

**Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales. Secretaría de Investigación y Postgrado.
Maestría en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles**

Maestranda
Sandra Roginski

Lepra en la Zona Norte de la provincia de Misiones. Estudio de casos y convivientes

**Tesis de Maestría presentada para obtener el título de “Magíster
en Salud Pública y Enfermedades Transmisibles”**

“Este documento es resultado del financiamiento otorgado por el Estado Nacional, por lo tanto,
queda sujeto al cumplimiento de la Ley N°26.899”.

Directoras
Dra. Sandra Grenón
Dra. Lucrecia Acosta Soto

Posadas, Misiones 2017



Esta obra está licenciado bajo Licencia Creative Commons (CC) Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS QUÍMICAS Y NATURALES

MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA Y ENFERMEDADES
TRANSMISIBLES

Lepra en la Zona Norte de la provincia de Misiones.
Estudio de casos y convivientes.

TESIS DE MAESTRÍA
SANDRA ROGINSKI

Directoras:

Dra. Sandra Grenón

Dra. Lucrecia Acosta Soto

Posadas, 2017

A Juliana y Ricardo, a mi madre y hermano.

EVALUADORES:

- Diego Torrús
- Martha Von Spech
- Gustavo Silva

AGRADECIMIENTOS

Muchos, muchos. Agradezco a las directoras: Dra. Sandra Grenón y Dra. Lucrecia Acosta. Sandra: amiga, compañera que después de 30 y algunos poquititos años más aún me tengas tanta paciencia y seas tan generosa conmigo... ¡¡¡Muchas Gracias!!! A mi nueva amiga Lucre: no son 30, pero más de 10 seguro. Gratitud infinita a vos (¡¡¡a ti!!!), atravesaste el Atlántico tantas veces, caminamos juntas las casas de los pacientes, sacaste las fotos, manejaste el auto, tomaste las muestras, las procesaste, me enseñaste, corregiste y muchas cosas más. ¡¡¡Muchas Gracias!!! A la Lic. Gladys Fattore: querida Gladys como si te conociera de siempre, compañera de ruta, gracias por estar siempre y trabajar a la par. A la Dra. Mirta Ames, por revisar a cada uno de los pacientes en sus casas y compartir el trabajo todos los días. A mi amigo del otro lado del Atlántico, Dr. Fernando Bornay que me recibió en su tierra, porque con él conocí Fontilles. Mi agradecimiento a la Universidad Miguel Hernández de España. A la Dra. Rosa del Carmen Piragine Niveyro, nuestra querida Ketty, que fuimos juntas esa vez y otra más y me entusiasmó para trabajar con la lepra. Al Dr. Pedro Torres que trabajó con las muestras y a Dr. Jose Ramón Gomez, que también se vino hasta Eldorado a revisar pacientes y compartir su experiencia. A todo el personal del Sanatorio Fontilles de Alicante España. A mi amiga y compañera Hilda Rios que atiende a los pacientes y sus familias y lleva los registros. A mis compañeros del Laboratorio del hospital. A la Bioq. Marisa Nuñez Díaz. A los técnicos de bacterio: Gladys Fernandez y Ruben Portillo. A mi colega Gustavo Silva que un enero caluroso me mando el dictamen del Comité de Etica. A nuestra querida Facultad de Cs. Exactas Qcas. y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Al Ministerio de Salud Pública de la Pcia. de Misiones, Hospital de Eldorado, Areas Programáticas de Eldorado, Montecarlo, Esperanza, San Pedro. A los PROMOTORES de salud, ¡¡¡sí, con mayúscula!!! Al Instituto Superior del Profesorado Antonio Ruiz de Montoya, mi otra casa, y especialmente a mi compañera y amiga Lic. Gladys Veron por su apoyo constante. A mi amiga y hermana de la vida Mirta Lia Hendrie que está SIEMPRE. A Priscilla Hendrie por su ayuda y compañía, a la Dra. Graciela Jorda, compañera y amiga, que también me aloja en su casa. A mi editora preferida, mi hija Juliana Galarza que me ayudó a escribir, y bueno Ruso, Dr. Jorge Deschutter, te dejé para el final. Cómo agradecerle Ruso por tantos años de amistad y proyectos. Gracias por creer en mí. Voy a tomar prestadas unas palabras que dicen algo así como:

“No creo que seamos parientes cercanos, pero si usted es capaz de temblar de indignación cada vez que se comete una injustia en el mundo, somos compañeros, que es más importante”.

Ernesto, Che, Guevara. Carta a María Rosario Guevara, febrero 1964.

RESUMEN

Misiones es una de las provincias con mayor notificación de casos nuevos de lepra en el país. Desde que se instauró el tratamiento en los ochenta, que se distribuye gratuitamente, uno de los desafíos para el control de la enfermedad es la detección temprana y el tratamiento lo más pronto posible para evitar la diseminación de la enfermedad y la aparición de discapacidades. El objetivo de este estudio fue describir el comportamiento epidemiológico de la lepra en pacientes atendidos en el Hospital SAMIC durante cinco años, estudiar a sus convivientes, buscar la enfermedad en ellos, y realizar pruebas diagnósticas. Se estudiaron a 37 pacientes y a sus familias (106 convivientes). La tasa de detección en el Hospital SAMIC de Eldorado fue de 4,3 casos nuevos /10⁵ habitantes por año. El 91,9% eran mayores de 35 años y el 76% tenía más de 45 años. El 54% fueron hombres y 91,9% presentaron lepra en su forma lepromatosa o multibacilar. En el 54,2% (13/24) de los pacientes diagnosticados con anterioridad al estudio y que recibieron tratamiento, se logró detectar la presencia del *M. leprae* por baciloscopia y/o PCR. Se diagnosticaron 4 casos de lepra en convivientes mayores de 35 años, todos provenían de familias con caso primario de lepra lepromatosa. El estudio de transmisión demostró que 67,8% de los pacientes y 14% de convivientes son portadores nasales del bacilo.

En conclusión: en el norte de Misiones la enfermedad, lejos de estar controlada, se detecta tarde, falla el tratamiento y existe transmisión entre los familiares.

ABSTRACT

Misiones is one of the provinces with more notification of new leprosy cases in the country. Since the treatment that was instated in the eighties, which is distributed for free, one of the challenges for the control of the disease is the early detection and the early treatment, to avoid the dissemination of the disease and the development of any disabilities. The objective of this study is to describe the epidemiological behavior of the leprosy in patients that were attended in the SAMIC Hospital for the period of five years, study their cohabitants and searching for the disease in them, and to perform diagnostic tests. 37 patients and their families (106 cohabitants) were studied. The rate of detection in the Samic Hospital was of 4,3 new cases /10⁵ cohabitants per year. The 91,9% were over 35 years old and the 76% were over 45 years old. The 54% were men and 91,9% presented leprosy in their lepromatous or multibacillary way. In the 54,2% (13/24) of the patients that had been diagnosed and treated before the study, the presence of *M. Leprae* were detected by skin smear and/or PCR. 4 cases of leprosy were diagnosed in cohabitants over 35 years old, all of them came from a family with a primary case of leprosy lepromatous. The study of the transmission proved that 67,8% of the patients and 14% of the cohabitants are nasal bacillus carriers.

In conclusion: in the north of Misiones the disease, is far of being in control, the detection is late, the treatment fails and the transmission between the cohabitants exist.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	9
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	13
I1. ANTECEDENTES Y REVISIÓN DE LA LITERATURA.	13
I.1.1. LEPROSA: GENERALIDADES.....	13
I.1.2. TRANSMISIÓN.....	15
I.1.3. INFECCIÓN-ENFERMEDAD.....	16
I.1.4. INMUNOLOGÍA DE LA LEPROSA.....	17
I.1.5. FORMAS CLÍNICAS.....	18
I.1.6. DIAGNOSTICO.....	25
I.1.7. TRATAMIENTO.....	33
I.1.8. EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPROSA.....	34
I.1.9. ANTECEDENTES CONTROL.....	43
I.2. ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN...44	
I.3. OBJETIVOS	46
I.3.1. OBJETIVO GENERAL.....	46
I.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	46
CAPITULO II. CUERPO DE DESARROLLO DEL TRABAJO DE	
INVESTIGACIÓN.....	47
II. 1. PROPUESTA METODOLÓGICA.....	47
II.1.1 Tipo de estudio y diseño.....	47
II.1.2 Universo y población objetivo.....	47
II.1.3. Definiciones utilizadas.....	47
II.1.4. Criterios de inclusión.....	47
II.1.5. Criterios de exclusión.....	48
II. 1.6. Aspectos éticos.....	48
II. 2. MATERIALES Y METODOS.....	48
II. 2.1. Área de estudio.....	48
II. 3. POBLACION DE ESTUDIO	54
II.3.1. Población.....	54
II. 3.2. Examen clínico.....	55
II. 3.3. Toma de muestra.....	55
II. 3.4. Estudio de las muestras.....	58
II. 3.5. Criterios de positividad.....	59
II.3.6. Recolección de la información.....	59
II.3.7. Variables.....	59
II. 3.8. Procesamiento de los datos y análisis de resultados.....	61
II. 3.9. Notificaciones al sistema sanitario.....	61
III. RESULTADOS	62
III.1 Estudio de pacientes.....	62

III.2 Estudio de convivientes.....	69
III.3 Estudio de transmisión.....	71
IV. DISCUSIÓN.....	72
V. CONCLUSIONES.....	80
VI. PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS Y/O RECOMENDACIONES ...	82
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS.....	96
ANEXO I. Modelo de consentimiento informado.	96
ANEXO II. Ficha del examen clínico.....	101
ANEXO III. Baciloscopia (Ziehl-Neelsen modificado).....	104
ANEXO IV. Métodos moleculares: Extracción de los ácidos nucleicos.	108
ANEXO V. Amplificación de ácidos nucleicos de <i>Mycobacterium lepra</i> mediante la reacción en cadena por la polimerasa (PCR).	110
REFERENCIAS DE ANEXOS.....	116

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Multiterapia aconsejada por la OMS para el tratamiento de los distintos tipos de lepra.

Tabla 2. Prevalencia de lepra en diferentes regiones del mundo desde 2006 a 2015.

Tabla 3. Número de casos nuevos y acumulados de lepra en Argentina especificados por provincias en el año 2015.

Tabla 4. Número de casos nuevos en Argentina especificados por Pacientes multibacilares, menores de 14 años, mujeres y discapacidad grado 2 en el año 2015.

Tabla 5. Distribución de casos por género y edad según los departamentos de residencia.

Tabla 6. Distribución de pacientes con lepra según el departamento de residencia y el tipo de lepra.

Tabla 7. Distribución de casos de lepra según la clasificación de la OMS y la edad de los pacientes n (%).

Tabla 8. Resultados de la técnica de baciloscopia según el lugar de toma de muestra.

Tabla 9. Resultados de la técnica de PCR según lugar de la toma de muestra.

Tabla 10. Resultados de las técnicas de laboratorio en las muestras tomadas a los pacientes clasificados según Ridley y Joplings.

Tabla 11. Tabla de doble entrada de los comparados de la técnica de baciloscopia con la técnica de PCR.

Tabla 12. Resultados de la técnica de PCR comparados con la baciloscopia.

Tabla 13. Número de convivientes por familia.

Tabla 14. Distribución por edades y sexo de los convivientes.

Tabla 15. Familias en las que la enfermedad se detecta en más de un integrante.

Tabla 16. Índice bacteriológico (IB) según la ILEP. Anexo III

Tabla 17. Cebadores usados para la amplificación de la región RLEP. Anexo IV

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frotis de linfa del lóbulo de la oreja teñido con la técnica de Ziehl - Neelsen donde se pueden observar los bacilos acido-alcohol resistentes de *M. leprae* teñidos en rojo a 1.000 aumentos.

Figura 2. Armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*).

Figura 3. Periodo de infección y evolución a las diferentes presentaciones que puede tener la lepra.

Figura 4. Clasificación de la lepra según Madrid, la OMS y según Ridley y Joplin. TT lepra tuberculoide DD lepra dimorfa LL lepra lepromatosa BT borderline tuberculoide BB borderline borderline BL borderline lepromatosa OMS Org Mundial de la Salud.

Figura 5. Lepra indeterminada.

Figura 6. Lepra tuberculoide.

Figura 7. Lepra lepromatosa.

Figura 8. Lepra borderline. A) LDT: lepra dimorfa tuberculoide, B) LDD: lepra dimorfa dimorfa, C) LDL: lepra dimorfa lepromatosa.

Figura 9. Leprorreacción de Tipo I.

Figura 10. Leprorreacción de Tipo II.

Figura 11. Distribución geográfica de los nuevos casos de lepra en el año 2015. WHO Global leprosy update, 2015.

Figura 12. Ubicación geográfica de Misiones.

Figura 13. Mapa de Misiones mostrando la densidad poblacional por Km².

Figura 14. Zonas Sanitarias y Red de Hospitales según Niveles Riesgo.

Figura 15. Hospital SAMIC de Eldorado.

Figura 16. Algoritmo de trabajo para revisión de los pacientes.

Figura 17. Algoritmos de trabajo para convivientes.

Figura 18. Mapa de distribución de casos por localidades y Tasas de lepra por departamento expresadas por 10.000 habitantes.

Figura 19. Distribución de casos conforme a género y grupos etarios.

Figura 20. Distribución del número de convivientes por sexo y grupo etario.

Figura 21. Procedimiento de coloración. Anexo III

Figura 22. Procedimiento de decoloración. Anexo III

Figura 23. Tinción de contraste.

Figura 24. Imágenes de baciloscopias Anexo III

Figura 25. Posibles resultados tras el análisis de hibridación. Anexo V

NOMENCLATURA

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

BAAR: Bacilos ácido-alcohol resistentes.

BT: Lepra borderline tuberculoides

BL: Lepra borderline lepromatosa

CD4⁺: Células CD4

CD8⁺: Células CD8

CGHDE: Coordinación General de Lepra y Enfermedades en Eliminación

CN: Casos nuevos

DG2: Discapacidad de grado 2.

dNTP: Deoxinucleósido trifosfato

GLP-1: Glicolípido fenólico 1

Hab: Habitantes

H₂O_{bd}: Agua bidestilada estéril.

IFN: Interferón

IL2: Interleuquina 2

LAM: Lipoarabinomano

LB: Lepra borderlain

LI: Lepra indeterminada

LL: Lepra lepromatosa

LT: Lepra tuberculoides

MB: Multibacilar/es

MDT: Multi droga terapia

MS: Ministerio de Salud

MT: Multiterapia

NET10: 10 mM NaCl, 10 mM EDTA y 10 mM Tris-HCl.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PB: Paucibacilar/es

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena por la polimerasa.

nPCR: PCR anidada (nested PCR)

RFLP: Polimorfismo en los segmentos de restricción

SDS: Dodecilsulfato sodico

SVS: Secretaria de Vigilancia en Salud

µm: Micras

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

11. ANTECEDENTES Y REVISIÓN DE LA LITERATURA.

I.1.1. LEPRA: GENERALIDADES.

La lepra es una enfermedad infecciosa crónica que afecta al sistema nervioso periférico, piel y otros órganos, cuyo agente causal es denominado *Mycobacterium leprae*¹. Esta fue la primera bacteria patógena descubierta en 1873 por el noruego Gerhard Armauer Hansen².

La especie *M. leprae* pertenece a la clase *Schizomycetes*, orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae* y al género *Mycobacterium*. Se trata de un bacilo intracelular obligado, inmóvil, no esporulado, con un diámetro de 0,3-0,5µm y 4-7 µm de longitud, gram positivo débil y ácido alcohol resistente (BAAR). Tanto el método clásico de tinción de Ziehl-Neelsen como las técnicas de fluorocromos se basan en la retención del colorante después de la exposición a ácido alcohol (ácido clorhídrico más etanol), propiedad debida a un alto contenido lipídico en su pared celular³ (Figura 1).

El bacilo se divide por fisión binaria cada 12 a 14 días. Su temperatura óptima de proliferación oscila entre los 27 a 30°C, lo que explica la preferencia del bacilo por las zonas superficiales como la piel y nervios periféricos.^{4,5} Hasta la fecha, no se ha podido reproducir “in vitro” en los medios sintéticos tradicionales, y su cultivo se encuentra delimitado a animales de experimentación: el armadillo de nueve bandas (*Dasypus novemcinctus*) (Figura 2), siendo este su reservorio natural,⁶ y ratones infectados experimentalmente.⁷

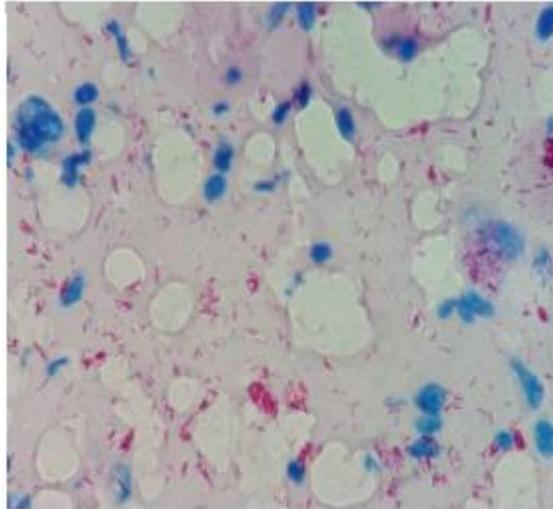


Figura 1. Frotis de linfa del lóbulo de la oreja teñido con la técnica de Ziehl -Neelsen donde se pueden observar los bacilos ácido-alcohol resistentes de *M. leprae* teñidos en rojo a 1.000 aumentos (Autor: Lucrecia Acosta).

El genoma completo del bacilo fue secuenciado por Cole y colaboradores en 2001⁸, está compuesto por 3.268.203 pares de bases (pb), y su contenido en guanidina y citosina es del 57,8%. Comparado con el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* que tiene 4.411.529 pb, se evidencia en *M. leprae* un fenómeno masivo de reducción génica que ha dado lugar a un genoma con 1.133 genes inactivos. Como resultado de esto, menos del 50% de su genoma codifica genes funcionales y esta reducción ha llevado consigo la eliminación de varias rutas metabólicas, que han dado lugar a un bacilo con unos requerimientos muy específicos para su desarrollo y crecimiento que revelan porque es un parásito intracelular obligado.^{8,9}



Figura 2. Armadillo de nueve bandas (*Dasypus-novemcinctus*).

I.1.2. TRANSMISIÓN.

