

Universidad Nacional Autónoma de México
FACULTAD DE QUIMICA



MYCOBACTERIUM LEPRAE, INTENTOS DE
CULTIVO Y REACCIONES INMUNOLOGICAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
BIOQUIMICO MICROBIOLOGICO
P R E S E N T A

EMILIO FILIBERTO VALDERRABANO VITE

México, D. F.

1979



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

U.T. ~~348~~ 348

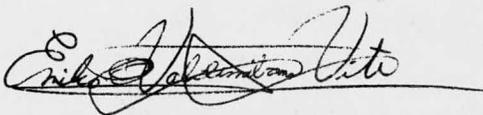


JURADO ASIGNADO

Presidente Q. F.B. OSCAR AMOR DODERO
Vocal Q. F.B. LEONOR MARTINEZ SOTO
Secretario Q. F.B. ELDA PENICHE QUINTANA
1er. Suplente Q. F.B. MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA
2do. Suplente Q. F.B. CRISTINA BELTRAN AGUERRABERE

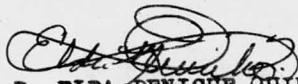
SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Biblioteca del Centro Dermatológico Pascua.



SUSTENTANTE:

EMILIO FILIBERTO VALDERRABANO VITE



ASESOR DEL TEMA:

Q.F.B. ELDA PENICHE QUINTANA

Quiero expresar mi agradecimiento y respeto para todas aquellas personas que de alguna forma contribuyeron para la realización de este trabajo.

Al H. Jurado

- Q. F. B. Oscar Amor Dodero
- Q. F. B. Leonor Martínez Soto
- Q. F. B. Elda Peniche Quintana
- Q. F. B. Ma. Dolores Lastra Azpilicueta
- Q. F. B. Cristina Beltran Aguerrebere

Quiero expresar de una manera muy especial mi más cordial agradecimiento a la profesora Q. F. B. Elda peniche Quintana por la orientación proporcionada y a sus consejos que permitieron llevar a feliz termino este trabajo y que han contribuido a mi realización y superación profesional

A mis Padres

Carmen Vite Vda. de Valderrábano

Eduardo Valderrábano e.p.d.

Con todo cariño quiero darles las
Gracias ya que supieron encausarme -
por la senda del respeto, honradez,
y del trabajo.

Gracias por sus sacrificios, apoyo,
y comprensión que hicieron posible -
mis estudios hasta mi realización -
profesional

A mis hermanos Alberto L. Valderrábano Vite y Eduardo Valderrábano Vite con todo mi respeto, por el apoyo continuo que me proporcionaron durante mis estudios y que permitieron llevarlos a fe líz termino.

Mis mas cumplidas gracias

Con todo cariño a mis Hermanos
Ma. del Carmen Valderrábano de C.
Antonio Valderrábano Vite
Juan José Valderrábano Vite
Guadalupe Valderrábano Vite

A mis Amigos

Mycobacterium leprae; INTENTOS DE CULTIVO Y

RESPUESTAS INMUNOLOGICAS

I.- INTRODUCCION

II.-GENERALIDADES

A).- Taxonomia

B).- Descripción de M.leprae

C).- Descripción de los diferentes tipos de lepra

a).- Lepromatosa

i).- Nodular

ii).- Difusa

iii).- Infiltrada

b).- Tuberculoide

c).- Indeterminada

d).- Dimorfa

D).- Estados susceptibles a la infección

a).- Referente a la edad

b).- De acuerdo al estado socioeconómico

c).- De acuerdo al estado inmunológico

III.- INTENTOS DE CULTIVO

A).- "in vitro"

B).- "in vivo"

IV.- INMUNOLOGIA

A).- Respuestas inmunológicas ante la infección

a).- Inmunidad en animales de cultivo

b).- Inmunidad en el hombre infectado

V.- EPIDEMIOLOGIA, PROFILAXIS Y TRATAMIENTO

A).- Zonas endémicas de lepra en el mundo

B).- Intentos de producir vacunas contra M.lepraeC).- Quimioterapia contra M.leprae

VI.- RESUMEN

VII.- COMENTARIOS

VIII.- BIBLIOGRAFIA

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

Pocas enfermedades tienen un impacto tan poderoso sobre la imaginación popular como la lepra, vieja enfermedad conocida desde la antigüedad y mencionada por los Vedas 1400 años A.C. No todas las enfermedades lo eran en efecto, aunque algunas sí.

En 1840 Danielssen recococió la célula leprosa y su yerno Hansen describió los bacilos de la lepra dentro de los monocitos (Norway, 1874). Sus observaciones fueron confirmadas por Neisser que propuso el nombre de "Enfermedad de Hansen" para el término antiguo de "lepra".

La lepra fue común en toda Europa y era tan grande el temor a la enfermedad, que los leprosos eran tratados con crueldad y proscritos socialmente; debido a ese temor se empezaron a hacer esfuerzos para controlarla, pero lo más efectivo fue el aislamiento de los enfermos en instituciones especiales, con tal éxito que el número de casos disminuyó rápidamente.

Aún cuando la mayoría de los profanos nunca ha visto a un leproso, ni leído una descripción autorizada del padecimiento, casi todos están convencidos de que la lepra es muy contagiosa y horripilante, produciendo una profunda impresión en la mente del hombre. Pero contrariamente a la idea popular de la lepra, los médicos durante mucho tiempo han estado convenciendo de que la infección no es transmitida fácilmente, pero que se presenta casi siempre entre personas que han tenido contacto prolongado e íntimo con leprosos en medio de malas condiciones higiénicas que favorecen la transmisión de microorganismos causales. La higiene personal parece

proteger contra la infección: médicos y enfermeras que atienden y cuidan a estos pacientes rara vez contraen la enfermedad, es más, parece ser que la lepra es incapaz de perpetuarse entre los habitantes de las ciudades modernas donde es una regla general la limpieza personal y de la vivienda.

En la actualidad la lepra es casi desconocida en Europa Central, aún cuando existen focos endémicos en Europa Septentrional, pero aún permanece en áreas tropicales y subtropicales, especialmente en Africa, China-India y sureste de Asia. Frecuentemente se presentan casos en poblaciones nativas de Filipinas, Indias Occidentales, México, América Central y en la mitad norte de América del Sur; en los Estados Unidos habrá unos 1000 casos, la mayoría son inmigrantes orientales pero es importante la existencia de focos endémicos en la población nativa de Louisiana, Florida, Texas y Nuevo México.

El tratamiento actual a base de sulfonas han permitido dar de alta cada año a muchos pacientes; sin embargo, hoy día se está pensando en la posibilidad de preparar una vacuna contra la lepra, sólo que el problema principal es que no se ha podido obtener una cantidad suficiente de inmunógeno micobacteriano para procesar dicha vacuna, pero para tratar de evitar dicho problema se han intentado preparar vacunas utilizando el antígeno de otras micobacterias que sean saprofitas y cultivables, además de que den una reacción inmunológica cruzada.

GENERALIDADES

La lepra por ser una enfermedad cosmopolita se ha investigado en todo el mundo y algunos países han logrado erradicarla mediante el aislamiento de los leprosos en clínicas especiales en donde son tratados y curados bajo estrictos controles infecto-contagiosos. Por otro lado se promueve la higiene personal de los demás miembros de la familia, a los que, además, se les hace la prueba de la lepromina tardía (Mitsuda) para determinar si hay contagio a no.

En la actualidad se estima que en el mundo hay 12 millones de leprosos (55) la causa se debe a la frecuencia de la enfermedad por contacto familiar que es de 5.1%, la infección puede abarcar a toda la familia y se presenta de un modo característico en niños de padres leprosos, posiblemente por un contacto íntimo y prolongado en el hogar, por lo que posiblemente una gran proporción de enfermos adquieran la infección original en la infancia o adolescencia. La infección puede ocurrir a través de la piel o de la mucosa nasal y las lesiones de la piel o de la nariz, de forma nodular, estarán llenas de gérmenes causales (7, 56).

Por ser M. leprae difícil de cultivar "in vitro" al ser un parásito intracelular estricto, los primeros intentos de cultivo fueron dirigidos hacia M. lepraemurium por que la infección de este podía mantenerse en ratas de laboratorio (56). El primer intento de cultivo de M. lepraemurium fue hecho por Zinsser y Carey en 1912, haciendo cultivos de bazos de ratas infectadas observando acumulos de bacilos en monocitos: pero estudios posteriores indicaron que los bacilos ya estaban dentro de los

fagocitos, estando presentes en el transplante y cultivo razón por la cual no pudieron obtenerse subcultivos. -- Posteriormente Litzki aparentemente habia subcultivado M. leprae 8 veces en un medio de Eagle modificado y enriquecido con extracto de micobacterias saprofitas y prepucio humano, pero al momento de inocular esta bacteria en el cojinete plantar del ratón, éste no desarrolló la enfermedad, por lo que concluyó que eran otros tipos de micobacterias saprofitas (8, 56).

El diagnóstico de laboratorio se basa en la demostración microscópica del bacilo causal mediante un frotis de un raspado de la mucosa nasal, o bien una biopsia de un nódulo leproso (36), si hay duda que el bacilo ácido-resistente encontrado sea tuberculoso o leproso, bastará inocular un cobayo y en caso de ser de la lepra no habrá lesión alguna inmediata, pero en caso de ser tuberculoso producirá la lesión tuberculosa en corto tiempo.

Como todas las micobacterias, M. leprae es relativamente difícil de teñir, pero una vez que fijan el colorante potente, con intervención de calor, van a resistir la decoloración con ácido, esta característica se debe a la presencia de lípidos en la estructura del microorganismo, solo que mientras M. leprae es solo ácido-resistente, M. tuberculosis es alcohol y ácido resistente a la vez, motivo por lo cual se les puede diferenciar (33).

Para teñir el bacilo de la lepra, el método tradicional es el de Ziehl-Neelsen que da buenos resultados, pero que se puede mejorar si se suprime la parafina según Wade-Fite (33), o con aceite de parafina de viscoci-

dad variable y gasolina de avión (1:2), según la técnica de Wade-Fite-Faraco (33).

