

CENTRO DERMATOLOGICO PASCUA

SECTOR SALUD

A.M.A.L.A.C.

U N A M

DR. FERNANDO LATAPI C.
PROF. DEL CURSODRA. OBDILIA RODRIGUEZ
DIRECTORAMETODO FDA/EB PARA MEDIR
LA VIABILIDAD DEL M. LEPRAETESIS DE POSGRADO EN
DERMATOLOGIA LEPROLOGIA Y MICOLOGIA

MA. EUGENIA CARVAJAL DAVILA

MEXICO, D.F. 1984 - 1986

**TESIS CON
FALLA EE ORIGEN**DR. JOSÉ ALVARO PEÑALOA MARTÍNEZ
JEFE DE ENSEÑANZA



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 está 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.

INDICE

I.-	Introducción.....	1
II.-	Microbacterium Leprae	
	2.1 Generalidades.....	3
	2.2 Composición Química.....	5
	2.3 Microscopía Electrónica.....	10
	2.4 Viabilidad y Transmisión.....	12
III.-	Indice Bacteriológico y Morfológico.....	14
	3.1 Indice Bacteriológico.....	15
	3.2 Indice Morfológico	16
	3.3 Indice Morfológico (Tabla de Ridley).....	18
IV.-	Métodos de Tinción.....	20
	4.1 Técnica de Zhiel Neelsen.....	20
	4.2 Técnica de Fite Faraco.....	21
	4.3 Verde Malaquita.....	22
	4.4 Carbol Fucsina Nifrosina.....	22
	4.5 Sudan III	
	4.6 Modificaciones de Técnicas de Tinción.....	23
	4.7 FDA/EB.....	24
	4.8 Prueba de Adenosin Trifosfato.....	25
V.-	Lepra Experimental.....	26
	5.1 Intentos de Cultivos.....	27
	5.2 Medio Muroshashi Yoshida.....	29
	5.3 Medio de Skinsnes.....	30
	5.4 Criterios para un posible Cultivo.....	31
	5.5 Otros Intentos de Cultivo.....	32
VI.-	Inoculación de Lepra a los Animales.	
	6.1 Lepra en el Ratón.....	33
	6.2 Lepra en Armadillo.....	37
	6.3 Inoculaciones a Primates.....	41

VII.-	Perspectivas en la Inmunología de la Lepra	
7.1	Generalidades.....	43
7.2	Infección subclínica FLA-ABS.....	47
7.3	ELISA - Antígeno Glicolípido Fenólico.....	48
7.4	Antigenicidad del M. Leprae.....	49
7.5	Alteraciones de los Macrófagos.....	50
7.6	Linfocitos T y B en Sangre Periferica.....	52
7.7	Vacuna en la Enfermedad de Hansen.....	53
7.8	HLA en Lepra.....	54
VIII.-	FDA/EB Método para medir la Viabilidad del M. Leprae.....	55
8.1	Objetivos.....	57
8.2	Material y Métodos.....	58
8.3	Preparación de la suspensión de Bacterias.....	63
8.4	Técnica de Tinción y Lectura.....	64
8.5	Preparación de Frotis y Tinción de Zhiel Neelsen.....	65
	Lectura de Índice Morfológico y Bacteriológico	
8.6	Fotografías de la Técnica.....	66
IX.-	Resultados (Tablas).....	70
9.1	Fotografías del Método FDA/EB y Tinción de Zhiel Neelsen.....	75
X.-	Discusión.....	82
XI.-	Conclusión.....	86
XII.-	Bibliografía.....	91

INTRODUCCION

INTRODUCCION

El *Mycobacterium leprae* es hasta el momento actual un microorganismo que no ha podido ser cultivado in vitro, y aunque numerosos han sido los intentos ninguno ha logrado el éxito total. La incapacidad de cultivarlo, ha obstaculizado el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la lepra y es por esto -- que deben buscarse nuevos métodos, ya que la inoculación en la almohadilla plantar del ratón, o bien, el armadillo de 9 bandadas tiene gran costo y dificultad en nuestro medio.

Con el propósito de desarrollar un método fácil, rápido y eficaz para determinar si el *Mycobacterium Leprae* está vivo o muerto, se ha estudiado un método de tinción fluorescente, que se ha demostrado en estudios previos mediante el uso de acetato de fluoresceína (FDA) y bromuro de etidio (EB), la viabilidad del *Mycobacterium smegmatis* y del *M. phlei*. Por este método las mycobacterias vivas fueron distinguidas de las muertas y deterioradas, según las características del teñido, dependiendo esto del estado metabólico y fisiológico de las bacterias.

Posteriormente, se descubrió que el *M. Leprae* tomado de armadillo infectado y de la piel humana de enfermos de lepra -- se teñían en forma similar a las especies de mycobacterias cultivables. Cuando se aplicó este procedimiento de tinción a especímenes de pacientes de lepra bajo tratamiento, los datos sugirieron que el método de teñido brindaba una medida de viabilidad del *M. Leprae*, según lo demostró el importante descenso en el porcentaje de bacterias teñidas de verde (vivas): También se han hecho estudios que comparan los datos de FDA/EB obteñidos de biopsias con el Índice Morfológico y el Índice Bacteriológico y resultados preliminares demuestran que existe -- una correlación significativa.

Teniendo así los reportes previos de otros autores (James T. Kvach, G. Munguía) de la efectividad de este método. Contamos incluso con una experiencia previa de algunos estudios - - preliminares hechos en este Centro Dermatológico (Dr.Cervera). El hecho de montar el método FDA/EB en el Centro Dermatológico Pascua y aplicarlo a los pacientes de lepra, demostrará que este método es efectivo y de gran ayuda para observar si el bacilo está vivo o muerto, sin tener que inocular a la almohadilla plantar del ratón. También se podrán observar con este método los diferentes esquemas de tratamiento y correlacionar los resultados con bacteriología en linfa cutánea, raspado de mucosa nasal, punción ganglionar y así como también el Índice Morfológico y Bacteriológico.

En el presente trabajo, se hará una breve revisión acerca del *Mycobacterium Leprae*. Las consideraciones actuales sobre la bacteriología e inmunología de la lepra, así como perspectivas en lepra experimental.

MICROBACTERIUM LEPRÆ

GENERALIDADES

El *Microbacterium Leprae*, fué descubierto por Hansen en el año de 1868, cuando al examinar las "Leprazellen" (células leprosas) de Virchow, observó en ellas lo que llamó "braune Moerperchen" (corpúsculos oscuros) y demostró que estaban constituidos por masas de bastones que se coloreaban por el ácido ósmico; en 1874 hace la descripción completa del germen, lo considera el agente causal de la lepra y le denomina *Bacillus leprae*. -- Más tarde, el germen recibe nombres diversos: *Cocothrix leprae* (Lutz), *Streptothrix leprae* (Babes), Bacilo de Hansen en honor de su ilustre descubridor, etc., hasta que la Sociedad Americana de Bacteriologistas, por recomendación de la Leonard Wood Memorial Conference (Manila 1931), decide llamarle y esta es su designación oficial: *Mycobacterium Leprae*. (73) (8) (38)

El género *Mycobacterium* pertenece a la familia de las *Mycobacteriaceas*, orden *Mycobacteriales* y clase *Actinomycetales*.

(1). (73)

Característica del *Mycobacterium leprae* es su disposición paralela formando ejes con aspecto de mazos de cigarros o en conglomerados globosos de diversos tamaños a los que Marchoux denominó globia. El diámetro de las globias varía entre 10 y 100 micras y los bacilos que las forman pueden ser escasos o incontables. (73) (8)

Al microscopio de luz, el bacilo de Hansen es un bastoncillo recto o curvo que puede terminar en punta o en forma de pabillo de tambor que mide de 1.5 a 6 micras de largo, por 0.2 a 0.4 micras de ancho. Durante su ciclo evolutivo en la parte central, formas granulosas que hacen relieve en número de 1 a 4 que miden de 1.3 micras y que reciben el nombre de gránulos de Lutz-Unna. (1) (73) (8)

Se tiñe con los colorantes básicos: fucsina, azul de metileno, violeta de metilo, violeta de genciana, verde metilo, dalia y safranina. Es un germen ácido alcohol-resistente, o sea, que cuando se tiñe con la técnica Ziehl Neelsen, conserva la coloración a pesar de someterlo al alcohol y a ácidos diluïdos, en gram positivo e intracelular. La multiplicación es por fisión transversa dentro de los fagolizosomas de las células de lepra; esto se ha comprobado por estudios hechos en ratones desnudos y armadillo de 9 bandas que fueron inoculados por bacilos de lepromas humanos. (71) (81) (91)

Existe gran parecido morfológico entre el *M. leprae* y el *M. leprae murium* productor de la lepra murina. Se ha comprobado que ambos tienen peptidoglicano en su pared, pero en el *M. leprae* también contiene ac. micólico, dicarboximicolatos y ac. tuberculoestearico. (7) (17) (38) (51)

COMPOSICION QUIMICA

Los estudios histoquímicos con el *M. leprae* derivado de armadillo, han empezado recientemente; se sabe que las bacterias toman glucosa y aminoácidos (probablemente presentes en la célula del huésped); contiene algunas enzimas implicadas en el metabolismo del oxígeno y varias enzimas hidrolíticas. Parece ser de la información disponible, que el *M. leprae* es una microbacteria con algunas características únicas, posiblemente relacionadas con el grupo del *M. tuberculosis*; pero el *M. leprae* no ha cumplido los postulados de Koch, ya que no ha podido ser cultivado *in vitro*. (17) (20) (81) (73)

Es conveniente señalar las diferencias entre el *M. leprae* y el *M. tuberculosis*: (Ver cuadro No. 1).

La composición química del *M. leprae* es compleja, los lípidos son los constituyentes principales del bacilo, así como ácidos grasos, grasas neutras, fosfátidos, cuerpos ceroides, - lecitina, proteínas e hidratos de carbono. (1) (8) (73)

En la composición química del *M. leprae*, se han encontrado ácidos micólicos de alto peso molecular idénticos a los bacilos del armadillo inoculado y distintos a otras especies de microbacterias. Otros componentes son el ácido tuberculoesteárico, el phithiocerol dimycocerostato y el glicolípido fenólico, siendo los dos últimos específicos del bacilo de la lepra. También es importante señalar la presencia del peptidoglycan, común en otras micobacterias pero que en el *M. leprae* la alani es reemplazada por la glicina. (2) (25) (51) (38)

El *M. leprae* obtenido de tejidos humanos, armadillos y - ratones, contiene la enzima hidroxilasa cúprico dopamina, y es tudios *in vitro* sobre esta enzima han demostrado que el ácido fusárico la inhibe; esto podría tener valor químico terapéutico contra *M. leprae*. (69)

Anteriores estudios indicaban que la enzima O-difenoxida-
sa, estaba ausente de tejidos humanos lepromatosos. La exis-
tencia o ausencia de esta enzima se ha estudiado de nuevo y --
los resultados sugieren que esta enzima no es característica -
del *M. leprae* y se le encuentra en escasa cantidad. (44)

Ya se informó de la presencia de un glicolípido fenólico
específico en *M. leprae* y en tejido de armadillo infectado. -
Tenía un oligosacárido, compuesto de 3-O-Me-ramnosa y 2,3-di-
O-Me-ramnosa y 3,6-di-O-Me-glucosa, unidos glucosídicamente -
al sustituyente fenólico. La estructura del oligosacárido -
ha sido determinado por hidrólisis ácida parcial premetilación
HMNR y ¹³CNMR. La hidrólisis ácida del Glicolípido-fenólico-l
desacetilado reveló un cuerpo fitilcerol fenólico y la espectro
metría de masa y patrón NMR del cuerpo premetilado sugieren la
siguiente estructura: Cromatografía gas-líquida combinada con es
pectrometría de masa demuestra 3 ácidos mycocexósicos tetra- -
metil ramificados, C 30m, C 32 y C 34, con pesos moleculares -
de 466, 494 y 522, respectivamente. (21) (33) (34) (83)

También se presentan evidencias de que el glicolípido es
inmunológicamente activo, ya que reacciona con antisuero de -
conejo a *M. leprae* y con suero de pacientes lepromatosos. (34)

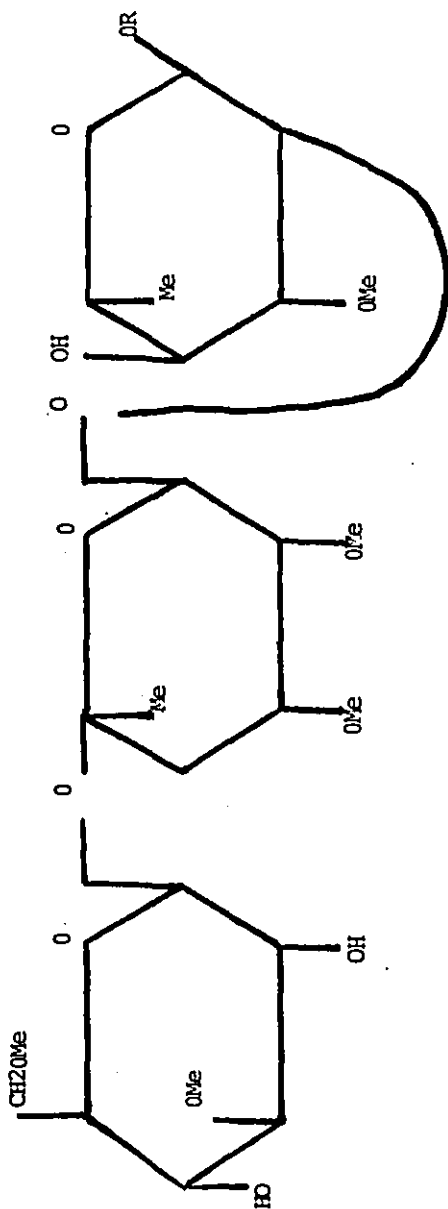
Un aspecto que nos interesa, es que la enzima dismutase -
superóxida ha sido identificada y la actividad peroxidádica --
demostrada. Esta enzima contiene manganeso y tiene baja acti-
vidad en los extractos de células libres. (88)

Respecto a las características bioquímicas, el *M. leprae*
muestra mayor similitud con el *M. vaccae* que con cualquier --
otra micobacteria cultivable. (18)

Por medio de cromatografía gaseosa y analizando los áci--
dos grasos constitutivos del *M. leprae*, se ha visto que tiene -
un elevado contenido de ácido behénico (n-C22:0) y el número -
del carbono de la rama en los ácidos micólicos de esta especie

es 20. Esto sugiere la posible identificación del *M. leprae* por medio de cromatografía gaseosa. (88) (89) (42)

ESTRUCTURA DEL GLICOLIPIDO FENOLICO



DIFERENCIAS ENTRE EL M. LEPRAE Y EL M. TUBERCULOSIS

M. Leprae

- 1.- Más corto y más rígido
- 2.- Se agrupa en globias
- 3.- Es más infeccioso
- 4.- El tejido lepromatoso contiene mayor número de bacilos
- 5.- Es menos ácido alcohol resistente
- 6.- Poder patógeno menor

M. Tuberculosis

- 1.- Más largo y menos rígido
- 2.- No se agrupa
- 3.- Menos infeccioso
- 4.- Los tejidos infectados con menor número de bacilos
- 5.- Es más ácido alcohol resistente
- 6.- Poder patógeno mayor

(CUADRO 1)

MICROSCOPIA ELECTRONICA

Las observaciones al microscopio electrónico han demostrado que el *M. leprae* está rodeado por una membrana que penetra en forma de red en el interior del protoplasma bacilar y esta membrana está compuesta por dos capas. En el citoplasma existen unos cuerpos redondos muy osmiofilos que son los nucleolos. (8)

En los exámenes ultraestructurales del *M. leprae* teñido con uramil acetato y citrato de plomo, se observaron esencialmente tres tipos de *M. leprae*: bacilos conteniendo todas las estructuras de una célula procariótica (pared bien definida y membrana citoplásmica alrededor del citoplasma granulado, con mesosomas visibles, ribosomas y nucleoplasmas), bacilos semejantes a los anteriores pero con un citoplasma homogéneo y bacilos en que no se observaban ultraestructuras regulares y que raramente contenían vacuolas; la frecuencia de los tres tipos de células es respectivamente del 5, 10 y 80%. (77)

El *Microbacterium leprae*, contiene una zona transparente exterior de electrones (ETZ), un enlace 1-2-glicol conteniendo polisacáridos (en la membrana citoplásmica y en el mesosoma) - una capa de peptidoglicano y un depósito de polisacáridos en la superficie exterior del ETZ. (77)

También debemos señalar recientes descubrimientos; por ejemplo, que las capas de la pared celular son simétricas. - Fukinishi y Col. han investigado la zona electrotransparente que rodea al bacilo dentro de los fagolisosomas de los macrófagos y está formada por lípidos y sobre todo por el peptidolípido en su mayor parte y en los cortes ultrafinos tienen una imagen en forma de gotitas esféricas idénticas a las del ratón desnudo y armadillo infectados así como amadillos con infección natural. Esta disposición no se observa en otras micobacterias cultivables. (77)

Hirada, en 1983, estudia inclusiones intracitoplásmicas que son homogéneas, esféricas, no uniformes en su distribución y que no están delimitadas por estructuras membranosas y de es casa diferencia con el bacilo de la lepra murina.(32) (38)

Se han estudiado las bandas en la superficie y cada banda está compuesta por dos finas líneas circulares. (38)

Por microdensitometría y por citoquímica ultraestructural de la membrana del *M. leprae*, se mostró que mide 7.04 a 7.08 nm y es PAS positiva en comparación con otras especies que miden - de 6.36 a 6.37 nm. (77)

VIABILIDAD Y TRANSMISION

La entrada del microorganismo en el hombre ha sido objeto de numerosos estudios. Se admite que la vía de penetración del germen es a través de las vías respiratorias así Davey y Rees - comprueban que en cada emisión forzada de moco nasal pueden encontrarse hasta e 8×10 bacilos cuya viabilidad fue comprobada al inocularlo a la almohadilla plantar del ratón. Chacko, - - practicando biopsias de la mucosa nasal a los convivientes sanos, encuentra bacilos vivos y en algunos casos con signos inflamatorios de los nervios de dicha mucosa, debido sin duda a la acción del bacilo. El hallazgo por parte de Narayan, de bacilos alcohol-ácidoresistentes en el cuerpo de algunos artrópodos, especialmente en lugares donde la lepra es endémica, no prueba en forma concluyente que la vía de entrada sea exclusivamente por picadura de posibles vectores. (7)

En relación a la viabilidad del germen que se consideraba muy escasa fuera de los macrófagos del enfermo, se ha demostrado, gracias al modelo experimental en el ratón, que puede permanecer vivo fuera del paciente hasta 10 días, incluso más.

