados a partir del estudio y la información proporcionada del genoma del agente infeccioso en cuestión.

En el caso de la lepra, la reciente secuenciación de su genoma posibilita el poder emplear las últimas tecnologías disponibles en el campo de la Biología Molecular para desarrollar una vacuna con antígenos seleccionados, es decir de tipo sub-unitaria. Un planteamiento práctico y efectivo para aplicar una vacuna de este tipo es combinar los antígenos obtenidos y seleccionados del *M. leprae* con los ensayados actualmente para la tuberculosis para conseguir la inmunización del huésped frente a las dos enfermedades.

MODELOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Rees divide la investigación experimental animal de la lepra en dos eras: 1874-1960 (“edad oscura”), post 1960 (el modelo almohadilla plantar de Shepard).

Esta primera época destaca por el empleo de muchos modelos animales (gatos, gallinas, canarios, conejos, etc.) aplicando muchos protocolos distintos y sin conse-

guir el pasaje seriado de la infección. Entre los inconvenientes de la época, reconocidos hoy, están la poca calidad de los inóculos obtenidos de los nódulos y lesiones de los pacientes lepromatosos sin tratar, desconocer el tiempo de generación tan prolongado del bacilo y su preferencia por las zonas más templadas del cuerpo.

A partir de 1960, con la descripción del modelo de inoculación en almohadilla plantar del ratón de Shepard, se consiguió el pasaje de la infección entre los ratones y un sistema de evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana de potenciales nuevos principios activos farmacológicos. Se utilizaron distintos modelos, desde el ratón inmunológicamente normal, ratón desnudo, ratones knock-out y armadillo, principalmente.

Mediante el empleo del ratón desnudo (timectomizado), se puso en evidencia la importancia de los linfocitos T en la resistencia del huésped frente a la infección. Mientras que en el ratón inmunocompetente la inoculación de algunos miles de bacilos consigue una reproducción de 10^6 bacilos de forma localizada y sin evidencia clínica de enfermedad en el ratón timectomizado, se consiguen hasta 10^{10} bacilos por almohadilla con indicios de diseminación.

Actualmente, mediante el empleo de distintas técnicas, se puede conseguir inactivar un gen específico y observar los efectos resultantes de la pérdida directa del gen, así como los mecanismos compensatorios operativos en su ausencia. Son los denominados ratones knock-out (KO) y se dispone comercialmente de distintos tipos (incapaces de producir alguna citosina específica, sin receptores específicos o que adolecen de algún marcador superficial). De entre los distintos tipos empleados en el estudio de la lepra destacan los:

(iNOS)KO(NOS2^{-/-}): son incapaces de producir compuestos de nitrógeno reactivos y no pueden inhibir la actividad metabólica del *M. leprae in vitro*; presentan una expresión de citocinas tipo Th-1 incrementado y sus características generales son similares a las de la lepra BT en humanos.

(IFN- γ)KO(IFN- γ ^{-/-}): las almohadillas plantares no presentan granulomas organizados, la respuesta citocínica es de tipo Th-2 y representa un modelo similar al BB-BL humano.

Actualmente hay en estudio el desarrollo de otros modelos.

Armadillos de nueve bandas

En 1968 Kirchheimer y Storrs observaron la temperatura corporal del armadillo (30 a 35°C) y demostraron que son susceptibles a la infección por *M. leprae*. El armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) es el único animal inmunológicamente intacto que desarrolla una infección por *M. leprae* totalmente diseminada. La inoculación intravenosa con 10^8 a 10^9 bacilos consigue, después de un período aproximado de 18 meses, incrementos del orden de 10^6 . Al sacrificar y purificar el sistema reticuloendotelial del animal se consiguen cantidades de bacilos purificados cercanas al gramo. Desarrollan la enfermedad

aproximadamente el 65 % de los animales experimentalmente inoculados y presentan inestabilidad inmunológica en las formas intermedias del espectro, igual que en formas humanas.

Presentan formaciones granulomatosas frente al *M. leprae* idénticas a las observadas en humanos y son los que experimentan la forma lepromatosa los más bacilíferos. De ellos se obtiene la lepromina derivada de armadillo (lepromina-A). Es el único animal que presenta protección frente al *M. leprae* mediante la vacunación con BCG de manera parecida a los humanos.

Los armadillos constituyen un buen modelo para el estudio, tanto de la susceptibilidad como de la variabilidad en la resistencia a la infección mediante vacunación o tratamiento, además de la afectación de los nervios periféricos como modelo de compromiso neural lepromatoso en humanos.

Habitán zonas de América del Sur y Central y del centro sur de Estados Unidos. Son un reservorio natural del bacilo y pueden ser vehículo de propagación y exposición al bacilo, pero su impacto real en la transmisión de la enfermedad todavía no está bien determinado.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN

El diagnóstico actual de la lepra sigue basándose todavía en los mismos principios del siglo pasado. Los criterios empleados son clínicos, histológicos y bacteriológicos. En determinados casos, que no resultan muy bien definidos, el diagnóstico es susceptible a interpretaciones subjetivas y por tanto a error.

Métodos convencionales

Los métodos convencionales, que siguen representando la base del diagnóstico habitual de una lepra, son el examen microscópico con detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) a partir de la lesión u otras muestras y la prueba inmunodiagnóstica de la lepromina, como estudio de la respuesta inmune celular.

Todas las muestras clínicas remitidas para la determinación de una posible infección por *M. leprae* deben examinarse en busca de BAAR. La característica de ácido-resistencia, prácticamente exclusiva de las micobacterias, hace que el examen microscópico tenga una importancia fundamental. Tanto el método clásico de tinción de Ziehl-Neelsen como las técnicas con fluorocromos, se basan en la misma propiedad de retención bacteriana del colorante después de su exposición a un ácido-alcohol. El hallazgo de bacilos ácido-resistentes en las muestras sólo indicaría la presencia de micobacterias ya que no identifica la especie.

La baciloscopia, tanto de linfa procedente de lesiones activas, previamente activas o de aquellos puntos más habituales de albergar bacilos, como la de raspado nasal, por microscopía directa con objetivo de inmersión, presenta un límite práctico de detección mínimo de 10^4 bacilos BAAR/mL. Por tanto cualquier canti-

dad de bacilos inferior no serían detectados y como resultado se produciría un error diagnóstico. Es el límite de sensibilidad de la técnica y por tanto uno de sus inconvenientes.