Aunque algunos investigadores utilizan ácido sulfúrico al 3%, se sabe que basta ácido sulfúrico al 1% para la decoloración. Durante las maniobras de tinción de Ziehl-Neelsen es posible que el bacilo de Hansen pierda su caracter de ácido-resistente, pero esto se puede evitar si se pone sobre el corte, despues de quitar la parafina, aceite mineral o aceite de oliva.

En pacientes con lepra lepromatosa, tuberculoide o indeterminada, al realizar un estudio microscópico de sus lesiones mediante biopsias y frotis, se encontro que en 96 frotis teñidos por el método clásico de carbol-fucshina y ácido sulfúrico como diferenciante, no había bacilos ácido-resistentes, pero sin embargo esos mismos frotis al ser teñidos con ácido peryódico-carbol para-rosanilina, 69 de ellos demostraron la presencia de bacilos ácido-resistentes.

Al realizar un estudio cualitativo y cuantitativo de M. leprae para conocer su composición de lípidos, se lograron extraer éstos en forma líquida, al analisis -- cromatográfico indicaron contener altas proporciones de triglicéridos, tambien se lograron extraer ciertas cereas blandas, se observó que ambas porciones contenían gran-cantidad de ácidos grasos libres, fracciones de fosfoli-pidos y de glicolipidos (43).

A).- TAXONIMIA

La clasificación de M. leprae es la siguiente:

Orden.- Actinomycetales (Buchanan)

Familia.- Mycobacteriaceae (Chester)

Genero.- Mycobacterium (Lehmann y Neumann)

Especie.- Mycobacterium leprae (Hansen)

La familia Mycobacteriaceae esta incluida en el orden de los Actinomycetales y se relaciona con las Corynebacteriaceae por su tendencia a formar ramificaciones inusuales durante su cultivo. Como la característica -- más sobresaliente de las micobacterias es su resistencia a la decoloración con alcohol ácido o con ácido solo, con frecuencia se les llama bacterias ácido-alcohol -- resistentes (BAAR), (7, 11, 56).

B).- DESCRIPCION DE M. leprae

El bacilo de la lepra fue descrito por primera vez por Hansen (1874), de cortes histológicos de nódulos leproso donde se encuentran en gran cantidad formando haces, entre las células de tejido conectiva y también formando aglomerados dentro de los grandes macrófagos -- que forman el nódulo (7).

Cuando la micobacteria de la lepra se tiñe por la técnica de Ziehl-Neelsen, se observan al microscopio bacilos que varían de longitud desde 0.2 a 1.4 micras por 1.0 a 7.0 micras de longitud, los bastones suelen ser -- rectos o ligeramente curvos y pueden aparecer teñidos uniformemente de rojo o mostrar gránulos o perlas algo -- mayores que el diametro de la micobacteria, se cree que los bacilos teñidos uniformemente están vivos y los que se tiñen arrosariadamente son bacilos que ya estaban -- muertos antes de ser teñidos; pero en sí, al bacilo de la lepra se le considera no esporulado y ácido-resistente (56).

Tinción de Ziehl-Neelsen para bacterias ácido-alcohol resistentes en los tejidos.

Fijación.- Dan buenos resultados el formol neutro amortiguado y los fijadores a base de mercurio.

Preservación de la ácidorresistencia.- Es fácil que se pierda el carácter de ácidorresistencia durante las maniobras de tinción, sobre todo del bacilo de la lepra , pero también con bacilos tuberculosos viejos. Faraco - combatía esta tendencia poniendo sobre el corte, después de quitar la parafina, aceite de oliva o aceite mineral lubricante.

Solución de carbolfucsina

Fucsina básica	1 gr.
Alcohol etílico absoluto	10 ml.
Fenol	5 ml.
Agua destilada	100 ml.

Se disuelve la fucsina básica en el alcohol y el fenol en el agua; se mezclan las dos soluciones. Debe filtrarse antes del uso.

METODO

- 1.- Los cortes en parafina se tratan con agua.
- 2.- Se tiñe durante 1 hora a 37°C con carbolfucsina, o durante 30 minutos a 56 °C (en la estufa), o toda la noche a temperatura ambiente.
- 3.- Se enjuaga cuidadosamente con agua de la llave.
- 4.- Se decolora con HCl al 1% o 3% en alcohol al 70%
- 5.- Se lava con agua y se aplica como colorante de contraste azul de metileno al 1% durante 30 segs.
- 6.- Se lava con agua de la llave.
- 7.- Se deshidrata con alcohol al 95% (dos veces) y con alcohol absoluto (dos veces).

8.- se aclara con xileno y se monta la tinción en Clari-
ta o en Permount.

RESULTADOS.- Los bacilos de la lepra son rojos brillante y los tejidos son azules, el material caseoso tiene un color azul grisáceo pálido, los globulos rojos deben mostrar un tinte rojizo pálido y constituyen un buen índice en caso de decoloración excesiva.

Tinción de Wade-Fite-Faraco para bacilos ácido-resistentes de tejidos.

Este metodo resulta conveniente para microorganismos frágiles como M. leprae.

METODO

- 1.- Se quita la parafina sumergiendo los cortes de 1 a 2 min. en una mezcla formada por 1 volumen de aceite de parafina (de viscosidad variable) y 2 volúmenes de gasolina de avión, o 1 volumen de aceite de parafina y 2 volúmenes de trementina refinada. Algunos investigadores emplean una mezcla a partes iguales de xileno y aceite de cacahuate, pero esto no constituye el metodo de Wade.
- 2.- Se escurre, se quita el exceso de aceite de los bordes y se aplica papel filtro hasta aspecto opaco; las preparaciones se dejan en agua hasta el momento de la tinción.
- 3.- Se tiñe con carbolfucsina de Ziehl-Neelsen durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Se enjuaga con agua y se decolora con HCl al 1% en alcohol etílico al 70%, hasta que los cortes tengan un color rosa ligero (de 1 a 2 min.), si se estudia M. leprae, sólo debe emplearse H_2SO_4 al 0.5% en agua durante 30 segundos a 1 minuto.

5.- Se lava con agua y se aplica como colorante de contraste azul de metileno al 0.5% durante 10 a 20 segs.

6.- Se enjuaga con agua de la llave, se limpian los bordes del portaobjetos, se **seca** con papel filtro y después al aire. Cuando la preparación está seca, se monta directamente en un madio sintético como Permout o Clarita.

RESULTADOS.- Los bacilos ácido-resistentes son rojos sobre fondo azul claro.

Tinción de Wade-Fite para bacilos ácido-resistentes

La fijación se hace con formol o líquido de Zenker.

METODO

1.- Se quita la parafina de los cortes con una mezcla de 2 volúmenes de trementina refinada y 1 volumen de aceite de parafina viscoso (dos baños, cada uno de 150 seg.). No es necesario quitar los depósitos de mercurio.

2.- Se escurre, se quita la parafina de los bordes y se seca con papel filtro hasta aspecto opaco; se deja en agua unos minutos antes de teñir.

3.- Se tiñe de 6 a 24 horas (o más tiempo, por ejemplo, 18 a 24 horas para bacilos viejos o mal conservados) a temperatura ambiente en carbolfucsina nueva (0.5 gr. de fucsina nueva disuelta en 10 ml. de alcohol y mezclado con una solución se 5 ml. de cristales de fenol fundido en 100 ml. de agua destilada).

4.- Se lava con agua; luego se coloca durante 5 min. en formol de 37 a 40% grado reactivo. esto permite que los bacilos tomen un color azul permanente debido a la reacción de la fucsina con el aldehído.

5.- Se lava con agua

6.- Se decolora 1 min. con H_2SO_4 al 5% en agua.

7.- Se lava con agua de la llave durante 5 minutos.

- 8.- Se deja 3 min. en $KMnO_4$ al 1%
- 9.- Se lava con agua de la llave.
- 10.- Se blanquea durante 30 seg. con ácido oxálico al 2%
- 11.- Se lava 5-10 min. con agua de la llave corriente.
- 12.- Se tiñe 3 min. con colorante de Van Gieson diluido (fucsina ácida 0.01 gr. más 1 gr. de ácido picrico en 100 ml. de agua destilada).
- 13.- Sin lavar, se deshidrata rápidamente con alcohol al 95% y alcohol absoluto, se aclara con xileno y se monta en Clarita.

RESULTADOS.- Los bacilos ácido-resistentes toman color azul intenso a azul negro; la colagena es roja y los otros elementos son de color amarillo.

Tinción fluorescente de bacilos ácido-resistentes

Hageman fue el primero en emplear la auramina, en el año de 1937, para la tinción fluorescente de bacilos tuberculosos. La volvieron a emplear Richards y Miller en 1941 y Lempert en 1944. Kuper y May (1960) la aplicaron a los cortes y le añadieron rodamina, que transforma el color amarillo producido por la auramina sola en amarillo dorado o rojizo; además, la rodamina se opone al palidecimiento de la imagen, lo que permite un estudio microscópico prolongado.

FIJACION.- Se debe trabajar con portaobjetos de buena calidad, delgados, sin rayas y con tejidos fijados con formol o líquido de Zenker.

METODO (Kuper y May)

- 1.- Se quita la parafina de los cortes con una mezcla de 2 volúmenes de xileno y un volumen de aceite de cacahuate (dos baños de 3 minutos cada uno).
- 2.- se deja escurrir, se seca con papel hasta aspecto -

opaco y se tiñe 10 min. con una mezcla filtrada de auramina-rodamina, a cerca de 60°C (1.5 gr. de auramina O, - y 6.75 gr. de rodamina, 75 ml. de glicerina, 10 ml. de cristales de fenol fundidos a 50°C y 50 ml. de agua destilada; se disuelve por agitacion).

3.- Se lava 2 min. con agua de la llave.

4.- Se diferencia 2 min. con HCl al 0.5% en alcohol etílico al 70% (para M. leprae se emplea HCl al 0.5% en agua) y lavar con agua.

5.- Se diferencia 2 min. en $KMnO_4$ al 0.5% para eliminar la fluorescencia de las células tisulares.

6.- Se lava 2 min. con agua de la llave.

7.- Se seca con papel. En caso de M. leprae los cortes se deben montar en glicerina o parafina líquida en esta etapa; para M. tuberculosis, los cortes se pueden deshidratar con xileno y montar en medio Harleco para fluorescencia o en Fluormount de Gurr.