(87) (38)

También se ha demostrado que el índice de infección, es mucho mayor que el de enfermedad y que los contactos con enfermos multibacilares pueden presentar infecciones subclínicas -- que curan espontáneamente si funcionan bien los mecanismos inmunocompetentes celulares. (38)

Otro hecho relevante, es la posibilidad de infección intrauterina, que hasta hace poco era negada y se afirmaba de -- forma rotunda, que los niños se contagiaban después del nacimiento en íntimo contacto con los padres enfermos. (83)

Hoy es bien conocida, la presencia en el suero del cordón umbilical de niños de madres lepromatosas, anticuerpos anti- IgA e IgM, la placenta está altamente vascularizada con una bacteremia de 10^5 en enfermas lepromatosas embarazadas por lo que pueden pasar numerosos bacilos al feto. (38)

Recientemente en un documentado trabajo, Melson demuestra la formación de anticuerpos en el recién nacido de madre lepromatosa, en cuyos sueros persisten anticuerpos frente al antígeno 7, hasta los 18 meses de edad, lo que prueba la existencia del paso através de la placenta del bacilo, o sus antígenos.

(6) (70)

Duncan y otros, encuentran dos niños de madres lepromatosas de 12 y 17 meses con lepra indeterminada y tuberculoide -- clínica e histológicamente y se demostraron anticuerpos antimicobacteriales IgA e IgM, en suero del cordón umbilical. (59)

(38)

La existencia de otros casos de lepra en niños menores de 2 años, uno de 11 meses. ('70) El caso de Givohar de 19 meses y otro de 18 meses, nos hace pensar en la posibilidad, por tan corto período de incubación, de un contagio intrauterino.

(38)

Neelson y otros, encuentran anticuerpos IgM e IgA, contra *M. leprae*, en un 20% a 50% de los niños de madres lepromatosas en el embarazo y no lo encuentran en niños de madres LT y controles sanos. (33)

El Dr. Kaur, demostró la viabilidad del *M. leprae* bajo -- condiciones atmosféricas normales y adversas. Bacilos recogidos de lepromas, fueron sacados a temperatura ambiente durante períodos variables, después fueron expuestos a la luz solar directa, UV, y fueron inyectados en la almohadilla plantar de -- ratones timentomizados para comprobar la viabilidad. Los organismos podían resistir los UV durante 30 minutos, la luz solar directa por 2 horas y la temperatura ambiente durante 7 días.

(42)

INDICE BACTERIOLOGICO Y MORFOLOGICO

INDICE BACTERIOLOGICO Y MORFOLOGICO

La búsqueda del bacilo de Hansen en los enfermos de lepra tiene gran importancia para el estudio, clasificación y para seguir la evolución de la enfermedad.

El material para estudio puede tomarse de la piel, de la mucosa nasal, o bien, de los ganglios. La zona elegida deberá ser una piel con actividad, ya sea de lesiones cutáneas o infiltración, siguiendo la técnica siguiente:

- A) Asepsia de la piel elegida
- B) Hacer isquemia completa
- C) Picar profundo en la zona isquémica
- D) Hacer un frotis delgado

Cuando la muestra es de la mucosa nasal, deberá tomarse del tabique en donde abunda el bacilo. Se puede hacer con una cuchilla o estilete, produciendo un discreto raspado. El material obtenido se extiende en un portaobjetos y se fija a la flama.

INDICE BACTERIOLOGICO

Para estudiar el índice bacteriológico, las láminas se tiñen con la tinción de Ziehl-Neelsen, de rutina. El índice bacteriológico, indica la cantidad de bacilos y según la Organización Mundial de la Salud, la determinación del índice bacteriológico debe hacerse estudiando por lo menos 100 campos de luz con aumento de 800 x o más. La clasificación se hace según la siguiente tabla:

Ningún bacilo en toda la lámina	negativa
De 1 a 10 bacilos en 100 campos	x
De 1 a 10 bacilos en 10 campos	xx
De 1 a 10 bacilos por campo	xxx
De 10 a 100 bacilos por campo	xxxx
De 10 a 1000 bacilos por campo	xxxxx
Más de 1000 bacilos por campo	xxxxxx

INDICE MORFOLOGICO

Nos expresa la capacidad con la que se tiñen los bacilos manifestando el porcentaje de bacilos sólidos y fragmentados. Para determinar el índice morfológico, las láminas deben fijarse y teñirse de la siguiente forma:

FIJACION:

- 1.- Una vez que el extendido se ha secado al aire, debe fijarse durante 3 minutos con vapores de formaldehído. Esto se hace poniendo unas gotas de formaldehído concentrado con un vaso de Coplin, colocando las láminas dentro y sellando el vaso con adhesivo.
- 2.- Fijación durante dos minutos sobre una lámina de vidrio que se ha colocado sobre un recipiente con agua hirviendo.
- 3.- Nuevamente fijación de 3 minutos con vapores de formalina.
- 4.- Por último, nueva fijación de 2 minutos sobre la lámina de vidrio caliente.

TINCION PARA DETERMINAR EL INDICE MORFOLOGICO

- 1.- Se usan los mismos colorantes que en el Ziehl-Neelsen de rutina, excepto la Fucsina, que se prepara disolviendo 20 grs, en 100 ml. de alcohol, o sea, una concentración al doble.

ILUMINACION

La iluminación del microscopio, debe hacerse según las reglas de la iluminación de Kohler.

La determinación del índice morfológico, consiste en determinar el porcentaje de bacilos sólidos y no sólidos o fragmentados en un extendido de *M. leprae*. Para esto, se cuentan 100 -- bacilos anotándose cuáles son sólidos y cuáles fragmentados.

Se considera como bacilo sólido únicamente aquel bacilo que está teñido uniformemente con bordes lisos y regulares y que no

presentan zonas de diferente intensidad de color. Deben examinarse con especial cuidado en los extremos, para ver si presenta zonas de decoloración.

Antes de empezar la clasificación de sólidos y no sólidos debe hacerse una revisión general de la lámina para estudiar el tipo de bacilo, ver si la tinción es uniforme en todo el extendido y buscar las zonas donde se encuentra mayor número de bacilos.

Solamente se estudiarán los bacilos que estén aislados y no en globias.

A mayor índice morfológico, mayor infecciosidad.

Procedimiento para índice morfológico: Se escoge una parte bien teñida de la placa y se busca un grupo de bacilos de Hansen aislados, deben desecharse los aglomerados y los de las globias. En el grupo escogido se cuentan 100 bacilos y de estos se deben contar cuántos bacilos sólidos y uniformes existen. Si un bacilo es de color claro, o muy corto o granuloso, no es sólido. Si existe un bacilo más largo que el promedio de los sólidos con claro pequeño en su parte central, probablemente está a punto de dividirse y se contarán como 2 sólidos. Cuando se ve una fila de 2 ó 3 granulos juntos son restos de un bacilo y se contará como uno "no sólido". (55) (39)

INDICE MORFOLOGICO (Ridley)

Ridley prefiere utilizar el index: S, F, G; o sea, divide a los bacilos en tres clases: Sólidos, Fragmentados y Granulosos. Se cuentan 200 bacilos y se anota el porcentaje de cada uno de ellos correspondientes a los granulosos, fragmentados y sólidos y posteriormente se anota el SFG Index siguiendo la tabla:

Ejemplo:

Sólidos	Fragmentados	Granulosos
X/200	X/200	X/200

El número 0 corresponde a menos del 1%

El número 1 corresponde de 1 a 20%

El número 2 corresponde a mas del 20%

Valor SFG. Ejemplo:

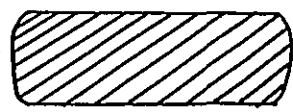
S F G
2 2 0 corresponde al SFG Index 8 (según la tabla)

Tabla:

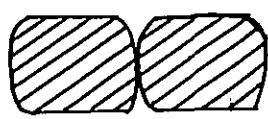
2 0 0	corresponde a 10	
2 1 0	a 9	75 a 100% Sólidos
2 2 0	a 8	50 a 75% Sólidos
2 1 1 y 1 2 0	a 7	
2 2 1	a 6	20 a 50% Sólidos
1 2 1	a 5	
1 2 2	a 4	1 a 20% Sólidos
1 1 2 y 0 2 1	a 3	
0 2 2	a 2	
0 1 2	a 1	menos del 1% Sólidos
0 0 2	a 0	

INDICE MORFOLOGICO

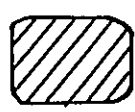
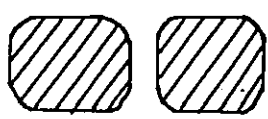
SOLIDOS



FRAGMENTADOS



GRANULOSOS



MÉTODOS DE TINCIÓN

METODOS DE TINCION

Una de las características más importantes del bacilo es su afinidad a los colorantes básicos y su tinción positiva con tinción de Gram.

El bacilo de Hansen através de su estudio, ha sido coloreado por diferentes métodos y aún más, en los últimos años se siguen analizando modificaciones de las técnicas clásicas para obtener mejores resultados.

Describiremos a continuación las diferentes tinciones para micobacterias.

1.- TECNICA DE ZIEHL NEELSEN.

Coloración más utilizada por su sencillez y seguridad en la cual se utiliza la fucsina ácida decolorando -- con alcohol ácido y se contrasta con azul de metileno; esta coloración se basa en la propiedad de la ácido - alcohol resistencia.

Esta técnica puede ser utilizada tanto en frotis como en cortes histológicos.

I.- Procedimiento para cortes histológicos:

Fijación de la muestra histológica en fomol buffer - neutral y secciones de parafina de 6 micras.

- a) Desparafinar e hidratar
- b) Teñir en solución carbol fucsina durante una hora al 1%.
- c) Lavar con agua corriente
- d) Decolorar con alcohol ácido hasta que las preparaciones tomen color rosa pálido
- e) Contrastar en solución de azul de metileno
- f) Deshidratar y montar

Resultados: Los bacilos no tiñen color rosa mexicano

II.- Procedimiento para frotis:

- a) Hacer el extendido y dejar secar al aire
- b) Ejar con calor
- c) Teñir con fucsina durante 5 minutos calentando 3 veces
- d) Decolorar con alcohol ácido al 5% hasta que no salga más rojo
- e) Teñir con azul de metileno durante un minuto

Resultados: Los bacilos se tiñen de color rosa, esta tinción sirve para el estudio del índice bacteriológico.

2.- TECNICA DE FITE FARACO.

En el año de 1938 Fite y Faraco preparan la técnica que lleva su nombre, para organismos ácido resistentes. Esta técnica es la que se utiliza en el Centro Dermatológico Pascua con excelentes resultados en todos los cortes histológicos de los pacientes enfermos de lepra.

I.- Procedimiento:

- a) Desparafinar los cortes en una solución de xilol, aceite de olivo en dos cambios de 5 minutos cada uno
- b) Escurrir y secar con papel filtro
- c) Lavar con agua corriente durante 5 minutos
- d) Teñir en solución carbol fucsina durante una hora
- e) Lavar con agua corriente
- f) Decolorar con ácido sulfúrico al 1%
- g) Lavar con agua corriente
- h) Contrastar con una solución verde luz
- i) Secar las preparaciones con papel filtro
- j) Pasar directamente a xilol y montar

Resultados: Bacilos ácido alcohol resistentes color rojo brillante y tejido conjuntivo verde claro.

Harada propone una modificación del procedimiento, usando la pararosanilina y oxidación con ácido periódico prolongado, tinción con la cual los bacilos se tiñen más intensamente y aparecen en mayor número.

3.- VERDE MALAQUITA (8)

Se colorea el bacilo con verde malaquita al 1% disuelta en 0.2ml. de acetato de buffer a un PH de 4.3 y se demostró la presencia de sustancias basofílicas liberadas del bacilo, después de haber sido calentado a -- 60°C. Estas sustancias son lípidos derivados de la -- oxidación de ácidos grasos insaturados. Esta coloración no hace diferencias entre el bacilo vivo o muerto.

4.- CARBOL-FUCSINA-NIGROSINA

Sirve para observar la membrana del bacilo. Se fija el frotis a color, luego se expone a carbol-fucsina -- por 5 minutos a 37°C y posteriormente se contrasta con nigrosina, observándose en el microscopio la cápsula -- del bacilo con bordes bien definidos.

5.- SUDAN III (66)

La importancia de este tipo de coloración, estriba en que casos considerados clínicamente como indeterminados, revelan histológicamente que son lepromatosos de bido a la presencia de lípidos componentes del bacilo.