A pesar de que la lepra es una enfermedad contagiosa, su morbilidad comparada con otras infecciones es bastante baja, debido a que gran parte de la población es resistente a la enfermedad de manera natural.¹⁰

Generalmente, los humanos son el principal reservorio del bacilo, exceptuando en las Américas donde el armadillo también puede jugar un papel importante.¹¹ De hecho, se estima que dos tercios de los casos que acontecen en el sur de Estados Unidos comparten cepas de *M. leprae* que se pueden relacionar con las encontradas en armadillos de la zona.¹²

Las vías de transmisión de la lepra no son del todo conocidas, pero se acepta como vía fundamental de contagio el contacto estrecho y prolongado con un paciente multibacilar (MB) no tratado que al hablar, toser o estornudar, entre otros, elimina los bacilos contenidos en las secreciones nasales o aerosoles.^{13.14.15} Recientemente existen evidencias de que la ruta aérea vía nasal es la ruta más probable de entrada de la bacteria al organismo.¹⁶ El riesgo de contagio aumenta en función de la cercanía al infectado, siendo mayor cuanto

más estrecho sea el contacto con este, y principalmente depende de la carga bacteriana, de modo que el riesgo llega a ser dos veces mayor en pacientes MB que en paucibacilares (PB).¹⁷ Por esto, la mucosa nasal es considerada la principal vía de ingreso,^{18,19} aunque no se descarta la transmisión por las úlceras o nódulos abiertos y otras vías como la sangre, la leche materna, picaduras de insectos o transmisión vertical.^{20,21,22}

Se asume que los individuos infectados, incluso aquellos que no llegan a desarrollar la enfermedad, pueden durante un periodo de tiempo, eliminar al bacilo por vía nasal.¹⁸ Diversos trabajos en los que se ha estudiado la presencia del ADN de *M. leprae* en hisopos o biopsias nasales de individuos sanos que viven en zonas endémicas, sugieren que también un portador sano puede jugar un papel importante en la transmisión.^{23,24}

I.1.3. INFECCIÓN-ENFERMEDAD.

La vía fundamental de contagio es el paciente multibacilar no tratado que al hablar, toser, estornudar elimina de las mucosas de las vías respiratorias superiores los bacilos.^{25,26,15} La persona predispuesta puede desarrollar la enfermedad si mantiene un contacto prolongado con el enfermo y en condiciones de vida desfavorables. El germen ingresa por las vías respiratorias superiores y tras un período de incubación de 2 a 5 años o más, manifestará la enfermedad.²⁷

Una vez que las bacterias invaden el organismo, van a los ganglios linfáticos y es aquí donde se va a desencadenar la lucha entre el microorganismo y el huésped. La mayoría de las veces la respuesta inmune es eficaz y elimina los bacilos no produciéndose la enfermedad. Si esto no ocurre las bacterias pasan a la sangre y se diseminan. Tras una fase indeterminada de la enfermedad el tipo de respuesta inmunitaria del paciente determinará la evolución hacia el polo tuberculoide o hacia el polo lepromatoso como puede observarse en la Figura 3.²⁸

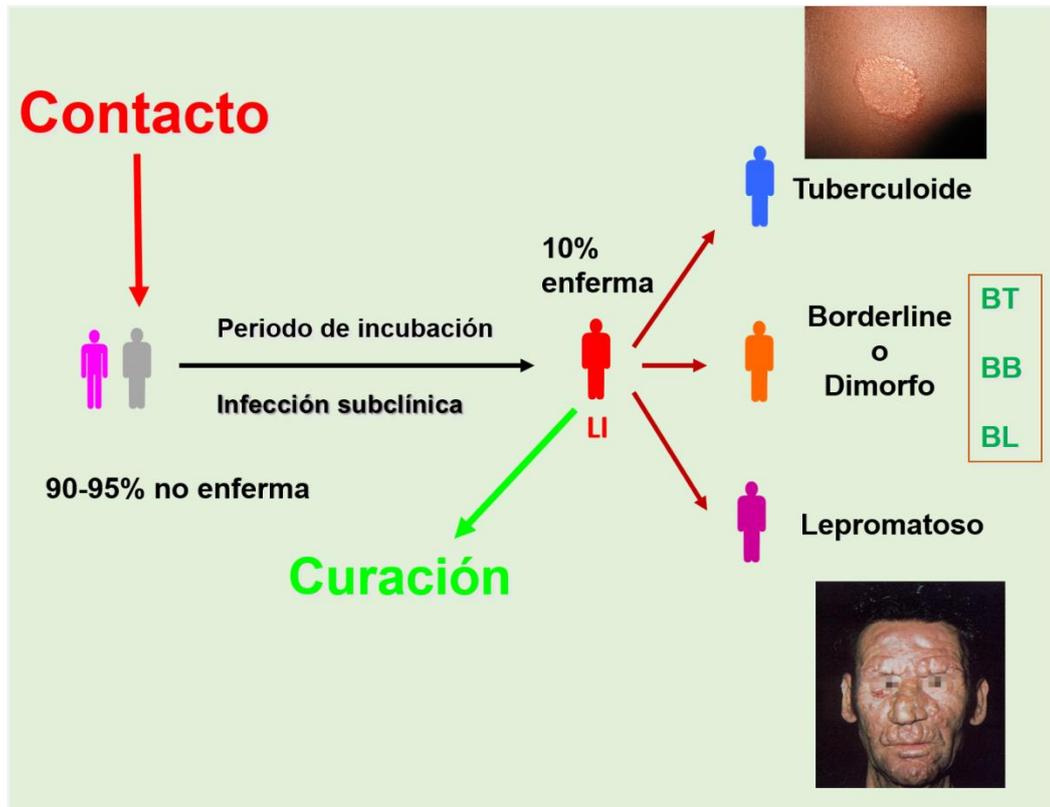


Figura 3. Periodo de infección y evolución a las diferentes presentaciones que puede tener la lepra.

I.1.4. INMUNOLOGÍA DE LA LEPROA.

En el caso de la LT hay un predominio de la respuesta mediada por las células auxiliares T CD4+ y citoquinas Th1 como la interleuquina 2 (IL2) y el Interferon gama (IFN γ), mientras que en la LL la respuesta esta mediada preferentemente por las células T, CD8+ citoquinas Th2 como la IL4, IL5 y IL10. Además, el bacilo es capaz de producir sustancias como el Glicolipido fenólico 1 (GLP-1) y el lipoarabinomanano (LAM) en el interior de los macrófagos, que dan lugar a un efecto supresor de la actividad macrofítica, favoreciendo su liberación y así su proliferación por el organismo.²⁹

Las células de Schwann son un objetivo importante de la infección por *M. leprae*, que da lugar a la desmielinización y la consiguiente incapacidad del nervio al que afectan.³⁰ En función del grado de respuesta o resistencia

Inmunológica del paciente, las manifestaciones neurológicas serán diferentes, en la LT la exacerbación de la inmunidad celular dará lugar a lesiones.³¹

Por la falta de factores de regulación mientras que la LL, como el control de la Infección queda limitado a la respuesta humoral, el mecanismo de lesión de los nervios será por compresión debido a la acumulación del bacilo.

I.1.5. FORMAS CLÍNICAS.

I.1.5.1. Características de las formas clínicas.

La aparición o no de la enfermedad y el tipo de clínica, depende, de diferentes factores: geográficos, socio-económicos, la edad, el género, vacunaciones previas, y sobre todo de la predisposición genética del paciente que condicionara su respuesta inmunitaria frente a la infección³².

La clasificación de las formas clínicas de la lepra ha ido variando con el paso de los años. Para explicar con más detalles los diferentes tipos de clínica a modo de consenso se utiliza la clasificación de Ridley-Jopling que está basada en las lesiones que aparecen en la piel y la carga bacteriana.³³ La Organización Mundial de la Salud (OMS) realizó otra clasificación y agrupó a los pacientes en dos grupos con el objetivo de simplificar a nivel operacional el trabajo en terreno y el tratamiento de los mismos³⁴ (Figura 4).

CLASIFICACIÓN	ESPECTRO DE LA LEPRO				
MADRID (1953)	TT	DD			LL
RIDLEY JOPLING (1962)	TT	BT	BB	BL	LL
OMS (1982)	Paucibacilar			Multibacilar	

Figura 4. Clasificación de la lepra según Madrid, la OMS y según Ridley y Joplin. TT lepra tuberculoide DD lepra dimorfa LL lepra lepromatosa BT borderline tuberculoide BB borderline bordeline BL borderline lepromatosa OMS Org Mundial de la Salud

En los extremos, se encuentran las denominadas lepras polares: la lepra **tuberculoide** y la lepra **lepromatosa**, y en medio las lepras **borderline /dimorfas o inestables** que dependiendo de las características más parecidas a una u otra lepra polar se van a denominar: lepra dimorfa tuberculoide, lepra dimorfadimorfa y lepra dimorfa lepromatosa.^{28,37}

A continuación, se describe con más detalle las diferentes formas clínicas según Ridley y Jopling.³⁵

- **Lepra indeterminada o inicial (LI):** Tiene lugar en el comienzo de la enfermedad. Las manifestaciones son cutáneas, nunca se presentarán alteraciones de los troncos nerviosos. Los pacientes sin tratamiento pueden evolucionar hacia el polo tuberculoide o lepromatoso en función del tipo de respuesta inmunitaria que presente. El resultado de la baciloscopia será negativo y la reacción a la prueba de la lepromina variable. (Figura 5)



Figura 5. Lepra indeterminada.

- **Lepra tuberculoide (LT):** Las principales manifestaciones tienen lugar en la piel y nervios periféricos. Las lesiones dérmicas aparecen en número escaso con alteración de la sensibilidad superficial y anhidrosis. Desde el punto de vista neurológico, la afectación suele ser localizada, intensa y destructiva, pudiendo provocar importantes alteraciones sensitivas, motoras y tróficas. Como en el caso anterior, la baciloscopia será negativa pero la prueba de la lepromina fuertemente positiva. (Figura 6)



Figura 6. Lepra tuberculoide.

- **Lepra lepromatosa (LL):** En estos casos, la falta de reacción inmunológica del paciente hacia el bacilo, da lugar a que la enfermedad se disemine por piel, nervios, nariz, boca, laringe, faringe, ojos y órganos internos, dando lugar a unas características clínicas peculiares y a que estos pacientes sean, desde el punto de vista epidemiológico, una fuente con alto poder de contagio. Por esto, la reacción de la lepromina será negativa pero la baciloscopia positiva. Las lesiones en la piel son generalmente numerosas y su localización y/o extensión es variable. En el caso de la afectación neurológica, será mayor el número de nervios comprometidos, pero menor la posibilidad de parálisis motora. (Figura 7)



Figura 7. Lepra lepromatosa.

- **Lepra borderline (LB):** Aparece en los portadores de LI que presentan una respuesta inmunológica superior a los portadores de LL pero inferior a los Portadores de la LT. Existen 3 formas distintas:
 - Lepra dimorfa tuberculoide (LDT): Aparecen numerosas lesiones con las características de las de la LT con la baciloscopia negativa.
 - Lepra dimorfa dimorfa (LDD): Se presenta generalmente con muchas lesiones que casi siempre forman placas uniformemente

elevadas que pueden ser anestésicas y anhidróticas. La baciloscopia es positiva.

- Lepra dimorfa lepromatosa (LDL): Aparecen lesiones cutáneas innumerables, sin características de anhidrosis ni anestesia. En este tipo clínico, también hay afectación neurológica, aunque generalmente es menos grave y severa que en el caso de la LL. El resultado de la baciloscopia es positivo. (Figura 8)

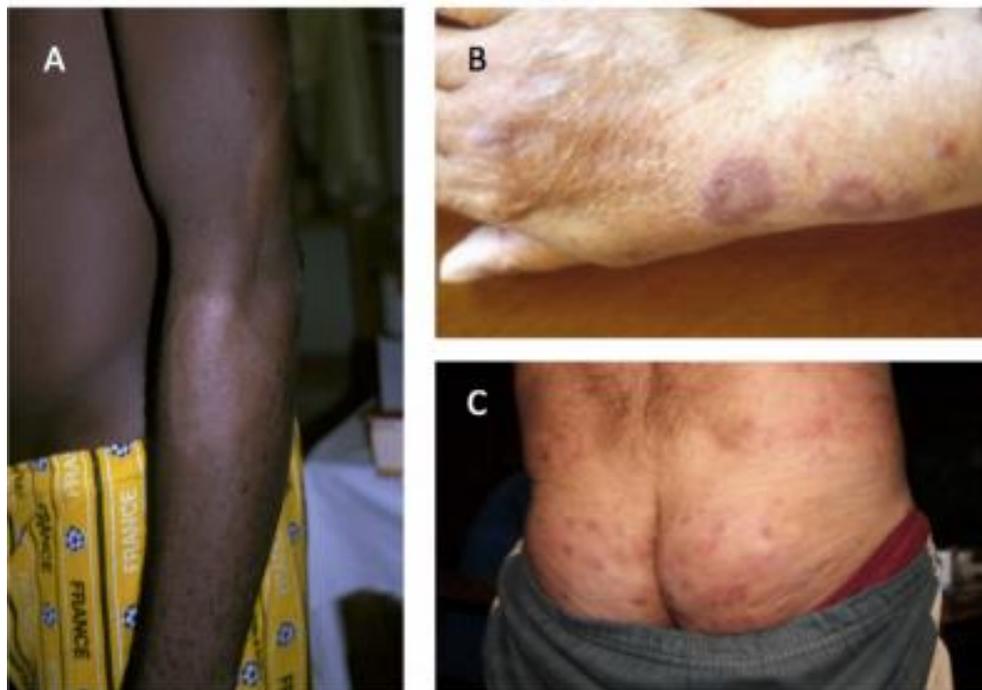


Figura 8. Lepra borderline. A) LDT: lepra dimorfa tuberculoide, B) LDD: lepra dimorfa dimorfa, C) LDL: lepra dimorfa lepromatosa

La OMS aconsejó una clasificación más simple mediante la cual los pacientes se dividen en dos grandes grupos en función del número de lesiones en la piel:

- **Pacientes paucibacilares (PB):** Hasta 5 lesiones cutáneas. No presentan más de un tronco nervioso afectado y la baciloscopia es

negativa. Por lo general, este grupo incluiría a los pacientes con LI, LT y algunos de LDT.

- **Pacientes multibacilares (PM):** Presentan más de 5 lesiones cutáneas, más de un tronco nervioso afectado y baciloscopia positiva. Incluiría a las formas LDD, LDL y LL.

La clasificación de Ridley-Jopling, al ser más rigurosa presenta mayor utilidad en los centros de referencia y estudios de investigación,³⁶ sin embargo, la clasificación de la OMS es la utilizada para establecer el tratamiento³⁷.

I.1.5.2. Leprorreacciones.

Las lepro-reacciones son cuadros agudos causados por cambios en el equilibrio entre el sistema inmunológico y los antígenos del bacilo³⁸.

Dependiendo del tipo de inmunidad, se observan dos reacciones diferentes:^{39, 40}

- **Reacción de Tipo I, Reacción Dimorfa o Reacción Reversa – De grado:** Están causadas por fenómenos de hipersensibilidad debidos a modificaciones en la inmunidad celular. Tienen lugar en las formas dimorfas: LDT y LDD, que evolucionan hacia el polo tuberculoide por mejoría de la inmuno competencia pero con empeoramiento de la clínica (Figura 9).



Figura 9. Leprorreacción de Tipo I.

- **Reacción de tipo II, Reacción Lepromatosa o Eritema Nudoso Leproso:**

Se forman inmunocomplejos con los antígenos liberados en la destrucción de las micobacterias, que se depositan en los vasos, desencadenan vasculitis necrotizantes en la piel, nervios, cámara anterior del ojo, testículo, etc. Tiene lugar principalmente en la LL (Figura 10).



Figura 10. Leprorreacción de Tipo II.

I.1.6. DIAGNOSTICO.

El diagnóstico actual de la lepra sigue basándose todavía en los mismos principios del siglo pasado. Los criterios empleados son clínicos, histológicos y bacteriológicos⁴¹.

MÉTODOS CONVENCIONALES

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

Todas las muestras clínicas remitidas para la determinación de una posible infección por *M. leprae* deben examinarse en busca de BAAR. La característica de ácido-resistencia, prácticamente exclusiva de las micobacterias, hace que el examen microscópico tenga una importancia fundamental. Tanto el método clásico de tinción de Ziehl-Neelsen como las técnicas con fluorocromos, se basan en la misma propiedad de retención bacteriana del colorante después de su exposición a un ácido-alcohol. El hallazgo de bacilos ácido-resistentes en las muestras sólo indicaría la presencia de micobacterias ya que no identifica la especie. La baciloscopia, tanto de linfa procedente de lesiones activas, previamente activas o de aquellos puntos más habituales de albergar bacilos, como la de raspado nasal, por microscopía directa con objetivo de inmersión, presenta un límite práctico de detección mínimo de 10^4 bacilos BAAR/ml. Por lo tanto cualquier cantidad de bacilos inferior no serían detectados y como resultado se produciría un error diagnóstico. Es el límite de sensibilidad de la técnica y por tanto uno de sus inconvenientes⁴¹.

La cantidad de bacilos que se encuentran con estas técnicas varía considerablemente, de acuerdo con los diferentes tipos de lepra y con la etapa de desarrollo de la misma. Para intentar estandarizar al máximo el sistema de

determinar el número de bacilos en las preparaciones observadas al microscopio, se utilizan dos índices: el índice bacteriano (IB) y el índice morfológico (IM). El IB sigue una escala logarítmica de 0 a +6, que estima la cantidad de bacilos detectados en 100 campos microscópicos con objetivo de inmersión y previa tinción de la muestra por método de ácido-alcohol resistencia. Con un tratamiento efectivo el número de bacilos desciende, junto con cambios en su forma. Estos cambios en la forma se miden con el IM que nos da la proporción de bacilos teñidos uniforme e intensamente (enteros) y considerados viables después de observar con el microscopio 100 bacilos de la muestra. La viabilidad de estos bacilos enteros se demuestra con su inoculación en almohadilla plantar de ratón, donde originan un crecimiento limitado que se observa con la inflamación en el sitio de inoculación y la obtención de bacilos en suspensiones procedentes de estas almohadillas después de sacrificar el animal a los 6-8 meses de la inoculación. Si la morfología de los bacilos no disminuye con el tratamiento es que el paciente no toma éste con regularidad o hay bacilos resistentes a la misma. La prueba de la lepromina fue descrita por Mitsuda y Hayashi, quienes describieron en 1916 una reacción en enfermos de lepra por la inyección intradérmica de una emulsión rica en bacilos y que se hizo público durante el Congreso Internacional de Lepra de Estrasburgo de 1923. Las reacciones se observaban a los 21-28 días de la inoculación y eran positivas en todos los enfermos de Hansen paucibacilares y sin embargo negativas entre los multibacilares. También, eran positivas en individuos sanos convivientes y no convivientes de enfermos de Hansen y se le atribuyó valor pronóstico y de clasificación del paciente de lepra en el espectro inmunológico de la enfermedad. Fernández, en 1940, observó una reacción a las 48 horas de la administración del antígeno, tipo hipersensibilidad retardada (DTH), que se correlacionaba casi totalmente con la tardía en los enfermos y algo menos en sanos no convivientes. En 1946, durante la 2ª Conferencia Panamericana

sobre la Lepra, celebrado en Río de Janeiro (Brasil), se denominó reacción de Fernández a la reacción de 48 horas y reacción de Mitsuda o leprominorreacción a la lectura tardía a las 3- 4 semanas⁴¹.