RESULTADOS.- Los bacilos ácido-resistentes son amarillos dorados. El colorante desaparece en pocos días, pero da tiempo para una investigación exhaustiva.

En el estudio al microscopio electrónico del bacilo de la lepra, se observa la presencia de una pared celular con 3 capas y un sistema complejo de membranas intracitoplásmicas que se conectan con la membrana citoplásmica (20). Por otro lado se ha observado que M. leprae aislado de nódulos cutáneos leprosoes es capaz de oxidar a la 3, 4-dihidroxifenilalanina (DOPA) y lo transforma en un compuesto que es incoloro.

Debido a todas las dificultades para cultivarlo "in vitro", incluso los realizados en cultivos de varios tipos de células humanas y por su característica de pará-

sito estricto intracelular, se han buscado huéspedes -- susceptibles aparte del hombre, para desarrollar el bacilo de la lepra, y se ha logrado cultivar en la almohadilla plantar de ratones, también en víboras (Elaphe quadrivitta) (29), en caimanes Brasileños (Caiman latirostris) (26) y en armadillos (Dasypus novemcinctus) (19) por vía intramuscular, el objeto de llegar a obtener un cultivo es de tener una cantidad suficiente del microorganismo para la preparación de vacunas.

C).- DESCRIPCION DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LEPROA

Siempre ha sido un misterio la distribución de las lesiones de la lepra, por lo común la piel es la que -- muestra las lesiones más evidentes, especialmente la del lóbulo de la oreja, de la nariz y de la cara, pero los nervios perifericos tanto los gruesos como los delgados, muestran un tipo asimétrico de lesiones al azar (20), - mientras que los órganos interiores no se infectan debido posiblemente a su alta temperatura (34). Normalmente la enfermedad sigue un curso extremadamente crónico aún cuando puede haber períodos de fiebre elevada (fiebre leprosa), con una resaltación de todos los signos y síntomas, las dos formas clínicas principales (lepromatosa y tuberculoide) , se presentan comúnmente en el mismo - paciente, aún cuando predomina alguna de las dos formas (56).

Durante el establecimiento de la lepra la hipersensibilidad tardía es escasa, principalmente en la variedad lepromatosa; en cambio, la respuesta inmunitaria humoral, que se traduce por la aparición de inmunoglobulinas, no se modifica. Parece ser que la proliferación reticuloendotelial granulomatosa que acompaña a esta enfer-

edad(en sus fiderentes formas) impide de una manera u otra la síntesis o la función normal del factor de ~~trans~~ferencia como respuesta a antígenos extraños, por lo que no se desencadena la hipersensibilidad celular (alergia) ante el antígeno causal.

En las lesiones tuberculoides los microorganismos se encuentran en baja cantidad e incluso a veces ni siquiera se manifiestan, esta forma de lepra es predominante en personas con alta resistencia a la infección, también tienden a la curación y desaparición espontánea de la lesión y es probable que algunos casos de esta lepra benigna no sean clínicamente evidentes.

En las lesiones lepromatosa bajo la piel, especialmente bajo la cara, aparecen protuberancias que dan al rostro una expresión leonina (facies leonina) debido a deformaciones fisonómicas que se inician como una erupción cutánea maculosa parduzca, simétrica, que progresa rápidamente, hasta formar infiltraciones deformantes -- denominadas lepromas, que son más abundantes en orejas, nariz, cara, garganta, ojos y algunos nervios periféricos, produciendo pérdida de la sensibilidad en las extremidades, como resultado de cambios secundarios en los tejidos afectados, generalmente se produce mutilación -- con pérdida de dedos en las manos y pies y aún de miembros enteros.

â).- LEPROMATOSA.

La lepra lepromatosa se caracteriza por un deterioro progresivo de nervios motores y nervios sensitivos -- que dan lugar a la patogénesis de la destrucción nervia

sa. En sí, la patología de la lepra lepromatosa se inicia por la aparición de un eritema nodoso leproso, que es seguido de una linfadenopatía, neuritis, y artralgia; muchos de estos síntomas aparecen después de un tratamiento con sulfonas y cuando ya hay pocos bacilos; se cree que estos síntomas se deben a una reacción de hipersensibilidad de tipo inmediato que es similar a la reacción de Arthus con suero de pacientes enfermos y debido a un producto de su degradación se combina con los anticuerpos circulantes ocasionando la fijación de complemento. Se ha establecido que las células Schwann son las más lesionadas por la microbacteria, aunque también en menor grado son las células perineurales, macrófagos y endoteliales, Un gran número de células Schwann infectadas, semejantes a los macrófagos, sufren de generación espumosa y su destrucción, ocasionando la desmielinización axial irreversible, dañando la arquitectura nerviosa, Durante la formación del eritema nodoso leproso el proceso destructivo de los nervios es más acelerado por la formación de abscesos agudos.

En el estado de lepra lepromatosa, el bacilo causante contiene mayor cantidad de fosfolípidos, glicolípidos colesterol libre y ácidos grasos libres y el paciente presenta una mayor cantidad de colesterol debido a la ~~catalisis~~ de los lípidos (lipofanerolisis).

En el estado leproso, el primer signo de la enfermedad es el eritema nodoso leproso, éste se caracteriza por reacciones oxidativas de la epidermis con células Virchow rodeadas de muchos neutrófilos y edema, muchas -

veces aparece unido a microabscesos con dilatación de los vasos, seguido de un bajo grado de vascularidad y solo se observan pocos bacilos fragmentados.

Durante un estudio de la enzima G6PD (glucosa 6-fosfodextrosa) en pacientes con lepra lepromatosa se encontro que 16.9% de estos presentaron deficiencia en dicha enzima pero en las mujeres se encontró la deficiencia enzimática en el 38.1% de ellas independientemente de raza o grupo étnico. Se observa en dicho estudio que la deficiencia enzimática y la anemia falciforme corrían en forma paralela.

Inmunologicamente se ha determinado una alteración en lo que respecta al movimiento direccional del macrófago (quimiotaxis) y movimiento al azar (quimiocinesis) cuando hay complicaciones de eritema nodoso leproso, donde hay una marcada depresión de migración del macrófago. Se observa también una hipergammaglobulinemia -- con disminución de albúmina sérica, mientras la IgM -- permanece inalterada; las IgA e IgG, están significativamente más altas esto sugiere una respuesta humoral -- directamente proporcional a la severidad de la enfermedad (16, 17).

Muchas de las variantes de esta forma de lepra se deben a la energía de la respuesta inmunológica o a la intensidad de esta respuesta.

i).- NODULAR.- Se caracteriza por la aparición de lepromas con varias localizaciones, que son claras y de forma nodular chica, pero que se pueden incrementar en tamaño y número, los nódulos son uniformes o irregulares y atacan mucho a la membrana de la mucosa nasal --

(sistema respiratorio alto), en ocasiones hay alteraciones en vísceras, especialmente en bazo, hígado y casi ningún paciente está libre de complicaciones de la vista, si la enfermedad progresa, no lo hace en corto tiempo.

Los síntomas también afectan a los nervios en forma de fiebres periódicas, muchos mueren en este período o pueden estancarse en esta fase, pero continúan nuevos períodos de fiebre. Cuando no se trata esta forma leprosa de manera adecuada, causa la muerte en un período menor de 10 años.

ii).- DIFUSA.- Esta forma de lepra se parece a la lepromatosa con la diferencia de que la sangre del paciente puede llegar a tener diez mil a cien mil bacilos por mililitro cuando el paciente no se ha tratado o no está en tratamiento; el paciente sufre continuas bacteremias, pero el bacilo generalmente es intracelular en los monocitos, histiocitos y muy frecuentemente en los leucocitos polimorfonucleares. Patológicamente se observa un deterioro neurológico de los nervios motores y de los nervios sensitivos que afectan a las células Schwann y conducen a la desmielinización axial en forma irreversible.

iii).- INFILTRADA.- En este tipo de lepra se observan continuas bacteremias con fiebre leprosa y la concentración del bacilo en la sangre es directamente proporcional a la extensión de la infiltración bacilar y del tamaño bacilar, pero es inversamente proporcional a la duración de la terapia.

Patológicamente se observa una vasculitis crónica que es muy conocida como fenómeno de Lucio que es muy -

frecuente en México y raro en Brazil, histológicamente es representada por un granuloma, con una vascularización necrótica de las venas pequeñas de la dermis, las cuales durante la necrosis se drenan conjuntamente; muchas veces bajo de la dermis se observa una ulceración como el proceso final del granuloma.

b).- LEPRA TUBERCULOIDE.

Se conoce a este tipo de enfermedad como máculo anestésico y es de un mejor pronóstico comparada con la lepromatosa, se inicia como máculas cutáneas parduzcas, simétricas, planas, pero con un borde infiltrado y engrosado, histológicamente esta zona consta de tubérculos de Langhans y un anillo pequeño de células redondas. Generalmente no hay degeneración caseosa en las zonas centrales de las máculas, la dermis sólo muestra un infiltrado perivascular de linfocitos, células plasmáticas y macrófagos, si se buscan, siempre se encontrarán ramas de nervios cutáneos afectados por granulomas tuberculoides fibrosos, esto explica la anestesia y el engrosamiento de los nervios que se observa(33). Hay un edema intenso de la colágena con formación aparente de espuma en las células, que por ser intracitoplásmica da la impresión aparente de células Virchow pero que sin embargo son diferentes por la ausencia de degeneración lipídica(100%) negativas en investigaciones de lípidos en secciones congeladas)muchos bacilos singulares pueden estar muchas veces en el material. Clínicamente en las lesiones tuberculoides los bacilos son escasos(3), algunos pacientes presentan formas transición o mezcla-

de ambos casos clínicos (tuberculoide y lepromatoso) en esta fase considerada benigna, los bacilos se encuentran en corto número, tan es así que muchas veces no se manifiestan al microscopio, existiendo una marcada tendencia a la curación espontánea y es muy probable de -- que muchos casos hallan curado sin haberse manifestado clínicamente.