La cantidad de bacilos que se encuentran con estas técnicas varía considerablemente, de acuerdo con los diferentes tipos de lepra y con la etapa de desarrollo de la misma. Para intentar estandarizar al máximo el sistema de determinar el número de bacilos en las preparaciones observadas al microscopio, se utilizan dos índices: el índice bacteriano (IB) y el índice morfológico (IM). El IB sigue una escala logarítmica de 0 a +6, que estima la cantidad de bacilos detectados en 100 campos microscópicos con objetivo de inmersión y previa tinción de la muestra por método de ácido-alcohol resistencia. Con un tratamiento efectivo el número de bacilos descende, junto con cambios en su forma. Estos cambios en la forma se miden con el IM que nos da la proporción de bacilos teñidos uniforme e intensamente (enteros) y considerados viables después de observar con el microscopio 100 bacilos de la muestra. La viabilidad de estos bacilos enteros se demuestra con su inoculación en almohadilla plantar de ratón, donde originan un crecimiento limitado que se observa con la inflamación en el sitio de inoculación y la obtención de bacilos en suspensiones procedentes de estas almohadillas después de sacrificar el animal a los 6-8 meses de la inoculación. Si la morfología de los bacilos no disminuye con el tratamiento es que el paciente no toma éste con regularidad o hay bacilos resistentes a la misma.

La prueba de la lepromina fue descrita por Mitsuda y Hayashi, quienes describieron en 1916 una reacción en enfermos de lepra por la inyección intradérmica de una emulsión rica en bacilos y que se hizo público durante el Congreso Internacional de Lepra de Estrasburgo de 1923. Las reacciones se observaban a los 21-28 días de la inoculación y eran positivas en todos los enfermos de Hansen paucibacilares y sin embargo negativas entre los multibacilares. También eran positivas en individuos sanos convivientes y no convivientes de enfermos de Hansen y se le atribuyó valor pronóstico y de clasificación del paciente de lepra en el espectro inmunológico de la enfermedad. Fernández, en 1940, observó una reacción a las 48 horas de la administración del antígeno, tipo hipersensibilidad retardada (DTH), que se correlacionaba casi totalmente con la tardía en los enfermos y algo menos en sanos no convivientes. En 1946, durante la 2.^a Conferencia Panamericana sobre la Lepra, celebrada en Río de Janeiro (Brasil), se denominó reacción de Fernández a la reacción de 48 horas y reacción de Mitsuda o leprominorreacción a la lectura tardía a las 3- 4 semanas.

Hasta 1960, la lepromina se obtenía de lepromas de pacientes con lepra lepromatosa. Estos lepromas se autoclavaban y el leproma resultante se homogeneizaba en mortero con un sistema de estandarización en base a su peso. La disponibilidad del material empleado, lepromas humanos, era escaso, variable e impredecible en su contenido bacilar. Desde 1975 se emplea lepromina obtenida de bacilos de *M. leprae* extraídos del hígado de armadillos ex-

perimentalmente infectados con un protocolo estandarizado de extracción y purificación, elaborado por la OMS, a una concentración aproximada de 4×10^7 bacilos/mL. Se inyecta 0.1 ml intradérmicamente en el antebrazo derecho de cada individuo y a los 21 días se mide la longitud en milímetros del diámetro del halo de induración.

La interpretación de los resultados es:

Negativa: ausencia de halo o este es inferior a 5 mm.

Positivo débil: halo eritematoso, infiltrado de 1 cm a 1.5 cm.

Positivo: igual halo de reacción, pero el eritema es de 1.5 a 2cm, llegando incluso a ulcerarse.

Métodos de diagnóstico actuales: serológicos y moleculares

A pesar de ser uno de los primeros patógenos descubiertos por el hombre en la actualidad, el *Mycobacterium leprae* sigue sin ser cultivable *in vitro*. El diagnóstico de rutina de la lepra sigue estando basado en el estudio de las manifestaciones clínicas del paciente y secuelas neurológicas asociadas.

En el diagnóstico de laboratorio, el examen histológico de las lesiones cutáneas confirma el cuadro clínico mediante la detección de BAAR. Aunque la histopatología, junto con la baciloscopia, tanto de lesiones cutáneas como de moco nasal, parecen adecuadas para el diagnóstico en la mayoría de los casos de lepra, la utilización de estas técnicas convencionales presenta el problema de falta de sensibilidad y especificidad, sobre todo cuando los síntomas clínicos son equívocos. Estas técnicas convencionales no permiten diferenciar las distintas especies de BAAR y además su límite inferior de detección por microscopía óptica es tan sólo de aproximadamente 10^4 BAAR/ mL. Cuando no se confirma la presencia de estos bacilos ácido-alcohol resistente en las lesiones, no se puede diagnosticar de manera definitiva lepra.

El no disponer de técnicas adecuadas ha dificultado el conocimiento de la transmisión de la enfermedad y de los principales reservorios de la infección. Resultaría deseable la identificación de individuos o grupos de población con alto riesgo de contraer la enfermedad aplicando alguna de las técnicas actuales de diagnóstico microbiológico. Tampoco se dispone actualmente de técnicas para el control y seguimiento de la multiterapia medicamentosa recomendado por la OMS para la detección precoz de resistencias. Debido a todos estos inconvenientes, en los últimos años se han intentado desarrollar métodos alternativos, tanto en el campo de la serología, para detectar respuestas humorales al disponer ya de antígenos específicos del bacilo, como con la aplicación de técnicas de amplificación de DNA genómico para la detección de fragmentos de DNA de *M. leprae* en la lesión, que resulten más sensibles y específicas en las diferentes formas de la enfermedad.

Métodos de diagnóstico serológico: potencial y limitaciones

Con los métodos serológicos se trata de detectar la respuesta humoral a los antígenos del *M. leprae*. Los estudios inmunológicos sobre la lepra indican que las distintas formas de la enfermedad presentan un espectro distinto. La lepra lepromatosa se caracteriza por ser muy bacilífera y presentar una respuesta inmunológica mediada por los linfocitos B, que puede ser policlonal y no específica, mientras que en la lepra tuberculoide se observan pocos bacilos en la lesión y la respuesta está fundamentalmente mediada por linfocitos T.