Hasta 1960, la lepromina se obtenía de lepromas de pacientes con lepra lepromatosa. Estos lepromas se autoclavaban y el leproma resultante se homogenizaba en mortero con un sistema de estandarización en base a su peso. La disponibilidad del material empleado, lepromas humanos, era escaso, variable e impredecible en su contenido bacilar. Desde 1975 se emplea lepromina obtenida de bacilos de *M. leprae* extraídos del hígado de armadillos experimentalmente infectados con un protocolo estandarizado de extracción y purificación, elaborado por la OMS, a una concentración aproximada de 4×10^7 bacilos/ml. Se inyecta 0,1 ml intradérmicamente en el antebrazo derecho de cada individuo y a los 21 días se mide la longitud en milímetros del diámetro del halo de induración.

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

Positivo débil: halo eritematoso, infiltrado de 1 cm a 1,5 cm

Positivo: igual halo de reacción, pero el eritema es de 1,5 a 2cm, llegando incluso a ulcerarse⁴¹.

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO ACTUALES

En el diagnóstico de laboratorio, el examen histológico de las lesiones cutáneas confirma el cuadro clínico mediante la detección de BAAR. Aunque la histopatología, junto con la baciloscopia, tanto de lesiones cutáneas como de lóbulo de oreja y/o codo son adecuadas para el diagnóstico en la mayoría de los casos de lepra, la utilización de estas técnicas convencionales presenta el problema de falta de sensibilidad y especificidad, sobre todo cuando los síntomas clínicos son equívocos. Estas técnicas convencionales no permiten diferenciar las distintas especies de BAAR y además su límite inferior de detección por microscopía óptica es tan sólo de aproximadamente 10^4 BAAR/ml. Cuando no

se confirma la presencia de estos bacilos ácido-alcohol resistente en las lesiones no se puede diagnosticar de manera definitiva lepra^{42,43}.

El no disponer de técnicas adecuadas ha dificultado el conocimiento de la transmisión de la enfermedad y de los principales reservorios de la infección.

Debido a todos estos inconvenientes, en los últimos años se han intentado desarrollar métodos alternativos, tanto en el campo de la serología, para detectar respuestas humorales, al disponer ya de antígenos específicos del bacilo, como con la aplicación de técnicas de amplificación de DNA genómico para la detección de fragmentos de DNA de *M. leprae* en la lesión, que resulten más sensibles y específicas en las diferentes formas de la enfermedad⁴³.

SEROLÓGICOS Y MOLECULARES

Con los métodos serológicos se trata de detectar la respuesta humoral a los antígenos del *M. leprae*. Los estudios inmunológicos sobre la lepra indican que las distintas formas de la enfermedad presentan un espectro distinto. La lepra lepromatosa se caracteriza por ser muy bacilífera y presentar una respuesta inmunológica mediada por los linfocitos B, que puede ser policlonal y no específica, mientras que en la lepra tuberculoide se observan pocos bacilos en la lesión y la respuesta esta fundamentalmente mediada por linfocitos T⁴¹.

El intento de lograr un método rápido e incruento que solucione todos los problemas del diagnóstico de la lepra, algunos ya expuestos anteriormente, es lo que ha motivado desde principios de siglo la aplicación de los estudios serológicos sobre la lepra y otras micobacterias. *M. leprae* no ha podido ser cultivado “in vitro” y sólo desde 1971 ha sido cultivado en modelos experimentales en animales, lo que ha permitido un mejor reconocimiento bioquímico e inmunológico de sus características antigénicas⁴¹.

Con los métodos de detección directa solo es posible diagnosticar cuando ya

aparecen las manifestaciones y síntomas clínicos. La detección de infección subclínica por *M. leprae* resulta difícil, lo que constituye un problema importante para el estudio epidemiológico de la enfermedad. Aunque los tests serológicos utilizados hasta hoy día para la detección de respuestas humorales presentaban gran cantidad de reacciones cruzadas con otras micobacterias, ya se dispone de antígenos específicos mediante los cuales se obtienen respuestas especie-específicas. La mayoría de las pruebas serológicas empleadas en el diagnóstico de micobacterias utilizan una técnica capaz de medir la cantidad de anticuerpo que se une a un antígeno previamente seleccionado⁴¹.

Sin embargo, también hay otras en que se han utilizado anticuerpos para tratar de detectar los antígenos. En todos los casos el resultado va a depender de la técnica empleada, del antígeno seleccionado y del anticuerpo medido. La sensibilidad de estas técnicas dependerá fundamentalmente de la técnica empleada, mientras que la especificidad lo hará del antígeno. Los antígenos utilizados en el estudio serológico de la lepra han sido múltiples a lo largo del tiempo. De todos ellos el más específico es el glicolípidos fenólico 1 (GLP-1) de *M. leprae* purificado por Brennan y colaboradores⁴¹.

Los tejidos infectados con *M. leprae* contienen grandes cantidades de GLP-1 que forman una cápsula amorfa alrededor del organismo, demostrándose que en almohadilla plantar de ratón el nivel de GLP-1 en tejidos corresponde aproximadamente a la cantidad de BAAR contenido en los mismos. Este antígeno se obtiene purificado en cantidades de miligramos de tejidos de armadillos infectados y en cantidades suficientes para su uso en cribajes serológicos. La especificidad del antígeno es conferida por la porción trisacárida específica del GLP-1: 3,6 -di -O-metilglucosa, que constituye el epítipo inmunodominante que aporta una especificidad cercana al 100%. Como el GLP-1 natural no es el más adecuado para trabajos de rutina por su estructura hidrofóbica, se han sintetizado glicoconjugados con estas estructuras glucosídicas específicas⁴¹.

Así se sintetizó químicamente un disacárido-BSA (D-BSA), con una excelente

reproductividad en los resultados con el GLP-1.

Los mejores resultados en la determinación de anticuerpos séricos en lepra se han obtenido mediante estudio de la cantidad de anticuerpo de tipo IgM que se liga al antígeno GLP-1, mediante la técnica ELISA, sobre todo en el grupo de pacientes de tipo multibacilar, y no es suficientemente sensible y por tanto adecuada para el diagnóstico y seguimiento de la lepra paucibacilar. Bühner y Sékula han desarrollado una metodología para el análisis del PGL-1 sérico, con una sola gota de suero o sangre entera, basado en una inmunocromatografía (ML Flow Test) en placa. Por su facilidad técnica y presumible bajo costo puede constituir un gran avance en el campo de la serología⁴¹.

Para incrementar la sensibilidad y la especificidad en la detección de *M. leprae* muchos autores han desarrollado métodos basados en la técnica de PCR^{44,45,46}. La aplicación de las técnicas de biología molecular va a depender en gran medida de la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos de las muestras biológica.^{47,48} La eficiencia en la lisis de las células, la proporción de ADN/ARN extraído, y reactivos residuales de la extracción van a influenciar en este proceso^{49,50,51}.

La pared celular de las micobacterias posee una compleja estructura impermeable que dificulta su lisis (ácidos micólicos) y posterior liberación del material genético^{51,52,53}. Resultado de ello, es que con la mayoría de procedimientos comúnmente usados para el aislamiento de ácidos nucleicos no se obtengan buenos resultados^{53,54,55}. Por ello, para la lisis celular y extracción exitosa del ADN de *M. leprae*, se deben introducir algunos cambios en las primeras fases de la extracción, como: congelación/descongelación,⁵⁶ incubaciones más largas de las convencionales de 16 horas en adelante,⁵⁷ agitación con perlas,⁵⁸ añadir proteinasa K,⁵⁹ Tris-HCL, Tris-EDTA,⁶⁰ o detergentes como Tritón X-100,^{61,62} SDS⁶²

La secuenciación del genoma completo de *M. leprae* ha revelado que éste posee un tamaño de 3,3 Mpb, con 1.605 genes que codifican proteínas y 1.115 pseudogenes. Las más frecuentemente usadas para diagnóstico son:

Amplificando el gen que codifica una proteína antigénica de 18 kDa,^{63,64,65,66,67,68} mediante PCR convencional, cuyo límite de sensibilidad son 100 bacilos en la muestra⁶⁵ o mediante amplificación por PCR anidada con amplicones de 136 y 110 pb respectivamente en la primera y segunda reacción de PCR⁷⁰. Usando como diana el gen que codifica una proteína antigénica de 36 kDa conocida como antígeno rico en prolina (pra)^{71,69,72,73,57}, pudiendo llegar a detectar una bacteria en la muestra⁷¹.

Plikaytis y colaboradores, desarrollaron una PCR anidada que amplifica un producto de 578 pb en la primera reacción y un producto de 347 pb en la segunda reacción, ambos pertenecientes al gen que codifica una proteína de choque térmico de 65 kDa denominada groEL y que puede detectar hasta 3 fg de ADN de *M. leprae* (una bacteria) presentes en la muestra⁷⁴. Sin embargo, Woods y Cole, basaron su metodología en la amplificación de secuencias repetitivas específicas de *M. leprae* (RLEP), las cuales se encuentran repetidas 28 veces por célula, y amplicones resultantes de un tamaño de 372 pb.⁷⁵

De todas las regiones usadas como dianas genéticas en el diagnóstico de *M. leprae*, la región RLEP, es la que parece ser la diana más adecuada, por su sensibilidad en el diagnóstico de lepra indeterminada y pacientes paucibacilares^{70,76,78}.

TIPOS DE MUESTRAS USADAS EN EL DIAGNÓSTICO DE *M. Leprae*

La detección de ácidos nucleicos de *M. leprae* para diagnóstico, se puede llevar a cabo en diferentes muestras biológicas como:

FROTIS CUTÁNEO

La aplicación de metodologías moleculares como complemento a la visualización mediante microscopía óptica de los frotis puede ayudar a incrementar tanto la sensibilidad (frotis negativos) como especificidad (frotis negativos y positivos) de

esta técnica^{79,80}. Pudiendo ser aplicada en frotis fijados tanto sin teñir como teñidos^{70,81,77}.

HISOPO DE MUCOSA NASAL

Aunque la ruta de infección es desconocida, en el ser humano, las vías respiratorias altas son consideradas como la principal puerta de entrada y salida de los bacilos en el organismo^{83,84,78}.

Siendo en pacientes con infección activa (pacientes multibacilares particularmente) la principal vía de infección^{85,86}. aunque por otro lado, también se ha demostrado la importancia de reconocer e identificar en el ciclo de transmisión a los portadores sanos y/o con infección subclínica mediante hisopos de mucosa nasal^{83,87,88,89,90,82}. La extracción y amplificación de ácidos nucleicos de *M. leprae* a partir de las secreciones nasales, pueden ser de gran utilidad tanto en el pronóstico como en el control de la lepra^{91,92,84,93}. En algunos estudios han identificado que no existen diferencias entre los portadores nasales, respecto de ser grupos de contacto con pacientes o no dentro de la misma comunidad^{85,83}.

SANGRE

La amplificación de ácidos nucleicos de *M. leprae* en sangre, se ha llevado a cabo en estudios tanto de contactos⁹², como en pacientes después de haber finalizado el tratamiento⁹¹ y puede persistir la positividad en éstos últimos un periodo de tiempo.^{73,57}

BIOPSIA CUTÁNEA

Se puede llevar a cabo en tanto en biopsias congeladas,^{59,60,94,57,77} en formalina (aunque no son el tipo de conservante adecuado para amplificación),⁵⁹ embebidas en parafina biopsias cutáneas,^{57,78} en etanol al 70% como

conservante⁹⁵ o en hisopos tras la biopsia.⁵⁷ Especialmente en las biopsias cutáneas, la PCR se puede inhibir fácilmente, aunque se desconocen los motivos.⁶⁵ Para evitarlo es recomendable que se tengan en cuenta algunas precauciones especiales, como incluir un control interno, realizar diluciones y analizar las muestras por duplicado.

ORINA

El uso orina como muestra de partida para estudios de amplificación de ácidos nucleicos en *M. leprae* y su uso como herramienta diagnóstica se está evaluando recientemente. Pero la posibilidad de amplificar el ADN de *M. leprae* en orina^{96,97} tanto de pacientes multibacilares como paucibacilares puede ser de gran ayuda en el diagnóstico de *M. leprae* ya que la toma de muestra no invasiva contribuye a la adherencia del paciente.

I.1.7. TRATAMIENTO.

Desde el año 1981 la OMS recomienda para el tratamiento de la enfermedad, la multiterapia (MT)⁹⁸, según se muestra en la Tabla 1. La duración de la terapia es de 6 meses en pacientes paucibacilares, pudiendo alargarse hasta un máximo de 9 meses, y 12 meses en multibacilares y hasta un máximo de 18 meses.

Tabla 1. Multiterapia aconsejada por la OMS para el tratamiento de los distintos tipos de lepra.

TIPO DE CLÍNICA	MEDICAMENTO Y POSOLOGÍA	
LEPRA PAUCIBACILAR	ADULTOS	<u>Rifampicina</u> 600 mg en una única dosis mensual
		<u>Dapsona</u> 100 mg en una única dosis mensual más 100 mg/24 h
	NIÑOS (10-14 años)	<u>Rifampicina</u> 450 mg en una única dosis mensual
		<u>Dapsona</u> 50 mg en una única dosis mensual más 50 mg/24 h
	NIÑOS (<10 años)	<u>Rifampicina</u> 10 mg/kg/mes
	<u>Dapsona</u> 1-2 mg/Kg/mes	
LEPRA MULTIBACILAR	ADULTOS	<u>Rifampicina</u> 600 mg en una única dosis mensual.
		<u>Dapsona</u> 100 mg en una única dosis mensual más 100 mg/24 h.
		<u>Dofazimina</u> 300 mg en una única dosis mensual más 50 mg/24 h.
	NIÑOS (10-14 años)	<u>Rifampicina</u> 450 mg en una única dosis mensual.
		<u>Dapsona</u> 50 mg en una única dosis mensual más 50 mg/24 h
		<u>Dofazimina</u> 150mg en una única dosis mensual más 50 mg/48 h
	NIÑOS (<10 años)	<u>Rifampicina</u> 10 mg/kg/mes
	<u>Dapsona</u> 1-2 mg/Kg/24 h	
	<u>Dofazimina</u> 1 mg/Kg/24 h	

Pie de tabla. mg: miligramos, Kg: kilogramos, h: horas.

I.1.8. EPIDEMIOLOGÍA DE LA LEPRA.

I.1. 8.1. Situación de la lepra en el mundo.

La OMS recolecta la información de los programas nacionales de diferentes países del mundo (número de pacientes en tratamiento en un momento determinado generalmente el 31 de diciembre), casos nuevos y casos que finalizaron el tratamiento. En el año 2015 solicitó además se informe sobre leyes o políticas de no discriminación a los pacientes afectados y extranjeros afectados.⁹⁹

Actualmente se utilizan varios indicadores para categorizar a los países: prevalencia, detección de casos nuevos, porcentaje de discapacidad grado 2 (DG2)/millón de habitantes y tasa en niños. La información provista por los países además incluye proporción de pacientes multibacilares (MB), casos femeninos y casos en niños con DG2.⁹⁹

La prevalencia de la enfermedad está disminuyendo gradualmente en muchos países del mundo, sin embargo, las tasas de detección de casos nuevos se mantiene al mismo nivel desde hace varios años. Los países más afectados son: India, países vecinos (Brasil) donde están censados aproximadamente el 75% de los pacientes, y países africanos como Angola, Mozambique, Tanzania, Etiopía. (Tabla 2)

Tabla 2. Prevalencia de lepra en diferentes regiones del mundo desde 2006 a 2015⁹⁹

Región	Número de nuevos casos detectados									
	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
África	34 480	34468	29814	28935	25345	20213	20 599	20 911	18 597	20.004
Américas	47 612	42135	41891	40474	37740	36 832	36 178	33 084	33 789	28 806
Mediterráneo oriental	3 261	4091	3938	4029	4080	4 357	4 235	1 680	2 342	2 167
Sudeste Asiático	174118	171576	167505	166115	156254	160132	166445	155385	154834	156118
Pacífico	6 190	5863	5859	5243	5055	5 092	5 400	4 596	4 437	3 645
Europa										18
Total	265661	258133	249007	244796	228474	226626	232857	215656	213899	210.758

Desde 2006 se presenta un descenso en el número de casos nuevos de lepra reportados en la Región, pasando de 47.612 en 2006 a 36.494 en 2011 (Brasil reportó el 93,04% de los casos nuevos); asimismo, la prevalencia notificada bajó de 0,72 por 10.000 habitantes en 2006, a 0,39 en 2011. De acuerdo con el criterio de los casos nuevos diagnosticados al año durante 2010 y 2011, se identifican dos grupos de países:

Países con **baja carga de enfermedad** representada por el nulo o bajo reporte de casos nuevos (menos de 100 por año): Barbados, Costa Rica, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Guyana, Guyana Francesa, Haití, Honduras, Nicaragua, Panamá, Perú, Saint Kitts y Nevis, Santa Lucía, Surinam, Trinidad y Tobago y Uruguay, y países con **alta carga de casos nuevos** representada por el hecho de que reportan 100 o más casos nuevos por año (n=10): Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Cuba, Ecuador, México, Paraguay, República Dominicana y Venezuela.⁹⁸

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) actualmente un país es considerado endémico cuando presenta uno o más enfermos por 10.000 habitantes (Figura 11).⁹⁹

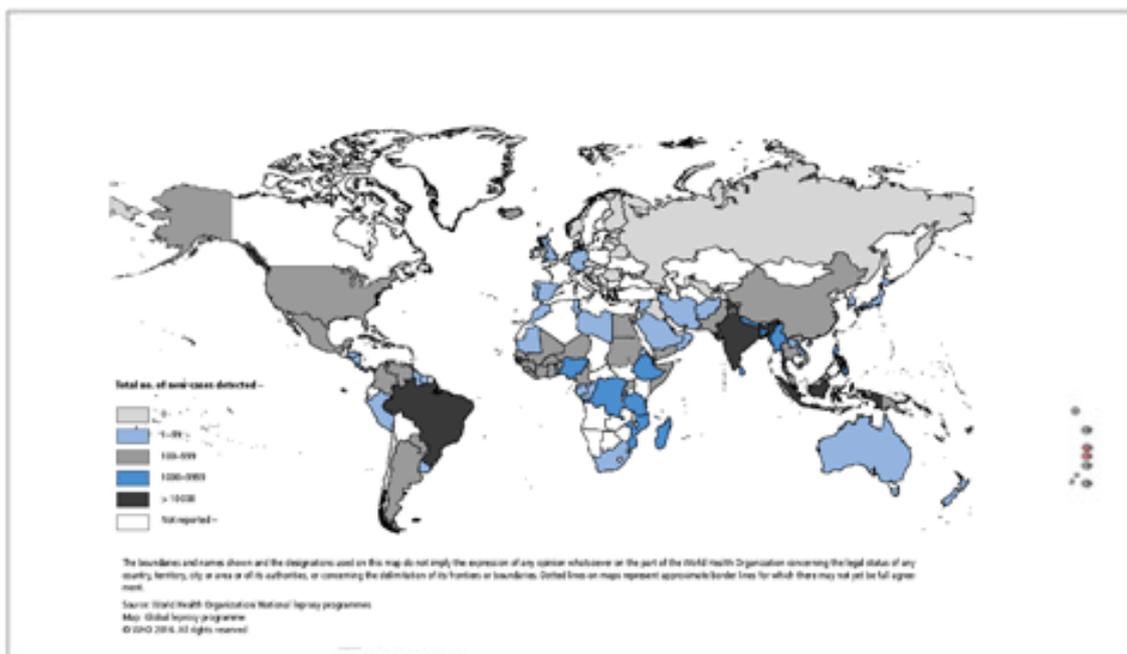


Figura 11. Distribución geográfica de los nuevos casos de lepra en el año 2015 (OMS 2016)⁹⁹

De los 24 países que informaron casos nuevos en 2011, con la excepción de Brasil, todos los países habían alcanzado la meta de eliminación de la lepra a nivel nacional y 18 de ellos la habían alcanzado a primer nivel administrativo sub-nacional. En 18 países y territorios no se registraron casos de lepra en 2010 y 2011.

