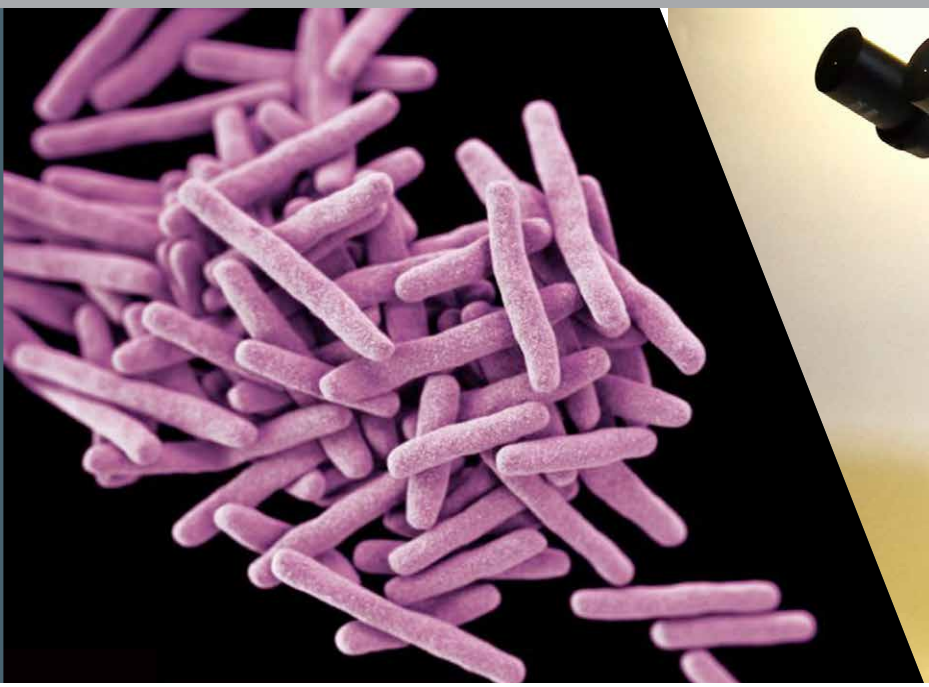
Organización Panamericana de la Salud

Organización Mundial de la Salud
OFICINA REGIONAL PARA LAS Américas

TESÃI HA TEKO PORÃVE MOTENONDEHA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL

TETÃ REKUÁI GOBIERNO NACIONAL
Jajapo ñande raperã ko´ãga guive
Construyendo el futuro hoy

MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL



DE LEPRA

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA LEPRA

EDICION I • AÑO 2017

Ministerio De Salud Pública Y Bienestar Social

DR. ANTONIO BARRIOS
Ministro de Salud Pública y Bienestar Social

DRA. MARIA TERESA BARÁN
Viceministra de Salud

DRA. ÁGUEDA CABELLO
Directora General de Vigilancia de la Salud

DRA. ESTELA QUIÑONEZ DE MEZA
Directora de Enfermedades Transmisibles

DRA. VICTORIA ALVARENGA DE MORRA
Directora del Programa Nacional de Control de la Lepra

Este Manual de diagnóstico laboratorial de lepra, del Programa Nacional de Control de la Lepra, sigue básicamente los delineamientos de la OPS/OMS.

Participaron en su realización, el equipo de trabajo del Programa Nacional de Control de la Lepra, y los consultores de la OPS/OMS, Dr. Santiago Nicholls, Dr. Aragon, a quienes agradecemos su colaboración.

La idea final es que este Manual se constituya en un instrumento de orientación, que ayude a todo el personal de laboratorio.

AUTOR

BIOQ. JOSÉ PEREIRA BRUNELLI
Bioquimico del Laboratorio de microbiología CED/PNCL

COMISIÓN DE REDACCIÓN

DRA. VICTORIA ALVARENGA DE MORRA
Directora del Programa Nacional de Control de la Lepra – MSPBS

DRA. MERCEDEZ ALVAREZ DE OVELAR
Jefa del Laboratorio de Microbiología del Programa Nacional de Control de la Lepra

DR. JOSÉ PEREIRA BRUNELLI
Bioquímico del Laboratorio de Microbiología del Programa Nacional de Control de la Lepra

El Manual de Diagnostico laboratorial del Programa Nacional de Control de la Lepra, ha contado con la cooperación técnica y financiera de la OPS/OMS.

Imágenes y fotografías: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.

Diseño editorial: DR Creativo

Corrección:

Paraguay 2017

INDICE

PRESENTACIÓN 7

INTRODUCCIÓN 9

1. CONSIDERACIONES GENERALES DE LA LEPRA

1.1. Agente Etiológico 11

1.2. Clasificación Clinica 11

1.3. Clasificación Operacional 13

1.4. Signos y Síntomas de la Lepra 13

2. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.1. Baciloscopía 14

2.1.1. Procedimiento 14

2.1.2. Materiales necesarios 14

2.1.3. Toma de muestra 15

2.1.4. Fijación 15

2.1.5. Acondicionamiento y transporte 16

2.1.6. Coloración del frotis por el método de Ziehl-Neelsen a frío 16

2.1.7. Observación microscópica 16

2.1.7.1. Índice Bacteriológico (IB) 17

2.1.7.2. Índice Morfológico (IM) 17

2.1.7.3. Bacilos Solidos 17

2.1.7.4. Bacilos Fragmentados 18

2.2. reacciÓN eN cadeNa de la PolimeraSa (Pcr) 19
2.2.1. Fundamento 20
2.2.1.1. PCR en tiempo real 20
2.2.2. Procedimiento 20
2.2.3. Materiales necesarios 20
2.2.4. Toma y envío de muestras 20
2.2.5. Interpretación de resultados 21

2.3. Vigilancia de la resistencia antimicrobiana en lepra 21
2.3.1. Objetivos 22
2.3.2. Métodos de detección de resistencia a drogas 22
2.3.3. Definiciones y procedimientos 23
2.2.3.1. Pacientes incluidos en el estudio 23
2.2.3.2. Materiales necesarios 23
2.2.3.3. Toma y envío de muestras 23
2.2.3.4. Reporte de resultados 23

ANEXOS 25
Ficha para envío de material de Baciloscopía 25
Ficha de envío de muestras para PCR y Resistencia antibiótica (página 1) 26
Ficha de envío de muestras para PCR y Resistencia antibiótica (página 2) 27
Reporte de resultado de Baciloscopía 28
Preparación de reactivos para Baciloscopía 29

BIBLIOGRAFIA 30

PRESENTACIÓN

Las enfermedades causadas por las micobacterias, en la actualidad aquejan a millones de personas en el mundo, siendo la Lepra o Mal de Hansen, una de las enfermedades más antiguas, y en nuestro país de interés en Salud Pública.

Desde el punto de vista epidemiológico llama la atención que el descenso mundial de la prevalencia de la Lepra no se ha acompañado de un descenso de su incidencia, o sea que no se haya podido prevenir la transmisión de la enfermedad, pese a que se ha adoptado la poliquimioterapia en los Programas, con un seguimiento muy estricto.