El intento de lograr un método rápido e incruento que solucione todos los problemas del diagnóstico de la lepra, algunos ya expuestos anteriormente, es lo que ha motivado desde principios de siglo la aplicación de los estudios serológicos sobre la lepra y otras micobacterias. *M. leprae* no ha podido ser cultivado "in vitro" y sólo desde 1971 ha sido cultivado en modelos experimentales en animales, lo que ha permitido un mejor reconocimiento bioquímico e inmunológico de sus características antigénicas. Con los métodos de detección directa sólo es posible diagnosticar cuando ya aparecen las manifestaciones y síntomas clínicos. La detección de infección subclínica por *M. leprae* resulta difícil, lo que constituye un problema importante para el estudio epidemiológico de la enfermedad. Aunque los tests serológicos utilizados hasta hoy día para la detección de respuestas humorales presentaban gran cantidad de reacciones cruzadas con otras micobacterias, ya se dispone de antígenos específicos mediante los cuales se obtienen respuestas especie-específicas. La mayoría de las pruebas serológicas empleadas en el diagnóstico de micobacterias utilizan una técnica capaz de medir la cantidad de anticuerpo que se une a un antígeno previamente seleccionado. Sin embargo, también hay otras en que se han utilizado anticuerpos para tratar de detectar los antígenos. En todos los casos el resultado va a depender de la técnica empleada, del antígeno seleccionado y del anticuerpo medido. La sensibilidad de estas técnicas dependerá fundamentalmente de la técnica empleada, mientras que la especificidad lo hará del antígeno. Los antígenos utilizados en el estudio serológico de la lepra han sido múltiples a lo largo del tiempo. De todos ellos el más específico es el glicolípido fenólico I (GLP-1) de *M. leprae* purificado por Brennan *et al.* Los tejidos infectados con *M. leprae* contienen grandes cantidades de GLP-1 que forman una cápsula amorfa alrededor del organismo, demostrándose que en almohadilla plantar de ratón el nivel de GLP-1 en tejidos corresponde aproximadamente a la cantidad de BAAR contenido en los mismos. Este antígeno se obtiene purificado en cantidades de miligramos de tejidos de armadillos infectados y disponible en cantidades suficientes para su uso en cribajes serológicos. La especificidad del antígeno es conferida por la porción trisacárida específica del GLP-1: 3,6 -di-O-metilglucosa, que constituye el epítipo inmunodominante que aporta una especificidad cercana al 100 %. Como el GLP-1 natural no es el más adecuado para trabajos de rutina por su estructura hidrofóbica, se han sintetizado glicoconjugados con estas estructuras

glucosídicas específicas. Así se sintetizó químicamente un disacárido-BSA (D-BSA), con una excelente reproductividad en los resultados con el GLP-1.

Los mejores resultados en la determinación de anticuerpos séricos en lepra se han obtenido mediante estudio de la cantidad de anticuerpo de tipo IgM que se liga al antígeno GLP-1, mediante la técnica ELISA, sobre todo en el grupo de pacientes de tipo multibacilar, y no es suficientemente sensible y por tanto adecuada para el diagnóstico y seguimiento de la lepra paucibacilar. Bühner-Sékula ha desarrollado una metodología para el análisis del PGL-1 sérico, con una sola gota de suero o sangre entera, basado en una inmunocromatografía (ML Flow Test) en placa. Por su facilidad técnica y presumible bajo coste puede constituir un gran avance en el campo de la serología.

Técnicas moleculares en el diagnóstico de la lepra

Al no ser el bacilo causal de la lepra actualmente cultivable *“in vitro”* mediante técnicas de rutina, los métodos de diagnóstico microbiológico convencional para micobacterias no resultan útiles para el diagnóstico definitivo de esta enfermedad, ni para la determinación de sensibilidades a los medicamentos en estos casos. Hasta 1960 la única fuente de bacilos era la de aquellos obtenidos a partir de biopsias de pacientes lepromatosos. Desde entonces hay que recurrir al modelo descrito por Shepard *et al.* de inoculación en almohadilla plantar de ratón como método para evaluar el posible crecimiento del bacilo como indicador de viabilidad del microorganismo.

Las nuevas técnicas moleculares de diagnóstico ofrecen en teoría varias ventajas potenciales como herramientas para la confirmación rápida de los aislamientos y detección directa de micobacterias en materiales clínicos, permitiendo por tanto el diagnóstico precoz de casos nuevos y ayudando a prevenir la aparición de resistencias a la multiterapia. Estas técnicas están teniendo especial aplicación en el diagnóstico de presencia de *M. leprae*, al ser este uno de los microorganismos no cultivables en rutina.

Durante estos últimos años y sobre todo después de la secuenciación del genoma del *Mycobacterium leprae* en el 2002, se han identificado distintas secuencias específicas de *M. leprae* a partir de las cuales se han desarrollado sondas de ácidos nucleicos para la demostración directa o amplificación de secuencias *M. leprae* específicas en distintas muestras clínicas de pacientes o contactos sanos. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy sensible por medio de la cual secuencias genómicas de DNA o RNA, que se encuentran en cantidades muy pequeñas, se pueden amplificar enzimáticamente incrementándose el número de fragmentos amplificables, de manera que es posible disponer de una cantidad de ácido nucleico suficiente para alcanzar un umbral límite de detección. La PCR y sus variantes consiguen una multiplicación exponencial de las secuencias de DNA o RNA, que va desde prácticamente una copia inicial hasta cantidades de magnitud mucho mayor. Entre sus distintas aplicaciones, la técnica se utiliza para detectar cantidades mínimas de ácido nucleico específico en muestras clínicas, en

las que se piensa que bacterias, virus u hongos tienen un papel causal. Esta tecnología se fundamenta en que cada organismo infeccioso posee una secuencia específica propia en su composición de DNA o RNA por medio del cual se le puede identificar y amplificar hasta un punto donde se puede detectar, empleando dos cebadores o "primers" que se acoplan a hebras opuestas del DNA diana desnaturizado y se polimeriza mediante la acción de una DNA polimerasa termoestable. Esta hebra DNA polimerizada pasa a ser la diana de la siguiente amplificación por medio de múltiples ciclos de desnaturalización, acoplamiento y extensión.

Los elementos necesarios para una reacción básica de PCR son: el dsDNA de la muestra, los oligonucleótidos cebadores o "primers" de cadena corta, la enzima de polimerización (Taq polimerasa), la mezcla de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato y una solución buffer en cuya composición figura como ión fundamental el Mg².

Los resultados obtenidos en distintos estudios con esta técnica revelan un gran potencial para la detección de DNA *M. leprae* por su mayor sensibilidad y especificidad en casos de lepra de tipo paucibacilar, infección subclínica o pacientes multibacilares ya tratados y todavía sin evidencia clínica de recidivas.