6.- MODIFICACION DE COLORACION DE FONDO DE LA TECNICA -- ZIEHL-NEELSEN EN LA IDENTIFICACION DEL M. LEPRAE

El Dr. Siqueira (1982) analiza la tinción con azul de metileno en el método de Ziehl-Neelsen, y propone una modificación en la técnica: alcalinización concomitante de la solución acuosa típica de azul de metileno, -- añadiendo algunas gotas de una solución de hidróxido

sódico 1:500, sobre el porte a teñir. Se observan - con esta técnica: a) mayor período de validez de la solución; b) ausencia de precipitado en los portes; - c) una visualización mayor del substato; d) mayor contraste entre el sustrato y los bacilos. (3)

7.-MODIFICACIONES DE TECNICAS DE TINCION

Los Dres. Harshadrai y Subhash, compararon un método de fluorescencia con el método Fite Faraco, para detectar microorganismos ácido resistentes en cortes - de biopsias incluídas en parafinas obtenidas de pa--cientes de lepra. Se estudiaron 50 casos y el método fluorescente fué mejor que el Fite Faraco. Su superio--ridad fue evidente en casos en que los bacilos eran -- muy escasos. La microscopía de fluorescencia puede -- usarse también para determinar los índices bacterioló--gico y morfológico. La facilidad y rapidez de la mi--crosco^pía de fluorescencia parecen ser grandes venta--jas. (31)

Es importante señalar que se describe una técnica en la cual se emplea azul soluble en lugar de azul de metile--no convencional como colorante de contraste en el proce--dimiento de Ziehl-Neelsen. Esto aumenta la intensidad de la coloración azul de los contaminantes no bacteria--nos, y por esto la técnica resulta de gran utilidad pa--ra seguir el progreso de la purificación a partir de -- tenido infectado. (65)

Se hizo un estudio de comparación de 3 procedimientos - de tinción por el Dr. Collons, utilizando el método - - Ziehl-Neelsen, el de auramina y de la planta-metenamida. El número de bacilos teñidos fue mayor con el teñido - por el método de la planta-metenamida que con los otros métodos. Las cuentas de bacilos teñidos con auramina -

no fueron tan altas pero sí mayores que con el método Ziehl-Neelsen. Los dos métodos anteriores delinearon claramente la pared de los bacilos y facilitó las - - cuentas especialmente cuando las suspensiones bacteria nas contenían muchas globias. (78)

8.-FDA/EB

Es importante mencionar en esta sección, el procedi-- miento de tinción fluorescente con diacetato de fluo-- resceina y bromuro de etidio y que son el propósito - de esta tésis; permite medir la viabilidad de las bac_{terias}. Las células viables se tiñen de verde, en -- tanto que las no viables de rojo. (25) (50) (49)

En sueros de pacientes lepromatosos por medio de una técnica de precipitación con polietilen glicol, se - encontró a microscopía de luz abundantes bacilos áci_{do}-alcohol resistentes similares a los observados en la piel de estos pacientes y se observaron entreos y fragmentados. La diferencia llamativa entre los bac_{ilos} del suero es la ausencia de una banda transversal lo que sugiere que los bacilos del suero no están en fase de división. (31)

9.- PRUEBA DE ADENOSIN TRIFOSFATO

Recientemente, se ha utilizado para conocer la viabi- lidad bacilar la prueba con Adenosin Trifosfato, que es un método que puede desarrollarse en pocas horas y a un costo mucho más bajo, ya que con la técnica del - cojinete plantar del ratón para obtener resultados, se requieren de 8 a 12 meses. (41) (25)

Los niveles normales de ATP son de 1.09 a 1.38 pico-- gramos por un millón de células. En estudios hechos - con pacientes bajo tratamiento con DDS, no se detecta-

ron niveles elevados de ATP y al inocularse a la almohadilla plantar, los bacilos crecieron. Todo esto sugiere que sería un método para detectar pacientes resistentes a la dapsona.(15)(16)

LEPRA EXPERIMENTAL

ESTADO ACTUAL DE LOS CULTIVOS

CULTIVO DEL M. LEPRAE:

Muchos fueron los intentos para realizar el cultivo del bacilo de Hansen. Para ello se han empleado prácticamente todos los medios artificiales conocidos, algunos elaborados selectivamente para tan exigente germen.

Así vemos al principio una marcada tendencia a cultivar en los medios propios para el bacilo de Koch. Otros emplearon atmósfera con concentraciones químicas variables, diferentes atmósferas de oxígeno, anhídrido carbónico, sangre, etc.

En 1958, el Comité de Bacteriología y Patología del VII Congreso Internacional de Lepra, presenta por primera vez un programa de trabajo para producir un medio de cultivo adecuado, pero los resultados de estos trabajos fueron desalentadores.

En 1970, el Comité de Expertos de la Lepra de la OMS, aconsejó el uso de las siguientes pruebas para el reconocimiento del M. leprae obtenidos de medios de cultivo sintéticos.

- 1.- Inoculación en la almohadilla plantar del ratón.
(Shepard 1960).

- 2.- Oxidación de 3,4 dihidroxifenilalanina (DOPA).

Prabhakarán en 1966 encontró que el M. Leprae oxida la DOPA a productos coloreados luego de incubación por 15 a 30 minutos. El producto coloreado es el indol-6,6 quinona y la lectura se realiza por espectrofotometría. La OMS recomienda esta prueba para

confirmación del resultado del cultivo y se le asigna importancia a la DOPA oxidasa en el metabolismo del bacilo, ya que éste se reproduce en tejidos ricos en esta enzima.

- 3.- Prueba de la lepromina
- 4.- Identificación serológica
- 5.- Inoculación en el armadillo (Kirchheimer y Stross, 1971)
- 6.- Se discute una sexta prueba propiedad de la piridina para extraer la ácida alcohol resistencia del M. leprae.

Skinsnes y Col. examinaron las propiedades de la piridina sobre la AAR del M. leprae y de otras ocho cepas de micobacterias. Los hallazgos estuvieron de acuerdo a publicaciones anteriores excepto que también pudo ser extraída la AAR del M. smegmatis y M. phlei, tratados con piridina por dos horas. El hallazgo más importante fue que la capacidad para extraer la AAR estaba relacionada con la edad del bacilo y probablemente sea una característica de los bacilos no viables. El M. leprae desarrollado in vitro en un medio joven, mostró resistencia a la extracción con piridina las primeras semanas, pero conforme el cultivo envejecía, la extratibilidad de la AAR era una propiedad de los bacilos viejos y no viables y como tal esta prueba no es definitiva para determinar si se ha cultivado o no in vitro el bacilo de Hansen. (27)

En el X Congreso Internacional de Leprología (Bergen 1973), Pattyn presentó su trabajo sobre el problema del cultivo del M. leprae basado en la investigación del artículo publicado en los 10 años anteriores y después de hacer una crítica detallada concluye afirmando que los resultados han sido desalentadores y que la solución del problema se podría lograr con el conocimiento y comprensión del medio ambiente intracelular y las posibilidades

metabólicas del *M. leprae* partiendo de técnicas bioquímicas, histoquímicas y ultramicroscópicas.

OTROS INTENTOS DE MEDIOS DE CULTIVO

MEDIO DE MUROHASHI-YOSHIDA (1973)

En 1969, los autores desarrollaron el medio M-Y constituido por: fosfato monopotásico, fosfato disódico, asparagina, citrato de sodio, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, glucosa, yeast RNA, glicerol, albúmina bovina, fracción V y agar al uno por mil. (62)

En este medio obtuvieron muy escaso desarrollo, por lo cual en 1972 lo modificaron llamándolo M-Y lld. Para ello, quitaron el glicerol, aumentaron los fosfatos y sulfato de magnesio e incorporaron piruvato de sodio. Con el producto obtenido de ese cultivo, realizaron subcultivos y se obtuvo un antígeno con el cual se realizaron pruebas cutáneas dando reacciones muy similares al test de la lepromina.

Al medio M-Y d, se le pueden formular las siguientes críticas: a) sólo se realizó como prueba para identificar el test de lepromina; b) la falta de publicaciones hace dudosa su efectividad.

MEDIO DE SKINSNES Y COOL. Ia-3 Medium (1975)

Ellos demostraron que la concentración del *M. leprae* en tejidos humanos está relacionada con la presencia de mucopolisacáridos ácidos en el huésped; al mismo tiempo, el ácido hialurónico, al realizar la técnica de Shepard, promueve el crecimiento si se usa en el inóculo y en el sitio de la inoculación.

También se observó que una solución salina de ácido hialurónico, mantiene viables a los bacilos por varias semanas en refrigerador a 37°C. En base a estas observaciones se desarro

116 el medio LA-3 compuesto por: buffer fosfato, glicerina, ácido hialurónico, albúmina bovina fracción V, extracto de levadura y penicilina G potásica.

El crecimiento inicial en el medio LA-3, requirió alrededor de 6 semanas, pero luego se redujo a dos semanas usando cantidades mayores del medio y se desarrollaron numerosas colonias amarillo-anaranjadas.

Los autores consideraron que el bacilo desarrollado es el *M. leprae* por: a) requerimientos nutricionales de ácido hialurónico por el *M. leprae*; b) varios cultivos con similares características han sido aislados de pacientes con lepra lepromatosa; c) incapacidad de subcultivar cultivos aislados en los medios usuales para cultivo de microbacterias; d) los bacilos aislados de los cultivos, dan positiva la inmunofluorescencia con suero de enfermos con lepra lepromatosa.

Pero Skinsnes no realizó todas las técnicas necesarias recomendadas por la OMS, para el reconocimiento del bacilo de Hansen obtenido en medios de cultivo sintéticos.(52)

En reciente trabajo de Prabhakarán, afirma que: en los estudios que ellos realizaron han encontrado que el *M. leprae* posee una habilidad característica para utilizar ciertas substancias que son importantes para la función normal de los tejidos de la piel y los nervios. Estas substancias son derivadas del aminoácido tirosina. En los tejidos específicos, la tirosina se convierte en DOPA y la DOPA en sus derivados: dopamina adrenalina y noradrenalina. Pero concluye diciendo que esta hipótesis de especificidad de tejido del *M. leprae* necesita más confirmación. (67)

El *M. leprae* sigue presentando dificultades para ser cultivado in vitro, pero a lo largo de la historia vemos como después de 1970 cuando la OMS recomienda las técnicas necesarias para el reconocimiento del bacilo, se despierta en los investigadores una inquietud cada vez mayor.

Durante el último Congreso de la Lepra en México (1972), el taller de trabajo sobre la microbiología del *M. leprae* actualizó los conocimientos microbiológicos actuales del *M. leprae* y los criterios a aplicar en caso de su posible cultivo in vitro. Estos criterios son los siguientes: la técnica debe realizarse con éxito en una proporción significativa de ensayos con material rico en bacilos procedente de animales o humanos. La multiplicación debe ser significativa. El procedimiento de aislamiento debe realizarse con éxito en un porcentaje elevado de intentos cuando se utilizó material rico en bacilos procedentes de pacientes sin previo tratamiento o animales. La multiplicación debe ser regular y significativa (teniendo en cuenta los errores experimentados y posibles artefactos de las técnicas utilizadas). Igualmente, debería de mostrarse que los bacilos pueden ser pasados sucesivamente de forma indefinida. (52) (27)

Entre los criterios utilizados para demostrar la identidad, están las siguientes: todas las cepas crecidas in vitro deben ser idénticas y no sólo en la mayoría, sino en todas las características. Las cepas deberán ser idénticas en aquellos antígenos de *M. leprae* que contengan determinantes específicos.

Los aislados deben poder diferenciarse de otras especies de micobacterias conocidas. Las cepas deben comportarse en -

pacientes humanos igual que el *M. leprae* derivado de tejido humano. Suspensiones standard de organismos muertos preparado del cultivo, deben dar reacciones negativas en las fases lepromatosas y positivas en las tuberculoides. La pared celular de las cepas cultivadas deben parecerse químicamente al tejido derivado del *M. leprae*. Se debe mostrar una homología elevada con *M. leprae* derivado de tejidos. (63)

Cultivo in vitro del mycobacterium X procedente de tejidos infectados con *M. leprae* en un medio de acetona-dimetil sulfóxido tetradecano. (Dr. Kato en 1983). Se cultivaron cepas de micobacterias aisladas de tejidos humanos y armadillos infectados con *M. leprae* en el medio mencionado. Se desarrolló a 38°C. una emulsión fina y a la microscopía se mostró una lenta pero abundante multiplicación de bacilos ácido resistentes. Durante los 2 a 3 meses siguientes de iniciado el cultivo, alcanzó su meseta. Los cultivos -- y los subcultivos en los cojinetes plantares de ratón producen una multiplicación similar a la obtenida por inyección de *M. leprae* aislado del humano. Los cultivos han sido denominados tentativamente *Mycobacterium X*. La relación de este y la patología de la lepra no está clara. (41)

Los Dres. Matsuo y Tatsukawa han intentado un cultivo (1983) celular del *M. leprae*, añadiendo agentes reductores como glutation reducido, DL cisteina en ácido hidroxilclorhídrico y ditiotreitól al medio de cultivo y con una tensión de oxígeno reducido. Durante un período de 5 años, se observó un ligero aumento en el número de bacilos ácido resistentes. Sin embargo, la viabilidad de los bacilos obtenidos no ha podido ser comprobado con la técnica de almohadilla plantar del ratón. (56)

INOCULACION DE LEPROA A LOS ANIMALES

INOCULACION

A partir del descubrimiento del *M. leprae* por Hansen, innumerables tentativas de inoculación fueron llevadas a cabo, principalmente en el hombre para determinar si la enfermedad se transmitía por contagio o era hereditario.

(27)

Admitida la contagiosidad de la lepra, no por el resultado de las inoculaciones (que siempre resultaron dudosas o negativas), sino por los datos epidemiológicos; dos motivos principales continuaron estimulando a los investigadores para encontrar el animal idóneo; el deseo de tener un recurso biológico para la confirmación de ciertos diagnósticos y la necesidad de esclarecer la patogenia de la afección.

Así se emplearon numerosos modelos animales: perro, gato, cerdo, caballo, mono, ratón, hamster, conejo, gallináceos y muchos otros, tentándose con diferentes inóculos, vías, técnicas.

A partir de 1960, dos animales se disputan el privilegio de permitir el desarrollo del *M. leprae*: el ratón y el armadillo. Gracias a ellos, la leprología avanza y más en el campo de la bacteriología.

1.- LEPROLOGIA EXPERIMENTAL EN EL RATON

Se sabe desde 1957 que el *M. leprae* crece en la almohadilla plantar del ratón, pero las condiciones requeridas para tener resultados significativos no fueron claras sino hasta 1960 (Shepard).

Los resultados en el ratón normal son consistentes y con buenos resultados. En una revisión realizada en Atlanta, ha mostrado que el *M. leprae* se ha aislado de 404 muestras y los resultados han sido exitosos; se conservan varias cepas y la más vieja tiene más de 11 años.

Rees y Col. (1966, 1967, 1968), demostraron que otro modelo útil es el ratón timecotomizado e irradiado (T/900). En la infección con *M. leprae* del ratón normal, no se reproducen fielmente muchos aspectos de la enfermedad humana, en el timecotomizado e irradiado, en cambio, se desarrollan infecciones lepromatosas que tienen muchas de las características de la enfermedad lepromatosa en el hombre. (27)

Se ha establecido que la transmisión del *M. leprae* al ratón, requiere de técnicas exactas y meticulosas, lo que la hace accesible para pocos laboratorios en el mundo. Han sido descritos varios métodos para contar bacilos. El conteo bacteriano se hace en suspensiones de tejidos.

La temperatura de control en las habitaciones de los animales, es de suma importancia. A 20°C. ambiente la temperatura de la pata del ratón es de 30°C. pero varía de acuerdo a la actividad del animal. Con respecto a la timecotomía, ésta debe realizarse cuando los ratones tienen de 4 a 8 semanas. Después se dá una dosis de radiación de 900 a 950 r. Dichos ratones quedan con una depresión inmunológica de larga duración, especialmente de inmunidad celular.

La curva de crecimiento del *M. leprae* en el ratón normal inoculado, fué dada por Shepard y Mc.Lae (1965). Con el inóculo usual de 5×10 bacilos, la curva tiene 3 fases. Una fa

se de estancamiento que dura 90 días, luego una fase de crecimiento o multiplicación logarítmica de 60 a 100 días, durante la cual los bacilos realizan una división binaria regular y finalmente, la fase en la cual el número de bacilos disminuye lentamente hasta agotarse.

En el ratón normal durante las dos primeras fases, los bacilos se localizan en los fibroblastos. La fase logarítmica termina abruptamente con la aparición de un infiltrado con macrófagos y linfocitos. El cuadro histológico recuerda la lepra boderline.

En los ratones timectomizados e irradiados, ocurre lo mismo que en los normales, hasta el final de la fase logarítmica. En ese momento, la respuesta inmune local es tan atenuada que la multiplicación bacteriana puede continuar -- aunque a una velocidad reducida. Se desarrolla una enfermedad local, semejante a la enfermedad lepromatosa y se disemina a otros sitios.

Una vez lograda la infección através de la almohadilla plantar del ratón, se tuvo la oportunidad de probar la respuesta al tratamiento en forma experimental. Se provó la actividad de la Rimfampicina y de la acedapsona en el ratón y se realizaron ensayos clínicos en el hombre. Se concluyó que la Rimfampicina es de acción bactericida rápida, ya que administrada al 0.03% en la dieta del ratón durante 2 días, parece destruir la mayoría de los bacilos; en cambio, la dapsona para lograr el mismo efecto bactericida debe ser administrada durante 60 a 90 días.

Estudios de Rees en 1967, establece la existencia de cepas resistentes, tanto a la DDS como al Thiambutosine y -

la inoculación en la almohadilla plantar del ratón es el primero y único método para establecer la aparición de cepas de *M. leprae* resistentes.

La aparición de resistencia a la DDS no es común, las cepas resistentes han aparecido por lo menos durante 6 años de tratamiento y la resistencia a drogas en lepra no debe esperarse antes de los 3 años, ya que el índice generacional del *M. leprae* es de 12 a 13 días y el índice generacional del bacilo de Koch es de 20 horas, por esto la resistencia en el *M. Tb* . ocurre después de los tres meses de tratamiento.