El diagnóstico Bacteriológico contribuye a la clasificación de casos nuevos, a determinar el grado de contagiosidad de cada caso, al monitoreo del tratamiento y al control de los contactos.

Una parte importante de la vigilancia y diagnóstico de los casos de lepra lo constituye el Laboratorio que sirve como apoyo para la confirmación y clasificación de los casos.

INTRODUCCIÓN

La lepra, o enfermedad de Hansen, es una enfermedad bacteriana antigua que, aunque es curable, sigue siendo un problema de salud en muchas partes del mundo. La lepra es causada por el bacilo *Mycobacterium leprae*, que produce una infección crónica en humanos que afecta principalmente a los nervios periféricos y la piel, requiriendo de la participación de factores inmunogénicos para el desarrollo de la enfermedad, pero también puede afectar a sitios como los ojos, las membranas mucosas, los huesos y los testículos y produce un espectro de fenotipos clínicos.

La lepra es de notificación obligatoria, curable, sin secuelas en sus estadíos iniciales, pero invalidante y discapacitante en sus estadios avanzados o dejados a la evolución natural. El *Mycobacterium leprae* es de baja virulencia. Para contagiarse de la lepra se precisa:

a) Convivir con el paciente por años.

b) Estar genéticamente predispuesto para adquirir la enfermedad.

Dado que los aspectos bioepidemiológicos dan como resultado varias manifestaciones clínicas y complicaciones, se requiere un método diagnóstico para confirmar la enfermedad y su correcta clasificación para asegurar el tratamiento adecuado. Sin embargo, es extremadamente difícil detectar Mycobacterium leprae en un individuo a inicios de la enfermedad y se utilizan varios criterios clínicos y laboratoriales en ausencia de un examen definido como "patrón oro"2. La baciloscopía, el examen histopatológico, la serología y la reacción en cadena de la polimerasa se utilizan con mayor frecuencia para el diagnóstico de la lepra3.

Las principales zonas endémicas del planeta son el sur y sureste de Asia, África Central Tropical, América Central y Sudamérica, donde según la Organización Paramericana de la Salud (OPS), para estas 2 últimas zonas, las tasas notificadas oscilan entre 0,1-14,0 x 10 000 habitantes4.

En Paraguay el Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, la Asociación Alemana de Ayuda al Enfermo de Lepra y Tuberculosis (DAHW), la OPS y el Comité de Iglesias Mennonitas del Paraguay, han conseguido reducir la tasa de prevalencia a menos de 1 caso por 10.000 habitantes.

Este logro, sin embargo, no debe conducirnos a bajar la dinámica de las actividades de control, ya que el número de casos nuevos por año se mantiene estable y en varias regiones sanitarias la cobertura de algunos distritos se completó recién en el año 2005**5**.

Los diferentes exámenes laboratoriales son de suma importancia no sólo para un diagnóstico certero y temprano de la enfermedad, sino también aportan para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades dermatoneurológicas, casos sospechosos de recidiva, resistencia y en la clasificación para el tratamiento**6**. En el Laboratorio del Centro de Especialidades Dermatológicas – Programa Nacional de Control de la Lepra se realizan la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), un método con elevada sensibilidad y especificidad; y la Baciloscopía, que es el método comúnmente utilizado por ser de fácil ejecución, poco invasivo, de bajo costo**6** y está implementado en todo el país.

1 CONSIDERACIONES GENERALES DE LA LEPRA

1.1. AGENTE ETIOLÓGICO

El *Mycobacterium leprae* o bacilo de Hansen tiene un diámetro de 0.3 a 0.5 micras y una longitud de 4 a 7 micras. Es curvado generalmente en uno de los extremos y es más corto que el de la tuberculosis.

Es un Bacilo Acido Alcohol Resistente (BAAR) intracelular, pleomorfo y usualmente con forma de bastón.

Clasificación científica:

Reino	:	Bacteria.
Filo	:	Actino bacteria.
Orden	:	Actinomycetales.
Familia	:	Mycobacteriaceae
Género	:	Mycobacterium.
Especie	:	*M. leprae*.
Nombre binomial	:	*Mycobacterium leprae*.

El bacilo tiene un tiempo de duplicación de 12 a 14 días en la almohadilla plantar del ratón.

La temperatura óptima para su crecimiento es de 30ºC de ahí su preferencia por las zonas frías de la piel y nervios periféricos. Expuesto al ambiente puede permanecer viable por 7 días aproximadamente.

Es inmóvil y se divide por bipartición. Secreta glea, sustancia pegajosa y responsable de la agregación de bacilos llamados globías, para resistir a los embates del sistema inmunológico del organismo.

1.2. CLASIFICACIÓN CLINICA

Se han propuesto varias clasificaciones para la lepra a lo largo de los años a medida que se obtienen nuevos conocimientos sobre la enfermedad. La clasificación de Madrid, establecida en el Congreso Internacional de Lepra, celebrado en Madrid en 1953, sigue el sistema polar definido en 1936 por Rabello Jr. Este sistema se basa en las características clínicas y el resultado de frotis de piel, dividiendo la lepra en dos grupos inmunológicamente inestables (Lepra indeterminada y Lepra Bordeline) y dos tipos polares estables (Lepra tuberculoide y Lepra lepromatosa)**7**.

Lepra indeterminada (HI): que se caracteriza por manchas (máculas) levemente blanquecinas, una o múltiples, en cualquier área de la piel, con pérdida o disminución de la sensibilidad en las mismas. La L.I es considerada como la forma de comienzo de la lepra**5**.

Lepra Borderline o dimorfa (HB): es la forma de lepra donde se ven entremezcladas lesiones que se parecen a lepra tuberculoide (lesiones de bordes netos) con lesiones de tipo lepromatoso (manchas eritematosas sin bordes definidos). Característicamente son lesiones anulares y según predomine uno de los dos polos serán escasas o numerosas y de bordes bien delimitados o evanescentes.**5**

Lepra tuberculoide (HT): esta es la forma no bacilífera. Se pueden ver una o más manchas de bordes bien definidos, circulares, que recuerdan al "uñé" (tiña del cuerpo). Representa una exagerada respuesta inmune ante la presencia de bacilos que son destruidos rápidamente, de modo que son lesiones abacilíferas.**5**

Lepra Lepromatosa (HL): Esta forma es la que más bacilos tiene y la abundancia de bacilos se debe a la resistencia disminuida del paciente. Se observan manchas eritematosas o parduscas, generalmente múltiples, sin bordes definidos, en toda la piel. También pueden presentar nódulos (lepromas).**5**

1.3. CLASIFICACIÓN OPERACIONAL

En 1988, la OMS recomendó el uso de un método de clasificación puramente clínica, estableciendo como Lepra Paucibacilar PB aquellos pacientes con hasta cinco Lesiones cutáneas y / o sólo un tronco nervioso implicado, mientras que los casos de Lepra Multibacilar MB son aquellos con más de cinco Lesiones y / o más de un tronco nervioso involucrado. Sin embargo, cuando el examen microscópico de la piel está disponible, los pacientes con resultados positivos son considerado MB, independientemente del número de lesiones.**7**

MB	PB
> de 5 manchas	5 manchas o menos
2 o más nervios afectados	1 solo nervio afectado
IB (+)	IB (-)

Las formas **I** y **T**, se denominan **PB** (Paucibacilares).