En 2015, de los 136 países que presentaron las estadísticas: 28 pertenecían a la región de África, 23 a América, 20 a la Región del Mediterráneo Oriental; 28 a la Región de Europa; 11 países de Sur de Asia Sudoriental y 26 de la Región del Pacífico Occidental. No hubo reporte de 92 países o regiones.⁹⁹

Los datos también muestran la importancia de las migraciones, 18 países reportaron 768 pacientes extranjeros entre 0,4 % en Yemen y 100 % en Siria y Hong Kong.

De la aplicación de indicadores resultan 22 países con alta carga de lepra: Angola, Bangladés, Brasil, Canarias, Costa de Marfil, República Democrática del Congo, Egipto, Etiopía, Estados Federados de Micronesia, India e Indonesia entre otros.

Se reportaron 18.796 casos nuevos en niños (8,9% del total) lo que indica la transmisión continua de lepra en la comunidad, 271 de ellos con DG2 que revela la necesidad de incluir campañas de detección en niños antes que lleguen a desarrollar discapacidad.⁹⁹ Es importante además cumplir con la MDT a fin de evitar las recaídas y la resistencia bacteriana (la tasa más baja de cura es de 14,9 % para formas paucibacilares (PP) y 6% para las multibacilares (MB) y muchos países informan tasas de curación menores al 85%.

En términos de progreso hacia el logro de los objetivos de la Estrategia Mundial de la Lepra 2016-2020, 39 países no registran niños con DG2 y 50 países tienen una tasa de DG2 en los casos nuevos de menos de 1 por millón de habitantes.¹⁰⁰

I.1.8.2. Contexto Nacional de los países fronterizos y de sus localidades de frontera: Paraguay y Brasil.

I.1.8.2.1. Paraguay.

El Programa de Lepra de Paraguay fue creado el 24 de setiembre de 1969, iniciando sus actividades primeramente en 6 Regiones Sanitarias: San Pedro, Itapúa, Misiones, Paraguarí, Central y Ñeembucú. Posteriormente se expandió a todo el País.

En el año 2001, logró reducir la tasa de prevalencia a menos de 1 caso por 10.000 habitantes a nivel País.¹⁰¹

A la fecha persisten aún Regiones Sanitarias y Distritos con tasas de detección y prevalencias altos. Si bien el porcentaje de control de contactos ha ido mejorando en los últimos 5 años, pero aún no se consigue llegar al 85% de

los contactos.

En el año 2015 Paraguay registró 423 casos nuevos con un coeficiente de detección de 6,26 por 100.000 habitantes y al 31 de diciembre, 459 casos en registro activo, con un coeficiente de prevalencia de 0,67 por 10.000 habitantes a nivel País. Fueron diagnosticados con la afección 14 menores de 15 años, (3,3% del total de pacientes). El número de casos multibacilares fue de 374 (88,4%).

I.1.8.2.2. Brasil.

En 2011, la Secretaria de Vigilancia en Salud (SVS/MS) dio origen a la Coordinación General de Lepra y Enfermedades en Eliminación (CGHDE) con el propósito de fortalecer la respuesta para un grupo específico de enfermedades a fin de eliminarlas de la lista de los problemas de salud pública o para que se redujera drásticamente su carga,¹⁰² retomándose la meta de eliminación de la lepra y alcanzar un coeficiente de prevalencia de menos de un caso para cada grupo de 10 mil habitantes.¹⁰²

En 2014, Brasil registró 31.064 casos nuevos de lepra y un coeficiente de prevalencia de 1,27/10 mil habitantes. De estos, 2.341 (7,5%) fueron diagnosticados en menores de 15 años, señalando focos de infección activos y transmisión reciente. Del total de casos nuevos registrados, 8.486 (27,3%), iniciaron tratamiento con alguna incapacidad física. De estos, 2.039 (6,56%) fueron diagnosticados con DG2. En ese mismo año, el Sistema de Ingresos Hospitalarios (SIH) registró por todo el país, 4.147 casos de ingresos/admisiones por complicaciones de la enfermedad.¹⁰²

En diez años, aproximadamente 100 mil casos tuvieron alguna incapacidad física y demandaron atención específica en el área de rehabilitación. De acuerdo con la Dirección de Salud del Trabajador de la Previdencia Social, entre los beneficiarios contemplados y activos en la División de Acompañamiento y Control de Beneficio por Incapacidad, 8.726 personas son afectadas por la lepra,

(Sistema Único de Informaciones de Beneficios, 15/09/2015).

I. 1.8.3. Situación de la Lepra en Argentina y Misiones.

En nuestro país, esta enfermedad se caracteriza por su moderada endemicidad y focalización en ciertas áreas geográficas, como son las provincias del Noreste, y Noroeste. El programa Nacional de Lepra se inició en el año 1976, como una estructura vertical que demostró baja cobertura hasta que el proceso de descentralización permitió alcanzar a un mayor porcentaje de la población expuesta. En ese entonces existía un registro nacional de 11.576 casos (pacientes en tratamiento, vigilancia y altas) que eran tratados con monoterapia sulfónica, esquema que fue reemplazado por el tratamiento poliquimioterápico (PQT) en la década del 80.¹⁰³ Esta nueva implementación asociada a una intensa tarea de depuración de registros históricos, posibilitó llegar a diciembre de 2011 con un número de casos de 736 pacientes. Desde junio de este año (2017) el programa pasa a depender junto a tuberculosis de la Dirección de ETS y Sida, a partir del reordenamiento de las direcciones en el Ministerio de Salud de la Nación.¹⁰⁵ Es una enfermedad sujeta a notificación obligatoria desde 1960 (Ley Nacional N°15.465) en nuestro país. Según la Clasificación Internacional de Enfermedades el código CIE A30, desde 30 0 al 30 9 corresponde al espectro de lepra indeterminada, tuberculoide, tuberculoide limítrofe, limítrofe, leprosa limítrofe, lepromatosa, otras formas y lepra sin especificar respectivamente).¹⁰⁶

Se notifica toda persona que cumpla con los criterios de “**caso sospechoso**”. Se carga en el SNVS, módulo C2 (Vigilancia clínica) en forma semanal en el establecimiento donde el paciente fue atendido. Se completan los campos mínimos solicitados: Fecha de inicio de síntomas, de consulta, DNI, Sexo, Edad, criterio epidemiológico.

La notificación a través del módulo de vigilancia de laboratorio **Sivila –SNVS** comprende una ficha individual y la periodicidad de la notificación es semanal.

Aunque en los últimos años se han recibido notificaciones de casos residentes en provincias no endémicas (Región de Cuyo y Patagonia), debiéndose esta circunstancia más a las muy frecuentes migraciones internas y ocasionalmente de países limítrofes (Bolivia y Paraguay) que a un hecho epidemiológico. Merece especial mención el área de ciudad de Buenos Aires y Conurbano Bonaerense, zona de gran concentración de casos autóctonos y migrantes internos y externos.

Para el año 2013, la tasa de prevalencia nacional fue de 0,18/10000 habitantes y la tasa de detección 0,84/100.000 habitantes.¹⁰⁴ Si bien se alcanzó la meta de eliminación definida por la OMS, persistían algunas bolsas endémicas donde la carga de la enfermedad era superior como Formosa, Misiones y Chaco.¹⁰⁴

En el año 2015, el Programa Nacional de Lepra del Ministerio de Salud de la Nación en su reunión anual informó un total de 255 casos nuevos¹⁰⁶ y calculó tasas de prevalencia a nivel país que variaron entre 1,1 y 0,04 casos/10.000 habitantes, y ubican a nuestra provincia en el extremo superior (0,596/10.000), solo superada por Formosa, aunque los datos disponibles son incompletos (Tablas 3 y 4). Misiones se constituyó en una de las provincias con más casos nuevos (solo superada por Buenos Aires) y con las tasas de detección de casos más elevadas (Formosa: 6,09 casos y Misiones: 3,69 casos/100.000).

Tabla 3. Número de casos nuevos y acumulados de lepra en Argentina especificados por provincias en el año 2015.

CUADRO FINAL AÑO 2015								
Provincia	Casos Nuevos			Tasa de detección /100.000 hab.	Total de casos			Tasa de prevalencia/10 .000 hab.
	MB	PB	Total		MB	PB	Total	
Bs. As.	43	3	46	0.29	98	2	100	0.06
C.A.B.A.	11	3	14	0.48	14	3	17	0.05
Chaco	26	3	29	2.59	47	2	49	0.44
Córdoba	6	4	10	0.28	11	4	15	0.04
Corrientes	19	1	20	1,83	31	1	32	0.29
Formosa	32	3	35	6,04	62	2	64	1.10
Misiones	40	4	44	3.69	62	5	67	0.596
Salta	10	0	10	0.74	19	0	19	0.14
San Luis	0	0	0	0	1	0	1	0,04
Santa Fe	20	3	23	0.70	22	4	26	0.08
Tucumán	19	5	24	1,65	24	4	28	0.19
Total	226	29	255	0.59	391	27	418	0.10

MB: Multibacilares, PB: Paucibacilares, Hab: Habitantes, Bs. As.: Buenos Aires, C.A.B.A.: Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Tabla 4. Número de casos nuevos en Argentina especificados por Pacientes multibacilares, menores de 14 años, mujeres y discapacidad grado 2 en el año 2015.

CUADRO FINAL 2015				
Provincia	MB en CN	<14 años	Mujeres en CN	DG2.
Bs. As.	26	0	12	11
C.A.B.A.	5	0	3	2
Chaco	26	1	15	9
Córdoba	6	0	7	1
Corrientes	19	0	8	2
Formosa	33	0	13	2
Misiones	40	s/d	s/d	s/d
Salta	9	1	1	3
San Luis	0	0	0	0
Santa Fe	20	0	6	s/d
Tucumán	19		10	4
Total	203	2	75	34

Pie de tabla MB: Multibacilar, PB: Paucibacilar, CN: casos nuevos. DG2: Discapacidad grado 2.

En la Provincia de Misiones los registros de la Dirección de Epidemiología informan 46 casos acumulados en el año 2011 y 22 casos en el año 2012, correspondiendo al Hospital de Eldorado el 30% de los casos notificados^{14,107}. De acuerdo con los datos extraídos del SiViLa (Sistema de Vigilancia Laboratorial) y del SNVS (Sistema nacional de Vigilancia en Salud, Ministerio de Salud de la Nación), el Servicio de Laboratorio del Hospital SAMIC de Eldorado entre el 1 de enero del 2011 al 30 de abril de 2014 diagnosticó 41 casos de lepra.

I.1.9. ANTECEDENTES CONTROL.

La detección temprana y el tratamiento completo constituyen los principios fundamentales del control de la enfermedad.⁹⁹

Más de 15 millones de enfermos de lepra han sido tratados y curados después de la introducción de la multiterapia (MT) en 1982,⁹⁹ dando lugar a una reducción significativa en la prevalencia de la enfermedad, de 5,4 millones de casos a unos cientos de miles actualmente.

En 1991 la 44ª Asamblea Mundial de la Salud aprobó la Resolución WHA44.9 en la que se estableció el compromiso de eliminar la lepra como problema de salud pública para fines del año 2000. La estrategia principal para esto era la administración regular de multiterapia (MT) a todos los casos detectados, con lo cual se logra la curación del paciente y se reduce la transmisión (WHO estrategia global).¹⁰⁸

La meta de eliminación de la lepra, definida como una prevalencia menor de 1 por 10.000 habitantes, efectivamente se alcanzó a nivel mundial en el año 2000 y el número de casos nuevos detectados anualmente ha tenido desde entonces un descenso constante, con una considerable reducción de la carga de enfermedad por lepra tanto en el mundo, como en la región de las Américas.

A estos logros contribuyó también la “*Estrategia Global para Reducir aún más la Carga de la Lepra y Sostener Acciones de Control (2006-2010)*” que fue revisada por la Organización Mundial de la Salud en 2011, dando lugar a la “*Estrategia Global Mejorada para Reducir aún más la Carga de Enfermedad por Lepra 2011-2015*”.

A pesar de ello en el 2015 se registraron 210.758 casos nuevos en 106 países que notificaron.⁹⁹ En abril de 2016 se publica el documento: *The Global Leprosy Strategy 2016–2020: “Accelerating towards a leprosy-free world”*, que asume una estrategia basada en la inclusión de los pacientes proponiendo políticas en contra de la discriminación.¹⁴

I.2. ALCANCES Y DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

La lepra es una enfermedad curable. Si se trata en las primeras fases, se evita la discapacidad. Si no se trata, puede causar lesiones progresivas y permanentes en la piel, los nervios, las extremidades y los ojos. El diagnóstico precoz y el tratamiento con multiterapia siguen siendo los elementos fundamentales para lograr que la enfermedad deje de ser un problema de salud pública.¹⁰

Dentro de las acciones propuestas para controlar la enfermedad, disminuir el número de casos y reducir la transmisión de la enfermedad se propone reforzar y expandir la cobertura de búsqueda de contactos de personas que tienen lepra y asegurar que los casos nuevos detectados reciban MT e implementar acciones de monitoreo del cumplimiento del tratamiento en las cohortes de pacientes.

En nuestro país, la magnitud de la endemia es moderada y la morbilidad

global por lepra es baja comparada con otras enfermedades transmisibles, su importancia como problema de salud pública está dada por las discapacidades físicas y sociales, permanentes y progresivas que produce, de no mediar un diagnóstico precoz y un tratamiento oportuno, regular y completo.¹⁰⁴

Si bien, la meta de eliminación en Argentina se alcanzó a través del Programa Nacional de Lepra aunque persisten regiones del norte de Argentina incluido Misiones donde la prevalencia es superior a lo señalado por OMS y resulta necesario aplicar estrategias intensificadas de prevención y control.¹⁰⁴

El elevado número de casos detectados en la zona norte de la provincia, no sorprende considerando su ubicación geográfica limítrofe con dos países, con altas tasas de incidencia.

En la estructura sanitaria de la Provincia de Misiones existe un Programa parcial de control de la Lepra, que responde a los lineamientos generales del Programa Nacional de Control de esta enfermedad; sin embargo, las acciones de seguimiento de los pacientes y estudio en los convivientes no se realiza, no existen acciones coordinadas entre el Hospital que efectúa el diagnóstico e instaura el tratamiento, y el primer nivel de atención (Caps) para el control de los pacientes y la transmisión de la enfermedad entre sus contactos.

La información aportada es parcial. Se desconocen las tasas de incidencia, los índices de casos nuevos detectados las edades de los pacientes, las presentaciones clínicas de la enfermedad, No se conocen antecedentes de estudios de diagnóstico en los convivientes de los pacientes ya que no existen protocolos de trabajo que normalicen los procedimientos una vez detectado el caso índice, a pesar que es uno de los elementos indispensables para el control de la enfermedad.

Esta situación dificulta la aplicación de acciones destinadas a lograr un mejor control de los casos una vez que han aparecido y prevenir la aparición de nuevos eventos.

Se plantea así un conjunto de incógnitas sobre este tema fundamentales para encausar la presente investigación: ¿Cuál es la dimensión de esta patología en la región? ¿Qué presentaciones clínicas se observan en los casos diagnosticados? ¿Qué edades tienen los pacientes? ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de técnicas utilizadas para hacer el diagnóstico? ¿Qué pasa con los convivientes de estos casos? ¿Hay casos de lepra no diagnosticados entre los mismos? ¿Hay transmisión intrafamiliar?

I.3. OBJETIVOS

I.3.1. OBJETIVO GENERAL.

Describir el comportamiento epidemiológico de la lepra, en pacientes atendidos en el Hospital SAMIC de Eldorado, durante un período de cinco años.

I.3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1) Describir el estado de los casos diagnosticados en el hospital entre 2011 y 2015.
- 2) Calcular la concordancia entre las pruebas diagnósticas utilizadas
- 3) Estudiar a sus convivientes intra-domiciliarios buscando signos y síntomas de enfermedad y mediante pruebas diagnósticas.
- 4) Realizar un estudio de transmisión de lepra mediante hisopado nasal a pacientes y convivientes incluidos en el estudio.

CAPITULO II. CUERPO DE DESARROLLO DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

II. 1. PROPUESTA METODOLÓGICA.

II.1.1 Tipo de estudio y diseño.