MÉTODOS Y MUESTRAS UTILIZADAS EN PCR PARA LA LEPPRA

Se han empleado numerosos genes en el desarrollo de protocolos PCR para la detección de *M. leprae* en muestras clínicas.

El análisis mediante 16SrRNA y PCR transcripción reversa permite evaluar la viabilidad post-tratamiento. La evaluación de estas técnicas ha revelado una especificidad del 100 % y sensibilidad del 34-80 % en pacientes paucibacilares y hasta del 90 % en las formas multibacilares.

Genes *M. leprae* utilizados para técnicas PCR

Gen: *hsp18, ag36, groEL*

Secuencias no codificantes: RLEP

rRNA: 16 Rrna

Utilidad y tipo de muestra para PCR *M. leprae*

Utilidad	Descripción
PCR útil	Pocos bacilos, historia clínica y otras circunstancias dudosas
PCR no indicado	Numerosos bacilos con Fite-Faraco o Ziehl Neelsen de buena calidad
Biopsia adecuada	Paciente nuevo o probable recidiva
Muestras válidas	Biopsia obtenida y procesada inmediatamente; congelada a -80°C; fijada en formalina al 10 % menos de 24 horas; en etanol 70 % a temperatura ambiente hasta 2 años.
Muestras no válidas	Muestras refrigeradas no congeladas y no fijadas

DETECCIÓN DE *M. LEPRAE* RESISTENTE A LA TERAPÉUTICA FARMACOLÓGICA

El estudio de las posibles resistencias del *M. leprae* frente a los principios activos de la multiterapia está limitado por la incapacidad de poder cultivar el bacilo en medios artificiales y depende de su inoculación y cultivo en las almohadillas plantares del ratón. Este método exige obtener del paciente una cantidad suficiente de organismos viables para inocular las almohadillas plantares de entre 20 a 40 ratones (dependiendo del número de principios activos a evaluar). Cada almohadilla debe recibir entre 5×10^3 y se obtienen resultados a los 6-12 meses. Se trata por tanto de una técnica fiable, pero muy lenta y laboriosa.

La primera técnica para un rápido cribaje de la sensibilidad bacteriana del *M. leprae* frente a los distintos principios activos empleados fue la radioespirometría (BACTEC y Buddemeyer). Estas técnicas están limitadas por el elevado número de bacilos viables necesarios ($\geq 10^7$).

Las técnicas de tipo molecular podrían simplificar la detección de la sensibilidad frente a los principios activos anti-*M. leprae*, reduciendo el número de bacilos necesarios y el tiempo de análisis. Estos métodos amplifican fragmentos específicos de DNA de las muestras clínicas mediante PCR y detectan mutaciones relacionadas con la resistencia. Se están utilizando actualmente:

- PCR directa y secuenciación del amplificado (la más definitiva, porque detecta el nucleótido en el gen diana donde aparece la resistencia).
- PCR-SSCP (se emplea sobre todo para detectar resistencias frente a la rifampicina).
- PCR-hibridación en fase sólida (para detección rifampicina *M. leprae* resistente).

BACILOSCOPIA

La investigación clínica del paciente con lepra, tanto para diagnóstico, clasificación o control de la respuesta al tratamiento depende fundamentalmente del examen de las baciloscopias y/o biopsias cutáneas. Para la realización de una baciloscopia hay que tener en cuenta los siguientes pasos:

1. Técnicas para la toma de muestras.
2. Tinción ácido-alcohol resistente.
3. Observación microscópica y clasificación.

TÉCNICAS PARA LA TOMA DE MUESTRAS

Selección de pacientes

1. Todos los pacientes nuevos.
2. Todos los pacientes positivos como seguimiento.

3. Ante cualquier sospecha de recidiva.
4. Todos los pacientes negativos bajo control.

Número de muestras por sesión

1. En pacientes activos el número mínimo de muestras: 2 (un lóbulo de la oreja + 1 lesión activa).
2. Si las lesiones han remitido se toman de los mismos sitios + el lóbulo.
3. Si no presenta lesiones: lóbulos + parte posterior antebrazos + justo encima de las rodillas.

Otros puntos a considerar:

- frente
- mejillas
- glúteos
- dedos

Frecuencia de la baciloscopia

Multibacilares y paucibacilares: 6 - 12 meses.

Toma de muestras

1. Con porta limpio y no rayado anotar fecha y registro del paciente.
2. Bisturí con cuchilla desechable. Si no es posible: limpiar con algodón humedecido en alcohol y pasar por mechero Bunsen 3 segundos.
3. Limpiar el sitio para la toma de muestra con algodón humedecido con alcohol.
4. Hacer un pliegue en la piel con los dedos índice y pulgar hasta que la piel se torne pálida y continuar con presión mientras se toma la muestra.
5. La incisión es de aproximadamente 5 mm. De largo por 2-3 mm de profundidad. Girar cuchilla en ángulo recto (perpendicular a incisión y extraer una cantidad visible y adecuada de tejido linfático de los lados y fondo de la incisión. Repetir 2-3 veces.
6. Extender el fluido linfático con la punta del bisturí sobre el porta cubriendo un área de 5-7 mm de diámetro con movimiento circular.
7. Si la lesión sangra, cúbrala con una compresa seca y esparadrapo.
 - Hay que intentar no recoger sangre o que ésta sea lo más mínimo posible.

Frotis nasal

El mejor sistema es con un aplicador (torunda) de algodón bañado en un suero fisiológico. Se sienta al paciente con la cabeza extendida hacia atrás y el

mentón hacia arriba de forma que se pueda ver el tabique nasal. Si hay mucho moco en la nariz el paciente debe sonarse sobre una hoja de celofán o plástico. Se frota la parte superior del tabique nasal con la torunda realizando movimientos giratorios y se deposita la muestra en un porta, extendiéndola sobre la misma.

Tinción Ziehl-Neelsen (ácido alcohol resistente):

A) En caliente:

1. Extensión, secado y fijación de la muestra sobre el porta.
2. Cubrir el porta con solución de fucsina fenicada (filtrada recientemente a través de papel de filtro en un embudo).
3. Calentar con un quemador humedecido en alcohol el porta hasta emisión de vapores.
No permitir que la fucsina hierva.
4. Repetir esta operación 3 veces cada 5 minutos.
5. Lavar abundantemente con agua.
6. Decolorar con alcohol clorhídrico (10 segundos) y enjuagar inmediatamente de nuevo con agua.
7. Cubrir el porta con solución de azul de metileno (3 minutos).
Los gérmenes ácido-alcohol resistentes aparecen de color rojo intenso.