Las formas **L** y **B**, se denominan **MB** (Multibacilares).

Para el tratamiento con **PQT** esta clasificación será útil para el tipo y tiempo de administración de la **PQT**.

1.4. SIGNOS Y SÍNTOMAS DE LA LEPRA

Un enfermo de lepra es alguien que tiene una o más manchas cutáneas con trastornos de sensibilidad.

Manchas de Lepra

- Pueden ser blanquecinas, rojizas o amarronadas;
- Pueden ser aplanadas o elevadas;
- No pican; no duelen, no sudan;
- Pierden la sensación de calor, tacto o dolor;
- Pueden aparecer en cualquier parte de la piel;
- Pueden ser únicas o múltiples.

Otros signos de la enfermedad

- Nódulos (lepromas) rojizos o del color de la piel;
- Engrosamiento de nervios periféricos;
- Alopecia de cola de cejas;
- Pérdida de pestañas (madarosis);
- Infiltración de lóbulos auriculares.**5**

2 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

2.1. BACILOSCOPÍA

La Baciloscopía se realiza para detectar Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR) en frotis de piel recogidos desde sitios como lesiones de la piel, lóbulo de las orejas, codos y rodillas. Se realiza utilizando la tinción de Ziehl – Neelsen en frío. Técnica que permite evaluar el índice morfológico (IM) y el índice bacteriológico (IB).**8**

2.1.1 Procedimiento

Como en otros procedimientos de laboratorio, en el momento de la recolección es necesario que los materiales indicados a continuación, estén disponibles y que todos los profesionales estén debidamente protegidos, utilizando equipos de protección personal (EPP) como: guantes, máscaras y guardapolvos.**6**

2.1.2. Materiales necesarios

- Alcohol al 70° y 96°.
- Colorante de Fucsina.
- Colorante azul de metileno 0,3%.
- Acido – Alcohol 1%.
- Agua de canilla.
- Laminas esmeriladas.
- Mechero.
- Gradilla de láminas.
- Gasas estériles.
- Algodón estéril.
- Bisturí nro. 15.
- Papel toalla.
- Guantes.
- Lápiz de papel.

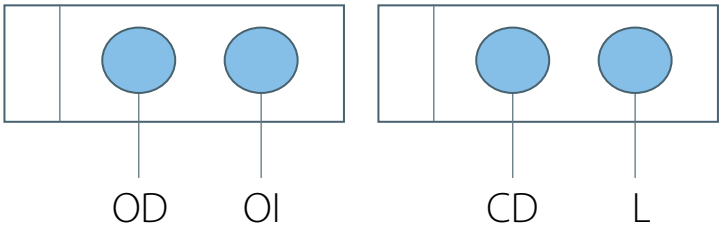
2.1.3. Toma de muestra

Después de desinfectar con alcohol 70°, con los dedos índice y pulgar de una mano se comprime firmemente la piel para descongestionarla de sangre lo máximo posible (isquemia provocada) y luego con un instrumento cortante (hoja de bisturí desechable Nº 15) se practica un corte pequeño de unos 5 mm de largo con profundidad suficiente (2 mm a 3 mm) para alcanzar el tejido subcutáneo.

Sin aflojar los dedos, para evitar que fluya sangre, se raspa girando el bisturí un ángulo de 90° varias veces, y la sustancia semilíquida recogida se esparce sobre la lámina procurando formar una capa delgada y uniforme (frotis de linfa cutánea). Recordar la importancia del raspado suave de tejido para conseguir células, que es donde se encontrarán los bacilos.**5**

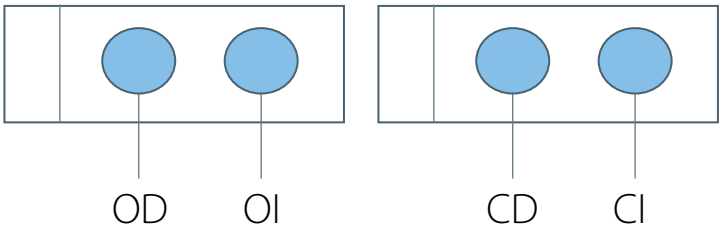
En pacientes con lesiones cutáneas visibles o áreas con alteración de sensibilidad, la recolección deberá realizarse en el lóbulo de la oreja derecha (OD), el lóbulo de la oreja izquierda (OI), codo derecho (CD) y lesión (L) (figura 1). En las lesiones planas, recoger en el límite interno. En los nódulos y tubérculos recoger en el centro.

Fig. 8 Disposición de los frotis en láminas de pacientes con lesiones



En pacientes que no presentan lesiones activas visibles, recoger material del lóbulo de la oreja derecha (OD), el lóbulo de la oreja izquierda (OI), codo derecho (CD) y el codo izquierdo (CI), según figura 2.

Fig. 9 Disposición de los frotis en láminas de pacientes sin lesiones



2.1.4. Fijación

La muestra de linfa cutánea se deja secar al aire por un minuto y luego, poniendo el dorso de la lámina de vidrio un breve instante sobre la llama (3 segundos), se "fija" por el calor evitando quemarla.

2.1.5. Acondicionamiento y transporte

La muestra queda útil por varias semanas. Cada lámina lleva la identificación que corresponde como fecha, nombre y zona de toma de muestra (ej: oreja derecha, codo derecho, etc). Las muestras, que deben ser enviadas a un laboratorio, deben ser previamente envueltas en papel (pañuelo desechable).

2.1.6. Coloración del frotis por el método de Ziehl-Neelsen en frío

El método de tinción en frío es el recomendado por preservar la morfología del bacilo. Además, evita que los vapores tóxicos de fenol, presentes en la fucsina, sean inhalados por el profesional.

La coloración de las láminas se realiza en los siguientes pasos:

A. Colocar las láminas en soporte apropiado, separadamente una de la otra.

B. Cubrir todo el frotis con la solución de fucsina de Ziehl-Neelsen, previamente filtrada, durante 20 minutos.

C. Retirar la lámina del soporte y lavar en agua corriente bajo baja presión.

D. Decolorar los frotis con solución de alcohol ácido al 1%, hasta que los mismos tomen una coloración rosada pálida (aprox. 3 segundos).