En esta ocasión la respuesta inmunológica es marcadamente inespecífica pero se ha observado que hay un aumento en los niveles séricos de IgG mientras que la IgA e IgM permanecen inalterables; además, en este tipo de lepra, no hay bacteremias debido al escaso número de bacilos. Por otro lado, se sabe que los anticuerpos producen una fuerte defensa que previene contra la reproducción bacilar, mientras que en la forma lepromatosa hay un crecimiento incontrolado (55). Pacientes con este tipo de lepra presentan un defecto benigno en la movilidad direccional (quimiotaxis) y en la movilidad al azar (quimiocinesis) de los leucocitos polimorfonucleares.

c).- LEPRO INDETERMINADA

Este tipo de lepra tiene mucho parecido con la forma lepromatosa y tuberculoide simultáneamente en lo que respecta a la forma de las lesiones. La expresión "forma indeterminada" se aplica a la enfermedad que puede curar espontáneamente como ocurre con frecuencia o bien puede evolucionar al tipo dimorfo, al lepromatoso o a la forma tuberculoide, en forma indistinta. En esta forma de lepra los bacilos están en las áreas de necrosis,

pero rara vez en forma diseminada, la prueba de la lepromina (Mitsuda) es positiva y muy intensa, El aspecto de la lesión es clara y son comunes los cambios leproso-
sos de una fase a otra, con molestias o bien con reducción de la patología.

En ciertas mujeres con esta enfermedad se ha descubierto la presencia de anticuerpos anti-esperma, observándose por las pruebas de aglutinación macroscópica de esperma, inmovilización de espermatozoides y hemaglutinación del esperma con eritrocitos (25).

Este tipo de lepra se caracteriza por un aumento simultáneo en los niveles séricos de IgM y de gammaglobulinas.

d).- LEPRA DIMORFA.- Los pacientes con este tipo de lepra inducen a la formación de un anticuerpo característico denominado precipitina anti-beta, que también se forma en ciertos pacientes con lepra lepromatosa, en las lesiones hay presencia de bacilos ácido resistente, y no se dideminan. Patológicamente hay formación de un eritema multiforme que se establece aislado o juntamente con el eritema nodoso leproso, se sitúa encima de la dermis sobre una infiltración tipo lepromatosa, hay formación de edema, dilatación de vasos e infiltración oxidativa con neutrófilos unidos a eosinófilos en los cuales se observan pocos bacilos fragmentos.

Los cuadros patogénicos de la lepra son los siguientes;

a) exacervación lepromatosa, que se establece durante la evolución de un caso de lepra y se caracteriza por--

edema de la colágena, presencia de neutrófilos y eosinófilos, con aumento del número de histiocitos y macrófagos jóvenes que ocasionan un decrecimiento en el número bacilar, b) eritema nodoso leproso, es exclusivo de la lepra lepromatosa, hay daño de las células Virchow y edema con dilatación de los vasos que ocasionan una baja vascularidad, a) eritema multiforme, se establece conjuntamente con el eritema nodoso leproso, hay una infiltración oxidativa con neutrófilos unidos a eosinófilos con pocos bacilos fragmentados, d) vasculitis necrótica, conocida también como fenómeno de Lucio, es una vascularización de una necrosis, conjuntamente con pequeñas venas dérmicas, e) reacción tuberculoide, esta reacción puede comenzar como tal o aparecer durante la evolución de un caso lepromatoso o tuberculoide, -- hay un granuloma con dilatación de vasos y un edema intenso de la colágena.

En la piel de pacientes leproso, se pueden observar varios procesos degenerativos como es la alteración fibrinoide, que se observa comunmente en lepra lepromatosa y que frecuentemente se acompaña de un granuloma anular, otro proceso es la caseación necrótica que se observa en ciertos casos de lepra tuberculoide cuando hay franca respuesta inmunológica, la verdadera caseación necrótica es intravenosa en la dermis, - pero si se prolonga a la piel externa en el mejor de los casos, allí mismo es subsecuentemente ulcerada(3).

La lepra es aceptada generalmente como una enfermedad que involucra nervios periféricos (implicaciones

somáticas), y fibras nerviosas autónomas. Cuando se estudian estos nervios en casos de lesiones planas e hipopigmentadas, se observa que ambas funciones (somáticas y autónomas) están dañadas en grado variable; además, - los daños son independientes uno del otro o sea que el daño puede ser a nivel de los nervios autónomos sin involucrar pérdida de sensibilidad (5,34).

Los procesos establecidos con frecuencia durante el tratamiento son los siguientes (2).

a).- Lepromatomas progresivas.- La infiltración es reducida y formada casi exclusivamente por células alargadas Virchow, que contienen muchos gránulos lipídicos en el citoplasma y muy pocos bacilos alterados o gránulos ácidos resistentes.

b).- Lepromatomas residuales.- Se caracterizan por muchas pequeñas células o por células alargadas Virchow con intensa degeneración lipídica intracitoplásmica de los bacilos, son extracelulares al igual que las lesiones progresivas que también son 100% lípidos positivas, por microfotografía se ha establecido que durante el tratamiento la degeneración lipídica desaparece junto a las células Virchow.

c).- Infiltración crónica residual.- Este proceso se caracteriza por muchas células pequeñas denominadas foci, o células mononucleares (linfocitos e histiocitos), este síntoma aparece debido a un tratamiento prolongado de alguna forma de lepra.

CORRELACION DE LAS LESIONES, la inmunología y la --
 bacterioscopía de la lepra (Trautman, 1965)

Tipo de la lesión	Inmunología (prueba de la lepromina)	Bacterioscopía (observaciones de biopsias)
Lepromatosa	(-)	(+)
a) Difusa	(-)	(+)
b) Infiltrada	(-)	(+)
c) Nodular	(-)	(+)
Tuberculoide	(+)	(-)
Dimorfa	(+)	(+)
Indeterminada	(+)	(+)

Características comparativas de la lepra lepromatosa y la lepra tuberculoide. (2)

TUBERCULOIDE

LEPROMATOSA

- | | |
|---|---|
| 1.- Localización bien definida con lesión circunscrita. | 1.- Localización difusa, extensiva, con lesiones poco limitadas |
| 2.- Pocos bacilos demostrables | 2.- Millares de bacilos demostrables |
| 3.- Fagocitosis intensa, respuesta del macrófago, con efectiva disposición del bacilo | 3.- Abundantes macrófagos (células espumosas), fagocitosis efectiva, sin disposición del bacilo |
| 4.- Reacción a la lepromina positiva (hipersensibilidad celular) | 4.- Reacción a la lepromina negativa |
| 5.- Inflamación granulomatosa | 5.- Ausencia de verdaderos granulomas |
| 6.- Anticuerpos circulantes (humoral) insignificantes | 6.- Anticuerpos circulantes (a polisacáridos) demostrables |

- 7.- Reacción inmunológica con características primarias, por hipersensibilidad celular
- 7.- Reacción inmunológica (eritema nodoso leproso) con características primarias, por la reacción tipo inmediato (anafiláctico)
- 8.- Respuesta inmediata a la terapia efectiva y específica
- 8.- Respuesta terapéutica lenta

D) ESTADOS SUSCEPTIBLES A LA INFECCION

Aunque la lepra es poco contagiosa, existen ciertos factores que ayudan a su propagación. Entre los factores más importantes de sensibilidad, está el de los defectos inmunológicos contra la enfermedad, ya que se contrae la enfermedad a una edad más temprana, lo cual es mucho más grave debido a la escasa resistencia presentada ante la infección, es por eso que los niños son más susceptibles a la infección ya que aún no está bien desarrollado su mecanismo inmunológico (36)

Otro factor verdaderamente importante para la propagación de la lepra es la higiene personal, ya que se ha visto que un contacto íntimo y prolongado por un largo período de tiempo en malas condiciones higiénicas va a favorecer la infección de los contactos para que contraigan la enfermedad.

Por lo que respecta al sexo parece que no hay bases para indicar si un sexo o el otro es más susceptible a la infección ya que la enfermedad se presenta en ambos indistintamente.

a).- REFERENTE A LA EDAD

Por métodos estadísticos se ha establecido que la

edad de aparición de la lepra en el paciente , es un factor determinante para visualizar el futuro desarrollo de la enfermedad, ya que se han visto que en niños leproso las complicaciones de la lepra son más acentuadas y de alta mortalidad en caso de no recibir un tratamiento adecuado, las complicaciones son debidas en gran parte a un estado inmunológico aún no bien establecido, o defectuoso lo cual impide una defensa adecuada ante la infección.

Al realizar un estudio epidemiológico mediante la prueba de la lepromina temprana (Fernández) y la lepromina tardía (Mitsuda) en zonas de baja andemia, como resultado de estas pruebas se encontró que las personas de 1-4 y de 15-19 años, dan positivas las pruebas en un 95% se observó que las reacciones aumentan en intensidad con la edad por lo que en los niños la prueba da resultados de menor intensidad. A pesar que la prueba de Fernández fue positiva en pocos casos la reacción de Mitsuda lo fue en una forma creciente en los individuos de 14-19 años en comparación con los 1-4 años, ésto indica que posiblemente los individuos de 14-19 años tengan cierto grado de resistencia a la lepra (44).

Se han utilizado tablas de sobrevividas de los miembros no leproso en una población donde la lepra se endémica, en los enfermos la sobrevivida en aquéllos cuyas edades de aparición de la enfermedad fueron tardías el tiempo de sobrevivida era similar al de una persona no infectada. Esto se comparo con personas donde la aparición de la enfermedad fue a una edad temprana, los cuales mue

ren antes del tiempo promedio esperado, esto permite postular la hipótesis de que los individuos en donde la enfermedad aparece después de los 20 años van a tener cierta resistencia a las complicaciones originadas por la infección, las cuales pueden conducir a una muerte prematura, a aquellos individuos en los cuales la lepra aparece en edad temprana (51)

Se han estudiado hijos asintomáticos cuyos padres son leproso y se han descubierto los siguientes cuadros; lesiones hepáticas en el 47% de ellos, bacilos ácidos resistentes en el 9.5%, granulomas en el 9%, áreas focales de necrosis en el 14.0% e hiperplasia de las células de Kupffer en el 33.0% de ellos. Esto habla en primer lugar del alto índice de contagio por contacto íntimo y prolongado, y en segundo lugar de la susceptibilidad a la infección en personas de corta edad, en los cuales muy probablemente aún no esté bien desarrollado el mecanismo de defensa inmunológico.

b).- DE ACUERDO AL ESTADO SOCIO-ECONOMICO

El nivel de la vida de la población es factor importante en la propagación de la lepra, en regiones altamente desarrolladas el padecimiento no se propaga, esto se observa comúnmente en Europa Central y en los Estados Unidos, en donde aunque llegan inmigrantes con lepra, ésta no se propaga a los residentes nativos de la región (7,11,56).