Se realizó un estudio descriptivo longitudinal de corte transversal, que consistió en recoger todos los casos de lepra, de pacientes atendidos por esta patología en el Hospital SAMIC de Eldorado entre 1° de enero de 2011 y 31 de diciembre de 2015, con un acumulado total de 5 años de vigilancia. Para el estudio se procedió a la búsqueda de los pacientes diagnosticados en los registros del hospital. Con los datos recolectados y una vez ubicados los domicilios, se realizó una visita. En la misma se explicó detalladamente los procedimientos y objetivos del proyecto y se le invito a participar.

II.1.2 Universo y población objetivo.

Fueron susceptibles de participar en el estudio a toda persona residente en el área de acción del Hospital SAMIC de Eldorado.

II.1.3. Definiciones utilizadas.

Para este estudio se definió como:

Caso: a la persona con diagnóstico de enfermedad,

Sospechoso: A la persona que concurrió solicitando atención a la consulta dermatológica del hospital durante el transcurso del presente estudio.

Conviviente: Aquella persona que cohabitó en el mismo domicilio que el paciente caso durante 5 años o más previos a la realización del estudio.

II.1.4. Criterios de inclusión.

Fueron incluidos en el estudio pacientes diagnosticados desde el año 2011 y los pacientes que concurrieron por primera vez a la consulta hospitalaria (sospechosos) y se les hizo el diagnóstico.

Pacientes, sospechosos y convivientes que aceptaron participar del estudio y firmaron el consentimiento informado en nombre propio o como padre/madre/tutor.

II.1.5. Criterios de exclusión.

Toda persona que no haya consultado al hospital de Eldorado y se atienda en el sector privado de salud. Paciente, sospechoso o conviviente que no aceptó participar en el estudio y/o no firmó el consentimiento informado.

II. 1.6. Aspectos éticos.

Se trabajó con la autorización del comité de Ética del Hospital Público Provincial de Pediatría de la Provincia de Misiones, y el comité de Docencia e Investigación del Hospital SAMIC de Eldorado, preservándose la identidad de los pacientes.

Todos los individuos que participaron del presente estudio recibieron información oral y escrita sobre los objetivos del trabajo, los exámenes clínicos y las pruebas de laboratorio (Anexo 1) que se les realizarían, antes de solicitarle la firma de aval al consentimiento informado para participar del mismo (AnexoII).

II. 2. MATERIALES Y METODOS

II. 2.1. Área de estudio.

La provincia de Misiones se encuentra ubicada en el extremo Noreste de la República Argentina, casi la totalidad de sus límites son ríos y posee 1.267 km de frontera internacional que representan más del 80% de sus límites: al Norte y Este limita con Brasil, al Oeste con Paraguay al Sur con la provincia de Corrientes y parte de la república del Brasil. La superficie de la provincia es de 29.801 Km² con una densidad poblacional estimada para 2014 de 39.09 habitantes por km².(ASIS)¹⁰⁹

El clima es de tipo subtropical sin estación seca, las precipitaciones son abundantes lo que trae como consecuencia alta humedad. La temperatura anual media es entre 20 y 21 grados.



Figura 12. Ubicación Geográfica de Misiones.

En la organización territorial, la provincia se encuentra dividida en 75 municipios agrupados en 17 departamentos. La población total es de 1.165.049 habitantes según la Proyección del año 2014 en base al Censo Nacional del año 2010, de los cuales 50.31% son mujeres y el 49.68% son hombres. Con un índice de masculinidad de 1,01 para el año 2014. La esperanza de vida para el quinquenio 2010 a 2015 es: en varones 72,45 años y en mujeres de 79,95 .¹¹⁰

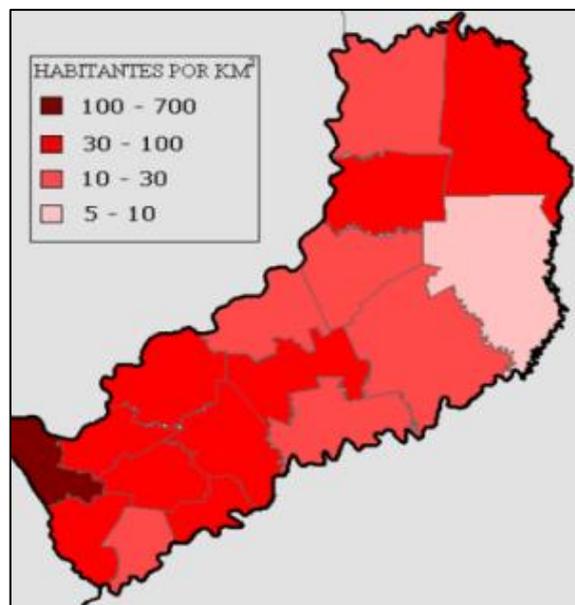


Figura 13. Mapa de Misiones mostrando la densidad poblacional por Km².

El total de la población de la zona Norte Paraná y la Zona Noreste es de 339.043 habitantes a fecha de 2010, que representa el 30,78% de la Provincia.¹¹⁰

II. 2. 1. 1. Dimensión Socio-Económica.

El Índice de desarrollo potencial (IDP) de la provincia es de 63,45% por lo que se puede decir entonces que cada 100 personas que potencialmente son activas hay otras 63 menores de 15 años y mayores de 65 que no lo son y dependen económicamente de aquellas. A nivel departamental son cinco los

departamentos que superan el Índice Provincial llegando al 70%; el departamento con mayor IDP es San Pedro con 77,3%. En la provincia de Misiones el 59,01% de la población es económicamente activa; siendo el mayor exponente el grupo de varones con un porcentaje de actividad del 61,09%. Dentro del grupo de población no económicamente activa las mujeres representan el mayor número en porcentaje con un 68,25% con respecto a 31,75% de los varones.¹⁰⁹

Según la encuesta permanente de hogares urbanos la Tasa de Empleo en las zonas urbanas de la provincia es de 37,1% y la de desocupación de 3,2%. Misiones según los datos del Censo del año 2010, se encuentra entre las provincias con mayor porcentaje de desocupación a nivel nacional.¹⁰⁹

II. 2. 1. 2. Dimensión de la Organización y Repuesta Sanitaria.

A partir del año 2008, Misiones cuenta con 6 Zonas de Salud:

- Zona Capital I: Departamento Capital.
- Zona Sur II: Concepción, Apóstoles, San Javier y L.N. Alem.
- Zona Centro Paraná III: Candelaria, San Ignacio y San Martín.
- Zona Centro Uruguay IV: Oberá, Caingúas y 25 de Mayo.
- Zona Norte Paraná V: Montecarlo, Eldorado e Iguazú.
- Zona Noreste VI: Guaraní, San Pedro y Belgrano.



Figura 14. Zonas Sanitarias y Red de Hospitales según Niveles Riesgo. (ASIS)

En la provincia de Misiones, la proporción de la población que no tiene cobertura de salud o plan privado según el Censo del año 2010 es de 44%, por lo cual su protección de salud está dada exclusivamente por los servicios públicos. De los datos de la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo (ENFR) se desprende que la cobertura general de salud (seguridad social y privada) aumento del 51,8% en 2005 al 66,6% en 2009.¹⁰⁹

II. 2. 1. 3. El Hospital SAMIC de Eldorado.

El Hospital SAMIC de Eldorado integra, con Nivel III, la red sanitaria de la Provincia de Misiones.¹¹¹ Cuenta con 187 camas y constituye el centro de referencia de la zona norte de la provincia, Además de atender pacientes de demanda espontanea, que se trasladan por sus propios medios, recibe pacientes de la Zona Norte Paraná y Zona Noreste a través de la Red de traslados de la Provincia. (Véase la Figura 14).

Fue inaugurado el 24 de abril de 1971 luego de varios años de construcción en el km 10 de la ciudad de Eldorado. Desde sus inicios se constituyó como hospital escuela con residencias médicas. Actualmente atiende 15.000 consultas mensuales, alrededor de 1200 egresos mensuales y casi 800 personas en su plantel de personal.¹¹²

Entre los profesionales que componen el plantel médico hay dos especialistas en dermatología para un área de influencia de 300,000 habitantes, los que atienden, además, pacientes que provienen de los países limítrofes de Paraguay y Brasil.



Figura 15. Hospital SAMIC de Eldorado.

Es el único nosocomio de esta zona donde se realiza diagnóstico de lepra, a nivel tanto bacteriológico como anatomo-histológico. La actividad principal es netamente asistencial y los pacientes concurren muchas veces cursando estadios avanzados de la enfermedad presentando discapacidades.

II. 3. POBLACION DE ESTUDIO

II.3.1. Población.

En el proyecto se incluyeron todos los pacientes atendidos en el Hospital en los que se diagnosticó lepra, fueron visitados en su domicilio, aceptaron participar del estudio, y se les efectuó toma de muestras

II. 3.2. Examen clínico.

II. 3.2. 1. Examen clínico pacientes

Se realizó una revisión dermatológica en busca de lesiones en la piel y/o neurológicas y se le interrogó acerca de: si procede o no de área endémica, antecedentes de contactos con otros enfermos de lepra, el tipo de signo-sintomatología (hiperestesia, hipoestesia, hormigueos, disminución de fuerza, epistaxis, lesiones cutáneas o mucosas) y tiempo de evolución. Tratamientos previamente realizados, como así también enfermedades previas significativas y enfermedades intercurrentes (ANEXO III). Se los clasifico de acuerdo con la clasificación de Ridley y Jopling y según la clasificación operativa propuesta por la OMS.

II. 3.2. 2. Examen clínico convivientes

Para los convivientes se realizó el mismo procedimiento que para los pacientes explicado en el apartado anterior.

En algunos casos se tomaron además muestras para biopsias que fueron conservadas en etanol al 70%.

II.3. 2. 3. Clasificación de los pacientes

Se utilizó la clasificación de Ridley y Joplings para categorizar a los pacientes en **I**: Lepra indeterminada; **TT**: Lepra tuberculoide; **BT**: Bordelaine tuberculoide; **BB**: Bordelaine bordelaine; **BL**: bordelaine lepromatosa y **LL**: lepra lepromatosa.³³ Y además, según la clasificación operativa propuesta por la OMS se los agrupo en **MB** (multibacilar) que comprende a las formas clínicas BB, BI y LL y **PB** (paucibacilar) que comprende a las formas clínica: TT y BT³⁷ (Figura 5).

II. 3.3. Toma de muestra.

1. Si el paciente y/o contacto presentaba lesiones activas: se tomó muestra de linfa del lóbulo de la oreja y de uno o varios bordes de lesiones activas. Si

en algunos casos se consideró pertinente, se tomó una biopsia del borde de una lesión activa.

2. Se tomó muestra de hisopado nasal a todos los pacientes y/o convivientes que aceptaron participar en el estudio.

El algoritmo de trabajo se muestra en la Figura 16 para pacientes y Figura 17 convivientes.

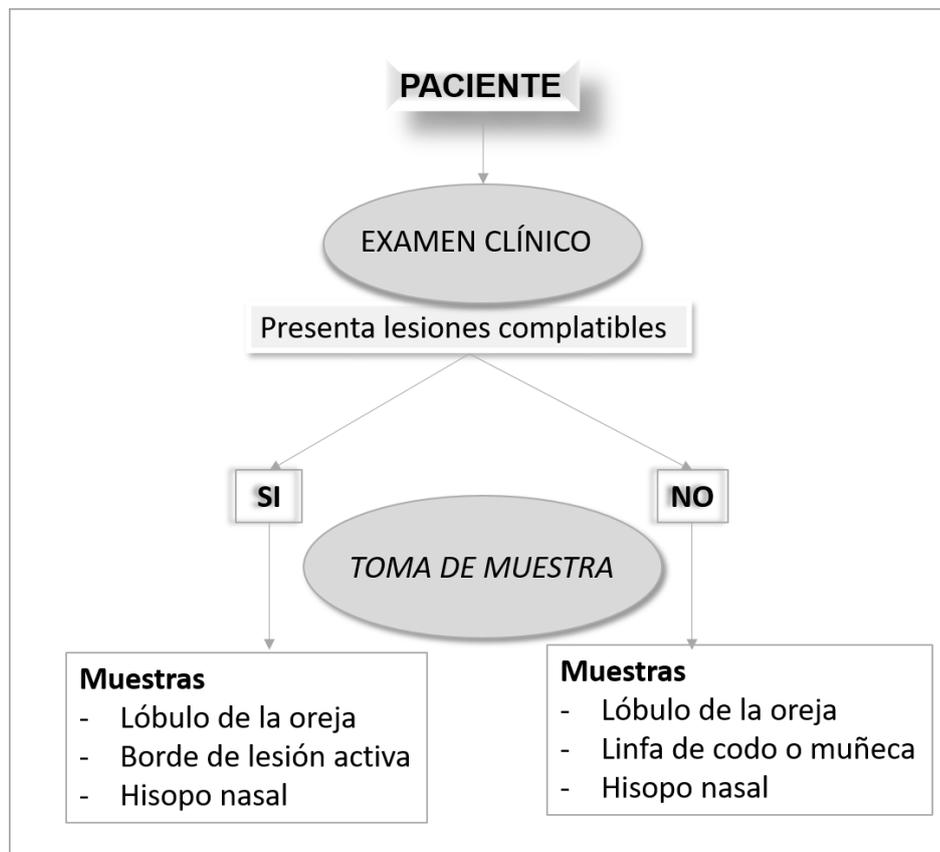


Figura 16. Algoritmo de trabajo para revisión de los pacientes.

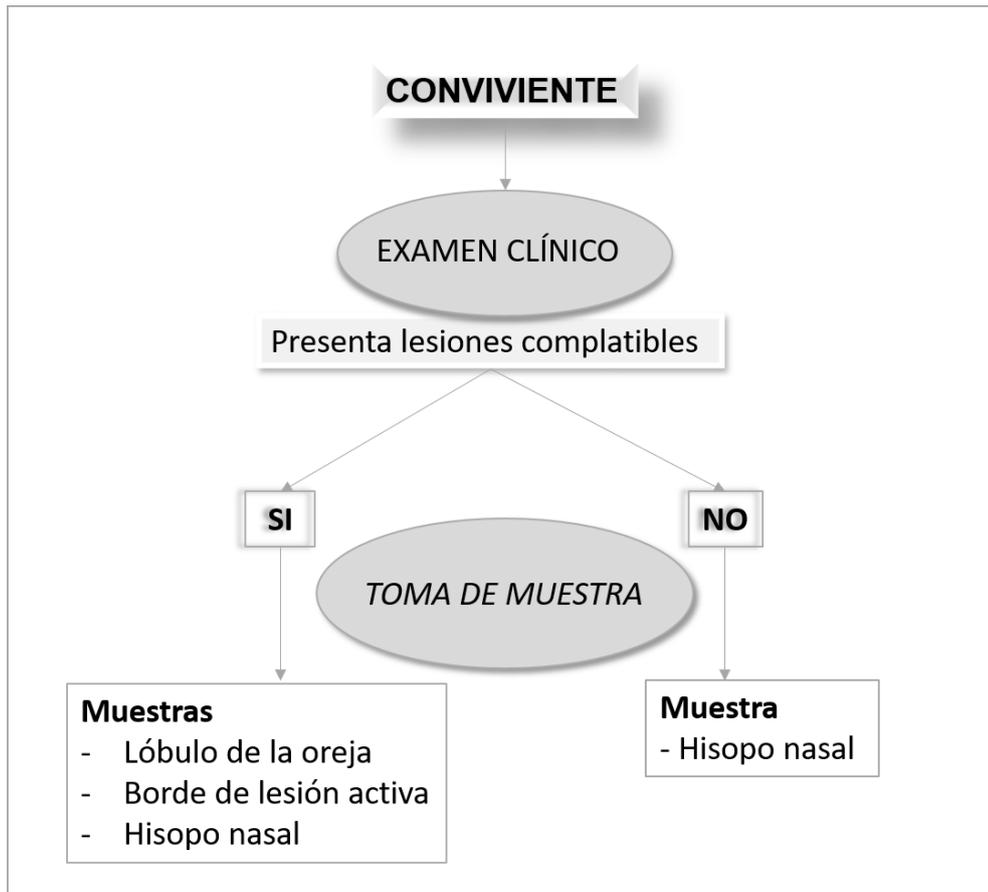


Figura 17. Algoritmos de trabajo para convivientes.

II.3.3.1. Hisopo del lóbulo de la oreja y/o borde de una lesión activa o antigua:

Primero se limpió la zona con etanol al 96%, a continuación, se realizó un pliegue en la piel con los dedos pulgar e índice hasta que la piel se tornó blanca. Se realizó un corte poco profundo con un bisturí desechable y se raspó el fondo y los lados de la incisión para tomar una muestra de linfa y material sólido sin sangre. Esta hoja del bisturí se utiliza para la realización de la baciloscopia, de modo que se extiende la muestra en un portaobjetos³⁹ (ANEXO IV)

II.3.3.2. Biopsia cutánea:

Se tomaron con un sacabocados de 3 a 5 mm de diámetro. Las muestras se conservan en etanol al 70% para su posterior análisis.

II.3.3.3. Hisopado nasal: Se tomó la muestra con hisopo y se conservó en heladera a 4° sin el agregado de ningún conservante hasta su traslado al Sanatorio Fontilles Alicante España donde fueron conservados a -20°C hasta su procesamiento. Se utilizaron hisopos estériles DRYSWAB mango de acero flexible sin conservantes.

II. 3.4. Estudio de las muestras.

Las muestras fueron evaluadas mediante examen directo utilizando la técnica de coloración de Ziehl-Neelsen y por técnicas moleculares mediante PCR anidada (nPCR).

II. 3. 4. 1. Baciloscopia (Ziehl-Neelsen modificado).

Con las muestras de linfa de oreja, nasal y lesión se procedió según la Técnica de Ziehl-Neelsen (ZN).³⁹ Estas muestras se procesaron en el laboratorio del Hospital de Eldorado y en el Sanatorio Fontilles.

Los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) aparecen de color rojo intenso (ANEXO IV).

II. 3. 4. 2. Técnicas moleculares.

En las muestras tomadas de hisopos nasal tras hacer el extendido, extendidos tras Ziehl-Neelsen y a las muestras de biopsias, se usaron para la extracción de ácidos nucleicos y posteriormente se realizó a todas ellas la amplificación mediante PCR anidada de una región del genoma de *M. lepra* de secuencia repetida denominada RLEP. Esta técnica adaptada y modificada de Donoghue *et al* (2001)⁷⁰ fue realizada en el Sanatorio Fontilles, España (Véase el ANEXO V).

II.3.4.3. Análisis de resistencias a antibióticos.

Tras la extracción de ácidos nucleicos y comprobar la amplificación de la región RLEP las muestras fueron sometidas al test cualitativo GenoType Leprae DR® (Hain Lifescience) que mide la resistencia a rifampicina, ofloxacino y dapsona siguiendo las instrucciones del fabricante (ANEXO VI).