E. Lavar nuevamente la lámina en agua corriente bajo baja presión.

F. Cubrir todo el frotis con solución de azul de metileno al 0,3% por 3 minutos.

G. Lavarla en agua corriente bajo baja presión y dejar secar a temperatura ambiente.

2.1.7. Observación microscópica

Para la lectura de los frotis, seguir los siguientes pasos:

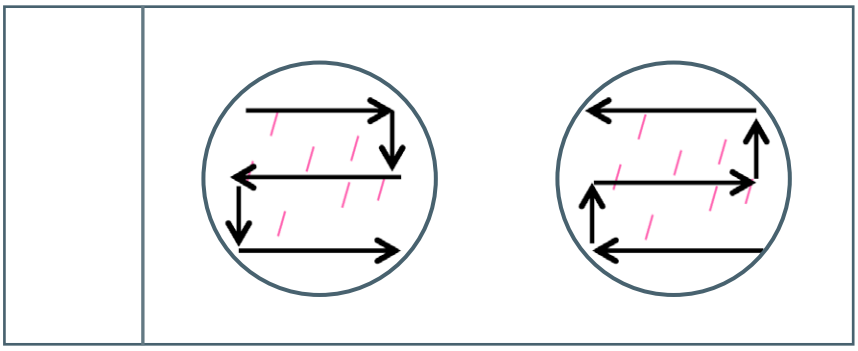
A. Utilizar el microscopio con objetivo de inmersión (aumento de 100x) y ocular de 10x.

B. Examinar inicialmente con objetivos de pequeño aumento (10x) para seleccionar campos que contengan muchos macrófagos y evitar aquellos con hematíes.

C. Agregar una gota de aceite de inmersión y luego pasar a objetivo de inmersión (100x), ajustando el foco con la ayuda del micrométrico.

D. Comenzar a examinar el frotis en la parte superior según figura 10 o inferior según figura 11, sistemáticamente, en zig-zag en 100 campos representativos, conforme el esquema a seguir:

Fig. 10 *Fig. 11*



E. Los Bacilos Acido Alcohol Resistentes se observan de color rosado.

2.1.7.1. Índice Bacteriológico (IB)

El Índice Bacteriológico (IB), propuesto por Ridley en 1962, se basa en una escala logarítmica con variación entre 0 a 6+. Es el método de evaluación cuantitativa más correcto y utilizado en la lectura de la baciloscopía en lepra.

Escala Logarítmica de Ridley

(0)	Ausencia de bacilos en 100 campos examinados.
(1+)	Presencia de 1 a 10 bacilos, en 100 campos examinados.
(2+)	Presencia de 1 a 10 bacilos, en cada 10 campos examinados.
(3+)	Presencia de 1 a 10 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
(4+)	Presencia de 10 a 100 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
(5+)	Presencia de 100 a 1.000 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
(6+)	Presencia de más de 1.000 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.

Observación: Para los índices de 0 a 3+ se deben examinar 100 campos microscópicos; de 4+ a 6+, la lectura podrá realizarse en 25 campos.

El IB del paciente es calculado por la media aritmética de los IBs de cada sitio de acuerdo con el siguiente ejemplo:

OD= 2+	
OI= 3+	$IB= \frac{2+3+2+4}{4} = 2,75$
CD= 2+	
Lesión= 4+	

2.1.7.2. Índice Morfológico (IM)

Este es el índice utilizado para describir el aspecto de la morfología del *M. leprae* en los frotis. Cuando se someten a la coloración, los bacilos se colorean, en su gran mayoría, irregularmente. Pueden observarse aisladamente o formarse aglomerados o globías que son estructuras formadas a partir de una sustancia incolora (glena) que se dispone entre los bacilos uniéndolos de forma arreglada y organizada, conforme figura.

Considerando que la lectura del IM requiere habilidad y mucha práctica, además de ser un análisis de carácter subjetivo, se recomienda que, cuando sea necesario, sea realizada solamente en los centros de referencia con más experiencia. La descripción morfológica de los bacilos es de especial importancia en los casos de sospechas de recidiva y resistencia medicamentosa.

Desde el punto de vista morfológico, el *M. leprae* puede presentarse en las formas de bacilo íntegro, fragmentado o granuloso, siendo el íntegro considerado la forma viable, conforme figura

2.1.7.3. Bacilos Solidos

Se consideran viables o vivos por presentarse totalmente coloreados en rosado y sin defectos de coloración en su pared celular. Se ven en frotis de pacientes que aún no han recibido el tratamiento o en los casos de recidiva de la enfermedad. Fig

2.1.7.4. Bacilos Fragmentados

Son bacilos que presentan pequeñas fallas en su pared celular debido a la interrupción de la síntesis de los componentes de la misma. Se consideran inviables o muertos y se observan frecuentemente en pacientes que ya terminaron su tratamiento. Fig.

Fig. Diferentes formas de M. leprae. D. Leiker e A.C. McDougall – Guia Técnico Baciloscopia da Hanseníase – 1987