El estado socio-económico de una familia va a delimitar su grado de higiene personal y de la vivienda, como ya se dijo con anterioridad el contacto prolongado con un leproso en malas condiciones higiénicas, va a facilitar la propagación de la lepra a los demás miembros de-

la familia(6). Es muy común que la lepra se propague en personas de escasos recursos económicos ya que estas no siguen reglas de higiene personal adecuadas, además de no hacer visitas periódicas al médico, que en caso de efectuarse, servirían para una detección temprana de la lepra y en su caso evitar que esta llegue a períodos -- graves o mortales, además de que servirán simultáneamente para detectar en otros miembros de la familia posibles casos de contagio, que en un momento dado actuarían como focos infectantes en potencia, sobre los restantes miembros . Es también común que al detectarse la lepra en un miembro familiar, no se acuda de inmediato ante el médico, sino ~~de~~ se trata de curar con "remedios caseros" o autorecetas por personas sin conocimientos y que por lo tanto no curarán al paciente y sí lo harán perder -- tiempo para iniciar inmediatamente un estudio adecuado -- de su infección y un tratamiento por persona~~s~~ especializada en este tipo de enfermedad.

c).- DE ACUERDO AL ESTADO INMUNOLOGICO

Es bien sabido que en la lepra hay anormalidad inmunológicas inespecíficas que conducen a la disminución en la capacidad de desarrollar la sensibilidad retardada a antígenos no relacionados con M.leprae, debido a una -- depresión linfocítica.

Altos niveles séricos de inmunoglobulinas IgG e IgA elevan la capacidad del Sistema Reticulo Endotelial hacia una marcada depresión de la timodependencia en los linfocitos de las áreas paracorticales de los nódulos linfáticos. Al estar altos los niveles de inmunoglobulinas (excepto IgD) se realizaron estudios de sus propiedades fisicoquímicas sin encontrarse anormalidades aparentes, por

lo que se cree que los niveles altos sean causados por -- el contacto prolongado y la incubación del antígeno antes de causar la enfermedad (16, 39, 54). En estos mismos -- estudios se descubrió la presencia de una nueva inmuno- -- globulina que fue denominada IgK, esta inmunoglobulina -- tiene carga neta negativa a pH de 8.8 además de su pro- -- pia especificidad antigénica; sin embargo, está parcial- -- mente relacionada con el fragmento Fc de la IgA y con el -- fragmento Fab de las inmunoglobulinas conocidas y su mo- -- lécula parece poseer cadenas ligeras (Kappa), pero no -- las cadenas largas (lambda) (28).

En la lepra tuberculoide las anomalías de una -- inmunidad inespecífica son más remarcadas que en los ca- -- sos lepromatosos, por lo que adquiere el paciente una -- susceptibilidad a otras enfermedades tales como la tuber- -- culosis, micosis y ciertas infecciones con actinomicas.

Se han descubierto un defecto en los linfocitos pe- -- queños en lo que respecta a las transformaciones libres -- ante la fitohemaglutinina. Cuando el bacilo es adherido -- a fitohemaglutinina, afecta la síntesis de DNA en los -- leucocitos cultivados de leproso; cuando los linfocitos -- son de pacientes con lepra tuberculoide no va a haber al- -- teraciones, pero si los linfocitos son de un paciente con -- lepra lepromatosa y son además estimulados con lepra mu- -- rina o con fitohemaglutinina, se va a observar una mayor -- transformación ante el estímulo.

La fagocitosis del bacilo por leucocitos polimorfo- -- nucleares durante la fase aguda de la lepra, revelan la -- actitud real del organismo humano leproso a luchar y des

truir al bacilo infectante.

La timectonomía neonatal completa, evita el desarrollo de inmunidad antimicobacteriana después de una vacunación con M. leprae irradiada, pero la capacidad inmunológica puede restaurarse por infusión intraperitoneal de timocitos sintéticos (41). Ratas timectomizadas neonatalmente y ratas normales fueron inoculadas por vía del cojinete plantar con M. leprae vivos y se observó que las ratas normales no permitían el desarrollo de la lepra con una segunda inoculación a los 120 o 180 días después de la primera; mientras que las ratas timectomizadas permitían el desarrollo después de una segunda inoculación, lo cual indica su incapacidad para la formación de inmunidad humoral.

Al llevar a cabo un estudio inmunológico en personas con inicios de lepra, se les realizaron injertos de piel y se observó una inmunidad deficiente ante el injerto el cual no fue rechazado, lo cual habla de una deficiencia inmunológica de grandes proporciones (18).

INTENTOS DE CULTIVO

truir al bacilo infectante.

La timentonomía neonatal completa, evita el desarrollo de inmunidad antimicobacteriana después de una inoculación con M. leprae irradiada, pero la capacidad inmunológica puede restaurarse por infusión intraperitoneal de timocitos singénicos (41). Ratas timentomizadas natalmente y ratas normales fueron inoculadas por el cojinete plantar con M. leprae vivos y se observó que las ratas normales no permitían el desarrollo de lepra con una segunda inoculación a los 120 o 180 días después de la primera; mientras que las ratas timentomizadas permitían el desarrollo después de una segunda inoculación, lo cual indica su incapacidad para la adquisición de inmunidad humoral.

Al llevar a cabo un estudio inmunológico en ratas con inicios de lepra, se les realizaron pruebas de piel y se observó una inmunidad deficiente a la que el injerto el cual no fue rechazado, lo cual habla de una deficiencia inmunológica de grandes proporciones.

do resistente, demás de que demuestra una fuerte propiedad para oxilar la 3, 4-dihidroxifenilalamina (DOPA), - convirtiendole en incoloro, por lo que cabe la posibilidad de que este microorganismo sea un precursor cultivable de una fase de M. leprae (8).

Resientemente (principios de 1978) se aislaron - bacilos de un caso de lepra y se llevaron con S.S.I.--- estéril y una solución de NaOH al 8% y con esta suspensión bacteriana se sembraron unos medios de yema de huevo que se incubaron a 33°C durante 5 semanas, observándose el desarrollo de colonias grises o amarillo naranja, las propiedades biológicas de este microorganismo - no son muy diferentes de las bacterias típicas de la -- lepra; sin embargo presenta marcados cambios morfológicos durante la incubación , especialmente en el tamaño y granulación citoplásmica y otros fenómenos que no son comunes en otras micobacterias, la frecuencia de aislamiento de bacilos ácido resistentes cultivables van del 0% en casos de lepra de la oreja, 17.4% de lepra subcutánea, 25% de lepra de la mucosa nasal, 28.6% de costura de la lepra nasal y 90% de lepra limpia de mucosa nasal (22, 38 y 49). Se ha visto que el desarrollo positivo o negativo del bacilo, en el medio de yema de huevo van a depender del pH del medio: además, el medio sin proteína no presenta desarrollo, sin embargo, el pH debe ser de 6.1-6.3, el medio de yema de huevo tiene -- muchas sustancias que permiten el crecimiento de los -- bacilos con ayuda de los lípidos del huevo, tan es así que si el huevo se cambiara por leche o suero de caba--

llo el crecimiento disminuye.

Para mantener a M. lepraemurium se prepara el medio con 1% de yema de huevo a partir de la mezcla de una -- parte del medio basal de Ogawa al 1% y dos partes de -- yema de huevo ajustando a pH de 6.1; este medio no permite el crecimiento de M. lepraemurium pero permite la sobrevivencia de la micobacteria por 2 meses, por lo -- que es apropiado para probar factores de crecimiento -- (22, 52). Al ser M. lepraemurium cultivable en el medio de Ogawa-yema de huevo al 1% se aclara la clave del cultivo de M. leprae, si se modifica la fracción del huevo usando el residuo de una extracción de la yema del huevo y liofilizando con éter de petróleo o acetona, dicho residuo contiene el factor de crecimiento del bacilo de la lepra (53).

A principios de 1978 Kato Laszlo utilizó el medio-basal de Ogawa con extracto de levadura, glicerol y suero de borrego y logró hacer crecer a M. leprae "in vitro", lenta pero abundantemente, el bacilo fue aislado de un tejido leproso de un armadillo infectado, el factor esencial para el crecimiento fue la fracción lipídica del suero, el colesterol, ya que éste no sólo reemplazó sino que sobrepasó el efecto promotor de crecimiento mostrado por la fracción lipídica; sin embargo, el crecimiento de las micobacterias solo se observó cuando los medios se enriquecieron con suero completo (30).

El medio utilizado por el cultivo primario de M. leprae a partir de tejido leproso, es el siguiente:

Disolver 8.4gr. de KH_2PO_4 , 0.5gr. de Na_2HPO_4 , 4gr.

de extracto de levadura "DIFCO" y 50 ml. de glicerol, se afora a 1 lt. de solución con agua destilada, este es el medio basal. Luego se preparan 200 mg. de colesterol en 4ml. de acetona y se inyecta con jeringa en el medio basal, después se calienta en autoclave 10 min. a 60°C para evaporar la acetona. Posteriormente se preparan -- 200 mg de lecitina disueltos en 20 ml. de medio basal -- frió y se mezcla con el resto del medio basal para después esterilizar en autoclave y al enfriar se agrega -- 1 ml. de suero de borrego (esterilizado por filtración)-- por cada 9 ml. de medio basal con colesterol y lecitina (22, 30, 49).

B).- CULTIVO "in vivo"

Se ha logrado cultivar M. leprae en varios huéspedes que desarrollan la infección típica de la lepra.

Debido a los problemas que existen para cultivar al bacilo de Hansen se ha realizado estudios para obtener un desarrollo "in vivo" en diferentes huéspedes que fueran susceptibles a la infección; así por ejemplo, se logró en víboras ratoneras amarillas (Elaphe quadrivittata), en caimanes Brasileños (Caiman latirostris) y en armadillos (Dasypus novemcinctus), en todos hubo un --- crecimiento adecuado, pero es mejor en armadillos, presentándose además en todos, infección de especie a especie (7,11,19,24,26,29,41,29).