B) En frío:

Dejar la fucsina en el porta por espacio de 30 minutos a la temperatura ambiente, procurando que la baciloscopia esté siempre cubierta.

Después lavar y proseguir igual que con método en caliente.

Reactivos

Ácido-alcohol

Para preparar el reactivo ácido-alcohol se diluyen 665ml. de etanol 95 % en 285 ml. de agua destilada y después hay que añadir lentamente y con cuidado 9.5 ml. de ácido clorhídrico (HCL) concentrado.

USO DEL MICROSCOPIO

El examen microscópico se efectúa con un microscopio de campo claro con oculares de 10x y objetivo de 100x, con aceite de inmersión, buscando zonas bien coloreadas y examinando por lo menos 100 campos con movimientos horizontales y en zig-zag y se analizan los denominados índice bacteriológico (IB) e índice morfológico (IM).

NÚMERO DE BACILOS EN LAS BACILOSCOPIAS

Índice Bacteriológico

La cantidad o número de bacilos varía considerablemente de acuerdo con los diferentes tipos de lepra, con la fase en que se encuentra la enfermedad y el período de tratamiento. La cantidad de bacilos o densidad de bacilos en la lesión, basada en el recuento de BAAR se denomina Índice Bacteriológico (IB). Se han empleado diversos y variados índices, como método de Hanks, Índice Dharmendra y el método Shepard y McRae, pero el más fiable y recomendado por la OMS es el Índice Bacteriológico Logarítmico de Ridley.

Así el IB utilizado siguiendo los criterios de la OMS se evalúa calculando la concentración de BAAR en un número determinado de campos microscópicos, de frotis tomados de las partes más representativas del paciente (lóbulo de las orejas, frente, antebrazo, falange proximal de dedos, borde de lesiones, etc...). Se representa por un número de 0 a 6 cada uno, con una carga bacilar 10 veces superior al número inmediatamente inferior. El IB final de cada paciente es el promedio de los IB en los puntos tomados.

Índice Bacteriológico (IB) de Ridley recomendado por la OMS

- 0:** no hay bacilos en ninguno de los 100 campos observados con aceite de inmersión.
- 1+:** 1-10 bacilos promedio en 100 campos.
- 2+:** 1-10 bacilos promedio en 10 campos.
- 3+:** 1-10 bacilos promedio en cada campo.
- 4+:** 10-100 bacilos promedio por campo.
- 5+:** 100-1000 bacilos en cada campo.
- 6+:** > de 1000 bacilos por campo.

Índice Morfológico (IM)

Se utiliza para describir la forma del bacilo en la baciloscoopia después de aplicar la tinción para bacilos ácido-alcohol resistente y su relación con la viabilidad del microorganismo observado. Se considera IM el porcentaje de bacilos enteros observados en frotis sobre el total de bacilos enteros y no enteros, expresado en tanto por cien. Aún en los casos de pacientes lepromatosos sin tratamiento, el IM no suele sobrepasar el 20 %.

El IM utilizado se basa en los trabajos de Rees y Valentine en 1962 que, comparando bacilos con microscopía óptica y electrónica, llegaron a la conclusión de que cada bacilo que aparece no uniformemente teñido con microscopía de campo claro sería no viable, al observarlo mejor con microscopía electrónica.

Esto lo confirmaron con la inoculación de bacilos en la almohadilla plantar (MFP) para ver su viabilidad, comprobándose por Shepard que el éxito de la inoculación de *M. leprae* en MFP dependía no de la cantidad mínima de microorganismos sino de la proporción de organismos teñidos enteros (viables) sobre el total de microorganismos observados o IM, aplicándose entonces el Índice Morfológico (IM).

En 1976 Ridley facilitó aún más el tema mediante la descripción de los porcentajes en sólidos-fragmentados-granulosos (SFG) en base a la siguiente pauta: Se selecciona una parte bien coloreada, con un alto número de bacilos aislados y se examinan al menos 100 microorganismos, moviendo el porta en forma horizontal y en zig-zag. Se examinan sólo aquellos bacilos que se encuentran realmente separados, no los que forman parte de globis. Se va anotando el número de bacilos que se encuentran teñidos en toda su extensión de forma intensa e uniforme (bacilos "S" o enteros). El porcentaje de estos enteros o "S" con relación al número total de bacilos examinados es el Índice Morfológico (IM).

Además los bacilos enteros se dividen en: i) fragmentados (F) que incluyen dos tipos: los que presentan pequeñas zonas no teñidas aunque en la mayor parte del mismo la tinción sea uniforme y los que son más cortos de manera que generalmente no se tiñen profundamente; ii) granulados (G) que incluyen aquellos bacilos que muestran dos o más áreas no coloreadas a través de todo su ancho. Los resultados expresan los números y porcentajes de bacilos sólidos (S), fragmentados (F) y granulados (G) en forma separada.

BIBLIOGRAFÍA

- Brennan PJ and Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. *Int J Leprosy* 1980; **48**:382-387.
- Bührer-Sékula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, and Oskam L. Simple and fast Lateral Flow Test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. *J.Clin. Microbiol* 2003; **41(5)**:1991-1995.
- Laboratory Techniques for Leprosy. OMS 1987.
- Leiker DL y McDougall AC. Guía técnica para examen de la baciloscopia en lepra por microscopia directa. INFOLEP 1985; 14-16.
- Luque J y Herráez A. Hibridación de ácidos nucleicos. Biología Molecular e Ingeniería Genética Ed. *Harcourt* 2001; 164-193.
- Marques MA, Espinosa BJ, Xavier da Silveira EK, Pessolani MC, Chapeaurouge J, Perales KM, Dobos JT, Belisle JS, Spencer JS and Brennan PJ. Continued proteomic analysis of *Mycobacterium leprae* subcellular fractions. *Proteomics* 2004; **4**:2942-2953.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, and Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews* 2006; **19(2)**:338-381.

- Shin YC, Lee H, Lee G, Walsh GP, Kim JD and Cho SN. Variable numbers of TTC repeats in *Mycobacterium leprae* DNA from leprosy patients and use in strain differentiation. *J. Clin. Microbiol.* 2000; **38**:4535-4538.
- The Immunology of Leprosy. : Hastings RC. Edition Leprosy. Edinburgh: Churchill Livingstone 1985; 53-87.
- Williams DL, Torrero P, Wheeler RW, Truman RW, Yoder N, Morrison N, Bishai WR and Gillis TP. Biological implications of *Mycobacterium leprae* gene expression during infections. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2004; **8**:58-72.