II. 3.5. Criterios de positividad.

Se consideraron positivas las muestras en las que se detectó BAAR en las baciloscopias observadas al microscopio óptico y/o en las que se logró amplificar el ADN de *M. leprae* mediante la técnica de PCR.

II.3.6. Recolección de la información.

De cada paciente que cumplía los requisitos indicados, se procedió a llenar los datos correspondientes en una ficha de encuesta. Se recogió información referente al paciente y su infección. Se volcaron en la misma además los resultados obtenidos en el Laboratorio respecto al resultado de los estudios.

A partir de esta información, se consolidó una base de datos en Excel para su ulterior análisis e interpretación.

II.3.7. Variables.

Las definiciones del estudio que se tuvieron en cuenta para recolección y análisis de la información son las siguientes:

Apellido y nombre se consignaron iniciales de apellido y nombre de acuerdo con la historia clínica del paciente.

Domicilio: dirección obtenida de historia clínica y/o documento de identidad.

Registros de Aps.

Edad: se tomó a partir de la fecha de nacimiento que constaba en el documento y si no poseía documento de identidad, de lo expresado por el mismo.

Género: de acuerdo con el documento de identidad.

Historia clínica: número asignado por el hospital.

Fecha de diagnóstico: de la historia clínica y de los registros de laboratorio.

Tiempo de evolución de la enfermedad: de lo expresado por el paciente a partir de los primeros síntomas y de la historia clínica del hospital.

Resultado de baciloscopia: se determinó como **positiva** la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en las muestras procesadas en el laboratorio del hospital Samic y/o en el sanatorio Fontilles. **Negativo:** ausencia de bacilos ácido alcohol resistente

Resultado de la histología: de acuerdo con el informe del servicio de Anatomía Patológica del hospital. **Compatible** con lepra o **Incompatible** de acuerdo con a la presencia o ausencia de cambios histológicos que se observaron en la biopsia.

Resultado de técnicas moleculares: del informe del sanatorio Fontilles. Presencia o ausencia de genoma bacteriano.

Tipo de lepra: de la evaluación del equipo de salud y de la historia clínica del hospital. Se utilizó la clasificación de Ridley –Joplings

Tratamiento: se utilizaron los medicamentos distribuidos por el programa Nacional de Lepra MB (multibacilar) o PB (paucibacilar)

Estado del paciente al momento del estudio: enfermo o curado. Evaluado por el equipo de salud.

Indicadores que se utilizaron: detección anual de casos nuevos y tasa de detección de casos nuevos (por 100.000 habitantes)

Prevalencia o tasa de prevalencia: por 10.000 habitantes.

II. 3.8. Procesamiento de los datos y análisis de resultados.

Con los datos obtenidos del paciente, convivientes y resultados de técnicas de laboratorio, se construyó una base de datos utilizando el programa Excel 2013 (©Microsoft), para el almacenamiento y análisis univariado y bivariado de datos, así como la construcción de los gráficos. Para calcular el índice Kappa o Kappa de Cohen se usó el programa se analizaron los resultados empleando tablas de contingencia de 2x2 para evaluar la concordancia entre métodos, tomando un nivel de significación de 0,05. Para realizar este cálculo fue necesario emplear el programa Epidat© 4.1.

Los valores del Índice de Kappa fueron interpretados como: < 0,00 no concuerdan; 0,00–0,20, leve concordancia; 0,21–0,40, concordancia pasable; 0,41–0,60, concordancia moderada; 0,61–0,80, concordancia considerable; 0,81–1,00, concordancia casi perfecta.¹¹³

II. 3.9. Notificaciones al sistema sanitario.

Todos los pacientes diagnosticados fueron notificados al SiViLa (Sistema de vigilancia de laboratorios) del SNVS (Sistema nacional de vigilancia en Salud), Ministerio de Salud de la Nación, información a la que tiene acceso también el Ministerio de Salud de la Provincia de Misiones.

III. RESULTADOS

III.1 Estudio de pacientes.

Se estudiaron 37 pacientes (casos) que concurrieron por demanda espontánea al hospital o fueron derivados de los centros de salud y a los que se diagnosticó la enfermedad y recibieron o se encontraban en tratamiento. Trece fueron detectados en el último año y 24 pertenecían al grupo de 41 casos diagnosticados entre 2011 y 2014 a los que se logró visitar en sus domicilios.

La tasa de detección de casos nuevos en el Hospital SAMIC de Eldorado fue de **4,3 casos/100.000** habitantes por año. La tasa de prevalencia más elevada se obtuvo en el departamento de Montecarlo y la más baja en el de General Belgrano, variando entre $2,17/10^4$ y $0,7/10^4$ habitantes respectivamente (Figura 18).

Doce de los pacientes provenían de Eldorado, cinco de Puerto Esperanza, cuatro de Puerto Iguazú, cuatro de Montecarlo y cuatro de Puerto Piray. Los demás estaban radicados en distintas localidades del norte de la provincia. (Figura 18)

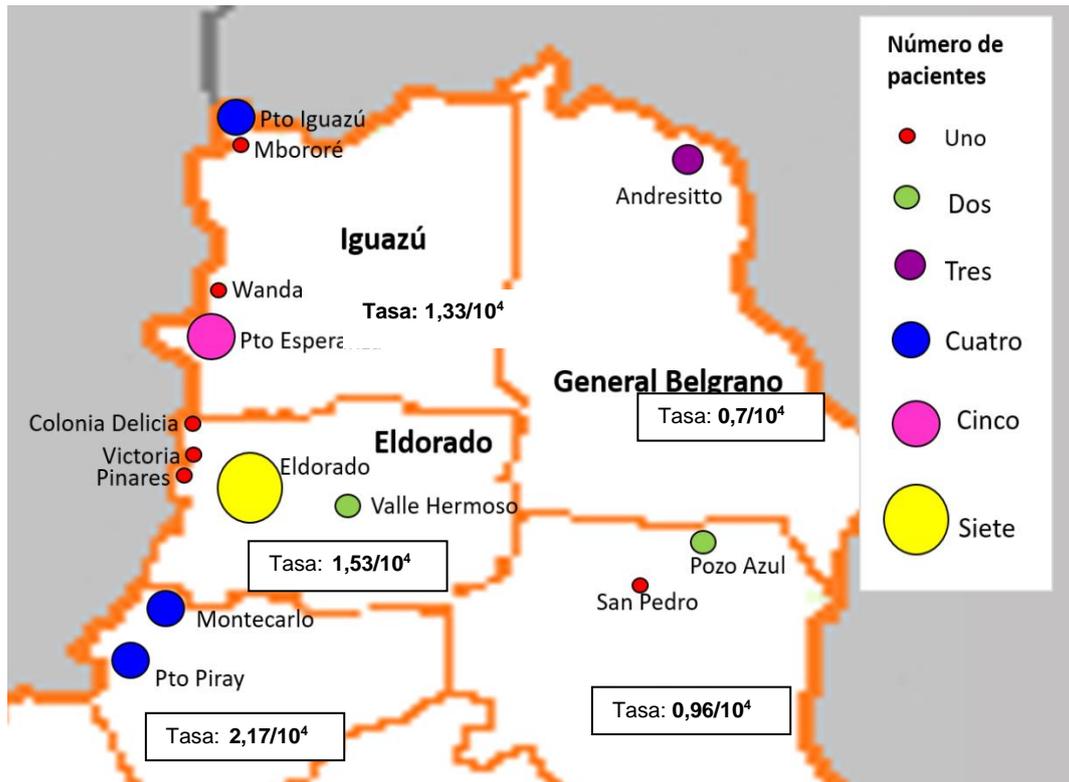


Figura 18. Mapa de distribución de casos por localidades y Tasas de lepra por departamento expresadas por 10.000 habitantes. Población por Departamento: Iguazú: 82.227, Gral Belgrano: 42.902, Eldorado: 78.211, Montecarlo: 36.745, San Pedro: 31.051. Inst Nac de Censo 2010

Los pacientes tenían entre 12 y 74 años, con una media de 44,7 años. El 91,9% (34/37) de ellos eran mayores de 35 años y solo 1 era menor de 15 años. Veinte (54%) eran hombres y 17 mujeres (46%) en una proporción M:F de 1,17:1 (Figura 19).

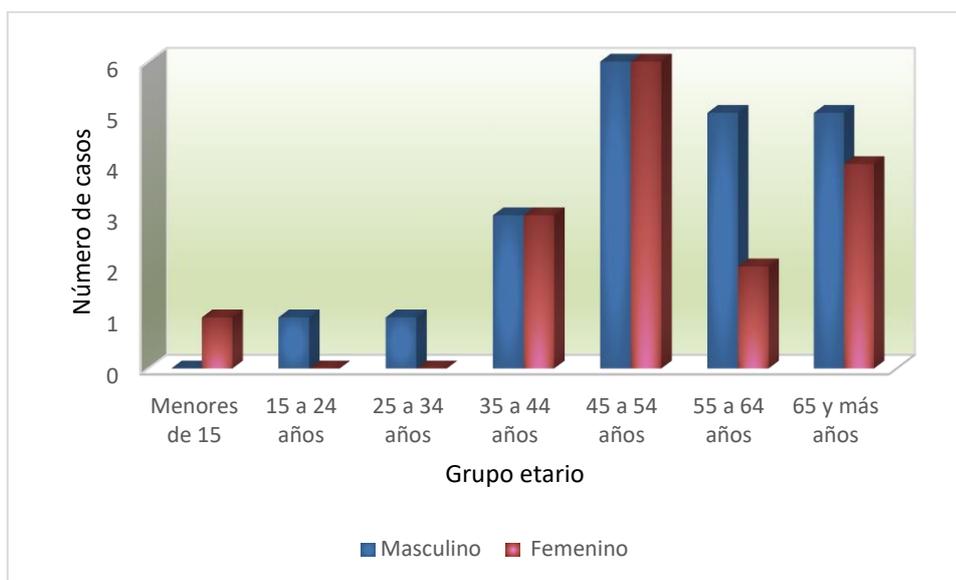


Figura 19. Distribución de casos conforme a género y grupos etarios.

Al momento de la detección del caso, observamos que el 32,5% de ellos residían en el Departamento Eldorado, donde el 76% tenía más de 45 años como puede apreciarse en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de casos por género y edad según los departamentos de residencia

Departamento	Menores15	15-24	25-34	35-44	45-54	55-64	+65	Total Pacientes (%)
	F/M							
P. Iguazú	-	0/1	0/1	0/1	2/3	0/2	0/1	11 (29,7)
Gral Belgrano	-	-	-	-	1/0	1/0	1/0	3 (8,1)
Eldorado	1/0	-	-	2/1	2/0	1/2	1/2	12 (32,5)
San Pedro	-	-	-	-	0/1	-	1/1	3 (8,1)
Montecarlo	-	-	-	1/1	1/2	1/0	1/1	8 (21,6)
Total	1/0	0/1	0/1	3/3	6/6	3/4	4/5	37 (100)

Pie de tabla. P Iguazú: Puerto Iguazú, Gral Belgrano: General Belgrano, F: Femenino, M: Masculino.

El 91,9% (34) de los pacientes presentaron lepra en su forma lepromatosa o multibacilar (2 casos BL; 32 casos LL), 2 (5,4%) en la forma tuberculoide o

paucibacilar (1 caso TT; 1 casos BT) y 1 (2,7%) de lepra indeterminada. La distribución de estos casos clasificados según Ridley y Joplings conforme al departamento de residencia se detalla en tabla 6.

Tabla 6. Distribución de pacientes con lepra según el departamento de residencia y el tipo de lepra.

Departamento	LL	BL	BT	TT	LI	Nº de casos (%)
P. Iguazú	10	-	-	-	1	11 (29,7)
Gral Belgrano	2	1	-	-	-	3 (8,1)
Eldorado	10		1	1	-	12 (32,5)
San Pedro	3	-	-	-	-	3 (8,1)
Montecarlo	7	1	-	-	-	8 (21,6)
Total	32 (86,5)	2 (5,4)	1 (2,7)	1 (2,7)	1 (2,7)	37 (100)

Pie de tabla. LL: Lepra lepromatosa, BL: Borderlaine lepromatosa, BT: Borderline tuberculoide, TT: Tuberculoide, LI: Lepra Indeterminada, P: Puerto, Gral: General.

La edad y género de los pacientes implicados en los casos de lepra según la clasificación operacional de la OMS se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Distribución de casos de lepra según la clasificación de la OMS y la edad de los pacientes n (%).

Edad años	Multibacilar		Paucibacilar		LI		Total
	F	M	F	M	F	M	
<15	-	-	1	-	-	-	1 (2,7)
15-24	-	1	-	-	-	-	1 (2,7)
25-34	-	1	-	-	-	-	1 (2,7)
35-44	3	2	1	-	-	-	6 (16,2)
45-54	6	5	-	-	1	-	12 (32,5)
55-64	3	4	-	-	-	-	7 (18,9)
+65	4	5	-	-	-	-	9 (24,3)
Total (%)	16 (43,2)	18 (48,6)	2 (5,4)	0	1 (2,7)	0	37 (100)

Pie de tabla. LI: lepra indeterminada, F; femenino, M: masculino.

El 52,8% (19/36) de las muestras procesadas por la técnica de baciloscopia resultaron positivas (Tabla 8), y en el 36% (9/25) de los frotis se logró detectar la presencia de ADN de *M. leprae* por PCR. (Tabla 9). La presencia del bacilo *M. leprae* se pudo detectar en 26 de 36 (72,2%) pacientes (Tabla 10).

Tabla 8. Resultados de la técnica de baciloscopia según el lugar de toma de muestra.

Tipo de lepra	BAAR Oreja pos/total (%)	BAAR Codo pos/total (%)	BAAR Lesión pos/total (%)	Total pos/total (%)
I	0/1 (0)	0/1 (0)	-	0/1 (0)
TT	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)	0/1 (0)
BT	0/1 (0)	0/1 (0)	-	0/1 (0)
BB	-	-	-	-
BL	2/2(100)	2/2 (100)	-	2/2 (100)
LL	17/31 (54,8)	14/27 (51,8)	0/4 (0)	17/31 (54,8)
Total	19/36 (50)	16/32 (50)	0/5 (0)	19/36 (52,8)

Pie de tabla. BAAR: bacilos ácido-alcohol resistentes, Pos: Positivo, LI: Lepra indeterminada, TT: Lepra tuberculoide, BT: Bordeline tuberculoide, BI: Bordeline lepromatosa, BB Bordeline bordeline, LL: Lepra lepromatosa. Uno de los pacientes no estaba en el domicilio en el momento del estudio, no se tomó muestras.

Tabla 9: Resultados de la técnica de PCR según lugar de la toma de muestra.

Tipo de lepra	PCR Oreja pos/total (%)	PCR Codo pos/total (%)	PCR Lesión pos/total (%)	Total pos/total (%)
I	-	-	-	-
TT	-	-	-	-
BT	0/1 (0)	0/1 (0)	-	0/1 (0)
BB	-	-	-	-
BL	-	-	-	-
LL	7/23 (30,4))	2/9 (22,2)	2/13 (15,4)	9/24 (37,5)
Total	7/24 (29,1)	2/10 (20)	2/13 (15,4)	9/25 (36)

Pie de tabla. Pos: Positivo, LI: Lepra indeterminada, TT: Lepra tuberculoide, BT: Bordeline tuberculoide, BI: Bordeline lepromatosa, BB Bordeline bordeline, LL: Lepra lepromatosa. Uno de los pacientes no estaba en el domicilio en el momento del estudio, no se tomaron muestras.

Tabla 10. Resultados de las técnicas de laboratorio en las muestras tomadas a los pacientes clasificados según Ridley y Joplings.

Tipo de lepra	Baciloscopia pos/total (%)	PCR frotis pos/total (%)	HISTO	PCR Biopsia pos/total (%)	PACIENTES pos/total (%)
I	0/1 (0)	-	1/1 (100)	-	1/1 (100)
TT	0/1 (0)	-		1/1 (100)	1/1 (100)
BT	0/1 (0)	0/1 (0)		-	0/1 (0)
BB	-	-		-	-
BL	2/2 (10)	-	1/1 (100)	-	2/2 (100)
LL	17/31 (54,8)	9/24 (37,5)		2/2 (100)	22/31 (74,2)
Total	19/36 (52,8)	9/25 (36)	2/2 (100)	3/3 (100)	26/36 (72,2)

Pie de tabla. Pos: positivo, HISTO: Histopatología, LI: Lepra indeterminada, TT: Lepra tuberculoide, BT: Bordeline tuberculoide, BI: Bordeline lepromatosa, BB Bordeline bordeline, LL: Lepra lepromatosa. Uno de los pacientes (LL) no estaba en el domicilio en el momento del estudio, no se tomaron muestras.

En el paciente con Lepra Indeterminada, según histopatología, la PCR realizada a partir del hisopado nasal resultó positiva a pesar de no observarse los bacilos en el frotis.

De los 24 pacientes antiguos, 13 fueron considerados positivos mediante baciloscopia y/o PCR. Nueve continuaban positivos por baciloscopia. En cuatro se logró detectar ADN de *M. leprae* en las muestras (PCR del frotis). Un paciente fue positivo por PCR en biopsia, baciloscopia y PCR del frotis simultáneamente.

De los 13 sospechosos que acudieron a consulta por primera vez durante el transcurso del estudio, en 10 se observaron BAAR en la baciloscopia, en 3 se logró detectar ADN por PCR en el frotis, en 2 se detectó ADN en el material

extraído por biopsia (aunque las otras técnicas dieron negativas, excepto la histopatología) y los otros 2 lo fueron por histopatología.

En 25 casos se analizaron muestras por ambas técnicas (baciloscopia y PCR), hallándose una concordancia del 12% (índice Kappa del 0,12), con resultados estadísticamente no significativos (Tabla 11).

Tabla 11. Tabla de doble entrada de los comparados de la técnica de baciloscopia con la técnica de PCR.

	PCR +	PCR-	Total n (%)
BAAR+	5	7	12 (48)
BAAR-	4	9	13 (52)
Total n (%)	9 (36)	16 (64)	25 (100)

Pie de tabla: BAAR: Bacilos ácido-alcohol resistentes.

Tabla 12. Resultados de la técnica de PCR comparados con la baciloscopia.

	Valor	IC 95%	
Sensibilidad (%)	55,56	17,54	93,57
Especificidad (%)	56,25	28,82	83,68
Índice de validez (%)	56,00	34,54	77,46
Valor predictivo + (%)	41,67	9,61	73,73
Valor predictivo - (%)	69,23	40,30	98,17
Prevalencia (%)	36,00	15,18	56,82
Índice Kappa	0,12	-0,29	0,52

Pie de tabla. +: Positivo, -: Negativo, IC 95%: Intervalo de confianza al 95%.