En los 4 casos (víboras, caimanes, ratones y armadillos) la técnica es la misma, se homogeniza un leproma de un paciente leproso con solución de tetraciclina-

al 0.01% en buffer de fosfatos de pH 7.2 y se hacen diluciones a manera de obtener una concentración adecuada de bacilos, se corren simultáneamente testigos inoculando con la suspensión pero inactivada a 100°C por 30 min y un segundo control se hace sembrando con la suspensión sin inactivar, en cajas de agar sangre, dextrosa - agar, caldo dextrosa, medio de tioglicolato, medio de Loewenstein-Jensen e inoculando ratones intraperitoneal o intradérmicamente. Una vez inoculados los huéspedes, se mantienen en observación unas 10 semanas y se sacrifica la necropsia demuestra la presencia de lesiones hepáticas pequeñas y de color naranja, de las cuales se hacen biopsias que se tiñen por técnica de Ziehl-Neelsen y al microscopio se observa la presencia de bacilos ácido -- resistentes intracelularmente en arreglos cilíndricos o en globos extracelulares, estos bacilos se observan --- también en bazo y en nódulos linfoides.

Cuando de los órganos infectados se hace un homogeneizado aséptico con s.s.i. estéril y se inoculan a otros huéspedes sanos, al cabo de unos 5 meses hay desarrollo de la enfermedad con todos sus síntomas y cuadros clínicos.

Todos los controles deben ser negativos, en lo --- que respecta al crecimiento del microorganismo e de otros que pudieran contaminar a la vacuna.

Con las diluciones hechas con los órganos infectados de los diferentes huéspedes con solución salina isotónica, se hacen pruebas de precipitación, y se observan varias bandas de precipitación con el suero del huésped.

I N M U N O L O G I A

Se ha reportado la presencia de anticuerpos en suero de pacientes leproso, estos estudios concernientes al mosaico antigénico utilizan un gran número de antígenos microbianos, en sistemas homólogos antígeno-anticuerpo, derivados de otras micobacterias y empleando antisueros preparados por inmunización de conejos con M. leprae inactivados (15, 40)

La inmunización con M. leprae irradiado, da como resultado una sensibilización de los linfocitos "T" que conducen a una inmunidad específica frente a M. leprae y M. tuberculosis, notándose una inmunidad inespecífica contra L. monocytogenes, otras micobacterias, Toxoplasma gondii, etc. (27, 40), lo cual hace suponer ser mediada por células y no por mecanismos humorales.

Los sueros de personas leprosas dan positiva la prueba de fijación de complemento y de precipitinas con extracto de M. leprae y M. tuberculosis.

Estudios de movilidad direccional de neutrofilos y movilidad leucocitaria al azar (quimiotaxis y quimiotaxis); aunque han reportado que el eritema nodoso leproso aumenta la reducción del nitro azul de tetrazolio (NBT) y la lepra lepromatosa presenta inhibición de quimiotaxis, dentro de áreas de la piel a inducir respuesta inflamatoria (35, 39).

A) RESPUESTAS INMUNOLOGICAS ANTE LA INFECCION

En el hombre y los animales de laboratorio se observa como respuestas a la infección leprosa un aumento en

el número de linfocitos en áreas paracorticales. M. lepra e actúa como estimulante o atrayente antigénico, aún cuando se caliente la vacuna en autoclave, pero esa capacidad disminuye si la inactivación es mecánica; como por ejemplo el congelamiento-decongelamiento (47).

Después de una vacunación subcutánea en ratones -- con M. leprae irradiado, se forma un acúmulo local de macrófagos activos en el sitio de la inoculación y una extensa distribución de linfocitos sensibilizados a los antígenos microbianos, así como una resistencia inespecífica también extensa, mediada por células, formandose al final una resistencia inmunológica específica (47).

Cuando el ratón es timentomizado y después se incula la vacuna, hay crecimiento de las micobacterias si no se inactivaron éstas, pero si se inactivaron por --- cualquier medio, no va a haber respuesta inmunológica ni la formación de anticuerpos, ni una inmunidad celular (15).

a) Inmunidad en animales de laboratorio.

Ratones, víboras, caimanes, armadillos y conejos -- van a desarrollar inmunidad contra la lepra, si la vacuna con la cual se inoculan se inactiva por el calor o -- por irradiación, primero hay desarrollo de una inmunidad celular inespecífica y posteriormente se forma una inmunidad humoral específica contra el Bacilo de Hansen.

En caimanes y armadillo hay formación de anticuerpos contra M. leprae, además, hígado, bazo y nódulos --

linfáticos presentan desarrollo de lepromas, los sueros obtenidos reaccionan indistintamente contra M. leprae y M. lepraemurium (19,26).

Se ha observado una población de linfocitos sensibilizados específicamente en el bazo de ratón vacunado con M. leprae irradiado, estos linfocitos son estimulados por una inyección de antígenos homólogos para producir linfocinas con una consecuente activación del macrófago. Si el antígeno no se inactiva y el ratón es timectomizado, va a haber una gran multiplicación del bacilo, debido a una inmunosupresión elevada pero incompleta (15).

Si un ratón inmunológicamente normal es inoculado con una suspensión de M. leprae en el cojinete plantar va a haber inicialmente un gran desarrollo de la micobacteria y de momento se va a detener esa multiplicación; esto se debe, según estudios, a que inicialmente el ratón no está inmunizado, pero una vez alcanzada una cierta inmunidad ante el bacilo inoculado, va a detener su multiplicación (15).

El cuadro que se presenta en el armadillo, ante la infección (14), se inicia con una parasitosis masiva del bacilo en las células Kupfer, después ataca los lóbulos hepáticos con aparición de infiltración masiva de macrófagos parasitados.

Las células hepáticas infectadas con M. leprae desarrollan un citoplasma granular pálido, el cual se hace espumoso en la lepra tardía (19).

b) Inmunidad en el hombre infectado.

Hay indicios de que infecciones subletales con el bacilo de la lepra, inducen la formación de una sensibilidad específica por linfocitos T; sin embargo, estos linfocitos no poseen la capacidad de destruir a los bacilos homólogos al que los sensibilizó; cuando éstos se inoculan directamente, sin embargo, influyen sobre el -- proceso de los fagocitos mononucleares activando su capacidad de destruir al bacilo. Evidencias considerables muestran la presencia de receptores inmunológicos sobre la superficie de los linfocitos que tienen parecido a la IgG y a la IgM, demostrándose ésto por inmunofluorescencia indirecta debido a sus determinantes inmunoglobulínicas. Este fenómeno pudiera ser la causa de tanta depresión en el número de células tímicas, así como de una activación no específica de las respuestas inmunológicas humorales (21).

Se ha determinado un gran defecto en la migración al azar (quimiocinesis) y en la migración direccional (quimiotaxis), debido a factores séricos inhibitorios de la migración, en caso de lepromatosis y de eritema nodoso leproso, hay presencia de una mayor inhibición -- pero los niveles de reducción de nitro azul de tetrazolio son muy altos, estas alteraciones vuelven a sus valores normales en etapas postinfecciosas.

E P I D E M I O L O G I A , P R O F I L A X I S
Y T R A T A M I E N T O

La relevancia de preparar una vacuna contra M. leprae está cada vez más cerca, M. leprae mantiene su inmunogenicidad aún si se irradia, se purifica p se calien ta en autoclave, lo cual garantiza que ninguna micobacteria o otro microorganismo esté vivo y contamine así - la vacuna.

Durante la diálisis se estraee antígenos de M. leprae, se cree que estos antígenos solubles del citoplasma, son supramoléculas formadas por un gran número de - determinentes antigénicas.

Un modelo epidermiológico indica que para controlar y erradicar la lepra se requiere seguir los pasos-- dados a continuación, algunos de los cuales están ya-- establecidos;

a) El control de la lepra como se hace en la actualidad en el estudio de la población, está basado en la detección temprana y en el tratamiento regular de los - casos.

b) La vacunación tipo BCG es efectiva para preve-- nir el desarrollo de la lepra en su forma lepromatosa o para convertir los casos potencialmente lepromatosos en tuberculoide benignos.

c) La vacunación con antígenicos específicos está-- conciderada como 100% efectiva en la prevención de la-- lepra.

d) El mejoramiento de las condiciones actuales en

el manejo de los casos.

e) El aislamiento de los pacientes lepromatosos durante un año a partir del día de su detección.

De todos estos puntos, el de la vacunación específica, es el más efectivo ya que protegería al total de la población inmediatamente. Esto ha motivado que las investigaciones actuales se orienten hacia la preparación de una vacuna específica, que saldría más económica que si se tratara a un paciente durante varios años con DDS (4,4, Diamino difenil-sulfona) e incluso a algunos durante toda su vida (31 y 32).

Hay algunos factores del huésped en la lepra lepromatosa que juegan un papel importante en la profilaxis, estos factores son; altos niveles de lisosima, bajos niveles de Zn y Fe séricos, así como niveles bajos de vitamina "A", valores anormales de ácidos grasos, fagocitosis normal y actividad antimicrobiana en los monocitos, macrófagos y polimorfonucleares.

Hay pruebas de gran sensibilidad para detectar la infección debido a que hay formación de anticuerpos, los cuales se ponen de manifiesto por pruebas de inmunofluorescencia indirecta con ayuda del antígeno adsorbido en cardiolipina o albúmina bovina.

A) Zonas endémicas de lepra en el mundo.

El número total de casos de lepra en el mundo se estima conservadoramente entre 10 y 12 millones, de los cuales hay 6.5 millones en Asia, 3.5 millones en -

Africa y en América unos 35000. Hoy día la lepra es casi desconocida en Europa Central, no así en Europa Septentrional, zonas tropicales y subtropicales en las cuales se presenta frecuentemente, como en el caso de la población nativa de las Filipinas, Indias Occidentales, México, América Central y la parte norte de América del Sur. En Estados Unidos hay regiones endémicas en Louisiana, Florida y Texas (55).

Es de importancia conocer las Zonas endémicas, ya que los emigrantes de esas zonas pueden ser focos de infección en los lugares en los cuales se establecen.