El patrón celular de respuesta es distinto en el ratón normal que en el timectomizado y radiado con 900 rads. En el primero, a los 20 meses o después los cambios histológicos corresponden al boderline de la lepra vista en el hombre, mientras que en el timectomizado y radiado con 900 rads, a los 8 meses el cuadro histológico es idéntico al visto en pacientes con lepra lepromatosa.

Por lo visto, la inoculación al ratón tiene gran valor en la lepra en la actualidad, ya que:

- 1.- Permite determinar el tiempo de generación del *M. Leprae*.
- 2.- Permite determinar la correlación entre el aspecto morfológico del bacilo (índice Morfológico) e infectividad.
- 3.- Constituye el método más sencillo para ensayos con nuevas drogas.
- 4.- Constituye el método que nos permite determinar la aparición de resistencias a drogas.

5.- Proporciona datos concretos sobre la patogénesis de la infección leprosa.

En relación a la viabilidad se ha demostrado, gracias al modelo experimental en el ratón, que puede permanecer activo fuera del paciente hasta 10 días; incluso mas.

También han mostrado su receptividad a la inoculación - las ratas Lewis timectomizadas neonatalmente y las ratas atímicas congénitas.

Ratones desnudos genéticamente atímicos, son muy susceptibles a las infecciones por *M. leprae*; estudios previos han puesto de manifiesto esto.

En 1983, el Dr. Lancaster, demuestra que la inoculación de la almohadilla plantar del ratón desnudo, con distintas cantidades de inoculación, provoca un crecimiento del bacilo hasta alcanzar 10^8 bacilos por almohadilla plantar. Hubo diseminación de la infección aproximadamente 10 meses después de la inoculación. (54)

2.- LEPRO EXPERIMENTAL EN ARMADILLO

En armadillo de nueve bandas sigue siendo el animal mas importante para la producción del *M. leprae*.

Es un mamífero del orden de los desdentados y familia de los dasípidos. El género *Dasyus Novemcintus* fue el primero de estos animales utilizado para la inoculación del *M. leprae*. Mide de 35 a 50 cms. de longitud (con cola de 70 a 90 cms.), - pesa de 3 a 6 kgs. con nueve anillos móviles en la coraza y 8 molares en cada mandíbula. Habitan en Brasil, Paraguay, Guayanas, Texas. La camada standard es de 4 cachorrillos que derivan de un simple huevo fertilizado, todos son del mismo sexo y

contienen idéntica serie de genes. El período de gestación puede ser hasta de 20 meses. Viven en cuevas, se alimentan de hierbas e insectos, con una temperatura corporal de 31°C y un promedio de vida de 10 años. (81)

Diversos autores entre ellos Storss y Kirchheimer, practicaron diversas inoculaciones con *M. leprae* extraídos de enfermos lepromatosos. El inóculo contiene 10^6 bacilos por c.c. y se inyecta en sucesivas etapas de la vida del animal, pudiéndose utilizar para ello las vías intradérmica, subcutánea, intraconjuntival, en la mucosa nasal e intravenosa, para aprovechar la diseminación hematógena; observando el desarrollo de lepromas con gran multiplicación bacilar al cabo de 14 a 18 meses. (45) (46)

Las comunicaciones mostraban incluso que el *M. leprae*, cuando desarrolla, lo hace en forma más grave en el armadillo que en el humano, dado que se encontró neumonitis leprotica e infección en esófago y meningitis, además se comprometen casi todos los órganos: hígado, bazo, médula ósea y ganglios linfáticos. Posteriormente se empezaron a utilizar estos mismos lepromas, como fuente bacilar para nuevas inoculaciones con buenos resultados. (27)

En otros estudios, el Dr. Portillo y Col., consideran que la baja temperatura del armadillo tiene relación con la deficiente respuesta inmunológica dado que observan que la transformación linfocitaria "in vivo" frente a agentes mitógenos, se veía deprimida a medida que disminuía la temperatura a que eran sometidos.

Convit J. y Col., practicaron la inoculación del *M. leprae* al armadillo autóctono venezolano, el *Dasyus sabanicola*, obteniendo a su vez resultados exitosos.

También se han inoculado *Dasyus* híbridos en Argentina por Baliña y Col., que se reproducen más fácilmente en cautiverio.

(25) (27)

LEPRA NATURAL EN ARMADILLOS

Algunas áreas, por ejemplo Florida, parecen estar libres de la infección. (25)

La Dra. Storss, presentó en el "Workshop" sobre armadillos de Caracas el hallazgo de 41 armadillos silvestres con lepra lepromatosa y el infiltrado lepromatoso en las vísceras del animal era aún más severo que las del inoculado. (27)

El Dr. Gerald, encontró en Louisiana, 49 armadillos positivos sobre 691 animales estudiados. En Texas, uno sobre 49 armadillos y en Mississippi uno sobre 40. Recientemente, se ha descubierto en México un armadillo con infección natural. (38) (27)

Es interesante que el armadillo sea un reservorio natural de la Lepra; una enfermedad que hasta hace poco se admitía como exclusiva del ser humano y no se descarta la posibilidad de contagio de armadillos inoculados, sea paradójico que un animal sea bacilo de Hansen en un país donde la lepra ha llegado de otro Continente.

Los armadillos contagiados son los animales ideales para tener abundante material bacilar para inmunoprofilaxis e inmunoterapia, por presentar la forma clínica que siempre es lepromatosa, aunque en 1982 Job y Col. obtienen un armadillo con

lepra dimorfa. . . (38)

LEPROMINA DE ARMADILLO

Se puede preparar lepromina bacilar de armadillo obtenida de lesiones infiltradas en sitios de inoculación, ya que el armadillo tiene más de 10^6 bacilos por gramo en tejido de hígado, bazo o nódulo linfático a los dos años de la inoculación. Un gramo contiene un miligramo de bacilos. Son susceptibles de la inoculación un 80% de los animales y aún aumentando la dosis del inóculo o empleando otra vía, no varía el porcentaje de animales contagiados. (6) (25)

La lepromina de armadillo nos da respuestas mayores, por ser más antigénica que la lepromina humana.

ASPECTOS CUANTITATIVOS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL EN ARMADILLOS

El Dr. Kirchheimer en 1980, hace un sumario de sus experiencias como sigue: el porcentaje de armadillos que desarrollan Lepra diseminada, depende del curso de la infección y del tiempo; y se diría que un 50% de los armadillos de nueve bandas infectados intravenosamente con varios cientos de millones de *M. leprae*, pueden producir sumas de billones 10^9 de *M. leprae* por gramo de tejido dentro de 12 meses aproximadamente y se acerca al 100% en dos años. (7) (47)

INOCULACIONES EN PRIMATES

Lo más reciente en el terreno de las inoculaciones, son los resultados obtenidos en primates. Ya en 1978, Lenninger, había observado en un chimpancé de Sierra Leona, una micobacteriosis similar a la lepra, adquirida en forma natural realizándosele necropsia a su muerte, siendo los bacilos y las lesiones idénticas a la Lepra. (81) (38)

Meyers en 1979, encuentra en un mono Mangabey (Cercopithecus satis) procedente de Nigeria, una enfermedad similar a la lepra humana y en 1980 inocular con material de este mono dos monos Mangabeys más y otros dos con bacilos de armadillo, - inoculado este con bacilos de lepra humana y de los 4 monos inoculados, 11 meses después hay generalización en todos, - con bacilos que son inidiferenciables de M. leprae. (38)

Gary en 1985, inoculó un mono Mangabey intravenosamente e intracutáneamente, con M. leprae aislados de otro mono mangabey con lepra adquirida en forma espontánea. El mono desarrolló lepra generalizada 46 meses después de la inoculación. La necropsia reveló severos infiltrados lepromatosos en piel, en mucosa nasal, en nervios periféricos y testículos. Los órganos internos se afectaron al mínimo. Las lesiones encontradas en la necropsia fueron muy similares a las observadas en casos humanos de LL sin tratamiento. Los hallazgos refuerzan la utilidad de los monos mangabey como modelos animales para el estudio de la lepra lepromatosa. (28)

En 1985, un caso de lepra adquirida de forma natural en un mono mangabey estudiado por Wayne y Col. se encontraron los hallazgos histopatológicos del tipo lepromatoso, el agen

te etiológico, se identificó como *M. leprae* en base a los siguientes criterios: invasión de los nervios, propiedades tintoariales, hallazgos al microscopio electrónico, - incapacidad de crecer en medios microbacteriológicos, actividad DOPA- oxidasa positiva, reactividad a la lepromina, patrones de infección en amadillos y ratones, sensibilidad a las sulfonas y homología del DNA. Y se pensó que este - animal adquirió la enfermedad de un paciente con lepra activa. El mono mangabey es la tercera especie animal reportada para adquirir lepra por infección natural. (86)

Siguiendo estas experiencias, se han conseguido también inoculaciones positivas en el mono verde africano y mono - Rhesus con bacilos procedentes de Mangabeys. (38)

Creemos que los primates son de gran interés, pues su sistema inmunitario es más similar al humano que el de ratones y amadillos.

PERSPECTIVAS EN LA INMUNOLOGIA DE LA LEPRO

PERSPECTIVAS EN LA INMUNOLOGIA DE LA LEPRO

Los estudios inmunológicos han sido objeto de una intensa investigación durante los últimos 15 años. Se han conseguido importantes progresos en determinadas áreas y se están acumulando pruebas que apoyan los conceptos aquí expuestos.

Podemos observar, en el eje de abscisas, el tiempo de exposición y en el de ordenadas la resistencia de la inmunidad medida por células. (81)

La idea sugiere que entre las personas expuestas, la gran mayoría parece desarrollar una respuesta inmunológica eficaz lo suficientemente rápida para detener la infección originada por el *M. leprae*, antes de que se transforme en una infección clínica manifiesta: esto constituye la infección subclínica. Sólo en una minoría se manifiesta clínicamente la enfermedad. Hacia el extremo tuberculoide hay suficientes pruebas para sugerir que la respuesta inmunológica del *M. leprae* es la principal causa de lesiones, mientras que hacia el extremo lepromatoso la infiltración de las células del huésped es por acumulos de bacilos. (22)

El deterioro neural de la lepra es de suma importancia, ya que es de origen de deformidades. La deformidad suele originarse a partir de la pérdida de la sensibilidad y de la función nerviosa motora.

Los nervios dañados de los pacientes tuberculoides, están deteriorados por infiltración de células inflamatorias, hay formación granulomatosa entre los nervios con, linfocitos, macrófagos y células epiteloides. Esta formación gra-

mulomatosa se origina a partir de los ataques inmunológicos del huésped contra los bacilos, que cuando son reconocidos por el sistema inmunitario del huésped, los linfocitos T son atraídos a esos lugares donde liberan unos factores llamados linfoquinas, que a su vez atraerán y activarán monocitos para que maten y engloben a las bacterias. Sin embargo, este ataque tiene como consecuencia distorsión y deterioro de las fibras nerviosas y de su función. Esto puede ocurrir en la reacción de reversa. Es importante por lo tanto, tratar a estos pacientes lo más pronto posible, ya que la función nerviosa es irreversible. (81)

En el caso de la Lepra lepromatosa, el sistema inmunitario del huésped no ataca a los bacilos que están reproduciéndose en gran número dentro de los tejidos. Se sabe por estudios previos, que este defecto inmunológico es muy específico para el bacilo de la lepra, ya que puede haber pacientes que respondan positivamente al BCG y al PPD, pero que son incapaces para responder contra el *M. leprae*.

Se ha sospechado que las células T, juegan un papel fundamental en el defecto inmunológico de la lepra lepromatosa. (58) (75)

La respuesta de las células T, puede ser subdividida en tres partes: rama aferente o fase inductiva, la fase central o reguladora y la fase afectora.

Con respecto a la fase inductiva, sabemos que las células T no detectan los antígenos por sí mismos, sino que otras

células llamadas presentadoras de antígenos no incluyen monocitos; macrófagos realizan esta función. Las células de Langerhans pertenecen a esta categoría.

Las células presentadoras de antígenos, tienen sobre su superficie antígenos derivados; en nuestro caso del *M. leprae* que son necesarios para la activación de las células T, así como una alta concentración. (81)

Además hay pruebas de que las células presentadoras de antígenos producen un factor que es la Interleukina 1 (IL-1) para la activación de una subclase de células T con la consiguiente liberación de interleukina-2 (cuya presencia no ha podido detectarse en pacientes con *L. lepromatosa*), factor necesario para la proliferación de células T. (81)

La activación de las células T, conduce a dos fenómenos a una subclase de células T que se llama T2 que empiezan a producir un factor necesario para la proliferación de células T y producción de linfoquinas llamado interleukina 2. - Algunas células llamadas T3, desarrollarán receptores para la interleukina 2 y serán capaces de responder. (81)

Estas tres funciones de las células T, corresponden a la fase inductiva que preparan a la fase reguladora, ya que las células T son controladas por células T llamadas supresoras y éstas células pueden interferir con la activación de las células T de distintas maneras, por ejemplo: bloqueando la inducción de los receptores L-2 o bloqueando la producción de IL-2. (80)

La tercera parte de la respuesta de las células T ó fase afectora, corresponde al ataque sobre el *M. leprae*. Las células T, producen linfoquinas, que tienen propiedades quimotácticas y atrae monocitos. Una de estas es llamada factor activador de macrófagos (MAF), que activa al macrófago para que destruya y digiera las bacterias englobadas. (30)

Ahora bien, lo importante de todo esto es saber lo que no funciona adecuadamente en la Lepra lepromatosa:

1.- Puede ser que las células presentadoras de antígenos estén comprometidas.

2.- O bien, que las células T carezcan de receptores para los Ag, de *M. leprae*.

3.- Sin embargo, la información indica que la falla está localizada a nivel central.

4.- Finalmente, el Dr. Haregewoin en Adis Abeba y Col., han demostrado que células T de la forma lepromatosa, no producen Interleukina 2, pero si se les proporciona de origen exógeno, son capaces de originar respuesta.

Estos hallazgos son muy importantes porque sugieren que los estudios sobre la naturaleza del defecto inmunológico de la LL, puede llevarnos a la tentativa de restaurar la capacidad inmunológica de dichos pacientes. (81)

INFECCION SUBCLINICA - FLA-ABS

La detección de la infección subclínica, es de gran importancia para la mayor comprensión epidemiológica de la lepra. (36)

Se han conseguido avances muy significativos en esta área mediante el desarrollo de técnicas serológicas específicas para el *M. leprae* como los empleados por Abe pionero en este campo para detectar infección subclínica en los convivientes y en niños enfermos menores de 2 años. Son el FLA-ABS (prueba de absorción del anticuerpo florescente de la lepra). Esta prueba fue positiva en el 100% de los pacientes con lepra bacteriológicamente positivos, un 80% en los casos tuberculoides y en un 91.9% de contactos convivientes de enfermos de lepra. Por lo tanto, la sensibilidad y especificidad de la prueba FLA-ABS, sirve para la detección de infecciones subclínicas. (25) (38) (57)

El Dr. Baohong, examinó 857 pacientes con diferentes tipos de lepra y les practicó la prueba FLA-ABS, confirmando la especificidad de esta prueba (1984). La combinación de una prueba FLA-ABS positiva con una mitsuda negativo podría indicar una infección individual con *M. leprae*. La infección subclínica puede no ser diferenciada de la lepra temprana, pero con la prueba FLA-ABS, se puede hacer el diagnóstico. En áreas endémicas, la prueba fue positiva en un 11.4% y 16.3%. (37)

También esta prueba podría servir para detectar casos precoces, ya que en un estudio realizado de FLA-ABS a 21 familias y contactos de pacientes con LL, fue positiva en 4 casos, dos de los cuales desarrollaron lepra 6 meses después. (61)

ELISA - ANTIGENO GLICOLIPIDO FENOLICO

También contamos con otras pruebas específicas de gran valor. El Radioinmunoensayo de Harboe y el test ELISA, modificado por Miller y Buchanan, o bien, el antígeno glicolípido fenólico al que se reconoce como único y específico del *M. leprae*. Estos tests serológicos, reconocen anticuerpos específicos en mínimas concentraciones y son de gran utilidad junto con la leprominorreacción para detectar infecciones subclínicas y la evolución de ellas, así como en un programa de control de la Lepra por la precocidad del diagnóstico. (25) (36)