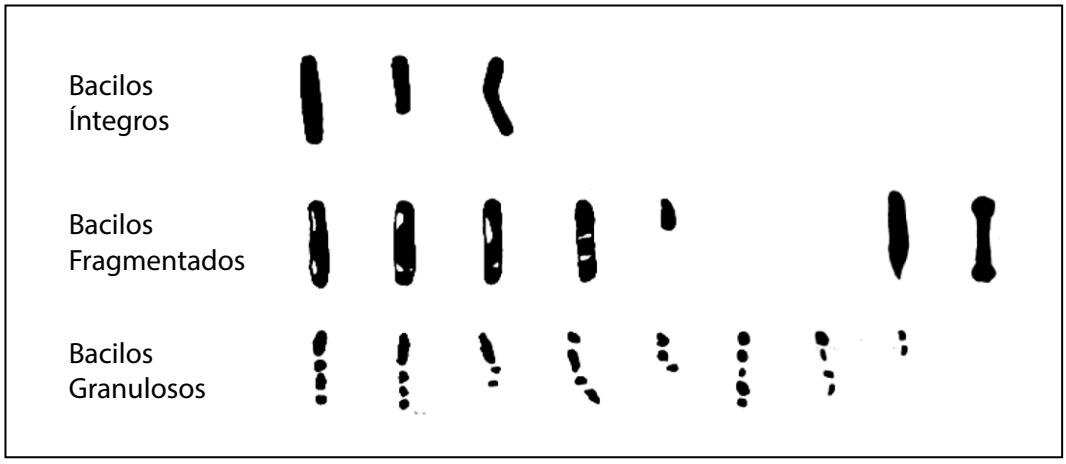


Fig. Ejemplo de Resultado de Baciloscopía en Paciente con Lepra

BACILOSCOPIA

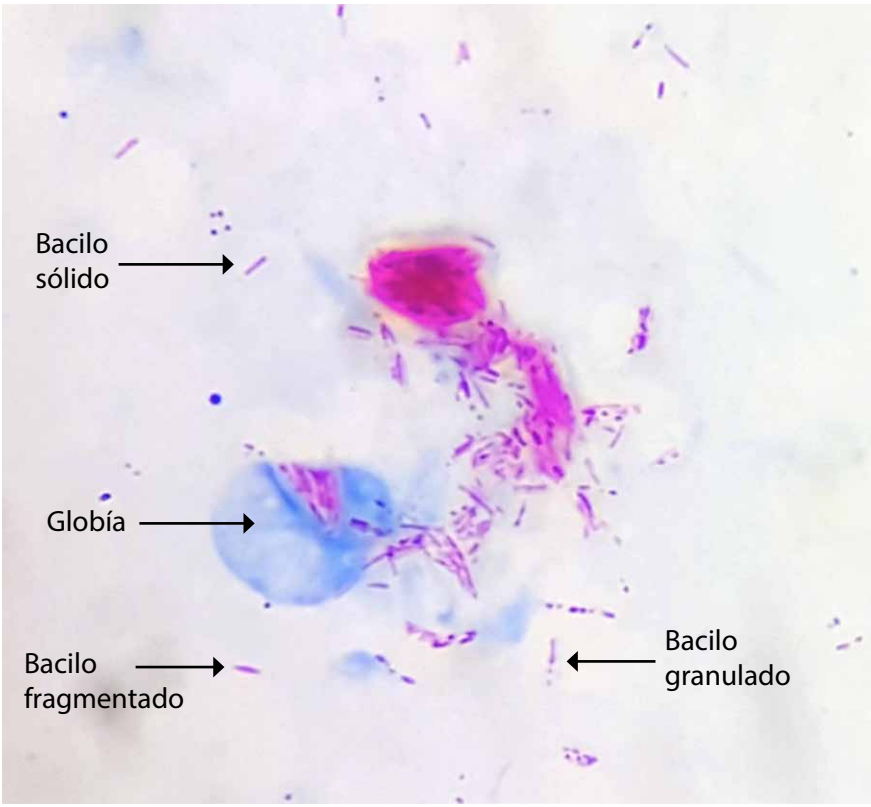
- MATERIAL: Raspado intradérmico
- Coloración de Ziehl – Neelsen: Se observan Bacilos Acido Alcohol Resistentes

RESULTADO

	Índice Bacilar (IB)	Índice Morfológico (IM)
Oreja Derecha	3+	3%
Codo Derecho	2+	3%
Oreja Izquierda	3+	3%
Codo Izquierdo	4+	3%
Lesión		

IB de Paciente: 3

Fig. Coloración de Ziehl – Neelsen. Morfología de los Bacilos sólidos, fragmentados, granulados y globías



2.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

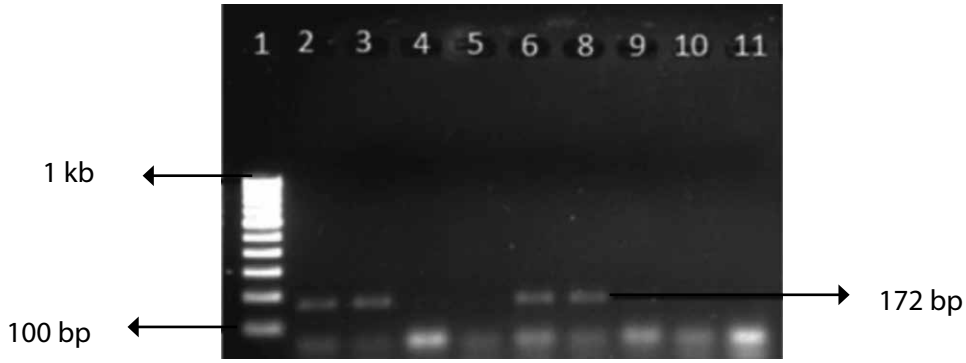
La PCR permite detectar microorganismos de crecimiento lento o incultivable y, a partir de los datos genéticos disponibles, se ha utilizado para detectar *M. leprae*, desde 1989.**8**

Debido a la dificultad de encontrar bacilos resistentes al alcohol-ácido (BAAR), a través de los métodos histopatológicos en las primeras etapas de la enfermedad o en las formas neurales puras, la técnica de PCR se ha utilizado con éxito para detectar pequeñas cantidades de bacilos en los tejidos**9**; además es útil para demostrar la infección subclínica en los contactos; seguimiento del tratamiento; determinar la curación de los pacientes o su resistencia a los medicamentos (Terapia multidroga) MDT; distinguir la reacción de la recurrencia; Y ayudar a entender los mecanismos de transmisión de *M. leprae*.**8**

Se basa en la amplificación de secuencias específicas del genoma de *M. leprae* y en la identificación del fragmento de ácido desoxirribonucleico amplificado (ADN) o ácido ribonucleico (ARN).**8**

Además de las técnicas convencionales de PCR, se han utilizado otras técnicas para detectar *M. leprae*, incluyendo PCR anidada (Nested PCR), amplificación genómica total y PCR en tiempo real. La PCR de transcriptasa reversa de ARN ribosómico de *M. leprae* puede determinar la viabilidad del bacilo.**8** Esta técnica se limita a los centros de investigación, debido al alto costo de los reactivos ya la necesidad de equipos específicos y profesionales calificados. El Programa Nacional de Control de la Lepra, a partir de la firma de convenios con centros de investigación, realiza la detección de *M. leprae* por PCR en tiempo real.

Fig. Producto de reacción en cadena de polimerasa del gen de ARN ribosómico 16S amplificado a partir de ADN complementario



2.2.1. Fundamento

2.2.1.1. PCR en tiempo real

La detección del DNA de *M. leprae* se lleva a cabo utilizando la tecnología TaqMan. Los primers y sonda utilizados fueron descritos por Richard W. et al. Los primers, que amplifican la región repetida en tándem (RLEP) de *M. leprae*, son: 5'-GCAGTATCGTGTTAGTGAACAGTGCA-3' (forward) y 5'-GCACA-TACGGCAACCTTCTAGCG-3' (reverse); y la sonda utilizada es: 5'-/56-FAM/TCGATGATCCGGCCGTCGG-CG/3BHQ_1/-3'. La amplificación se realiza utilizando Maxima Probe qPCR Master Mix (2X) (#K0261 Thermo Scientific®).

Las reacciones son llevadas a cabo utilizando el termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen) en un volumen final de 20uL. Para cada reacción de amplificación son añadidos controles positivos y negativos.

2.2.2. Procedimiento

Como en otros procedimientos de laboratorio, en el momento de la recolección es necesario que los materiales indicados a continuación, estén disponibles y que todos los profesionales estén debidamente protegidos, utilizando equipos de protección personal (EPP) como: guantes, máscaras y guardapolvos.**6**

2.2.3. Materiales necesarios

- Alcohol al 70°
- Gasas estériles
- Algodón estéril
- Guantes
- Lidocaína al 2% inyectable
- Jeringas de insulina de 1 mL
- Punch o sacabocados nro. 4
- Tubos eppendorf 1,5 mL

2.2.4. Toma y envío de muestras

La muestra utilizada para la detección de *M. leprae* por PCR es la biopsia de piel. La misma debe ser tomada de las lesiones. En el caso de sospecha de lepra neural o difusa, la muestra debe ser tomada del lóbulo de orejas o codos o rodillas o cejas infiltradas de la siguiente forma:

A. Desinfectar la zona con alcohol 70°, anestesiar la lesión inyectando lidocaína al 2% en la piel intacta, subyacente a la zona que será muestreada.

B. Con un punch nro. 4 tomar una biopsia y colocar en un tubo eppendorf con alcohol 70°.

C. Remitir la muestra junto con la ficha epidemiológica completa al Laboratorio del Centro de Especialidades Dermatológicas – Programa Nacional de Control de la Lepra, y el laboratorio se encarga del envío al Centro de Investigación para su procesamiento.