En tres de cuatro pacientes en los que, por sospecha clínica de resistencia al tratamiento y/o recidiva de la enfermedad se efectuó biopsia de la lesión, se detectó la presencia del patógeno por PCR (Véase la Tabla 12).

En dos de estos pacientes, se realizó el test GenotypeLepraeDR, amplificándose la diana para el genotipo salvaje, indicando que en estos pacientes el *M. leprae* detectado era sensible a rifampicina, dapsona y ofloxacino.

III.2 Estudio de convivientes.

Entre las 37 familias se registraron 106 convivientes. Una de las familias estaba constituida por 12 convivientes y dos pacientes vivían solos, con un promedio de 3,5 convivientes/ familia (Tabla 13).

Tabla 13. Número de convivientes por familia.

Nº convivientes	Nº de familias
s/convivientes	2
1-4 convivientes	24
5-8 convivientes	9
9-12 convivientes	2
Más de 12	0

Pie de tabla. Nº: Número, S/convivientes: Sin convivientes.

Los convivientes tenían entre 2 y 71 años, con una media de 23 años. El 61,3% (65) eran mujeres (Figura 20 o Tabla 14)

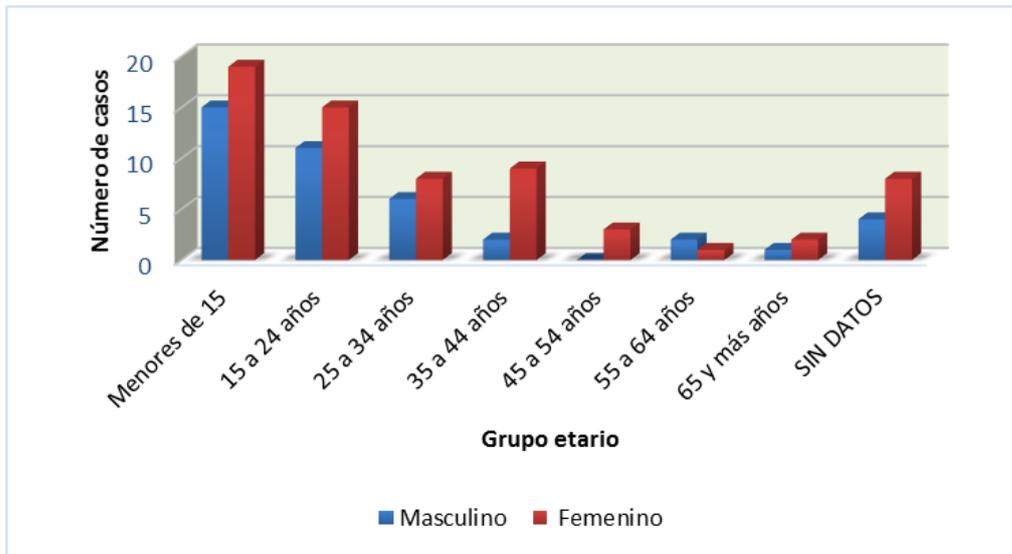


Figura 20. Distribución del número de convivientes por sexo y grupo etario.

Tabla 14. Distribución por edades y sexo de los convivientes

Edad (años)	Femenino	Masculino	Nº de convivientes
Menores de 15	19	15	34
15 a 24 años	15	11	26
25 a 34 años	8	6	14
35 a 44 años	9	2	11
45 a 54 años	3	0	3
55 a 64 años	1	2	3
65 y más años	2	1	3
Sin especificar	8	4	12
Totales	65	41	106

Al llevar a cabo la revisión dermatológica de los mismos, se observó clínica compatible en 17 de ellos. Todos eran convivientes de pacientes con LL. De estos, 4 fueron positivos por baciloscopia y/o PCR. En 3 (17%) se observaron

BAAR en la baciloscopia y en 2 se detectó ADN de *M. leprae* en los frotis. Uno de los positivos por PCR fue negativo por baciloscopia.

Los convivientes que resultaron diagnosticados fueron: 3 mujeres (33, 39 y 33 años) y 1 hombre (64 años). Tres fueron categorizados como LL y uno como LI, iniciado la multiterapia con la pauta descrita en cada caso.

III.3 Estudio de transmisión.

Para el estudio de transmisión de la lepra se tomaron 131 hispos nasales (31 pacientes y/o sospechosos y 100 convivientes). Se detectó ADN de *M. leprae* en 26,7% (35/131) de los individuos estudiados. El 67,8% (21/31) de los pacientes y/o sospechosos y el 14% (14/100) de los convivientes estudiados resultó ser portador nasal de este germen. De las 37 familias estudiadas, en 24 se demostró la transmisión de enfermedad intra-familiar.

De los 22 pacientes estudiados 13 (59%) resultaron positivos. De estos portadores, 9 resultaron positivos además por baciloscopia y/o PCR (extendido y/o biopsia).

Por otro lado, de los 9 sospechosos, 8 (88,9%) estaban transmitiendo el bacilo a través de la mucosa nasal y resultaron positivos por alguna de las pruebas diagnósticas llevadas a cabo (baciloscopia, PCR de extendido o biopsia), y fueron finalmente diagnosticados de lepra: 5 como LL, 2 como BL y uno fue clasificado como TT. El caso negativo fue clasificado como una lepra indeterminada diagnosticada por histopatología.

De los catorce convivientes portadores del bacilo (PCR de hispos nasales positivos), 13 eran convivientes de pacientes LL y uno de un paciente BL (Tabla 15). Todos eran portadores asintomáticos salvo uno que presentó sintomatología compatible y el resto de pruebas diagnósticas realizadas positivas.

Estos catorce convivientes se encontraban en 9 familias diferentes y principalmente eran familiares de primer grado (9 eran hijos del paciente en siete de las familias), en 2 de ellas sus cónyuges y uno era la actual pareja de un ex cónyuge (sin existencia de consanguinidad).

Tabla 15: Familias en las que la enfermedad se detecta en más de un integrante.

Familia	CASO ÍNDICE FAMILIAR					CONVIVIENTE		
	Sexo	Tiempo de evolución	Edad del paciente	PRESE NTAC CLINIC A	Tratamiento	Parentesco CON CASO ÍNDICE	Edad del conviviente	Presentación clínica
1	Fem	29 años	61	LL	abandono	hija	39	LL
						hijo	38	LL
2	Fem	5	59	LL	completo	esposo	64	LL
3	Masc	5	55	LL	completo	esposa	53	LL
4	Masc	Desconocido	77	LL	completo	hija	44	LL
5	Masc	10	40	LL	completo	hija	12	BL
6	Fem	10	67	LL	Sin tto	hija	39	LL
7	Fem	10	71	LL	Sin tto	hija	33	BT

IV. DISCUSIÓN

La campaña de eliminación de la lepra patrocinada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reducido con éxito la tasa de prevalencia de la enfermedad a menos de un caso por cada 10.000 habitantes en todo el mundo, pero el número de nuevos casos en países endémicos ha permanecido estable o aumentado ¹¹⁴. A la luz de este programa, algunos estudios han enfatizado la necesidad de identificar a los pacientes índices y tratarlos como una prioridad, especialmente en áreas con bajas tasas de incidencia¹¹⁵. Sin embargo, otros señalan la preocupación de que se pueda interrumpir el seguimiento de contactos y otras iniciativas, aumentando el número de pacientes infecciosos ¹¹⁷.

La tasa de detección anual obtenida en este estudio: $4,3/10^5$ habitantes es superior a la denunciada para Argentina (total país: $0,84/10^5$ habitantes), la provincia de Corrientes: $1,83/10^5$ e incluso Misiones: $3,59/100.000$ ¹⁰⁴. Esto nos permite plantear que el norte de nuestra provincia se constituye en un bolsón endémico con una carga de la enfermedad mayor que en el resto del país y la región ¹⁰⁴, a pesar de que la mayoría de los cálculos de incidencia y prevalencia de lepra probablemente son menos precisos que los de otras enfermedades, ya que los estigmas que se asocian a su diagnóstico y la detección de la lepra asintomática puede resultar difícil¹¹⁷.

Esta tasa se ubica entre la denunciada para la región sur de Brasil, que limita con nuestra provincia: $3,57/100.000$ ^{101,102} y la denunciada por Paraguay, que estimo para el año 2015 un coeficiente de detección de $6,26/10^5$ habitantes.

Observamos que los departamentos con mayor prevalencia corresponden a los que limitan con Paraguay (Figura 18). Esto puede deberse al amplio intercambio que ocurre entre los dos países. En ciertas familias algunos de sus miembros, sobre todo las personas mayores, viven alternativamente en uno u otro país y muchos de los pacientes incluidos vivieron parte de su infancia en Paraguay o el sur de Brasil. Esta hipótesis es respaldada cuando se analizan las tasas de detección de casos nuevos y prevalencia del vecino país, donde el departamento Alto Paraná, que limita al oeste con nuestra provincia

(Departamentos de Iguazú, Eldorado y Montecarlo), se constituyo en 2013, en uno de los departamentos con valores más elevados ¹⁰¹

Por otra parte, cuando se compara con el vecino país de Brasil es el estado de Paraná (que limita con los departamentos de Iguazú y General Belgrano (Misiones) el que mantiene históricamente una elevada incidencia de la lepra a pesar de ser la región sur la de más bajas tasas en el país¹¹⁸.

La distribución geográfica del lugar actual de domicilio demostró mayor número de casos en las poblaciones con más habitantes por departamento: Eldorado y Puerto Iguazú, aunque se desconoce la asignación por lugar de nacimiento y donde vivieron la mayor parte de sus vidas. Las ciudades de Puerto Iguazú y Foz do Iguazú conforman un lugar particular en la región. El tránsito de personas de una ciudad a otra es cotidiano, ya sea por razones familiares, comerciales y/o laborales, lo que puede explicar las tasas elevadas en ambas ciudades ¹¹⁸.

Se observa un reparto de casos a lo largo de las principales carreteras que comunican con el hospital, la ruta nacional 12 y ruta principal N°17 (más accesible para la consulta) lo que puede explicarse porque los pacientes concurren por demanda espontanea o enviados a interconsulta para especialista en dermatología.

El género es relevante en los pacientes adultos: a diferencia de lo que sucede en los niños, en los que no hay diferencias en la prevalencia entre los dos sexos, los varones adultos tienen el doble de probabilidad de desarrollar la enfermedad que las mujeres adultas ¹¹⁹.

La proporción hombres/mujeres encontrada (1,17/1) en este trabajo es menor al resto de Latinoamérica, y el mundo donde la lepra afecta en general entre 1,8¹²⁰ y 2 hombres por cada mujer infectada¹²¹. Esta menor proporción de hombres detectados del esperado podría deberse a concepciones culturales de la región, donde es en general es la mujer la que se acerca con mayor frecuencia a los sistemas de salud.

La probabilidad de desarrollar la enfermedad está determinada por diversas variables. La edad es un factor importante, ya que la enfermedad clínica presenta una distribución bimodal: los adolescentes entre 10-19 años son los más sensibles, seguidos por un segundo pico de incidencia a la edad de 30 años ¹²²

En nuestra región el 2,7% de los casos eran menores de 15 años señalando focos de infección activos y recientes. Este porcentaje es similar al 3,3% informado en Paraguay (2015), pero menor al 7,5% notificado en Brasil (2014) para esta época ⁹⁹.

La mayoría de los pacientes estuvo comprendido al igual que lo que se refiere en Brasil ¹²³ y Cuba ¹²⁰ en el grupo etario de 45 a 54 años.

La clasificación de Ridley-Jopling³³ incluye un amplio espectro de respuestas inmunes a *M. leprae*. Estas respuestas se subdividen en dos clasificaciones operacionales: pacientes paucibacilares (PB), caracterizados por una fuerte hipersensibilidad retardada a la prueba de Mitsuda y pacientes multibacilares (MB), caracterizado por títulos elevados de anticuerpos y grados decrecientes de respuestas inmunitarias mediadas por células que se aproximan a la anergia ¹²³.

El 91,8 % del total de pacientes con lepra en nuestra región presentaron formas multibacilares y el 86,5% lepra lepromatosa, en concordancia con lo informado por investigadores brasileros ^{125 126 127}. Los mismos hallaron que las formas multibacilares variaron entre un 67,2% ¹²⁶ en Matto Grosso do Sul, 72,9 % ¹²⁵ en el estado do Maranhao y un 98,8% de los casos¹²⁷ en Bello Horizonte.

En los países desarrollados, a diferencia de lo observado en este estudio, predominan las formas tuberculoides ¹²⁸.

Como puede observarse en las tablas 6 y 10 el porcentaje de multibacilares en pacientes adultos de ambos géneros y de todos los departamentos es muy alto, señalando esto un gran desafío para el sistema de salud ya que es sabido que el riesgo de desarrollar la enfermedad entre los contactos es mayor con

pacientes multibacilares¹²⁹. Sin embargo, los pocos pacientes con formas paucibacilares e indeterminadas eran del género femenino.

La baciloscopia de *M. leprae* es el ensayo de laboratorio de referencia para determinar la presencia de la enfermedad y su clasificación operativa para fines de tratamiento ¹³⁰.

En nuestro estudio, las muestras para baciloscopia extraídas de oreja y codo contribuyeron en igual proporción al diagnóstico de las formas multibacilares (BL y LL), si bien la presencia de los bacilos solo pudo ser detectada en la mitad de los casos. Debería recalarse que aunque *M. leprae* es ácido-alcohol resistente, es particularmente sensible a la decoloración por alcohol, por lo que la tinción de Ziehl-Neelsen puede dar lugar a resultados falsos negativos¹¹⁷.

La baciloscopia demostró ser eficaz tanto para la detección de esta enfermedad como para el seguimiento de antiguos pacientes al igual que lo demostrado por investigadores de Brasil¹²⁵.

Al igual que lo señalado en la bibliografía ¹³¹ la PCR fue más sensible en los pacientes multibacilares, que en los pacientes con afectación paucibacilar

Las técnicas aplicadas a los especímenes extraídos a los pacientes (baciloscopia y PCR) mostró una leve concordancia entre ambas (Índice Kappa: 12%). Esto podría deberse, entre otras causas, a que el proceso de tinción y transporte pudo degradar el ADN. A pesar que otros investigadores han demostrado la ventaja de la PCR en muestras clínicas^{80,132} incluso en frotis teñidos, en nuestro estudio la baciloscopia presentó mayor sensibilidad para el seguimiento de los pacientes.

Otra explicación a la discordancia entre baciloscopia y PCR podría ser la reciente descripción de otra especie de micobacteria implicada en enfermos *Micobacterium lepromatosis* ¹³³ y su detección en America del Sur ¹³⁴ por lo que

sería de importancia estudiar a estas muestras en particular investigando esta nueva especie.

La técnica de PCR aplicada a muestras tomadas por biopsia y /o raspado de lesiones ha demostrado utilidad para el diagnóstico de la enfermedad en los casos de pacientes con una sola lesión al momento de la consulta ¹³⁵ y podría ser útil, como lo demuestran nuestros resultados, para la confirmación de nuevos casos ya que el índice de concordancia en esta situación fue considerable (72%). Sobre todo, en los casos en los que la baciloscopia fue negativa y se tomó una biopsia de la lesión, situación en la que se detectó la presencia de ADN en el 100% de las muestras.

Más de la mitad de los pacientes que habían sido diagnosticados anteriormente (54,2% (13/24)) y recibieron tratamiento, continuaron siendo positivos por baciloscopia y/o PCR a partir de las muestras de frotis. En 9 de ellos, se puede constatar la presencia de bacilos en la baciloscopia lo que podría indicar abandono del tratamiento, tratamiento incompleto o resistencia al mismo ¹¹⁷. Debemos considerar que en algunos casos, en pacientes tratados previamente, se puede detectar ADN de *M. leprae* por la técnica de PCR, hasta 8 años luego de completar la terapia⁹¹ a pesar que clínica y bacteriológicamente estén curados. Por lo que estos pacientes en los que no se observan bacilos acido-alcohol resistentes en la baciloscopia, deben seguir con las revisiones rutinarias, sin considerar abandono o resistencia al tratamiento.

Debido a la emergencia en el mundo de resistencia a las drogas utilizadas en lepra, en dos de los pacientes se sospechó resistencia a la multiterapia ¹³⁶ Sin embargo, ambos resultaron sensibles a los antibióticos estudiados (Rifampicina, Dapsona y Ofloxacino), pudiendo observarse en todos ellos el genotipo salvaje no mutado ¹³⁶ Esto difiere de lo reportado en San Pablo donde sobre 40 pacientes con sospecha de recidiva, en 11 se detectó *M. leprae* resistente a dapsona y 2 resistente a rifampicina, no denunciándose resistencia múltiple¹³⁷.

Los contactos domiciliarios comprenden un grupo reconocible de individuos con alto riesgo de enfermedad, ya que viven cerca de una fuente de infección¹³⁸.

En las 37 familias estudiadas co-habitaban con pacientes multibacilares 106 individuos. Estas estaban conformadas por un promedio de 3,5 convivientes, donde el 60% de los mismos eran menores de 24 años, población que debería vigilarse especialmente, considerando que aquellos que entran en contacto con pacientes multibacilares son los que presentan el riesgo más alto de desarrollar la enfermedad¹²⁹ Cabe mencionar que no respondieron a la convocatoria desde el hospital sino que fueron visitados en su domicilio por el equipo de salud, por lo que un Programa de Control debería incluir a estos jóvenes de manera particular, ya que la difusión de *M. leprae* a personas susceptibles en comunidades endémicas no puede ser descuidada⁹³.

Al revisar a los convivientes, se encontró clínica compatible en 17 de ellos y en 4 de estos se confirmó el diagnóstico de lepra (23,5%), lo que resalta la importancia de realizar una búsqueda activa entre convivientes intradomiciliarios¹⁰⁰.

El tracto respiratorio superior es considerado el principal portal para la entrada y salida de *M. leprae*^{139,140} y los individuos con enfermedad activa (en particular los pacientes MB) son las principales fuentes de infección⁸⁶.

Resultados similares a los encontrados en nuestro estudio, donde el 67,8% de los pacientes, resultaron portadores nasales del germen fueron presentados por Araujo y colaboradores en pacientes de Brasil (71,7%)¹⁶.

La presencia de ADN de *M. leprae* en la mucosa nasal de contactos domiciliarios de pacientes lepromatosos refleja la presencia de bacilos en la nariz. Sin embargo, esto no determina infección, sólo indica transporte⁹². Que esto haya ocurrido en nuestro estudio en el 14% de los convivientes indica la importancia del seguimiento de los portadores asintomáticos, como estrategia para el control

de la enfermedad, ya que según lo señalan diversos investigadores podrían tener un papel importante en la diseminación de la enfermedad ^{92,16}.