B).- Intentos de producir vacunas contra M. leprae.

Debido al problema de cultivar "in vitro" M. leprae y a fin de obtener cantidad suficiente del inmunógeno para preparar vacunas se ha recurrido a otra bacteria que sean cultivables y que contengan antígenos similares al bacilo de Hansen, esto puede determinarse realizando reacciones cruzadas, el problema encontrado es que por este método no se obtiene una inmunidad específica, y efectiva.

El método más investigado para preparar la vacuna antileprosa es el utilizar el bacilo de la lepra inactivado por calor en autoclave o bien irradiado, ya que se ha visto que ninguna de estas formas de inactivación elimina su capacidad inmunogénica, y que si una vacuna preparada por uno de estos métodos se inyecta en animales o en el cojinete plantar del ratón, éstos van a crear una inmunidad ante futuras infecciones con el

bacilo vivo, impidiendo su desarrollo (10. 39, 41).

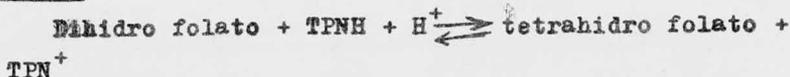
El último intento por obtener una inmunización contra la lepra ha sido el de utilizar una suspensión de M. leprae inactivo junto con otra micobacteria como por ejemplo BCG que actúe como adyuvante conveniente. Armadillos inmunizados con una vacuna de M. leprae emulsificada en adyuvante incompleto de Freud, mostraron que a los 46 días, los animales responden a la prueba de la lepromina y a los 8 meses responden con reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado con la prueba cutánea de la lepromina (39).

C).- Quimioterapia contra la lepra

Algunas sulfonas como la DDS (4-4' diamino difenil sulfona) y la rifampicina suprimen el crecimiento de M. leprae y las manifestaciones clínicas de la lepra si se administran durante un tiempo prolongado.

Se ha observado en otras enfermedades, que la acción prolongada y combinada de los inhibidores, es más efectiva en su poder bactericida y además crea menos resistencia, esto se ha tratado de lograr en el caso de la lepra, utilizando la DFD (difenil derivado de la diamino defenilsulfona) ya que es un bloqueador de crecimiento de M. leprae en el cojinete plantar del ratón, el bloqueo resulta de la potencia sinérgica de la acción aumentada de la droga, a diferencia de que se trabaje exclusivamente con DDS.

Estructuras intermediarias biosintéticas pueden llevar a cabo el bloqueo de la vía de los folatos en M.

leprae.

La enzima que cataliza la adición de dos hidrógenos en las posiciones 5 y 6 del anillo pirimídico del dihidro folato, es inhibida por las sulfonamidas, sulfonas diaminopteridinas, diaminoquinazolininas y diaminopiridopirimidina, estos últimos diaminos contienen una estructura parecida a la del folato.

Como se ha visto que la DDS es de mecanismo antifolato en M. leprae, se han tratado de producir antimetabolitos que en combinación con la DDS den una acción sinérgica a lo largo de la vía metabólica de los folatos y que sería de efecto terapéutico más rápido (37).

Tabla comparativa de sensibilidad y resistencia a drogas antileprosas (usando dosis mínima inhibitoria)

DROGA	SENSIBLES	RESISTENTES	<u>RESISTENTES</u> <u>SENSIBLES.</u> -R
DDS	8.1	3225	400
SULFALEINA	3.6	12143	3373
SULFADIMETOXINA	6.5	5850	900
SULFAMETOXINA	6.9	8280	1200
SULFAMETOXIPIRIDAZINA	7.1	10650	1500
TRIMETOPRIM	34	172	5
PIRIMETAMINA	101	403	4
AMINOMETARINA	742	1483	2
RIFAMPICINA	1.1	1.1	1
B. 663	6.3	6.3	1

Hay un estudio con pacientes que presentaban erite

ma nodoso leproso a los cuales se administró metandienona junto con esteroides y se observó cierto poder adyuvante que permite utilizar dosis menores del esteroide-antileproso, la metandienona (esteriodes anabólico) se ha usado también como sustituto de la DDS con 60% de eficiencia en casos donde la DDS ya había creado resistencia (9).

En estos mismos **pacientes** se probó una transfusión del factor de Lawrence, y se observó un cierto alivio - ante la infección 7 meses y medio después de realizada la primera transfusión, así como también se observó un mejor estado inmunológico; el factor se extrae de leucocitos cuyos donadores dan positiva la prueba de la lepromina y de la tuberculina (4).

RESUMEN Y COMENTARIOS

A).- RESUMEN

De lo que se ha dicho durante el desarrollo de este trabajo se puede resumir que la lepra es una enfermedad poco contagiosa en áreas citadinas, donde se observa una higiene regularmente efectiva, además se puede decir que la infección o la no infección va a depender netamente de factores inmunológicos, ya que se dice que una persona con defectos inmunológicos va a contraer la infección a una edad temprana, por lo que los cuadros patológicos van a ser más graves, los cuales condicionarán a una muerte prematura; mientras que, en los que su deficiencia inmunológica es leve, la infección va a tardar más tiempo en hacerse manifiesta y al hacerlo no se observará tanta intensidad en la sintomatología, lo cual indica una cierta resistencia a la infección, esta gente generalmente vive una vida promedio similiar a la de una persona normal.

Por lo que respecta a los intentos de cultivo, todos tienen un mismo objetivo; obtener una biomasa inmunogénica suficiente para producir una vacuna específica contra la lepra, ya que aunque se sabe que M. leprae da reacción cruzada con otras micobacterias y con ciertos actinomycetos, se probó durante mucho tiempo una protección, utilizando la vacuna BCG, sólo que la inmunización proporcionada contra la lepra fue de bajo nivel y además inespecífica.

Al saberse que el bacilo de Hansen es un parásito intracelular estricto, los primeros intentos de cultivos semiartificiales fueron utilizando huéspedes suscepti-

bles y así se logró cultivar en ratones, víboras, caimanes y armadillos, solo que este tipo de cultivo presentaba el inconveniente de que con los lepromas utilizados extraídos del huésped, se obtenía otros antígenos -- del propio huésped, que requiere de una purificación -- exhaustiva, obteniéndose al final, una baja cantidad de antígeno leproso, esto causó que las investigaciones -- posteriores se orientaran a obtener un medio de cultivo artificial, con el cual se obtenga una cantidad alta -- del inmunógeno, lográndose a principios de 1978, cuando a un medio artificial de Ogawa al 1% con yema de huevo, se le adicionó extracto de levadura, lecitina y suero -- de borrego (el cual contiene colesterol) que es el factor de crecimiento de M. leprae.

En estudios previos al descubrimiento del medio -- artificial para el cultivo de M. leprae se había encontrado que ni el calor, ni la inactivación por irradiación afectaban las propiedades antigénicas del bacilo de la lepra, ya que éstos después de una inactivación total de sus funciones vitales mantenían sus propiedades inmunogénicas, que inducen a la formación de una inmunidad, primero inespecífica mediante mecanismos humorales y -- posteriormente específica mediada por linfocitos "T" -- sensibilizados y aunque estos no pueden destruir al bacilo, promueven a los macrófagos, mediante linfocitos, a destruir a los bacilos de la lepra que fagocitan.

Con esta información se deduce la inminente fabricación de una vacuna anti-leprosa en un corto tiempo, -- ya que aunque las sulfonas son muy efectivas contra la

lepra, cada día hay más casos de resistencia, por lo que se ven obligados los médicos a abandonar este tipo de -
terapia, considerando además, que la profilaxis, es siem
pre mejor que la curación.

COMENTARIOS

El presente trabajo realizado sobre la lepra, fue con el fin de contribuir a resolver el problema sociológico que representa dicha enfermedad, ya que mucha gente la considera como una enfermedad muy contagiosa y desagradable, motivo por el cual, a los leprosos se les rechaza socialmente.

Como se ha dicho durante el presente trabajo, la lepra a sido mal interpretada debido a la falta de información adecuada y autorizada, respecto a la enfermedad, y esto ha ocasionado que muy poca gente esté enterada de que la lepra no representa un peligro infectocontagioso y, que es además curable en forma completa si se sigue una terapia efectiva y bajo la vigilancia médica.

Se ha demostrado prácticamente que el contagio es raro, y que va a depender fundamentalmente del estado inmunológico del organismo, y por otro lado que la lepra tratada en períodos tempranos es curable principalmente con sulfonas.

Por todo esto es que se recomienda un control -- sanitario estricto en zonas endémicas, además de un -- trato social y clínico adecuado a las personas infectadas.

En la actualidad se están investigando métodos -- idoneos para producir una vacuna específica contra la lepra, basándose en que las radiaciones y el calor -- (incluso el de autoclave) no le afecta en lo que res-

pecta a sus determinantes antigénicas, que inducen a la formación de una inmunidad específica. El motivo por el cual se ha detenido la producción de la vacuna es la falta del inmunógeno en cantidades suficientes, pero una vez resuelto el problema, debido a que se ha encontrado un medio artificial que permite el cultivo "in vitro", se piensa en la obtención de grandes cantidades de la micobacteria; para la preparación de la vacuna en forma inmediata ya que es más problemático mantener a una persona en tratamiento prolongado e incluso a algunos de por vida, que una inmunización de la población de las zonas endémicas.

Sin embargo debe tomarse en cuenta que los pacientes leprosos padecen deficiencias inmunológicas, y que si se vacuna es dudoso que respondan ante el antígeno, por lo que la preparación de dicha vacuna tendrá que ser muy estudiada para vencer dichos problemas.