Clínica y Diagnóstico

Palit A, Inamadar, AC. Lepra histoide como reservorio de la enfermedad; un desafío para la eliminación de la lepra. [*Histoid leprosy as reservoir of the disease; a challenge to leprosy elimination*] *Lepr Rev* 2007; 78(1):47-9.

Resumen:

La lepra histoide es una forma poco frecuente de la lepra multibacilar caracterizada por una clínica, histopatología, bacteriología e inmunología particulares. Es bastante extraña y se presenta sobre todo en pacientes con lepra que han recibido monoterapia con dapsona en el pasado. Sin embargo, se ha detectado en pacientes sin tratamiento previo, como manifestación de recidivas después de años de haber completado un tratamiento adecuado de MDT y en pacientes HIV con inmunosupresión severa. Como la carga bacteriana en estos pacientes es muy elevada, puede constituir un reservorio de la enfermedad.

La continua detección de lepra histoide en zonas de baja endemia y en áreas donde la lepra ha sido declarada como eliminada es motivo de preocupación.

Singal A, Mehta S, Pandhi D. Co-existencia de lepra y psoriasis: una presentación poco frecuente. [*Co-existent leprosy and psoriasis: an unusual presentation*]. *Indian J Lepr* 2006; 78(4):371-2.

Resumen:

Desde tiempo inmemorable la asociación entre lepra y psoriasis ha sido motivo de debate ya que algunas personas consideraban la psoriasis como una forma de lepra. Aunque si que hay informes sobre asociaciones entre distintas condiciones cutáneas y lepra, la asociación lepra-psoriasis es poco frecuente (Pavithran, 1992). Sugathan y Riyaz (1990) son los primeros en documentar esta asociación y desde entonces sólo ha habido informes de casos esporádicos y aislados. Informamos de esta infrecuente asociación de dos afectaciones relativamente comunes.

Epidemiología y Prevención

Chumin S, Zheng Y, Zheng M, Wang D. Estudio sobre la detección de lepra en una situación poco endémica, condado de Zhucheng, provincia de Shandong, Repú-

blica Popular China. [*Rapid survey on case detection of leprosy in a low endemic situation, Zhucheng County, Shandong Province, The People's Republic of China*]. *Lepr Rev* 2007; 78(1):65-9.

Resumen:

La prevalencia de la lepra disminuyó a menos de 1 por 100,000 en la provincia de Shandong en 1994. Desde entonces se han detectado algunos casos incipientes en la zona durante los últimos 10 años. Para averiguar si la reducción es porque se han dejado de aplicar programas activos de detección de casos, se llevó a cabo un estudio de las aldeas en un condado anteriormente endémico, mediante un servicio de enfermedades cutáneas. Se cribaron noventa y una aldeas de 23 ciudades, con una población total de 104,885. No se detectaron casos de lepra. Los resultados, junto a otras evidencias como la proporción mayor de MB/PB entre los nuevos casos detectados e inicio tardío de la enfermedad, sugieren que la lepra se está eliminando en el condado, así como en la provincia de Shandong. Los esfuerzos del programa de control de la lepra deben cambiar a otros servicios como prevención de discapacidades y cuidados de las discapacidades.

General e Historia

Gómez JL. México o el conocimiento de la lepra. Parte III: La conquista. *Arch. Argent. Dermatol.* 2007; 57(1):39-40.

Resumen:

La conquista de México es un tema del que no se habla habitualmente en ese gran país de América Central, porque así como el color de las laderas de los volcanes en las diferentes horas del día es parte del paisaje del altiplano, ese hecho profundo y trágico ya está incorporado al espíritu de la gente.

Atraído por este paisaje interior, en mi "Viaje de un leprologo" me desvié un poco de la ruta central conducente a la lepra, para echar una mirada rápida y dolorosa a esa circunstancia decisiva para la historia de México. Entre el humo y el fuego de los recuerdos, hice un pequeño trayecto a pie por esos senderos ruinosos de su pasado.

Noto S, Clapasson A, Di Negro G, Broganelli P, Pippione M, Nunzi E. La enfermedad de Hansen en el Piamonte y el Valle de Aosta. [*Hansen's disease in Piedmont and the Aosta Valley*]. *G Ital Dermatol Venereol* 2007; 142(1):49-52.

Resumen:

La Torre de los Leprosos de Aosta recuerda la presencia de la enfermedad en la Italia del noroeste al principio del siglo diecinueve. En 1897, durante la primera Conferencia Internacional de Lepra, el delegado italiano, Pelizzari, informó de 13 casos de lepra diagnosticados por el Departamento de Dermatología de la Universidad de Turín. En su lectura "Epidemiología y profilaxis de la lepra en Italia", de 1953, Manca Pastorino informa de la presencia de pacientes de lepra en 9 pueblos del Piamonte, mientras que en 1947 se informaron de casos en 15 pueblos. En 1977, se reportaron 16 casos de lepra en el Piamonte, 8 autóctonos; se les clasificó como 15 lepromatosos y 1 tuberculoide. Desde 1990 a 2005 la presencia del Centro de Referencia Nacional para la Lepra en Génova, permitió una clasificación más fiable: de los 8 casos, 6 son borderline y 2 lepromatosos. Dos de estos pacientes son autóctonos y 6 importados. Como en otras regiones italianas, hay un incremento de casos importados; los 2 pacientes autóctonos son del sur de Italia. Hay un caso importado que presenta histopatología de la tuberculoide borderline (BT) y una carga bacilar compatible con la forma borderline lepromatosa (BL), esta aparente inconsistencia es causada por la presencia de una reacción de tipo 1 de carácter decreciente.

Porichha D. El problema de la lepra – devuelto a los dermatólogos. [*The leprosy problem – back to the dermatologists*]. *Lepr Rev* 2007; 78(1):22-5.

Resumen:

Su naturaleza incurable, junto a los mitos y misticismos, mantuvo a la lepra lejos de las corrientes principales de la medicina. Por motivos similares, los expertos en salud pública también permanecieron lejos del problema, dejando la mayor parte del trabajo para los trabajadores sociales y algunos especialistas en lepra. Fue la llegada de un tratamiento efectivo, la dapsona, y posteriormente la MDT, que consiguieron que se tratara la lepra en términos de salud pública, con énfasis sobre la detección de casos y tratamiento. Por tanto, el concepto de salud pública con su impacto es un fenómeno reciente en el largo transcurso de la erradicación de la enfermedad. El problema de la lepra que exigía una mejor percepción en las siguientes áreas era a) estigma sobre la lepra, b) necesidad de aclarar el gran número de casos atrasados, c) compromiso de gran cantidad de ONGs y d) disponibilidad de fondos. A todo esto se puede añadir la necesidad de afrontar el tema de la resistencia a la dapsona.