Investigándose la actividad serológica del glicolípido fenólico característico del *M. leprae*, el cual puede ser obtenido en grandes cantidades del hígado de armadillos infectados, usando la técnica de enzimas unidas a inmunoabsorventes (ELISA). Se obtuvo una buena correlación entre estas técnicas, pero el ELISA era más sensible. Se encontraron niveles altos de anticuerpos por antiglicolípidos IgG e IgM en pacientes con lepra lepromatosa. También se pudo demostrar la existencia de anticuerpos antiglicolípidos tipo IgM en algunos pacientes tuberculoides, pero con títulos menores. (5) (36)

Los anticuerpos monoclonales dirigidos al sacarido terminal del glicolípido, muestran mayor especificidad para el *M. leprae* en ELISA. Estos anticuerpos por inmunofluorescencia indirecta, revelan localización superficial de los determinantes específicos al *M. leprae* del antígeno glicolípido. Además de su uso para proporcionar información sobre las propiedades antigénicas del glicolípido fenólico, estos anticuerpos tienen aplicación potencial para determinar los papeles

de glicolípido en la patogénesis de la lepra. (25) (19) (91)

En pruebas realizadas en laboratorio "in vitro", podemos diferenciar los linfocitos B por técnicas de inmunofluorescencia, utilizando sueros anti-Ig conjugados y con ELISA y se mide el nivel de la respuesta humoral (anticuerpos) en el paciente o contacto, frente al *M. leprae*. (4)

El *M. leprae* ha sido usado para descubrir anticuerpos en el suero de enfermos de lepra y en controles sanos mediante el método de inmunofluorescencia indirecta. Se encontraron anticuerpos en el 78.8 por ciento de los enfermos. La sensibilidad y especificidad de dicho método es útil para el diagnóstico de la infección. (35)

Es hoy bien conocida la presencia en el suero del cordón umbilical de niños de madres lepromatosas anticuerpos anti IgA e IgM antimicrobiales. (38) (59)

ANTIGENICIDAD

Un aspecto interesante es la antigenicidad del bacilo. Harboe ha llegado a cabo estudios orientados en la búsqueda de algún antígeno que fuera propio y específico del *M. leprae*; para ello inmunizó conejos frente a los *M. leprae*, tuberculosis y lepramurium. Frente a los 70 antígenos que presenta el bacilo de Koch y 40 el *M. lepraemurium*, el bacilo de Hansen solamente ofrece 7 antígenos fuertes y 20 débiles, pero con el agravante que presentan reacción cruzada con *M. tuberculosis*. Estos resultados ponen de manifiesto la escasa antigenicidad del bacilo. (7)

Anticuerpos contra siete antígenos del *M. leprae*, se han encontrado en bebés desde su nacimiento hasta los 18 meses de edad cuyas madres presentaban lepra lepromatosa. Esto indica que los bebés han sido estimulados por 7 antígenos del *M. leprae*, o bien, por un antígeno libre; todo esto sería un indicador de infección intrauterina en la lepra. (7) (60) (59)

ALTERACIONES DE LOS MACROFAGOS

Se han realizado cultivos de macrófagos a los que se les añade *M. leprae* viables y se valoraron para la formación de rosetas eritrocíticas; los pacientes lepromatosos han mostrado una reacción en la habilidad de formación de rosetas. La conclusión de esto sería que el *M. leprae* al penetrar en un macrófago inicia la producción de una proteína que altera la membrana. Es posible que esta membrana alterada previene una interreacción macrófago linfocito efectiva. Todo esto podría ser uno de los múltiples mecanismos por los cuales la inmunidad mediada por células es suprimida en lepra lepromatosa. (3)

La proliferación de células mononucleares de sangre periférica humana inducidas por *M. leprae*, puede ser inhibida por el factor supresor del lisado de macrófagos de pacientes lepromatosos. Los macrófagos de pacientes tuberculoides y controles normales no hay producción de factor supresor. La inhibición tenía lugar sólo cuando el factor estaba presente en las fases iniciales del cultivo linfocítico. (75) (82)

El lisado de macrófagos lepromatosos también genera actividad supresora en poblaciones enriquecidas con linfocitos T, en individuos normales. Por lo tanto, la inmunosupresión en los pacientes lepromatosos está producida por los macrófagos y linfocitos T. (75)

Otro hallazgo que podía explicar algunas de las aberraciones inmunológicas observada en los pacientes lepromatosos, que poseen gran número de bacilos en sus tejidos, es que el *M. leprae* suprime la respuesta proliferativa in vitro de las células mononucleares de la sangre periférica humana al antígeno y al mitógeno. En altas concentraciones el *M. leprae* probó ser citotóxico para los linfocitos.

Los macrófagos poseen receptores para la mitad del carbohidrato presente en la pared celular de *M. leprae*. El nivel de adherencia está disminuída en la fase activa de la enfermedad, pero puede ser restaurada con un tratamiento efectivo, o bien, por tratamiento in vitro con tripsina de los macrófagos. Se concluye que la estructura membranosa alterada de los macrófagos con respecto a sus receptores para carbohidratos puede significar impedimento para el reconocimiento del patógeno. (53)

Con la técnica de transformación linfocítica, medimos la actividad celular T in vitro de los pacientes de lepra, pudiendo establecer comparaciones entre los distintos tipos de lepra, contractos, etc. frente al *M. leprae* por su capacidad de división frente al mismo (transformación blástica) al medir la incorporación de timidina tritiada por el DNA formado.

LINFOCITOS T Y B EN SANGRE PERIFERICA

Recientemente algunos investigadores han enumerado los linfocitos T y B encontrados en la sangre periférica de pacientes con lepra, obteniendo los siguientes resultados: -- los linfocitos T y B se enumeraron por medio de la técnica formadora de roseta y por la de eritrocitos de ratón. (12)

Los linfocitos T totales en pacientes con LL, eran de 66%.

En BL 69%

En BT 70.4%

En TT 71.9%

En el grupo control sano de 72%

El porcentaje de linfocitos B era de 8% en pacientes con LL.

En BL 6.5%

En lepra tuberculoide de 6.6%

En el grupo control de 5.7%

Con estos resultados observamos una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T en pacientes con lepra lepromatosa. En cambio, los linfocitos B estaban aumentados en los pacientes lepromatosos. (26)

VACUNA EN LA ENFERMEDAD DE HANSEN

Las teorías sobre el desarrollo de la vacuna de la lepra, se basan en opiniones, como la naturaleza del defecto fundamental de la lepra lepromatosa. Si el defecto fundamental es adquirido y no genético. Sería posible por muerte del *M. leprae* inmunizar a los individuos. Si el defecto es genético en origen, se debe de incluir algo diferente al *M. leprae* para la vacuna. Un grupo cree que el *M. leprae* mas BCG el enfoque correcto. Otros creen que el *M. leprae*, mas un material para hacer un *M. leprae* más efectivo -un ayudante-, es el enfoque más probable. Otros adoptan la posición de que el *M. leprae* mismo es inútil como medio de prevenir la lepra lepromatosa, y que debería usarse otro microbacterium. Los ensayos con BCG en el pasado no fueron efectivos para prevenir la lepra lepromatosa. Un trabajo más reciente se ha basado en hallar microbacterias más cercanas al *M. leprae* un grupo ha abogado por el *Mycrobacterium delhi*, como pariente antigénico cercano al *M. leprae*.
(93) (83) (30)

Por otra parte, la destrucción o muerte de los bacilos disminuye su poder inmunógeno, hecho importante por cuanto las tentativas de conseguir una vacuna eficaz para la protección han fracasado. Se han hecho estudios con bacilos irradiados que permitiría conservar su capacidad antigénica sin peligro de contagio, pero sin resultados favorables.

En Venezuela se ha usado *M. leprae* muerto mas BCG y en la India *M. vaccae* mas BCG, consiguiendo una reconversión de pacientes leprominosos negativos a positivos, pero por períodos cortos de tiempo. (81)

Hoyavía quedan muchas incógnitas por resolver en este terreno, pero los resultados obtenidos durante los últimos años, no permiten albergar esperanzas de que en un futuro se pueda obtener una vacuna efectiva.

HLA EN LEPRA

Todas las reacciones inmunitarias se encuentran sujetas a un control genético ya estudiado. Sabemos que en el brazo corto del cromosoma 6 humano, se encuentran los locus denominados Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

En los estudios genéticos realizados sobre la enfermedad de Hansen, hay evidencias que ciertos fenotipos HLA-DR están relacionados con el tipo de lepra que se desarrolla en el individuo afectado, encontrándose una correlación entre el HLA-DR2 y la lepra tuberculoide. (81)

Se observó una herencia preferencial significativa de HLA-DR2 por hermanos afectados con lepra tuberculoide, pero no por hermanos sanos ni por hermanos afectados con LL. Hay datos compatibles con una herencia recesiva de susceptibilidad ligada HLA a la lepra toberculoide. (85)

FDA/EB METODO PARA MEDIR LA VIABILIDAD
DEL M. LEPRAE

FDA/EB METODO PARA MEDIR LA VIABILIDAD DEL MYCOBACTERIUM
LEPRAE

Un procedimiento de teñido incorporando el uso de diacetato de fluoresceína (FDA) y bromuro de etidio (EB) ha demostrado previamente medir con precisión la viabilidad de *Mycobacterium smegmatis* y *M. phlei* bajo una variedad de condiciones fisiológicas. Las células micobacteriales vivas se distinguían de las muertas y de las dañadas por sus características de teñido que dependían del estado fisiológico y metabólico de las células. (49) (8)

En el estudio de los Dres, James T. Kvach y R. José Verras, confirman las anteriores experiencias y agregan el concepto de las células duales que son las que están entre la vida y la muerte.

Las células vivas se teñían de verde debido a su habilidad para hidrolizar enzimáticamente el FDA por la acetiltransferasa convirtiéndolo en fluoresceína fluorescente y la presencia de una membrana celular intacta permite a las células acumular intracelularmente fluoresceína y excluir EB. Las células teñidas de rojo mostraron estar muertas y ser incapaces de modificar enzimáticamente al FDA y el Bromuro de Etidio tiene capacidad de penetrar a las células muertas con daño en la membrana y se intercala con las moléculas de DNA. (49) (50)

Sin embargo, la tinción del *M. leprae* se ha visto complicada por la interferencia de los componentes tisulares que enmascaran la presencia de las bacterias. Existe una técnica de separación con éter de petróleo que permite segregar al *M. leprae* de los componentes tisulares facilitando entonces su tinción.

Este método permite la tinción de biopsias de piel humana

y de tejido de cojinete plantar del ratón y a la vez permite la valoración clínica. Los datos preliminares indican que los pacientes tratados de 3 a 24 meses, poseen en sus tejidos porcentajes significativamente menores de *M. leprae* teñidos de verde que los pacientes no tratados.(50)

Los bacilos obtenidos de los cojinetes plantares de 5 a 13 meses de infección, tuvieron un 90% de células teñidas de verde. (8)

Este estudio también serviría para determinar la efectividad del tratamiento en los pacientes. Los pacientes que responden a la terapia deben mostrar una disminución progresiva del *M. leprae* teñidos de verde. Contrariamente, los pacientes que reinciden debido a resistencia a las drogas o al incumplimiento del tratamiento NO muestran una disminución del porcentaje de micobacterias viables, o bien, este porcentaje puede estar aumentado.

OBJETIVOS:

- 1.- Revisión de las características del M. leprae
- 2.- Revisión sobre intentos de cultivo del M. leprae así como inoculación en animales.
- 3.- Revisión de los diferentes métodos de tinción para Mycobacterias.
- 4.- Montar el método FDA/EB en el Centro Dermatológico Pascua y aplicarlo en los pacientes de lepra para su evaluación.
- 5.- Evaluar el método FDA/EB en pacientes con Lepra Lepromatosa en pacientes vírgenes al tratamiento y en pacientes ya tratados.
- 6.- Evaluar el estado bacteriológico de los pacientes de lepra lepromatosa sin tratamiento, y con tratamiento.
- 7.- Comparar el método FDA/EB con el Índice Morfológico y el Bacteriológico y correlacionar los resultados con la bacteriología en linfa cutánea y raspado de la mucosa nasal.

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 26 pacientes enfermos de lepra, de los cuales 20 correspondían al Centro Dermatológico Pascua y 6 procedentes del Estado de Sinaloa, de 1984 a 1985.

De los 20 pacientes estudiados en el Centro, 19 eran de primera vez y vírgenes a tratamiento; a los que se les realizó historia clínica, estudio histopatológico, baciloscopías de lóbulo de la oreja y de mucosa nasal y algunos se les realizó punsión ganglionar. El último de los pacientes correspondiente al Centro Pascua era un paciente que había abandonado su tratamiento durante 10 años.

Los 6 pacientes enfermos de lepra del Estado de Sinaloa eran pacientes con Dx de Lepra Lepromatosa Difusa (pura y primitiva) y todos ellos recibían tratamiento.

Los diagnósticos de los 20 pacientes del Centro Pascua correspondían a los siguientes diagnósticos siguiendo los cuatro parámetros: 16 pacientes con Dx de LLN, 4 pacientes con Dx de LLD y un paciente con Lepra Dimorfa..

Se obtuvo tejido infectado de los 26 pacientes, por medio de biopsia bajo anestesia local con lidocaína y se mantuvieron en nitrógeno líquido por tiempo que variaba desde un mes a un año, dependiendo de cada paciente. La otra porción de la biopsia se mandó a estudio histopatológico y tinción para bacilos.

METODO FDA/EB

I.- Se montó el método FDA/EB, siguiendo los siguientes pasos:

- a) Descongelar el tejido infectado
- b) Preparar la suspensión de bacterias
- c) Preparar la técnica de tinción FDA/EB
- d) Técnica de lectura e interpretación

II.- Preparación de los frotis y tinción con Ziehl-Neelsen.

- a) Lectura de Índice Morfológico y Bacteriológico

III.- Lectura de Índice Bacteriológico en pruebas histológicas.

METODO PARA PREPARAR LA SOLUCION FDA/EB PARA ALMACENAR

FDA.- 100 mg. de FDA (Diacetato de fluoresceína) en
20 ml. de acetona, 5.0 mg/ml.

EB .- 20 mg. de EB (Bromuro de etidio) en 10 ml. de
solución de Hanks.

Almacenar a -20°C . protegiéndola de la luz.
(Pueden permanecer estables las soluciones hasta
2 años bajo las condiciones antes citadas).

SOLUCION DE HANKS

Glucosa	1.0 g.
Cloruro de Sodio	8.0 g.
Cloruro de Potasio	0.4 g.
Cloruro de Calcio	0.14 g.
Sulfato de Magnesio	0.1 g.
Cloruro de Magnesio	0.1 g.
Fosfato Monopotásico	0.06 g.
Fosfato Disódico	0.06 g.
Bicarbonato de Sodio	0.35 g.
Agua Tridestilada	1 litro

METODO PARA PREPARAR LA SOLUCION FDA/EB DE TRABAJO

FDA:

Diluya la solución almacenada en proporción 1:10 en acetona y ésta puede ser almacenada a -20°C ., protegiéndola de la luz.

Para utilizar la solución de FDA hay que diluirla en 5 ml. de solución de Hanks, tomando de la solución anterior 0.02 ml. y se obtendrá una solución de FDA de 2 ug./ml.

EB:

Para utilizar la solución de bromuro de etidio, añada a los 5 ml de solución de Hanks que ya tiene FDA, 0.01 ml. de la solución de EB que se tiene almacenada y así se obtendrá una solución de FDA/EB con concentraciones de 4.0 ug. EB/ml. y 2.0 ug.FDA/ml.

Protegiéndola de la luz y a temperatura ambiente, esta solución puede permanecer estable por un día de trabajo.

METODO FDA/EB

Preparación de la suspensión de bacterias

- 1.- Se toma el tejido humano infectado y se coloca en solución de Hanks con un Ph de 7.4 y sin rojo fenol.
- 2.- Se machaca en un mortero
- 3.- El producto del machacado se resuspende a partes iguales con éter de petróleo, se agita y se deja reposar. El éter de petróleo se va a la superficie llevándose los bacilos y los residuos caen al fondo.
- 4.- De la capa del éter de petróleo se toman los bacilos que se van a estudiar.

Técnica de tinción y lectura

- 1.- Se toma un pequeño inóculo de la suspensión antes mencionada y se coloca en un portaobjetos.
- 2.- Se añade una porción idéntica de FDA/EB de solución de trabajo recién preparado.
- 3.- Se le coloca un cubreobjetos y se sella con barniz
- 4.- Se deja incubar 30 minutos

Lectura e interpretación

Lista la preparación, se pasa al microscopio de epifluorescencia y se procede a la lectura utilizando el objetivo de inmersión.