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

- 1).- Abe M., Isumi S., Saito T. and Mathur S. K.
Early serodiagnosis of leprosy by indirect immuno-
fluorescence.
Leprosy review 48:3 (209), Academic press. 1977
- 2).- Abstracts. Reactional processes of leprosy
Inter. jour. of leprosy 39:2 (249) 1971
- 3).- Abstracts. The manifestation of leprosy
Inter. jour. of leprosy 46:3-4 (278) 1978
- 4).- Abstracts. arts. 74 y 75 Transfection of Lawrence's factor obtained for leucocytes.
- 5).- Leprosy review 48:3 (209-210) Academic press. 1977
- 5).- Antia N. H., Vankany B. and Pandey N. J.
Surgical decompression of the ulnar nerve in leprosy neuritis. Leprosy India 48 (362-370) 1976
- 6).- Bechelli L., R. Quaeliato, S. Nakumara & Lima Filho
Lepromis test in noncontact (Mainly 1-19 years old) living in an area of low leprosy endemicity.
Inter. jour. of leprosy 39:2 (136-145) 1971
- 7).- Burdon Kenneth L. and Robert P. Williams.
"Microbiología" 1ª reimpresión en español
Ed. Publicaciones culturales S.A. México 1974 (676)
- 8).- Chatterjee B. R. A nonacid-fast coccoid precursor-possible cultivable phase of M. leprae
Inter. jour. of leprosy 45:1 (87) 1977
- 9).- Choudhury S., S. Kundu, S. Ghosh and S. Hazra
Anabolic steroid as an adjuvant in the treatment of chronic leprosy reaction and ENL under corticosteroid therapy. Leprosy review 48:3 (169-174) A. press 1977

- 10).- Convit, Jacinto
General ideas concerning a vaccine against leprosy
Inter. jour. of leprosy 46:1 (61-63) 1978
- 11).- Davis, Bernard D. and R Dulbecco "Microbiologia"
2^a tomo, Ed. Harper & row, Canada 1969 (865-867)
- 12).- Desikan K. W. (Abstracts art # 71)
Correlation of morphology with viability of M. leprae.
Leprosy review 48:3 (201) A. press 1977
- 13).- Druntz D. J. and Levy L.
The viability of blood-borne M. leprae
Inter. jour. of leprosy 39:1 (88) 1971
- 14).- Field workers' forum
Leprosy review 48:3 (200-201) Academic press 1977
- 15).- Fieldsteel A. H. and Louis Levy
Neonatally thymectomized Lewis rats infected with
M. leprae response to primary infection, secondary
challenge and large inocula
Infection and immunity 14:3 (736) sept. 1976
- 16).- Gupta R. M. Sinh G. and Khanna S.
Immunoglobulins in leprosy
Inter. jour. of leprosy 46:3-4 (337-341) 1978
- 17).- Gupta S., Sinh G., Sharma N. and Gupta R. M.
Serum proteins and immunoglobulins in leprosy
Inter. jour. of leprosy 46:1 (9-13) 1978
- 18).- Han S. H., R. S. Weiser and St. Kau
Prolonged survival of skin allograftt in leprosy
patientes. Inter. jour. of leprosy 39:1 (1-6) 1971

- 19).- Job C. K., Kirchheimer W.F. and Sánchez R. M.
Liver lesion in experimental lepromatoid leprosy
of the armadillo, a histopathologic study.
Inter. jour. of leprosy 46:1 (1-8) 1978
- 20).- Job C. K. and Thulo J.
Pathology of peropheral nerve lesion in leproma--
tous leprosy a light and electronic microscopic -
study. Inter. jour. of leprosy 39:2 (251-268) 1971
- 21).- Jha P., Balakrishnan, G. P. Talvar & L. Bhutani
Status of humoral immune responce in leprosy
Inter. jour. of leprosy 39:1 (14-19) 1971
- 22).- Kato Iazlo, Kim S. J. and Ishaque M.
"in vitro" cultivation of mycobacteria in choles-
terol-lecithin media from lepromas of rats infec-
ted with M. lepraemurium
Inter. jour. of leprosy 46:3-4 (376-385) 1978
- 23).- Kiyoshy Harada and Kasai Tosaku
Two methods of demostrating leprosy bacilli in
smears. Inter. jour. of leprosy 46:2 (167-171) 1971
- 24).- Kirch Heimer W. F., Sánchez R. M. and Shannow E.J.
Effect of specific vaccine on cell-mediated immu-
nuty of armadillos against M. leprae.
Inter. jour. of leprosy 46:3-4 (353-357) 1978
- 25).- Kumal Saha and Indrani Gupta
Immunologic aspects of leprosy with special refe-
rence to the circulating antispermatozoal antibo-
dies. Inter. jour. of leprosy 45:1 (28-37) 1977
- 26).- Kwapisky J. B. G. and G. H. Kwapisky

Immunological reaction of M. leprae and M. leprae-murium grown in cayman

Can. jour. Microb. 19:6 (764) 1973

- 27).- Kwapisky J. B. G., I. Bechelli, N.Haddad & E.Tavares
Impairment of reactivity to lepromin by micobacte--
rial antigens related to, or identical with M. leprae
Can. jour. Microb. 21:6 (896) june 1975
- 28).- Kwapisky J. B. G., Kwapisky G. H. and McClung N.
Preliminary investigations on abnormal immunoglob-
ulins in leprosy.
Inter. jour. of leprosy 45:1 (24-27) 1977
- 29).- Kwapisky J.G., Kwapisky G. H. and J. O. de Almeida
The growth of M. leprae in snakes
Can. jour. Microb. 20:3 (420) march 1974
- 30).- Kato Iaszlo. Cholesterol, a factor which is re-
quired for growth of mycobacteria from leprous ti-
ssues. Inter. jour. of leprosy 46:2 (135-143) 1978
- 31).- Lechat M., C. Misson, A. Bouchaert & C. Vellut
An epidemiometric model of leprosy: A computer si-
mulation of various control methods with increasing
coverage. Inter. jour. of leprosy 45:1(1-8) 1977
- 32).- Lechat M., C. Vellut, C. Misson and J. Y Misson
Application of an economic model to the study of le-
prosy control cost.
Inter. jour. of leprosy 39:2 (308-319) 1971
- 33).- Linch. Tecnicas de laboratorio. Ed. interame-
ricana México 1971 (970-971, 1251-1254)
- 34).- Mathur N., S. Dasgupta, Haran Pal & Naunihal Singh

- Comparison of the cutaneous automatic and somatic nervous function in the lesion of leprosy
Inter. jour. of leprosy 49:2 (86) 1971
- 35).- Miranda R.N. Confirmation "in vitro" of M. leprae phagocytosis by polymorphonuclears.
Inter. jour. of leprosy 45:1 (86) 1977
- 36).- Mittal M., Saha K. and Sharma R.
Hepatic lesions in asymptomatic children of leprosy patients Inter.jour.of leprosy 46:1 (42-46) 1976
- 37).- Norman E. Morrison Sequential blockade of the mycobacterial de Novo folate pathway
Inter. jour. of leprosy 39:1 (34-43) 1971
- 38).- Murohashi Toyoho and Konosuke Yoshida
Attempts at the cultivation of M. leprae in cell-free semi-synthetic soft agar media.
Inter.jour. of leprosy 39:2 (368-319) 1971
- 39).- Navalkar R. G. Immunological analysis of M. leprae antigens by means of diffusion in gel methods
Inter. jour. of leprosy 39:2 (105-112) 1971
- 40).- O. de Almeida, J. G. Kwapisky and G. H. Kwapisky
Immunological analysis of M. leprae using cross-reactions with cytoplasmic antigens of the actinomycetales. Can. jour. Microb. 18;3 (391) 1972
- 41).- Patel P. J. and M. J. Lefford
Specific and nonspecific resistance in mice immunized with irradiated M. leprae
Infection and Immunity 20:30 (692) June 1978
- 42).- Pui Chin Wong and C. H. Chan Teoh

Lymphocytes transformation by phitohemagglutination
in leprosy sera.

Inter. jour. of leprosy 39:1 (7-13) 1971

- 43).- Sakurai Isamu and Olaf K. Skinsnes
Studies of lipids in leprosy, 3-chomatographic -
analysis of lipids in leprosy
Inter. jour. of leprosy 39:2 (113-128) 1971
- 44).- Sehgal V. N. Rage V. L. and Singh K. P.
The age of onset of leprosy
Inter. jour. of leprosy 45:1 (52-55) 1977
- 45).- Shepard C. C., Walker L.L. and R. Van Landingham
Heat stability of M. leprae immunogenicity
Infection and Immunity 22:1 (87) oct. 1978
- 46).- Shepard C. C., Youmans A. Y. and Youmans G. P.
Lack of protection afforded by ribonucleic acid -
preparation from M. tuberculosis againt M. leprae
infection in mice.
Infection and Immunity 15:3 (733) march 1977
- 47).- Shepard C. C., R. Van Landingham and L. L. Walker
Immunity to M. leprae infection in mice stimulated
by M. leprae, BCG and Graft-Versus-Host reaction
Infection and Immunity 14:4 (919) oct. 1976
- 48).- Sher R., Anderson R., Anne M. Groyer & Wade H. A.
Polymorphonuclear cell function in the varius po-
lar types of leprosy and erithema nodosom leprosom
Infection and Immunity 21:3 (959) sept. 1978
- 49).- Skinsnes K., Kuba B., Anderson C. and Kuwahara T.
"in vitro" cultivation of leprosy bacilli in hya-
luronic acid-based medium, 2- progress and deve--

- loping concepts of the role of hyaluronic acid suggested by culture and armadillo infection study
Inter. jour. of leprosy 46:3-4 (394-413) 1978
- 50).- Skinsnes Olaf K. Lesion lodgement in leprosy
Inter. jour. of leprosy 46:2 (204-215) 1978
- 51).- Smith David G. and Guinto Richard S.
The association between age of onset and mortality in lepromatous leprosy.
Inter. jour. of leprosy 46:1 (25-29) 1978
- 52).- Stanford J. I. A vaccine for leprosy
Leprosy review 47:2 (87-91) Academic press 1976
- 53).- Muri Tatsuo. Growth factor of M. lepraemurium
Japan Jour. of Bacter. 30 (207), Japan 1975
- 54).- Verna R., Bala Krishnan, Vasnenan D. and Talwar G.
Lymphocytes bearing immunoglobulin determinant in normal human, lymph nodes and patients with lepromatous leprosy. Inter. jour. of leprosy 39:1 (20-24) 1971
- 55).- World Health Organization (WHO), Geneva
Leprosy and the community, massive attack on leprosy: WHO. Leprosy review 48:3 (193-199) A. press 1977
- 56).- Zinsser. Microbiología de Zinsser
14^a Edición, Ed. UTEHA, México 1971 (632-643)