La OMS presentó una rápida respuesta a la amenaza de resistencia a la dapsona, movilizando los desarrollos científicos actuales y desarrollando una estrategia MDT mediante un proyecto piloto sobre MDT en Alemania del Profesor Freckson, del Instituto Borstel, y llevado a cabo en Malta 10 años antes de las recomendaciones de la OMS. Sobre todo, la MDT servía para situar la lepra en la corriente principal de la medicina. Sea mediante pautas farmacológicas cortas o

largas, o incluso de dosis única de MDT; ya se han tratado más de 14 millones de personas desde 1985 hasta inicios de 2005, con hasta el momento pocos informes de recidivas.

Ryan TJ. Dermatología comunitaria incluyendo la lepra: su pasado, presente y futuro. [*Community dermatology inclusive of leprosy: its past present and future*]. *Lepr Rev* 2007; 78(1):7-10.

Resumen:

Actualmente, se están recopilando los archivos de la historia de la lepra y su historia global en Oxford. Se alberga una colección de documentos y libros en la librería histórica de Sir William Osler bajo el encabezamiento de "Salud Pública antes y después de Osler" y se puede encontrar la historia de la lepra en <http://www.leprosyhistory.org>. Una característica sorprendente de los antiguos libros es su atención al nombre "Lepra" y la evolución no sólo de la lepra, sino de otros diagnósticos diferenciales del siglo dieciocho y diecinueve como la psoriasis. Incluso en el siglo veinte, el desarrollo con gran interés en Oxford llevado a cabo por Weddell fue la invención de la piel primero en psoriasis y después en lepra, en reuniones conjuntas con Weddell, Cochrane, Browne, Rees y otros sobre la lepra, en el Anexo del edificio Cochrane y el trabajo de Colin McDougall en el Departamento de Dermatología.

Inmunopatología

Dhanya NB, Sundaram VS, Rai R, Surendran P, Kumar PN, Matthai J, Srinivas CR. Síndrome de dapsona con reacción leucemoide. [*Dapsone syndrome with leukemoid reaction*]. *Indian J Lepr* 2006; 78(4):359-63.

Resumen:

La dapsona es un derivado de la sulfona usada en el tratamiento de la lepra y otras condiciones dermatológicas. Se sabe que origina tanto efectos adversos farmacológicos como idiosincrásicos (Russell y Hall, 2002). La toxicidad hematológica está relacionada con el metabolito N-hidroxil de la dapsona (Russell y Hall, 2002). Un efecto adverso más severo asociado con la dapsona es el "síndrome de la dapsona" y "síndrome sulfona" inicialmente descritos como erupciones infecciosas tipo-mononucleosis en pacientes tratados para lepra lepromatosa (Prussick y Shear, 1996; Frey *et al*, 1981). El síndrome se caracteriza por fiebre, erupción eritematosa generalizada, linfadenopatía, hepatitis y ocasionalmente agranulocitosis (Russell y Hall, 2002). Se describe un caso de síndrome dapsona con reacción leucemoide.

Duarte Deps P, Azevedo de Paula Antunes, JM, Tomimori-Yamashita J. Detección de la infección por *Mycobacterium leprae* en armadillos salvajes de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) mediante el test rápido ML Flow. [*Detection of Mycobacterium leprae infection in wild nine-banded armadillos (Dasypus novemcinctus) using the rapid ML Flow test*]. Rev Soc Bras Med Trop 2007; 40(1):86-7.

Resumen:

Se investigó la infección por *Mycobacterium leprae* en armadillos del estado de Espírito Santo, Brasil. Se efectuó el test ML Flow sobre 37 armadillos de nueve bandas y se hallaron resultados positivos en 11 (29.7%). Esta técnica se puede utilizar para identificar posibles fuentes de *Mycobacterium leprae* en armadillos salvajes.

Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duración, combinación y coordinación: el modelo de integración de la señal de la activación de las células dendríticas. [*Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation*]. Trends immunol 2007; 28(5):227-33.

Resumen:

La activación de células dendríticas en reposo (CD) constituye un paso crucial en la iniciación de la inmunidad adaptativa, porque enlaza los eventos periféricos iniciados con el encuentro del bacilo patógeno con la activación y expansión de los linfocitos T antígenos específicos de los órganos linfoides secundarios. Se sabe que hay muchos compuestos microbianos y señales endógenas que inician la activación CD y que hay distintas clases de subgrupos CD que inducen distintos tipos de respuestas inmunológicas. En esta revisión, nos centralizamos en cómo distintos aspectos de la maduración CD están regulados no sólo por la naturaleza del estímulo de maduración CD, sino también por su duración, combinación y coordinación, y proporciona una visión global de cómo distintos modos de activación de CD pueden afectar las respuestas celulares T.

Ottenhoff THM. Sección especial: Forum sobre inmunología: Genética del huésped y las enfermedades micobacterianas. [*Special section: Forum in immunology: Host genetics and mycobacterial infectious diseases*]. 1 *Microbes and Infection* (2006) 8 (4) 1117-1188 Amsterdam, Netherlands; Elsevier [En]. Indian J Lep 2006; 78(4):377.

Resumen:

Este número presenta 9 trabajos sobre factores genéticos que afectan la susceptibilidad del huésped a las enfermedades micobacterianas. La primera parte

(3 trabajos) revisa los planteamientos que abarcan todo el genoma para identificar factores genéticos del huésped en enfermedades infecciosas micobacterianas, incluyendo la tuberculosis y la lepra. La segunda parte (4 artículos) describe infecciones graves micobacterianas poco frecuentes resultantes de desórdenes genéticos únicos, incluyendo defectos en la señalización dependiente del factor KB nuclear, señalización interferon-g y IL-12/IL-23-dependiente. La tercera parte (2 artículos) revisa las lecciones aprendidas de los modelos animales en infecciones intracelulares. Se pretende ofrecer a los lectores una mejor comprensión de los factores genéticos del huésped que controlan la inmunidad humana y susceptibilidad a la enfermedad a las micobacterias e infecciones relacionadas.