Se observarán las bacterias color rojo que corresponden a las que están muertas, amarillo a las que están entre la

vida y la muerte (dúales) y las que están vivas se observarán color verde.

Se deberán contar 200 bacterias y posteriormente se calculará el porcentaje de cada una de ellas.

Preparación de los frotis y tinción con Ziehl-Neelsen.

- 1.- Se toma una pequeña porción del inóculo suspendido de éter de petróleo y se coloca en un portaobjetos y se fija a la flama.
- 2.- Se realiza la tinción con Ziehl-Neelsen
- 3.- Se procede a la lectura del IB y del IM siguiendo el esquema para la OMS en la lectura del IB y el método de Ridley para el I. Morfológico y se anotan los resultados para la comparación con el método FDA/EB.

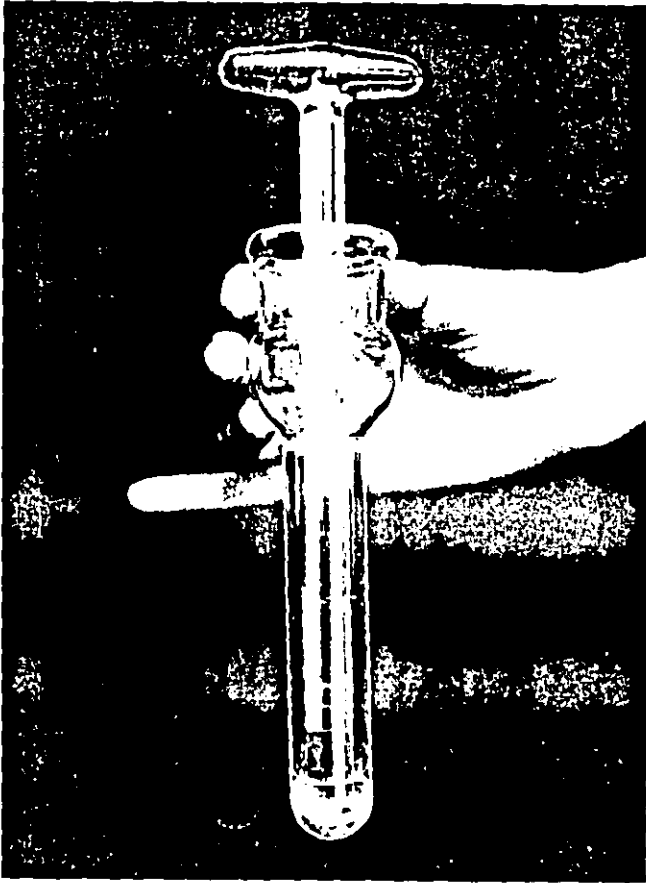


FOTO No.1

Se toma el tejido humano infectado y se coloca en un mortero con solución de Hanks con un PH de 7.4 sin rojo fenol y se machaca en el mortero.

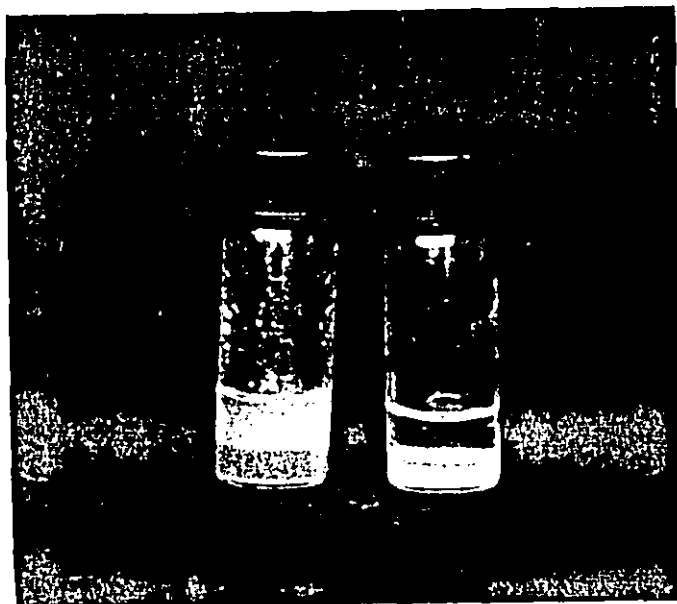


FOTO No. 2

El producto del machacado se resuspende a partes iguales con éter de petróleo, se agita y se deja reposar. El éter de petróleo se va a la superficie llevándose los bacilos; los residuos caen al fondo.

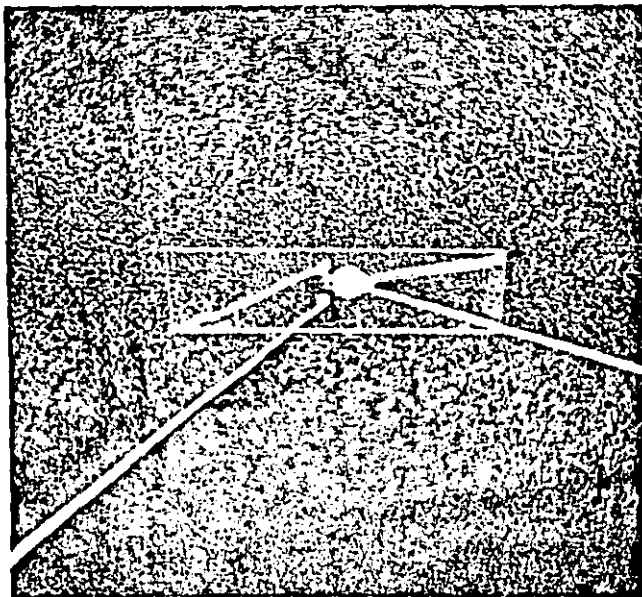


FOTO No. 3

De la capa de éter de petróleo se toma un pequeño inóculo y se coloca en un portaobjetos y se añade una porción idéntica de FDA/EB de solución de trabajo.

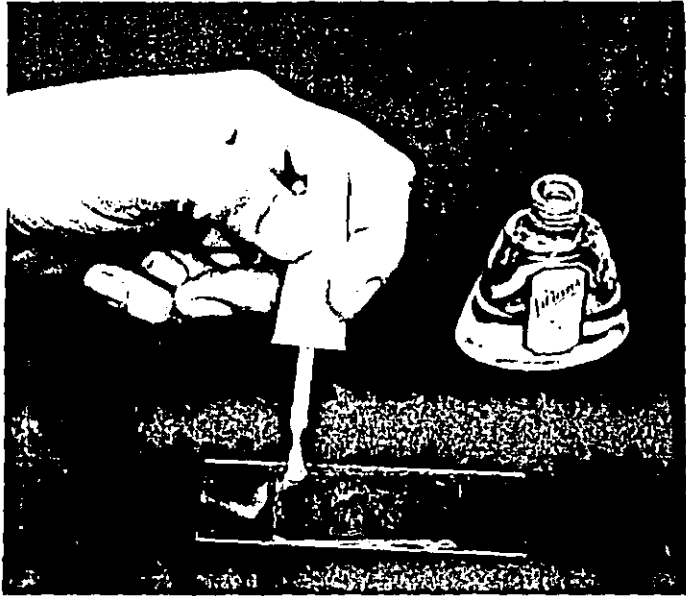


FOTO No. 4

Posteriormente se coloca un cubreobjetos y se sella con barniz dejando incubar 30 minutos; lista la preparación se pasa al microscopio y se procede a la lectura.

RESULTADOS (Tablas)

RESULTADOS COMPARATIVOS FDA/EB CON INDICE MORFOLOGICO Y BACTERIOLOGICO

Pacientes	DX	Tratamiento	Método FDA/EB			I. Morfológico			Index	I. Bacteriológico
			rojos	amarillos	verdes	S	F	G		
1.-	LLN	S/T	9%	2%	89%	40%	60%	0%	2 2 0-8	6+
2.-	LLN	S/T	1%	4%	95%	5%	70%	25%	0 2 2-2	6+
3.-	LLN	S/T	0%	0%	100%	30%	70%	0%	2 2 0-8	3+
4.-	Dimorfo	S/T	0%	0%	0%	sin bacilos				sin bacilos
5.-	LLN	S/T	1.5%	0%	98.5%	0%	60%	40%	0 2 2-2	+
6.-	LLN	S/T	1%	1%	0%	1%	0%	0%	0 0 0	+
7.-	LLN	S/T	9%	2%	40%	1%	70%	30%	0 2 2-2	3+
8.-	LLN	S/T	15%	34%	1%	0%	50%	50%	0 2 2-2	6+
9.-	LLN	S/T	60%	39%	1%	0%	70%	30%	0 2 2-2	+
10.-	LLD	S/T	2%	2%	86%	2%	28%	70%	0 2 2-2	3+
11.-	LLN	S/T	1%	0%	99%	10%	90%	0%	1 2 0-5	5+
12.-	LLN	S/T	0%	0%	100%	20%	80%	0%	1 2 0-5	+

N° Pacientes	Dx	Tratamiento	Método FDA/EB			I. Morfológico			Index	I. Bacteriológico
			rojos	amarillos	verdes	S.	F	G		
13.-	LLD	S/T	0%	0%	100%	0%	50%	50%	0 2 2-2	+
14.-	LLN	S/T	99%	0%	1%	70%	30%	0%	2 2 0-8	3+
15.-	LLD	S/T	0%	0%	1%	70%	20%	10%	2 2 1-6	+
16.-	LLD	S/T	0%	100%	0%	0%	70%	30%	0 2 2-2	+
17.-	DXLLN	S/T	0%	0%	100%	40%	50%	10%	2 2 1-6	++
18.-	DXLLN	S/T	0%	15%	75%	0%	80%	20%	0 2 1-1	++
19.-	DXLLN	S/T	0%	0%	100%	0%	80%	20%	0 2 1-1	3+
20.-	DXLLN	S/T	4%	6%	90%	2%	38%	60%	0 2 2-2	3+
21.-	DXLLD	C/T	3	0	3	sin bacilos				neg.
			en 20 campos							
22.-	DXLLD	C/T	3 verdes en 20 campos			sin bacilos				neg.
23.-	DXLLD	C/T	negativo			sin bacilos				neg.
24.-	DXLLD	C/T	negativo			sin bacilos				neg.
25.-	DXLLD	C/T	negativo			4 fragmentados en 20 campos				+
26.-	DXLLD	C/T	negativo			sin bacilos				neg.

RESULTADOS DE I BACTERIOLOGICO EN HISTOLOGIA Y BACILOSCOPIA

Paciente	Dx	I Bacteriológico en Histopatología	Baciloscopias Mucosa	IB e lóbulo	IM lesión	ganglio
1.-	DxLLN	Numerosos bacilos en globias IB 6+	3+	2+	2+	no se hizo
2.-	DxLLN	Numerosos bacilos IB 6+		2+ 0 2 2-2		4+
3.-	DxLLN					
4.-	DxDimorfo	negativo	negativos			
5.-	DxLLN	IB 6+	2+			
6.-	DxLLN	23 por campo IB 4+ frag. y azurofilos	2+			
7.-	DxLLN	48x campo, granuloso azurófilos IB 4+	neg.	2+		5+
8.-	DxLLN	215x campo IB 5+ aislados y en globias	escasos	neg.		
9.-	DxLLN	35x campo IB4+ Escasos bacilos				

Paciente	Dx	I Bacteriológico en Histopatología	Baciloscopias Mucosa	IB lóbulo	e	IM lesión	ganglio
10.-	DxLLD	Mal procesada	3+				3+
11.-	DxLLN						
12.-	DxLLN	No reportada	3+	3+		3+	
13.-	DxLLD	Mal procesada	3+				3+
			0 2 2-2				0 2 2-2
14.-	DxLLN	80x campo IB 4+ aislados y en globias	3+	2+			
15.-	DxLLD	3x campo IB 1+ Escasos y fragmentados	3+	1+			
16.-	Dx	Negativo	neg.				
17.-	DxLLN	Incontables IB 6+ en globias		2+		3+	
18.-	DxLLN	Incontables IB 6+ Integros y en globias	3+	1+			3+
			1 2 0-7	0 2 2-2			2 1 0-9

Paciente	Dx	I Bacteriológico en Histopatología	Baciloscopias Mucosa	IB e Lóbulo	IM Lesión	Ganglio
19.-	DxLLN	Incontables IB 6+ aislados y en globias	3+	1+		
20.-	DxLLN	Incontables IB 6+ en globias	3+ 0 2 2-2	2+ 2 2 0-8	2+ 0 2 2-2	2+ 2 2 0-8

FOTO 5



Se observan los bacilos teñidos con el FDA/EB. Se observa un bacilo rojo, un verde y varios duales.

FOTO 6

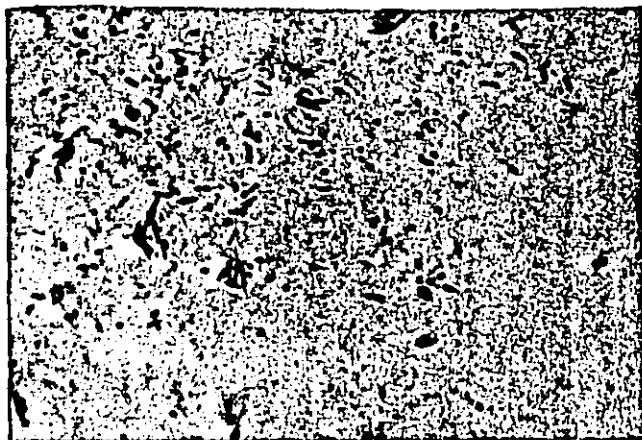


Obsérvese los bacilos por el método FDA/EB - verdes y
duales. (acercamiento)



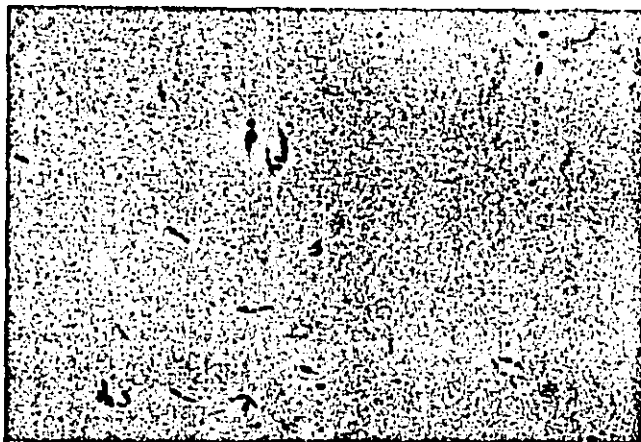
Panorámica de un campo con tinción FDA/EB. Obsérvense las características de tinción de los bacilos.

FOTO 9



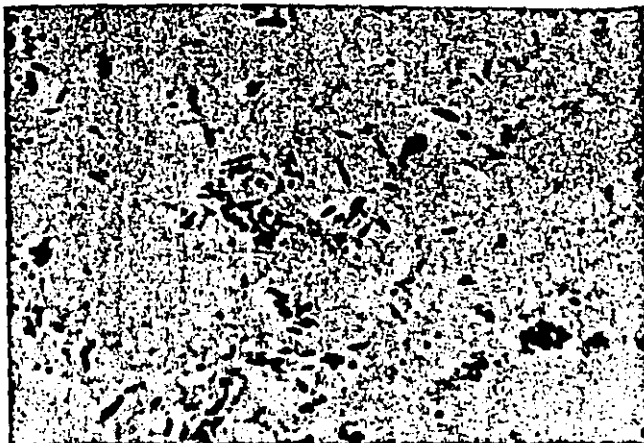
Obsérvese el concentrado de bacilos teñido con Zhiel Neelsen. Algunos fragmentados, granulosos y sólidos.

FOTO 10



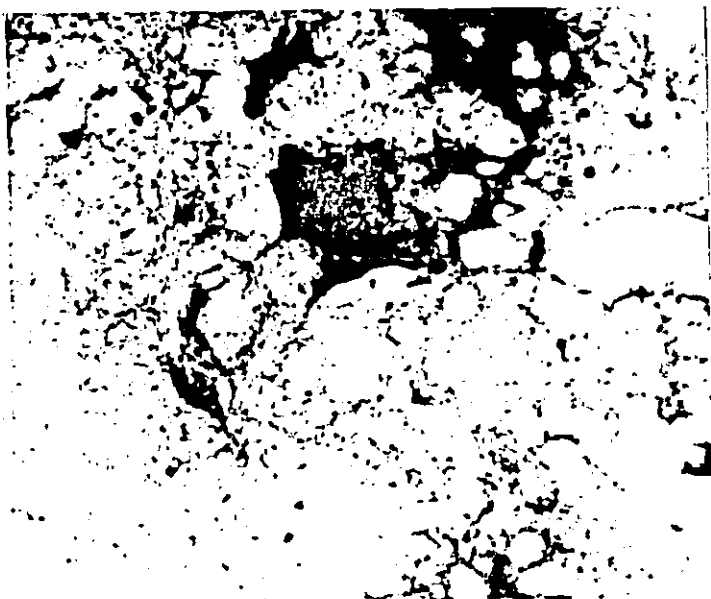
Frotis de shiel Neelsen del concentrado de bacilos, obsérvense el campo donde pueden contarse para el Índice Morfológico.