D. Las muestras podrían mantenerse a temperatura ambiente y enviadas al laboratorio para su procesamiento. Los bacilos son inactivados por etanol, lo que significa que las muestras pueden ser enviadas por transporte de rutina sin necesidad de controlar la temperatura durante el transporte o tomar precauciones adicionales para el control de los riesgos biológicos.

2.2.5. Interpretación de resultados

Un resultado de PCR para lepra positivo indica presencia de bacilos de *M. leprae* en la muestra.

2.3. VIGILANCIA DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LEPRA

Hasta 1982, el tratamiento de la lepra se basó en la monoterapia con dapsona. La emergencia de cepas de *Mycobacterium leprae* resistentes a este antimicrobiano hizo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendara el uso de la poliquimioterapia (PQT), que combina tres antibióticos: dapsona, clofazimina y rifampicina. La base de la PQT es la rifampicina, ya que es el componente con mayor actividad bactericida, incluso mayor que la de nuevos antimicrobianos empleados específicamente contra *M. leprae*. La función principal de la dapsona y la clofazimina es garantizar la eliminación de las poblaciones de M. leprae resistentes a la rifampicina (3). El uso de este esquema terapéutico ha permitido reducir eficazmente la prevalencia global de la enfermedad.**10**

Recientemente, la Organización Mundial de la Salud estableció y coordinó un programa de Vigilancia Global de Resistencia a Drogas en la Lepra para monitorear la resistencia global a los fármacos contra la lepra en casos de recaída. En 2010, este programa informó de 9 casos de lepra resistente a la dapsona y 1 caso de lepra resistente a la rifampicina en 72 pacientes con lepra recidivante de 8 países participantes.**11**

La última reunión de la Vigilancia Global de Resistencia a Drogas se llevó a cabo en Katmandú, Nepal en octubre del año 2016, donde Paraguay empezó a formar parte de dicha vigilancia. La detección de Resistencia a Drogas se lleva a cabo con la colaboración del Centro de Referencia en Lepra, Instituto Lauro de Souza Lima, Brasil.

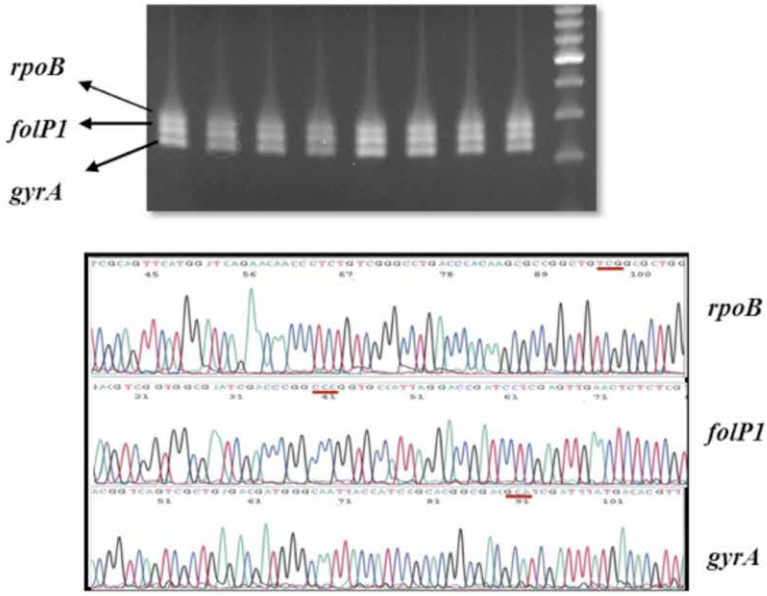
2.3.1. Objetivos

- **Laboratorio de Referencia**. Establecer una red de vigilancia utilizando un método estandarizado en todo el país para la detección de casos de resistencia primaria (casos nuevos), resistencia secundaria (recaídas) y monitorizar su tendencia.
- **Centros centinela**. Identificar y reportar los casos de recaídas para la realización de pruebas de resistencia.

2.3.2. Métodos de detección de Resistencia a Drogas

La prueba estándar para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de M. leprae es la técnica de la almohadilla plantar del ratón, que además de costosa, demora entre 6 y 12 meses en dar resultados y está disponible en pocos laboratorios. Debido a estas limitaciones, se han desarrollado diferentes técnicas moleculares basadas en la detección de mutaciones puntuales en los genes rpoB y folP1 de *M. leprae*, las cuales se utilizan como marcadores de resistencia a la rifampicina y la dapsona, con una alta correlación con la prueba estándar. Esto se basa en diversas investigaciones que han demostrado que esas mutaciones puntuales en los genes rpoB y folP1 son las responsables de la resistencia de *M. leprae* a la rifampicina y la dapsona, respectivamente. Se ha podido predecir la resistencia antimicrobiana de algunos aislamientos mediante diversa técnicas de biología molecular que detectan estas mutaciones.

Fig. Mutaciones puntuales y resistencia en fármacos utilizados contra la lepra




```
M.leprae rpoB
Rifampin-S ctg acc cac aag cgc cgg ctg tcg gcg ctg ggc ccg ggt
Rifampin-R ctg acc cac aag cgc cgg ctg ttg gcg ctg ggc ccg ggt
           *** *** *** *** *** *** *** * * *** *** *** *** ***
                                       S456L
M.leprae folP1
Dapsone-S  gtc gac gtc ggt ggc gaa tcg acc cgg ccc ggt gcc att
Dapsone-R  gtc gac gtc ggt ggc gaa tcg acc cgg ctc ggt gcc att
           *** *** *** *** *** *** *** *** *** * *** *** ***
                                         P55L
M. leprae gyrA
Ofloxacin-S aat tac cat ccg cac ggc gac gca tcg att tat gac acg
Ofloxacin-R aat tac cat ccg cac ggc gac gta tcg att tat gac acg
            *** *** *** *** *** *** *** N91V *** *** *** *** ***
```

2.3.3. Definiciones y procedimientos

2.2.3.1. Pacientes incluidos en el estudio

- **CASOS NUEVOS:** personas que presentan signos y síntomas de lepra y que nunca han recibido tratamiento. Se estudian al 10% de casos nuevos multibacilares.
- **RECAÍDAS:** Se define como la recurrencia de la enfermedad en pacientes que terminaron el tratamiento recomendado por la OMS. Los pacientes presentan nuevamente signos y síntomas de la enfermedad. Se estudian el 100% de los pacientes con recaídas.

2.2.3.2. Materiales necesarios

- Alcohol al 70°
- Gasas estériles
- Algodón estéril
- Guantes
- Lidocaína al 2% inyectable
- Jeringas de insulina de 1 mL
- Punch o sacabocados nro. 4
- Tubos eppendorf 1,5 mL

2.2.3.3. Toma y envío de muestras

La muestra utilizada para la búsqueda de resistencia a drogas en *M. leprae* por PCR es la biopsia de piel. La misma debe ser tomada de las lesiones. En el caso de sospecha de lepra neural o difusa, la muestra debe ser tomada del lóbulo de orejas o codos o rodillas o cejas infiltradas de la siguiente forma:

A. Desinfectar la zona con alcohol 70°, anestesiar la lesión inyectando lidocaína al 2% en la piel intacta, subyacente a la zona que será muestreada.