Rehabilitación

Malaviya GN. Prevención de disfunciones y discapacidades en la lepra después de la integración: papel de la medicina de tipo físico y la rehabilitación personal. [*Prevention-of-impairment-and-disabilities activities in leprosy alter integration: role for physical medicine and rehabilitation personnel*]. Indian J Lepr 2006; 78(4):347-57.

Resumen:

Las opciones de derivar pacientes para cuidados especializados en el campo de las afectaciones y disfunciones son imperativas en orden de disponer de un sistema integrado para el control de la lepra. Esto requiere entender la enfermedad, además de conocimientos especiales para controlar las discapacidades específicas. El personal de medicina física y rehabilitación (PMR) es el más preparado para manejar las discapacidades relacionadas con la lepra. Están preparados para tratar los aspectos biomédicos de las deformidades y están cualificados para facilitar escayolas, ortopedia, etc. a las personas necesitadas y puedan evaluar las funciones de sensibilidad motora y las deformidades. Si se capacita al personal PMR en la corrección de deformidades, puede ser un importante recurso para el cuidado secundario y terciario de las personas afectadas de lepra.

El personal PMR puede ser voluntarios para estos puestos y rellenar el vacío creado por la desaparición de los cirujanos en lepra. También, tendrán la responsabilidad adicional de capacitar al personal sanitario general para que puedan atender las necesidades de los afectados por la lepra, muchos de los cuales necesitarán ayuda en el futuro.

Deseamos y agradecemos el envío regular de Revistas dedicadas a Medicina
Con gusto aceptamos el canje con las que lo deseen. Los envíos han de dirigirse a:
revista de LEPROLOGÍA. – Biblioteca Médica. Sanatorio San Francisco de Borja.
03791, Fontilles (Alicante) España

Recibimos ya las siguientes publicaciones que recomendamos a nuestros lectores

ESPAÑA

- 1.—Actualidad dermatológica — Barcelona
- 2.—Anales de la Real Academia Nacional de Medicina — Madrid
- 3.—Anales del Instituto Barraquer — Barcelona
- 4.—Anàlisi Epidemiològica Setmanal — Valencia
- 5.—Archivos de la Facultad de Medicina de Zaragoza — Zaragoza
- 6.—Atención Farmacéutica. *Revista Europea de Farmacia Clínica*..... — Barcelona
- 7.—Boletín Epidemiológico Semanal — Madrid
- 8.—Boletín Informativo de la Fundación “Juan March” — Madrid
- 9.—Ciencia Forense — Zaragoza
- 10.—Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica — Barcelona
- 11.—Evidence-Based Medicine — Madrid
- 12.—Farmacéutico, El — Barcelona
- 13.—Gaceta Médica de Bilbao..... — Bilbao
- 14.—Geriatría..... — Madrid
- 15.—Inmunología..... — Barcelona
- 16.—Investigación Clínica..... — Granada
- 17.—Labor Hospitalaria..... — Barcelona
- 18.—Medicina Clínica..... — Barcelona
- 19.—Medicina de Rehabilitación — Madrid
- 20.—Microbiología Clínica — Madrid
- 21.—Noticias Médicas — Madrid
- 22.—Nutrición Clínica — Madrid
- 23.—Obstetricia Ginecológica — Barcelona
- 24.—Oncología..... — Barcelona
- 25.—Panorama Actual del Medicamento — Madrid
- 26.—Psiquis — Madrid
- 27.—Revista de la Universidad de Navarra..... — Pamplona
- 28.—Revista Española de Medicina, Educación Física y Deporte..... — Madrid
- 29.—Revista Española de Neurología — Madrid
- 30.—Revista Española de Salud Pública — Madrid
- 31.—Siete Días Médicos..... — Madrid
- 32.—Tiempos Médicos..... — Madrid
- 33.—Todo Hospital — Barcelona

EXTRANJERO

- 1.—American Leprosy Missions..... — New York (USA)
- 2.—Amici dei Lebbrosi..... — Bologna (Italia)
- 3.—Archivos Argentinos de Dermatología..... — Buenos Aires (Argentina)
- 4.—Biomédica — Bogotá (Colombia)
- 5.—Bulletin de l'Academie Nationale de Médecine..... — París (Francia)
- 6.—Bulletin de l'ALLF..... — Bordeaux (Francia)
- 7.—Bulletin of the World Health Organization..... — Geneve (Suiza)
- 8.—Chinese Journal of Dermatology — Nanking, Jiangsu (China)
- 9.—Dermatología e Venereologia — Torino (Italia)
- 10.—Dermatología Revista Mexicana..... — México (México)
- 11.—Hansenologia Internationalis..... — Sao Paulo (Brasil)
- 12.—Indian Journal of Leprosy — New Delhi (India)
- 13.—Japanese Journal of Leprosy — Tokio (Japón)
- 14.—Lepra Mecmuasi — Cebici-Ankara (Turquía)
- 15.—Leprosy Review..... — London (UK)
- 16.—Medecine Tropicale..... — Marseille (Francia)
- 17.—Miteinander — Würzburg (Alemania)
- 18.—Revista Argentina de Dermatología..... — Buenos Aires (Argentina)
- 19.—Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical..... — Sao Paulo (Brasil)
- 20.—Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo — Sao Paulo (Brasil)
- 21.—The Star — Carville (USA)
- 22.—Tuberculosis — Amsterdam (Holanda)

A LOS SEÑORES EDITORES

Se publicará en esta revista médica una nota bibliográfica de todas las obras que se nos remitan ejemplares

Respuesta comercial
Autorizaci n n m. 13654
B.O. de correos
(fecha: 04-11-94)

No
necesita
sello



Apartado 112 FD- 46080 Valencia



**Biblioteca Médica del Sanatorio San Fco. de Borja
03791 Fontilles (Alicante)
España**

**Tel. 965 58 33 50
Fax. 965 58 33 76
biblioteca@fontilles.org**

Nombre/ Name

Apellidos/ Surname

Dirección/ Address

Población/ City C.P/ P.O.Box

País/ Country

e.mail: Teléfono/ Phone

N.I.F/ Passport number

- Suscripción anual a la Revista Leprológica**
- España 30 /año Extranjero vía ordinaria 42 /año
 vía aérea 60 /año
- Solicitud del número... atrasado**
- España 8 Extranjero 16

Forma de Pago

- Contrareembolso
 Cheque bancario a nombre de Fontilles
 Transferencia bancaria

2090 0051 31 0040002687
Caja de Ahorros del Mediterráneo

fecha y firma