FOTO 11



Frotis de Zhiel Neelsen del concentrado obtenido del machacado, obsérvense los bacilos sólidos, granulados y fragmentados, algunos se agrupan.

FOTO 8



Muestra de un conglomerado de bacilos. Este es un mal frotis ya que es imposible contarlos. En este caso hay que repetir el frotis.

DISCUSSION

DISCUSION

Los resultados de los 26 pacientes incluidos en este estudio fueron los siguientes:

A todos los pacientes se les realizó biopsia de piel de tejido infectado; esta biopsia fue dividida en dos porciones: la primera de ellas se congeló en nitrógeno líquido para el estudio de FDA/EB; la segunda porción se envió para estudio histopatológico y tinción con Fite Faraco. Los pacientes - fueron estudiados en forma integral, realizándoseles historia clínica completa, toma de baciloscopías de mucosa nasal, lóbulo de la oreja y algunos de ellos punción ganglionar. De acuerdo a los cuatro parámetros, se hicieron los diagnósticos de Lepra lepromatosa nodular en 15 pacientes, 9 pacientes con Lepra lepromatosa difusa y un paciente caso dimorfo.

Los primeros 20 pacientes vírgenes a tratamiento alguno y los últimos 6 pacientes recibían politerapia que consistía en: 1200 mg. de rifampicina una vez al mes y DDS 100 mg. cada 24 horas. Estos 6 pacientes iniciaron su tratamiento tomando diariamente 300 mg. de rifampicina durante 6 meses, - aquellos pacientes que presentaron en el curso reacción leprosa, fueron manejados con clofazimina.

Los pasos a seguir para la realización del estudio, fueron - de la siguiente manera:

- 1.- Se descongeló la fracción del tejido infectado y se machacó en un mortero en solución de Hanks, sin rojo fenol.
- 2.- Posteriormente el concentrado obtenido del machacado - se resuspendió a partes iguales con éter de petróleo, quedando de esta forma los bacilos suspendidos en la -

superficie libre de residuos tisulares, ya que éstos caen al fondo.

- 3.- Se tomaron dos pequeñas cantidades del concentrado: la primera fue colocada en un portaobjetos a la que se le añadió una porción igual de FDA/EB, posteriormente se cubrió con un cubreobjetos y se selló con barniz, se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz antes de observarse en el epifluoroscopio. La segunda porción del concentrado, se colocó en un portaobjetos para hacer un frotis en el cual se tiñó con Shiel Neelsen para la lectura de IB e IM.
- 4.- La otra parte de la biopsia se envió a estudio histopatológico con tinción para bacilos y lectura de IB.
- 5.- Se realizó además IB e IM en algunos pacientes de las baciloscopías de punción ganglionar, lóbulos de la oreja y mucosa nasal.

Los resultados obtenidos se describirán con detalle a continuación. (ver tablas).

Los resultados de 13 de los 26 pacientes (3, 5, 10, 11, 12, 7, 13, 17, 18, 19, 20) (Ver tabla), en la lectura del FDA/EB fueron de un 80 a 100% de bacilos verdes que son los viables. De estos mismos 12 pacientes, el inóculo del concentrado de bacilos teñidos con Shiel Neelsen se obtuvo un Índice Morfológico con estos resultados: 8 pacientes tenían un 60 a 90% eran bacilos fragmentados y en los 4 restantes, era de 30 a 50% fragmentados.

El Índice Morfológico, según Joplin, fue el siguiente: 8 a 2 pacientes, este número correspondería un 50 a 70% de -

bacilos sólidos. El índice de 6 a un paciente, que sería de 20 a 50% de sólidos con el número 5 en los pacientes que sería un 20% de sólidos. Cinco pacientes con el número 2 y dos con el número 1 y a éstos correspondería menos del 1% de sólidos. Todos estos resultados no concuerdan con el FDA/EB ya que 12 pacientes tenían un 80 a 100% de verdes, o sea, - viables y el índice morfológico reporta que 7 de estos pacientes tienen menos del 1% de sólidos y sólo 2 pacientes tienen un 50 a 75% de sólidos.

El IB del concentrado teñido con Shiel Neelsen, fué muy variable de una a 6 cruces. En cambio el IB del estudio histopatológico teñido con Fite Faraco fue de 6 cruces con bacilos en globias y aislados en 7 pacientes, los 5 restantes no se reportó la biopsia por múltiples causas.

La lectura del Índice Morfológico en estos 12 pacientes de la mucosa nasal y lóbulos de la oreja y punci6n. En 5 pacientes sí corresponde con el IM del concentrado. En los 7 pacientes restantes, no hay reporte. El I. Bacteriol6gico de baciloscopías de mucosa nasal y l6bulo de la oreja, es de 2 a 3 cruces.

El paciente número 14, por el método FDA/EB, un 99% fueron rojos que son bacilos no viables y el Índice Morfol6gico del concentrado reporta un 70% de sólidos y 30 de fragmentados con un index de 8, o sea, un 50 a 75% de sólidos. El IB de concentrado fue de 3 cruces. El IB del reporte histol6gico es de 4 cruces. Estos resultados no concuerdan con el FDA/EB.

El paciente 16 el FDA/EB reporta que el 100% fueron -

duales y el IM del mismo concentrado reporta un 70% de fragmentados y 30% de granulosos con un Index de 2, o sea, menos del 1% de sólidos. IB con una cruz en mucosa negativo. Este paciente sí concuerda con el FDA/EB.

En el paciente número 9 con el FDA/EB, fue un 60% fueron rojos y 39% duales y el IM reporta 70% fragmentados y 30% granulosos con un IB del concentrado de una cruz. En cambio, en la biopsia en Fite Faraco IB 4 cruces. Este paciente también corresponde con el FDA/EB.

El paciente número 8 el FDA/EB 15% de rojos y 34% de duales y el IM del mismo concentrado es de 50% fragmentados y - 50% de granulosos. Este paciente también corresponde y concuerdan los resultados con nuestro método.

El paciente número 6 el resultado FDA/EB 1% duales, 1% rojos y el IM reporta 1% de sólidos y 0% de granulosos y fragmentados.

En el reporte histopatología, 4 cruces y en mucosa nasal 2 cruces este no corresponde ni concuerda con nuestro método.

Los últimos 6 pacientes, los cuales recibían tratamiento el FDA/EB no fue significativo en 2 pacientes, sólo se pudieron contar 3 verdes en 20 campos y el IM fue negativo. Los cuatro restantes el FDA/EB, fue negativo.

CONCLUSION

CONCLUSIONES

En primer lugar se hizo una revisión de las características del *M. leprae*, así como los intentos de cultivo y la inoculación a diferentes animales. También se mencionan los diferentes tipos de tinción y se hace una revisión sobre las perspectivas en la inmunología de la lepra mencionando y haciendo hincapié en el antígeno glicolípidico fenólico que es específico del *M. leprae* y su aplicación potencial para determinar la patogénesis de la lepra.

En lo referente al propósito de la realización de este estudio que fue la aplicación del método FDA/EB en el Centro Dermatológico Pascua en pacientes vírgenes a tratamiento y en paciente bajo tratamiento en forma regular, se pudo palpar sin lugar a dudas que los pacientes que no tomaban tratamiento con el método FDA/EB, los resultados fueron los siguientes: en 13 pacientes se observaron de un 80% a 100% de bacilos color verde que son los viables; en dos pacientes se observaron bacilos rojos en un porcentaje importante y el resto de los pacientes el porcentaje de bacilos rojos fue mínimo. Un paciente presentó 100% de bacilos duales.

En los 6 pacientes que recibían tratamiento por el método FDA/EB, se observaron escasos bacilos en dos pacientes y en los otros cuatro no hubo bacilos. En estos 6 pacientes el Índice Morfológico del concentrado fue negativo y en la histopatología con Tinción de Fite Faraco, tampoco se encontraron bacilos.

Con lo mencionado anteriormente, podemos ver la diferencia de los hallazgos entre los pacientes no tratados y

los pacientes con tratamiento. Sin embargo, sería de vital importancia tomar biopsias de control al año de tratamiento a los pacientes vírgenes de tratamiento incluidos en el presente estudio para de esta forma valorar los cambios que ocurrieran en la lectura del FDA/EB; por lo tanto, se considera este trabajo como estudio preliminar que podía continuarse posteriormente con los mismos pacientes y llegar a una conclusión definitiva.

Ahora bien, en lo que respecta a la elaboración de la técnica, pudimos deducir que no plantea problema alguno, ya que es sencilla de realizar y siempre con resultados positivos; incluso el machacado obtenido de la pieza infectada con servado en el refrigerador durante 3 a 4 días y preparado nuevamente con el FDA/EB y vistos en el microscopio de epifluorescencia hay presencia de bacilos aunque no en los mismos porcentajes vistos en el concentrado recientemente machacado, por lo tanto, los resultados no son constantes.

Otro problema observado en el transcurso del estudio, es el siguiente: Una vez hecho el machacado y resuspendido con éter de petróleo, los resultados obtenidos son muy diferentes según el nivel de donde sea tomada la muestra, por ejemplo: si es tomada de la superficie, o bien, de la parte media o de la unión con los restos celulares. Esto es muy variable por lo que nuestra técnica podía plantear problemas dependiendo del sitio de donde se tome el inóculo para la preparación con FDA/EB.

Es importante mencionar también que en varias ocasiones se repitió el machacado de una porción del mismo tenido infectado colocado en el nitrógeno líquido y al realizarse la técnica los resultados no fueron constantes al reproducir la prueba.

El propósito de este estudio fue comparar el método -- FDA/EB con el Índice Morfológico y el Bacteriológico como se pudo observar en las tablas de resultados esto no corresponde.

Por ejemplo, se supone que el I. Morfológico nos reporta el porcentaje de bacilos sólidos, fragmentados y granulosos. Los primeros son los que se supone están vivos, sin embargo, en los 13 pacientes en los cuales el FDA/EB reportó un 80 a 100% de bacilos verdes, o sea, los que están viables, el Índice Morfológico del mismo machacado nos reporta un porcentaje mayor de 70, pero de bacilos fragmentados y granulosos. - Si esto concordara con el FDA/EB, deberían predominar los bacilos sólidos y bien teñidos pero sucede lo contrario.

Ahora bien, en un paciente donde por el FDA/EB predominan los bacilos rojos en un 99% por el Índice Morfológico, reporta un 70% de sólidos.

Sin embargo, hay que mencionar que en tres pacientes po día decirse que sí se relaciona; en uno de ellos que presenta ba el 100% de bacilos duales y el Índice Morfológico reporta un 70% de fragmentados. En otro paciente que presentó un 60% de rojos y 39 de bacilos duales con el método FDA/EB y el Índice Morfológico del concentrado en la tinción de Shiel Neelsen mostró un 70% de fragmentados, lo mismo ocurrió con el - tercer paciente.

En resumen, tenemos 13 pacientes en donde los resultados se contraponen y únicamente en tres sí concuerdan el FDA/EB con el I. Morfológico.

De los siguientes se pueden deducir dos cosas: la primera de ellas es que el método FDA/EB no es práctico, ya que es más sencillo realizar tomas de baciloscopías de mucosa nasal, de lóbulos de la oreja y punción ganglionar para la evaluación del Índice Morfológico, ya que aunque haya estudios previos de que el FDA/EB mide la viabilidad por los resultados obtenidos del presente estudio se contraponen completamente con los resultados del Índice Morfológico. Esto se puede descartar haciendo un estudio posterior comparando el FDA/EB con otra prueba que es la de Adenosin Trifosfato que también mide viabilidad del *M. leprae*, o bien, por medio de inoculaciones a la almohadilla plantar del ratón, para de esta manera corroborar si realmente están vivos los bacilos.

La segunda cuestión sería que el I. Morfológico no mide en realidad la viabilidad como se piensa y esto pondría en duda conceptos previos. Como se ve, esto quedaría en tela de juicio ya que por medio de otros métodos que determinan la viabilidad, sin lugar a dudas, la más confiable y segura es la inoculación a la almohadilla plantar. La prueba de -- ATP sí ha sido confirmada inoculando al ratón aunque tampoco hay relación entre esta prueba y el Índice Morfológico como sucede con el FDA/EB. La prueba de incorporación de la 3H Timidina, tampoco se correlaciona con el Índice Morfológico.

Tampoco existe una buena correlación entre la ultraestructura de los bacilos viables, vistos en el microscopio electrónico. El Índice Morfológico en microscopio de luz (Z.N.) y la inoculación en la almohadilla plantar del ratón. El porcentaje elevado del IM puede explicarse por formas sólidas bien teñidas de bacilos muertos. También el porcentaje elevado de formas viables en ME puede significar una ultraestructura normal no característica de las formas vivas.

En resumen, el método FDA/EB debe compararse con otros métodos que prueben la viabilidad. No debe tomarse como un método definitivo para medir viabilidad.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arenas, R.M.P.: M. Leprae en conjuntiva.: Tesis de postgrado. Centro Dermatológico Pascua. 1978.
- 2.- Asselineau, V.: Clavel. S.: Cle: y otros: Constituyentes lipídicos del M. leprae aislados de armadillos infectados experimentalmente. Ann. Microbiol, 132 A/1 (19-30), 1981.
- 3.- Bridi, T.J.; Mistry, N.F.; et al.: Alterations in the membrane of macrophages from leprosy patients. Infect. Immun. 41/1 (121-127) 1983.
- 4.- Brett, S.J.: Analysis of the major antigenic determinants of the characteristic phenolic glycolipid from M. leprae. Clin. Exp. Immunol, 56 (89-96), 1984.
- 5.- Brett, S.J.; Draper, P.; et al.: Serological activity of a characteristic phenolic glycolipid from M. leprae in sera from patients with leprosy. Clin. Exp. Immunol. 52-2 (271-279), 1983.
- 6.- Carrillo, M.: Lepra Experimental. El armadillo. Fontilles. 14/4 (343-344), 1984.
- 7.- Castells, R.: Estado actual de la inmunología de la lepra. Fontilles, 13/3, (281-291), 1981.
- 8.- Cervera, C.; Método FDA/EB para medir la viabilidad del M. leprae. Tesis de postgrado. Centro Dermatológico Pascua. 1984.
- 9.- Colston, M.J., e Hilson, G.R.F.: The effect of freezing and storage in liquid nitrogen on the viability and growth of M. leprae. J.Med. Microbiol., 12/1 (137-142), 1979.
- 10.- Collins, F.M.; Morrison, N.E.; Dople, A.M.: Microscopic counts carried out on M. leprae and M. tuberculosis suspensions. Int. J. Lepr., 48/4, (402-407), 1981.

- 11.- C. Charles.; Landingham, R.M.: Studies of vaccines against *M. leprae* Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia.
- 12.- Dang Duc, T.; Pham, M.H. et al.: Rosette-forming cells in patients with treated leprosy. *Int. J. Leprosy*. 51/2, (174-178), 1983.
- 13.- Dhople, A.M.: Taxonomic studies on *M. leprae*, *Lepr.* in India. 55/1. (39-44), 1983.
- 14.- Dhople, A.M.: Adenosine Triphosphate content of *M. leprae* from leprosy patients. *Int. J. of Leprosy*. 52/2 (183-187), 1984.
- 15.- Dhople, A.M.; Hanks, J.H.: Adenosine triphosphate content in *M. leprae*. A brief communication. *Int. J. of Leprosy*. 49/1 (57-59), 1981.
- 16.- Dhople, A.M.; Storrs, E.E.: Adenosine triphosphate content of *M. leprae*: Effect of purification procedures. *Int. J. of Leprosy*. 50/1 (83089), 1982.
- 17.- Dhople, A.M.: Effect of lysozyme in *M. leprae*. *Leprosy in India*. 55/3 (455-462), 1983.
- 18.- Dhople, A.M.: Taxonomic studies on *M. leprae*. *Leprosy in India*. 55/1 (39-44), 1983.
- 19.- D.B.Young.; Melinda,: A spot test for detection of antibodies to phenolic glycolipid I. *Lepr. Rev.* 56 (193-198), 1985.
- 20.- Draper, P.: Bacteriology of *M. leprae*: State of the art pape. *Ann. Microbiol.* 133 B/1 (13-14), 1982.
- 21.- Draper, P.: The leprosy glycolipid. *Indian J. of Lepr.* 56-2 (433), 1984.
- 22.- Duzgun, N.; Tokgoz, G.; et al.: Humoral immunity in leprosy. *Excerpt. Med. Lepro.* 5-5 (124), 1983.
- 23.- Duzgun, N.; Tokgos, G.; et al.: Cell mediated immunity in leprosy. *Excerpt. Med. Lepro.* 5/5 (125), 1983.