B. Con un punch nro. 4 tomar una biopsia y colocar en un tubo eppendorf con alcohol 70°.

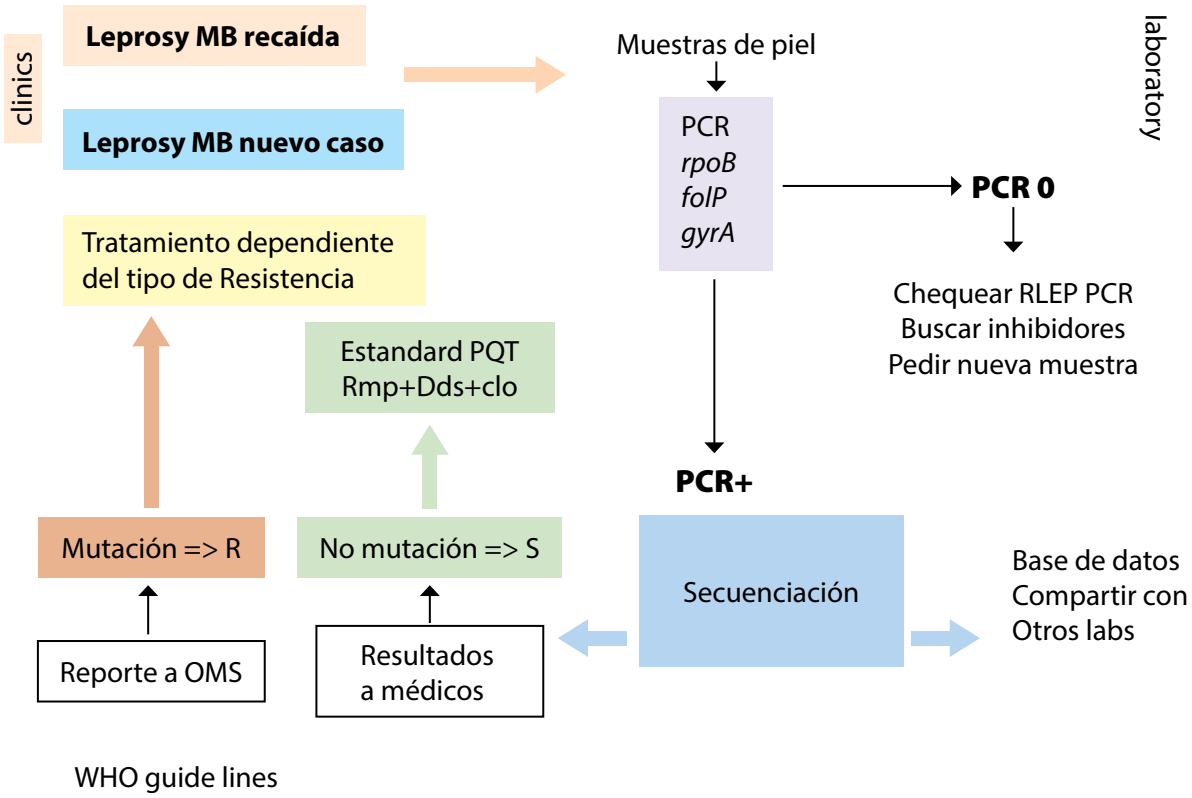
C. Remitir la muestra junto con la ficha epidemiológica completa al Laboratorio del Centro de Especialidades Dermatológicas – Programa Nacional de Control de la Lepra, y el laboratorio se encarga del envío al Centro de Investigación para su procesamiento.

D. Las muestras podrían mantenerse a temperatura ambiente y enviadas a laboratorios para su secuenciación posterior. Los bacilos son inactivados por etanol, lo que significa que las muestras pueden ser enviadas por transporte de rutina sin necesidad de controlar la temperatura durante el transporte o tomar precauciones adicionales para el control de los riesgos biológicos.

2.2.3.4. Reporte de resultados

Los resultados de la PCR y la secuenciación se comunicarán directamente al Programa Nacional de Control de la Lepra y al Centro / Hospital que envió la muestra (clínico a cargo del paciente) para tomar las decisiones terapéuticas.

Fig. OMS. Flujograma de Vigilancia de la Resistencia Antimicrobiana en Lepra



ANEXOS
FICHAS Y PLANILLAS

Ficha para envío de material de Baciloscopía

PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA LEPRA

TESÃI HA TEKO PORÃVE MOTENONDEHA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL

RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE LEPRA
FORMULARIO PARA ENVIO DE MATERIAL PARA BACILOSCOPIA

REGION		DISTRITO	
SERVICIO			
FECHA TOMA		ENCARGADO	
N° TELEFONO DEL SERVICIO O ENCARGADO PARA CONTACTO			

DATOS DEL PACIENTE

NOMBRES / APELLIDOS			
C.I.N°		EDAD (años)	
DOMICILIO			
TELEFONO		FORMA CLINICA	
MARQUE	Para DX		
	En Tratamiento		
	Para alta		
	Control de Calidad		

OBSERVACIONES

FIRMA

Ficha de envío de muestras para PCR y Resistencia antibiótica (página 1)

TESÃI HA TEKO PORÃVE MOTENONDEHA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL

TETÃ REKUÁI GOBIERNO NACIONAL
Jajapo ñande raperã ko'ãga guive
Construyendo el futuro hoy

DIRECCION GENERAL DE VIGILANCIA DE LA SALUD
PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA LEPRA
Brasil entre Manuel Domínguez y Fulgencio R. Moreno – Tel/Fax: 021 204 633 - Asunción
CENTRO DE ESPECIALIDADES DERMATOLOGICAS
Dr. Pellón Nº 207 casi Azara – Tel/Fax: 021 585 807 – San Lorenzo

ENCUESTA EPIDEMIOLÓGICA DE LEPRA

Datos del paciente

Nombres y Apellidos:_____

C.I N°:_____

Fecha de Nacimiento: __-__-____ **Edad:**_____

Teléfono:_____ **Ocupación:**_____

Sexo: Femenino ☐ Masculino ☐

Lugar de residencia: Departamento:_____

Cuidad: _____

Dirección:_____

Barrio: _____

Fecha de registro: _____ **Ficha N°:**_____

Datos de la enfermedad

Fecha de diagnóstico: _____ **Fecha de inicio de síntomas:** _____

Manifestación clínica: ☐ Lepra multibacilar

☐ Lepra paucibacilar

Lesiones: Sí ☐ No ☐ **Número de lesiones:** _____

Tipo de lesiones (aclarar):

Cabeza:_____

Tronco:_____

Miembros superiores:_____

Miembros Inferiores:_____

Tratamiento previo (marcar una opción):

Multiterapia ☐ Monoterapia ☐ Sin Tratamiento ☐

Ficha de envío de muestras para PCR y Resistencia antibiótica (página 2)

Fecha de inicio de tratamiento previo: _____

Fecha de fin de tratamiento previo: _____

Tratamiento actual (marcar una opción):

Multiterapia ☐ Monoterapia ☐ Sin Tratamiento ☐

Fecha de inicio de tratamiento actual: _____

Fecha de fin de tratamiento actual: _____

Hospitalizado: Sí ☐ No ☐

Grado máximo de discapacidad (marcar una de las siguientes opciones):

Discapacidad grado 1 ☐ Para manos y pies: insensibilidad sin deformidad o lesión visible. Para ojos: problemas oculares, pero sin afección visual).

Discapacidad grado 2 ☐ Para manos y pies: Deformidad o lesión visible (lesión significa ulceración, acortamiento, rigidez y pérdida de la totalidad o parte de la mano o el pie). Para ojos: grave defecto visual).

DATOS CLINICOS (clasificación Ridley y Jopling)

Borderline Tuberculiode ☐ Borderline Lepromatoso ☐

Borderline – Borderline ☐ Lepra Lepromatosa ☐ → Tipo:

Lepra Tuberculoide ☐ Lepra Indeterminada ☐

DATOS DE LABORATORIO

Fecha de diagnóstico de laboratorio: __-__-____

Muestra

Biopsia cutánea ☐ Linfa cutánea ☐

Prueba

Histopatología Positiva ☐ Baciloscopía Positiva ☐

Negativa ☐ Negativa ☐

Agente causal: *Mycobacterium leprae* ☐

Infección /Enfermedad concurrente:

_____

CATEGORIZACIÓN DEL CASO

Clasificación del caso (marcar una de las siguientes opciones):

Sospechoso ☐ Probable ☐ Confirmado ☐

Reporte de resultado de Baciloscopía

TESÃI HA TEKO PORÃVE MOTENONDEHA
MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA Y BIENESTAR SOCIAL

TETÃ REKUÁI GOBIERNO NACIONAL
Jajapo ñande raperã ko'ãga guive
Construyendo el futuro hoy

DIRECCION GENERAL DE VIGILANCIA DE LA SALUD
PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA LEPRA
Brasil entre Manuel Domínguez y Fulgencio R. Moreno – Tel/Fax: 021 204 633 - Asunción
CENTRO DE ESPECIALIDADES DERMATOLOGICAS
Dr. Pellón Nº 207 casi Azara – Tel/Fax: 021 585 807 – San Lorenzo

LABORATORIO

- NOMBRE:
- EDAD: C.I.: N° DE FICHA:
- FECHA:

BACILOSCOPIA

- MATERIAL: Raspado intradérmico/ Linfacutánea
- Coloración de Ziehl – Neelsen:

RESULTADO

	Índice Bacilar (IB)	**Índice Morfológico (IM)**
Oreja Derecha		
Oreja Izquierda		
Codo Derecho		
Codo Izquierdo		
Lesión		

IB de Paciente:

Observación:

Preparación de reactivos para Baciloscopía

1. Coloración de Ziehl-Neelsen en frío

A) Solución decolorante (mezcla alcohol-ácido al 1%)

Alcohol Etílico 96°…… 99ml

Ácido Clorhídrico concentrado……..... 1ml

- Colocar en una probeta 50 ml de alcohol etílico.
- Agregar ácido clorhídrico concentrado (1 ml) al alcohol, gota a gota,.
- Completando con alcohol etílico hasta el volumen final de 100 ml.
- Guardar en un frasco apropiado a temperatura ambiente.

B) Colorante Azul de Metileno (contratante de Ziehl-Neelsen)

Azul de Metileno ..... 3g.

Agua destilada q.s.p 1.000ml

- Disolver el azul de metileno en agua destilada y completar hasta el volumen de 1.000 ml.
- Dejar en reposo por 24 horas, en frasco ámbar.
- Filtrar antes de usar.

C) Carbo Fucsina de Ziehl-Neelsen

Fucsina Básica 10g

Alcohol Etílico 96° ..... 100 ml

Fenol (ácido fénico) ..... 50 ml

Agua destilada qsp 1.000ml

- Disolver la fucsina básica en el alcohol etílico o alcohol absoluto. A continuación, colocar el fenol y homogeneizar.
- Pasar a una probeta y añadir agua destilada hasta el volumen final de 1.000 ml.
- Dejar en reposo durante 24 horas.
- Filtrar y transferir a un frasco ámbar, almacenando al abrigo de la luz.
- Agitar y filtrar antes del uso.

BIBLIOGRAFIA

Whitea C, Franco C. Leprosy in the 21st Century. Clin. Microbiol. Rev. January 2015. vol. 28 no. 1 80-94. doi: 10.1128/CMR.00079-13.

Teixeira A, Cruvinel D, Roma F , Luppino L, Resende L, Sousa T, et al . Evaluation of the agreement between clinical and laboratorial exams in the diagnosis of leprosy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [Internet]. 2008 [cited 2017 June 3] ; 41(Suppl 2): 48-55. doi.org/10.1590/S0037-86822008000700011.

Frade MAC, de Paula NA, Gomes CM, et al. Unexpectedly high leprosy seroprevalence detected using a random surveillance strategy in midwestern Brazil: A comparison of ELISA and a rapid diagnostic test. Johnson C, ed. PLoS Neglected Tropical Diseases. 2017;11(2):e0005375. doi:10.1371/journal.pntd.0005375.

Rivero E, Barrios M, Berdasquera C, Tápanes T, Peñalver S, Ana G. La lepra, un problema de salud global. Rev Cubana Med Gen Integr [Internet]. 2009 Mar [citado 2017 Jun 4] ; 25(1): . Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21252009000100010&lng=es.

Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Manual de Normas y Procedimientos. Programa Nacional de Control de la Lepra, Paraguay 2016.

Brasil. Ministerio de Salud, Secretaría de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica. Guía de procedimientos técnicos: baciloscopia en hanseniasis / Ministerio de Salud, Secretaría de Vigilancia en Salud, Departamento de Vigilancia. Epidemiológica. - Brasilia: Editora del Ministerio de Salud, 2010.

Lastoria J, Morgado M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1. An Bras Dermatol. 2014;89(2):205-18. DOI:http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450

Lastoria J, Morgado M. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2*. An Bras Dermatol. 2014;89(3):389-403. DOI:http://dx.doi.org/10.1590/abd18064841.20142460

Bernardes I, Goulart L. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. Arch Dermatol Res (2008) 300:269–290. DOI 10.1007/s00403-008-0857-y

Hernández E, Cardona-Castro N, Rodríguez G, Villegas S, Beltrán C, Kimura M, D. Vissa V, Gómez Y. Estudio de resistencia a la rifampicina y la dapsona en tres pacientes con recurrencia de lepra. Rev Panam Salud Publica/ Pan Am J Public Health 23(2), 2008.

Williams D, Lewis C, Sandoval F, Robbins N, Keas S,2 Gillis T, Scollard D. Drug Resistance in Patients With Leprosy in the United States. Clinical Infectious Diseases 2014;58(1):72–3. DOI: 10.1093/cid/cit628.

MANUAL DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE LEPRA