- 24.- Echainz, T.B.R.: Método de tinción fite faraco modificado para *M. leprae*. Tesis de postgrado. Centro Dermatológico Pascua, 1979.
- 25.- Editorial. XII International Leprosy Congress.: *Indian J. of Lepr.* 56/2 (166-176), 1984.
- 26.- Eun, H.C.; W.S.; Kim, D.I.: A Study on peripheral blood T and B lymphocytes in leprosy. *Excerpt. Med. Lepro.* 4/4 (96), 1982.
- 27.- Gatti, J.C.; Balifa, L.M. y cols.: Estado actual de los cultivos e inoculación del bacilo de Hansen. *Arch. Argent. dermat.*, 28/1 (1-16), 1978.
- 28.- Gary, B.: Experimental leprosy in the magnabey necropsy findings. *Int. J. of Leprosy.* 53/2 (269-277), 1985.
- 29.- Goiriena, de G.,; F.J. y Barranquero.: IgE, IgG, IgA y complemento en enfermos leprosos y población normal. *Gaceta Med. Bilbao.* 78/6. (379-392), 1981.
- 30.- Hastings, R.C.: A vaccine in Hansen's disease. *Staar.* 40/1 (4-5), 1980.
- 31.- Harshadrai, J.; Jariwala y Subhash S. Kelkar.: Fluorescence microcopy for detection of *M. leprae* in tissue sections. *Int. J. of Lepr.* 47/1. (33-36), 1979.
- 32.- Hirata, T.: Electron microscopic observations of intracytoplasmic inclusions in human and murine leprosy bacilli. *Int. J. Lepr.* 51/1 (84-88), 1983.
- 33.- Hunter, S. W.; Brennan, P.J.: A novel phenolic glycolipid from *M. leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J. Bacteriol.* 147/3 (728-735), 1981.
- 34.- Hunter, S. W.; Fujiwara, T. y Brennan, P.J.: Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *M. leprae*. *J. Biol Chem.* 257/24 (15072-15078), 1982.
- 35.- Iordanou, P.; Patramani, I.; y cols.: Detectacion of anti-*M. leprae* antibodies. *Acta Microbiol.* 25/1 (43-47), 1980.

- 36.- James, T. D.; Development of an ELISA for detection of antibody in leprosy. Int. J. of Leprosy. 52/1 (19-25), 1984.
- 37.- Ji, Baohong Tang Quakui; The sensitivity and specificity of fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *M. leprae*. Lepr. Rev. 55 (327-335), 1984.
- 38.- J. Terencio de las Aguas.; Consideraciones actuales sobre la bacteriología de la lepra. Fontilles. 14/6 (603-606), 1984.
- 39.- Jopling, W.H.; Handbook of leprosy third edition. pag. 8-13 1984.
- 40.- Katoch, V.M. y Desikan, K.V.; Observations on the cultivation of *M. leprae* in medium "V" (Veeraraghavan). Lepro. in India. 54/2 (292-298), 1983.
- 41.- Kato, L.; In vitro cultivation of *Mycobacterium X* from *M. leprae* infected tissue in acetone-dinethylsulfoxide-tetradecane medium. Int. J. of Lepr. 51/1 (77-83), 1983.
- 42.- Kaur, S.; Kumar, B. et al.; Viability of *M. leprae* under normal and adverse atmospheric conditions. Lepro. in India. 54/2 (228-233), 1982.
- 43.- Khanolkar, S.R. and Wheeler, P.R. Purine metabolism in *M. leprae* grown in armadillo liver. Excerpt. Med. Sec. 51/6 (112), 1984.
- 44.- Kim, S.J.; Ishaque, M. and Kato, L.; *Mycobacterium leprae* and phenoloxidase activity. Microbios 22/89-90. (142-143), 1978.
- 45.- Kirchheimer, W.F.; Experimental transmissional H.D. Word Wide. Star 37/3, 1978.
- 46.- Kirchheimer, W.F.; Stores, E.E.; Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novencintus* Linn) as a model for the study of leprosy. Inf. J. of Lepr.. 39/3 (693), 1971.

- 36.- James, T. D.; Development of an ELISA for detection of antibody in leprosy. *Int. J. of Leprosy*. 52/1 (19-25), 1984.
- 37.- Ji, Baohong Tang Quakui; The sensitivity and specificity of fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *M. leprae*. *Lepr. Rev.* 55 (327-335), 1984.
- 38.- J. Terencio de las Aguas.; Consideraciones actuales sobre la bacteriología de la lepra. *Fontilles*. 14/6 (603-606), 1984.
- 39.- Jopling, W.H.; Handbook of leprosy third edition. pag. 8-13 1984.
- 40.- Katoch, V.M. y Desikan, K.V.; Observations on the cultivation of *M. leprae* in medium "V" (Veeraraghavan). *Lepro. in India*. 54/2 (292-298), 1983.
- 41.- Kato, L.; In vitro cultivation of *Mycobacterium X* from *M. leprae* infected tissue in acetone-dinethylsulfoxide-tetradecane medium. *Int. J. of Lepr.* 51/1 (77-83), 1983.
- 42.- Kaur, S.; Kumar, B. et al.; Viability of *M. leprae* under normal and adverse atmospheric conditions. *Lepro. in India*. 54/2 (228-233), 1982.
- 43.- Khanolkar, S.R. and Wheeler, P.R. Purine metabolism in *M. leprae* grown in armadillo liver. *Excerpt. Med. Sec.* 51/6 (112), 1984.
- 44.- Kim, S.J.; Ishaque, M. and Kato, L.; *Mycobacterium leprae* and phenoloxidase activity. *Microbios* 22/89-90. (142-143), 1978.
- 45.- Kirchheimer, W.F.; Experimental transmissional H.D. *Word Wide. Star* 37/3, 1978.
- 46.- Kirchheimer, W.F.; Stores, E.E.; Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novencintus* Linn) as a model for the study of leprosy. *Inf. J. of Lepr.* 39/3 (693), 1971.

- 47.- Kirchheimer, W.F.: Quantitative aspects of experimental infection of armadillos with *M. leprae*. Excerpt. Med. Lepro. 3/4 (110), 1981.
- 48.- Kusaka, T. and Izumi, S.: Gas chromatography of constitutive fatty acids in *M. leprae*. Microbiol. Immunol. 27/5 (409-414), 1983.
- 49.- Kvach, J.T.; Verás, J.R.: A fluorescent staining procedure for determining the viability of mycobacterial cells. Int. J. of Lepro. 50/2 (183-191), 1982.
- 50.- Kvach, J.T.; Mungia G. and Strand, S.H.: Staining tissue-derived *Mycobacterium leprae* with fluorescein diacetate and ethidium bromide. Inf. J. of Lepro. 52/2 (176-182), 1984.
- 51.- K. Venkatesan, V.P.: Analysis of mycobacterial lipids in skin tissue of leprosy patients. Indian J. of Lepro. 56/2 (438), 1984.
- 52.- K. V. Desikan.: Evaluation of culture of *M. leprae*. Lepr. in India. 55/2 (188-191), 1983.
- 53.- Lad, S.J. and Mahadevan, P.R.: Adherence of *M. leprae* to macrophage as an indicator of pathogen induced membrane changes. Excerpt. Med. Sect. 51/6 (22), 1984.
- 54.- Lancaster, R.D.; Hilson, G.R.F. et al.: *M. leprae* infection in nude mice: Bacteriological and histological responses to primary infection and large inocula. Infect. Immun. 39/2 (875-872), 1983.
- 55.- Manual de normas, métodos, técnicas y procedimientos para el control de la enfermedad de Hansen. 1984. Quito, Ecuador.
- 56.- Matsuo, T. and Tatsukawa, H.: Attempts at cultivation of *M. leprae* in cell culture under regulation of redox potential at environment. Excerpt. Med. Lepro. 5/7 (170), 1983.

- 57.- Masahide Abe, Fumishige Minigawa, et al.: Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS). Test for detecting subclinical infection with *M. leprae*. *Int. J. Lepr.* 48/2 (109-119), 1980.
- 58.- Mehra, V.; Convit, J. et al.: Activated suppressor T cells in leprosy. *J. Immunol.* 129/5 (1946-1951), 1982.
- 59.- Melsom, R.; Duncan, M.E.: A clinical and immunological study of four babies of mother with lepromatous leprosy, two of whom developed leprosy in infancy. *Int. J. of Lepr.* 51/1 (7-17), 1983.
- 60.- Melsom, R.; Duncan, M.E. et al.: Antibodies against *M. Leprae* antigen 7 from birth to 18 months of age: An indicator of intrauterine infection in leprosy. *Clin. Exp. Immunol.* 42/1 (107-113), 1980.
- 61.- Mtsial, M.; Parisis, N.: Prueba FLA-ABS en la exploración para detectar casos precoces. *Fontilles* 12/2 (226), 1979.
- 62.- Murohashi, T.; Yoshida, K.: Intento para cultivar el *M. leprae* en un medio líquido. *Act. Leprol.* 58/ (5-21), 1975.
- 63.- Pattyn, S.R.: Culture of *M. leprae*. *Quad Coop Sanit.* num. 1 (27-28), 1982.
- 64.- Pattyn, S.R.: Bacteriology of *M. leprae*. *Lepr. Rev.* June (17-22), 1983.
- 65.- Paul, R. Wheller and Philip Draper.: Soluble blue as a counterstain in the Ziehl-Neelsen procedure. *Int. J. of Lepr.* 48/1 (15-17), 1980.
- 66.- Palomares, C. Ma. P.: *Mycobacterium Leprae* tinción de lípidos por Sudan III. tesis de postgrado Centro Dermatológico Pascua. 1981.
- 67.- Prabhakaran, K.: Un estudio de intento de cultivo del *M. Leprae* in vitro y la transmisión de la lepra a los animales. *Leprosy in India.* 47 (325-336), 1975.

- 68.- Prabhakaran, K.; Harris E.B.: Glutamic acid decarboxylase in *M. leprae*. Arch. Microbiol. 134/4 (320-323), 1983.
- 69.- Prabhakaran, K.; Harris, E.B.: Effect of fusaric acid on odiphenoxidase and on multiplication of *M. leprae* Microbiol. Lett. 22/86. (81-84), 1983.
- 70.- Prabhakaran, K; Hari, L. Herbert, D.: Observations on the culture of *M. leprae* in medium V. Leprosy in India. 55/3 (450-454), 1983.
- 71.- Ridley, M. and Ridley, S.D.: Stain techniques and the morphology of *M. leprae*. Lepr. Rev. 42 (88-95), 1971.
- 72.- Ridell, M.: Comparative ultrastructure of *M. leprae* and *M. avium* grown in experimental host. Ann Microbiol. 133B/1 (109-128), 1982.
- 73.- Rodríguez, O.: La lepra y los niños. Tesis de postgrado del Centro Dermatológico Pascua, 1949.
- 74.- Saha, K; Chakraborty, A.K.: A quick method of demonstrating bacillemia in patients with lepromatous leprosy and ultrastructural studies of the circulating acid-fast bacilli. Excerpt. Med. Sec. 51/6 (113), 1983.
- 75.- Salgame, P.R. and Antia, N.H.: Mechanis of immunosuppression in leprosy : Presence of suppresor factor from macrophages of lepromatous patients. Infect. Immun. 40/4 (119-126), 1983.
- 76.- Senarath, D. Douglas, B.: Evaluation of the significance of antibodies to phenolic glycolipid of *M. leprae* in leprosy patients and their contact.
- 77.- Silva, M.T. Macedo, P.M.: Electron microscopic study of *M. leprae* membrane. Int. J. of Lepr. 51/2 (2190224), 1983.
- 78.- Siqueira, L.F.; Almeida, R.G.: Modificación de coloración de fondo de la técnica de Ziehl-Neelsen en la identificación del *M. leprae*. Hansen Int. 7/2 (88), 1982.

- 79.- Songnain, Wu Quinxue.: In vitro cultivation of *M. leprae* Excerpt. Med. Lepro. 4/10 (230), 1982.
- 80.- Tore, G.: XII Congreso Internacional de la Lepra-Nueva Delhi, India. Perspectivas en Inmunología de la lepra, Fontilles. 14/6 (639-643), 1984.
- 81.- Torres, M.P.: Perspectivas en la Inmunología de la lepra. Fontilles. 14/5 (497-499), 1984.
- 82.- Touw, J.; Stoner, G.L.: Effect of *M. leprae* on lymphocyte proliferation suppression of mitogen and antigen responses of human peripheral blood mononuclear cells. Clinical and Exper. Immunol. 41/4 (397-405), 1981.
- 83.- Tropical Disease Research: 1983-1984.
- 84.- Van Eden, W.; De Vries, R.R.: HLA segregation of tuberculoïd leprosy: Confirmation of the DR2 marker. Excerpt. Med. Lepro. 3/4 (113), 1981.
- 85.- Wayne, et al.: Leprosy in a mangabey monkey-naturally acquired infection. Int. J. of Lepr. 53/1 (1-13), 1985.
- 86.- Welch, T.M.; Gelber, R.H. et al.: Viability of *M. leprae* after multiplication in mice. Infect. Immun. 30/2. (325-328), 1980.
- 87.- Wheeler, P.R.: Superoxide Dimutase, peroxidatic activity and Catalase in *M. leprae*. J. Gen Microbiol 121/2 (457-464), 1980.
- 88.- Young, D.B.: Identification of *M. leprae*; use of wall-bound mycolic acids. J. of Microbiology. 121/1 (249-253), 1981.
- 89.- Young, D.B.: Identificación de *M. leprae*: Use of wall bound mycolic acids. Excerpt. Med. Lepro. 3/7 (166), 1981.
- 90.- Young, D.B.; Khanolkar, S.R.: Generation and characterization of monoclonal antibodies to phenolic glycolipid of *M. leprae*. Infect. Immun. 43/1 (183-188), 1984.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 91.- Yukiko Fukunushi: Electron microscopic findings of transverse fision of *M. leprae* by freeze-etching methods Int. J. of Lepr. 53/2 (247-250), 1985.
- 92.- Ylnch, N.R.; López, R.I. et al: IgE in Leprosy: Efect of a *M. leprae* - BCG vaccine - Int. J. Lepr. 51/2 (169-173), 1983.

LISTA DE PACIENTES

- 1.- EXP. M3106-69 MRJC (Dr. Castro)
- 2.- EXP. F2683-86 MGVB (Dr. Flores)
- 3.- EXP. S/n. GG.
- 4.- EXP. M4050-85 RBT (Dra. Arenas)
- 5.- EXP. M4064-85 AMF (Dr. Castro)
- 6.- EXP. M4074-85 Ade la PR (Dr, Ortiz)
- 7.- EXP. M4073-85 BCS (Dr. Arenas)
- 8.- EXP. F2674-85 MRM (Dr. Castro)
- 9.- EXP. M4075-85 RRS (Dra. Ibarra)
- 10.- EXP. M4062-85 CMP (Dra. Zambrano)
- 11.- EXP. S/n. Gde la V.
- 12.- EXP. M4071-85 AGH (Dr. Malacara)
- 13.- EXP. F2672-85 SJT (Dr. Ruiz)
- 14.- EXP. M4060/85 JMR (Dra. Ibarra)
- 15.- EXP. M4052-85 APA (Dra. Ortiz)
- 16.- EXP. F2245-85 RHC (Dr. Castro)
- 17.- EXP. M1902-56 ARA (Dr. Castro)
- 18.- EXP. M4077-85 NMA (Dra. Pérez)
- 19.- EXP. F2679-85 TRG (Dra. Zambrano)
- 20.- EXP. M4082-85 ICS (Dr. Arenas)
- 21.- S/n. No.19, SIN.
- 22.- S/n. No.12, SIN.
- 23.- S/n. No.10, SIN.
- 24.- S/n. No.11, SIN.
- 25.- S/n. No.8, SIN.
- 26.- S/n. No.9, SIN.