La presencia de secuencias específicas de DNA en 35 de las 131 muestras estudiadas (26,7%), indica que la transmisión continua activa en la zona norte de la provincia ya que los individuos no enfermos y aun aquellos que no desarrollarán la enfermedad pueden eliminar bacilos al ambiente ¹⁴¹.

Nuestros resultados demuestran que en 24 de las 37 familias estudiadas hubo transmisión intrafamiliar reforzando la idea propuesta por otros investigadores ^{142,92} que indican que un programa exitoso de control de lepra requiere prevención, diagnóstico precoz, tratamiento e interrupción de la cadena de transmisión. Esto comprendería la quimioprofilaxis de los contactos domiciliarios con infección subclínica como una estrategia de prevención ¹⁴² y el tratamiento de portadores sanos y de contacto para lograr la depuración de los bacilos e interrumpir la transmisión de la lepra⁹².

V. CONCLUSIONES

De los Pacientes:

- Un poco mas de la mitad de los pacientes fueron hombres y mayores de 45 años o sea pacientes adultos.
- La mayoría de los pacientes provienen del departamento de Montecarlo la tasa de detección anual resulto elevada :4,3 casos nuevos por 100.000 habitantes.
- La forma clínica predominante fue la lepromatosa y en más de la mitad de ellos la baciloscopia resulto positiva, mientras que en 36% de los frotis se logró detectar la presencia de *M. leprae* por PCR.
- Los sospechosos que acudieron a consulta por primera vez durante el transcurso del estudio y fueron confirmados como pacientes en 9 se observaron BAAR en la baciloscopia, dos resultaron positivos por PCR en la biopsia y los otros 2 lo fueron por histopatología.
- La concordancia entre baciloscopia y PCR resultó leve (12%).

De los convivientes:

- En las familias estudiadas, se registraron 106 convivientes con un promedio de 3,5 convivientes por familia, la mayoría muy jovenes, la media de edad en este grupo resulto de 23 años.
- Se observaron síntomas compatibles de la enfermedad por lo que se les tomo muestras como sospechosos y a 4 de ellos se le diagnostico la enfermedad ya sea por baciloscopia o PCR, más mujeres que hombres 3:1.

Estudio de transmisión:

- Se detectó ADN de *M. leprae* en el 26,7% (35/131) de los individuos estudiados.
- Un porcentaje alto de pacientes y/o sospechosos (67,8) y 14% de convivientes resultaron portadores nasales del germen.

- De las 37 familias estudiadas, en 24 (64,8%) de ellas se demostró la transmisión de enfermedad intra-domiciliar.

Conclusiones finales:

- De los 143 individuos estudiados (pacientes y convivientes) 47 individuos (30 enfermos y 17 portadores asintomáticos) distribuidos en 32 familias diferentes, fueron positivos mediante pruebas diagnósticas y/o hisopados nasales para *M. leprae*.
- En 7 de las familias la enfermedad fue diagnosticada en más de un integrante, el 75 % parientes de primer grado (hijos).
- La concordancia entre la técnica de PCR y la baciloscopia en los casos nuevos fue considerable (72%).
- La baciloscopia fue la técnica más sensible para la revisión de los pacientes y la PCR en biopsias para el diagnóstico de pacientes paucibacilares.
- De las 37 familias estudiadas, en 26 de ellas había al menos un integrante con la enfermedad confirmada sin curar y en 24 de ellas al menos un portador nasal (paciente o conviviente).
- En dos de las familias hubo portadores nasales asintomáticos y tanto el caso índice como el resto de convivientes fueron negativos por todas las pruebas realizadas.

VI. PROPUESTAS DE TRABAJOS FUTUROS Y/O RECOMENDACIONES

Los resultados y conclusiones del estudio indican la necesidad de reformular el actual modelo de vigilancia de la lepra en la zona Norte de la provincia de Misiones, se sugiere formular un modelo de vigilancia activa basado en síntomas dermatológicos tempranos, lo que incluye otras enfermedades de la piel prevalentes en la región.

Para captar pacientes en fases tempranas de la enfermedad se recomienda brindar asistencia médica en Centros de Atención Primaria facilitando la extensión y capacidad diagnóstica en la Provincia de Misiones, de este modo se contribuya a asegurar el tratamiento completo y cortar la cadena de transmisión.

La implementación de un nuevo protocolo exige capacitar a los médicos de atención primaria para reducir las complicaciones frecuentes que afectan a pacientes durante el tratamiento (leproreacciones) y que resultan causa significativa de abandono.

La captación temprana de casos tempranos genera un mayor número de pacientes con lepra indeterminada que significa un desafío diagnóstico. Es importante disponer de nuevas técnicas moleculares para optimizar la capacidad diagnóstica.

El modelo de trabajo implementado en este trabajo, con las adecuaciones a contextos locales puede replicarse en regiones de la Provincia de Misiones donde la información sobre lepra es deficiente.

Los resultados de este estudio generan nuevas hipótesis de investigación que podrían ser abordadas por profesionales e instituciones de modo integrado para contribuir a la eliminación de esta patología como problema de salud pública en nuestra provincia.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*, 2004;363:1209-1219.
2. Lastória JC. Leprosy: review of the epidemiological, clinical and etiopathogenic aspects - Part 1. *An. Bras. Dermatol*, 2014;89(2):205-218.
3. Rees RJ. W, Young DB. The microbiology of leprosy. En: Hasting RC, editor.
4. Shepard CC. Temperature optimum of *Mycobacterium-leprae* in mice. *J. Bacteriol.*,1965;90:1271-1275.
5. Hastings RC, Brand PW, Mansfield RE, Ebner JD. Bacterial density in the skin in lepromatous leprosy as related temperature. *Lepr. Rev.*, 1968;39 (2):71-74.
6. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2006;19:338-381.
7. Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacillus into footpads of mice. *J. Exp. Med.*, 1960;112:445-454.
8. Cole ST, Eiglmeier K., Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Hollroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quali MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Dimmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, vDtevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodwars JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 2001;409:1007-1010.
9. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium - leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome Biol.*, 2001;2(8):1023.1-1023.8.
10. Gómez JR. Introducción, etiología, transmisión, patogenia y clasificación. En: Fontilles. *Manual de leprologia*. 1ª ed. Espana: Sergraf Integral;2013 a. p. 70-74.
11. Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Panizk Mondolfi A, Kapopoulou A, Brisse S, Scollard DM, Gillis TH, Cole ST. Probable Zoonotic leprosy in the southern United States. *N. Engl .J. Med.*, 2011;364:1626–1633.
12. Truman RW, Fine PEM. ‘Environmental’ sources of *Mycobacterium-leprae*: issues and evidence. *Lepr. Rev.*,-2010;81:89-95.

13. Shepard CC. The nasal excretion of *Mycobacterium-leprae* in leprosy. *Int. J. Lepr.*, 1962;30:10-18.
14. Hatta M, Van Beers SM, Madjid B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium-leprae*-nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 1995;89:381-385.
15. Bratschi MW, Steinmann P, Wickenden A, Gillis T. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: asystematic literature review. *Lepr Rev* (2015) 86, 142–155.
16. Araujo S, Oliveira Freitas L, Goulart LR, BernardesGoulart, IM Molecular evidence for the aerial route of infection of *Mycobacterium leprae* and the role of asymptomatic carriers in the persistence of leprosy. *Clinical Infectious Diseases Advance Access* published August 23, 2016.
17. Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet. Infect. Dis.* 2011; 11: 464-470.
18. Frade, MAC; Foss, NT. Evidence of Aerial Route of *M. leprae* infection and Doubts About Transmission and Natural Protection in Leprosy. *Clin Infect Dis*;63(11):1421-1422, 2016 Dec 01.
19. Pedley JC. The presence of *M.-leprae* in human milk. *Lepr. Rev.*, 1967;38:239-242.
20. Melsom R, Harboe M, Duncan ME, Bergsvik H. IgA and IgM antibodies against *Mycobacterium leprae* in cord sera and in patients with leprosy: an indicator of intrauterine infection in leprosy. *Scand. J. Immunol.*, 1981;14:343-352.
21. Santos AR, Balassiano V, Oliveira ML, Pereira MA, Santos PB, Degraive WM, Suffys PN. Detection of *Mycobacterium-leprae* DNA by polymerase Chain reaction in the blood of individuals, eight years after Completion antileprosytherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2001;96:1129-1133.
22. Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium-leprae* In nasal mucosa biopsies by The polymerase chain reaction. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.*, 2005;44:311-316.
23. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2008;78:518-521.
24. Shepard CC. The nasal excretion of *Mycobacterium-leprae* in leprosy. *Int. J. Lepr.*, 1962;30:10-18.

25. Hatta M, Van Beers SM, Madjid B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of Mycobacterium-leprae-nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*,1995;89:381-385.
26. Shepard CC. The nasal excretion of Mycobacterium- leprae in leprosy. *Int. J. Lepr.*, 1962;30:10-18.
27. Bullock, WE. Leprosy (Hansen´s disease). En: Wyngaarden JB, Smith LH Jr, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 16th ed. Philadelphia: Saunders; 1982.
- 28 Cuevas J, Patología. En: Fontilles. *Manual de leprologia*. 1ª ed. Espana: Sergraf Integral; 2013 b. p. 108-119.
- 29 Araújo MG. Hanseníase no Brasil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 2003;36:373-382.
- 30 Saunderson P.The epidemiology of reactions And nerve damage. *Lepr.Rev.*,2000;71:106-110.
- 31 Moll F. Manifestaciones neurológicas y lesión en lepra. En:Fontilles.*Manual de leprología*.1ªed.España:Sergraf Integral;2013.p.86-98.
- 32 Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet. Infect. Dis.*2011;11:464-470.
- 33 Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr.Rev.*,1962;33:119-128.
- 34 Lockwood DN, Sarno E, Smith WC. Classifying Leprosy patients searching For the perfect solution? *Lepr.Rev.*,2007;78:317-320.
- 35 Gomez JR. Leporreacciones. En: Fontilles. *Manual de leprologia*. 1a ed.Espana: Sergraf Integral; 2013c. P 100-105.
- 36 Lockwood DN, Sarno E, Smith WC. Classifying Leprosy patients searching For the perfect solution? *Lepr.Rev.*,2007;78:317-320.
- 37 Organización Mundial de la Salud (OMS) Guía para la Eliminación de la Lepra como problema de Salud Pública1a ed. Suiza: OMS; 2000. Disponible en: http://www.who.int/lep/resources/Guide_S.pdf
- 38 Walker SL, Nicholls PG, Dhakal S, Hawksworth RA, Macdonald M, Mahat K, Ruchal A, Hamal A, Hagge Da, Neupane KD, Lockwood DNJ. A phase Two randomised controlled double blind trial of high dose Intravenous methylprednisolone and oral prednisolone versus Intravenous Normal salineand oral prednisolone in individuals with leprosy Type 1 reactions and/or nerve function impairment.*PLOS. Negl. Trop. Dis.*,-2011;5:e1041.

- 39 International Federation of Anti Leprosy Associations(ILEP). Cómo-reconocery tratarlas reacciones leprosas: guía de aprendizaje número 2. Londres: ILEP,2003. Disponible en:http://www.ilep.org.uk/fileadmin/uploads/Documents/Learning_Guides/lg2s.pdf
- 40 Gomez JR. Leprorreacciones. En: Fontilles. Manual de leprologia. 1a ed. Espana: Sergraf Integral; 2013c. P 100-105.
- 41 Torres, Pedro; Métodos de diagnóstico de la Enfermedad de Hansen En: Fontilles. Manual de leprologia. 1ª ed. España: Sergraf Integral; 2013a. p.32-33
- 42 Acosta Lucrecia; Diagnóstico molecular En: Fontilles. Manual de leprologia. 1a ed. Espana: Sergraf Integral; 2013a:p. 46-57
- 43 Pautas sobre Prevención, Diagnóstico y Tratamiento de la Lepra.<http://www.msal.gov.ar> Versión en revisión 2017.
- 44 Saiki , RK; Scharf, S; Faloona, F; Mullis , KB; Horn , GT; Erlich, HA; y Arneheim, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985; 230(4732):1350-1354.
- 45 Mullis, KB; Faloona, FA; Scharf , S; Saiki , G; Horn, G and Erlich, H. Specific enzyme amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol, 1986;51:263-273.
- 46 Mullis, KB; Faloona , FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. Methods Enzymol, 1987; 155: 335-350.
- 47 Taylor, GM; Worth , DR; Palmer, S; Jahans, K; Hewinson , RG. Rapid detection of Mycobacterium bovis DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. BMC Veterinary Research, 2007;3:12.
- 48 Bachmann, L; Däubel, B; Lindqvist, C; Kruckenhauser, L; Teschler-Nicola, M; Haring, E. PCR diagnostics of Mycobacterium tuberculosis in historic human long bone remains from 18th century burials in Kaiserebersdorf, Austria. BMC Research Notes 2008,1:83.
- 49 Honore-Bouakline, S; Vincensini, JP; Giacuzzo, V; Lagrange, PH; Herrmann, J.L. Rapid Diagnosis of Extrapulmonary Tuberculosis by PCR: Impact of Sample Preparation and DNA Extraction. J Clin Microbiol, 2003;41:2323-2329.
- 50 Amita, J; Vandana, T; Guleria, R.S; Verma, R.K. Qualitative Evaluation of Mycobacterial DNA Extraction Protocols for Polymerase Chain Reaction. Mol Biol Today, 2002;3:43-50.

- 51 Kotlowski, R; Martin , A; Ablordey , A; Chemlal , K; Fonteyne , P-A; Portaels , F. One-tube cell lysis and DNA extraction procedure for PCR-based detection of *Mycobacterium ulcerans* in aquatic insects, molluscs and fish. *J Med Microbio*, 2004;53:927-933.
- 52 Reischl, U. Application of molecular biology-based methods to the Diagnosis of infectious diseases. *Frontiers in Bioscience*, 1996;1:e72-77.
- 53 Barry , MC; Mdluli, K. Drug sensitivity and environmental adaptation of mycobacterial cell wall components. *Trends Microbiol*, 1996;4:275-8.
- 54 Kolk, AHJ; Schuitema, ARJ; Kuijper, S; Van Leeuwen, J; Hermans, P.W.M; Van Embden, JDA; Hartskeerl, RA. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by using polymerase chain reaction and a non radioactive detection system. *J Clin Microbiol*, 1992;30:2567-2575.
- 55 Fries, J.WU; Patel, RJ; Piessehn WF, Wirth DE. Detection of untreated *Mycobacteria* by using polymerase chain reaction and specific DNA probes. *J Clin Microbiol*, 1991; 29:1744-1747.
- 56 Via, LE; Falkingham , JO. Comparison of methods for isolation of *Mycobacterium avium* complex DNA for use in PCR and RAPD. *J Microbiol Meth*, 1995; 26:151-161.
- 57 Torres, P; Camarena, JJ; Gomez, J.R; Nogueira, JM; Gimeno, V; Navarro, JC; Olmos, A. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. *Lepr Rev*, 2003;74:18-30.
- 58 Plikaytis, BB; Gelber, RH; Shinnick, TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J Clin Microbiol*,1990;28(9):1913-1917.
- 59 De Wit, MY; Faber, WR; Krieg, SR; Douglas, JT; Lucas, SB; Montree wasu wat, N; Pattyn, SF; Hussain, R; Ponnighaus, JM; Hartskeerl, RA; Klatser, PR. Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol*, 1991;29(5): 906-910.
- 60 Yoon, KH; Cho, SN; Lee, MK; Abalos, RM; Cellona, RV; Fajardo, TT; Guido, LS; de la Cruz, EC; Walsh, GP; Kim, JD. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae* specific repetitive sequence in biopsy specimens from Leprosy patients. *J Clin Microbiol*, 1993;31(4):895-899.
- 61 Williams, DL; Gillis , TP; Booyh, RJ; Looker, D; Watson, JD. The use of specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis*, 1990;162:193-200.

- 62 Awua, AK; Doe, ED; Gyamfi, OK. Evaluation of cost-effective total nucleic acids extraction protocols for cultured *Mycobacterium tuberculosis*; a comparison by PCR amplification of genes associated with drug resistance. *BMC Res Notes*, 2010;3:48.
- 63 Booth, RJ; Harris, DP; Love, JM; Watson, JD. Antigenic protein of *M. leprae*: complete sequence of the gene for the 18kDa. *J Immunol*, 1988;140(2): 597-601.
- 64 Scollard DM; Gillis, TP; Williams, DL. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am J Clin Pathol*, 1998;109:642–646.
- 65 Williams , DL; Gillis, TP; Booyh, R.J; Looker, D; Watson, J.D. The use of specific DNA probe and polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Infect Dis*, 1990;162:193-200.
- 66 Williams , DL; Gillis, TP; Fiallo, P; Job, CP; Gelber, RH; Hill, C; Izumi, S. Detection of *Mycobacterium leprae* and the potential for monitoring antileprosy drug therapy directly from skin biopsies by PCR. *Mol Cell Probes*, 1992;6:401-410.
- 67 Job, CK; Jayakumar, J; Williams, DL; Gillis , TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr*, 1996;65:461-464.
- 68 Chae, GT; Kim, M.J; Kang, T.J; Lee, S.B; Shin, H.K; Kim, JP; Ko, YH; Kim, SH; Kim, NH. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy. *J Med Microbiol*, 2002;51:417-422.
- 69 De Wit, MY; Klatser, PR. Purification and characterization of a 36kDa antigen of *M. leprae*. *J Gen Microbiol*, 1988;134(6):1541-8.
- 70 Donoghue, HD; Holton, J; Spigelman, M. PCR primers that can detect low levelsof *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol*, 2001;50(2):177-182.
- 71 Hartskeerl, RA; de Wit, MY; Klatser PR. Polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae*. *J Gen Microbiol*, 1989;35(9):2357-2364.
- 72 Kampirapap, K; Singtham, N; Klatser, PR; Wiriya wipart, S. DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1998;66:16–21.
- 73 Lee, K.s; Youl OK; Wok , RY; Suh, MH. Detection of *Mycobacterium leprae* in tissue and blood by polymerase chain reaction. *Int J Lepr*, 1994;62(1): 139-140.

- 74 Plikaytis, B.B; Gelber, R.H; Shinnick, TM. Rapid and sensitive detection of *Mycobacterium leprae* using a nested-primer gene amplification assay. *J Clin Microbiol*,1990; 28(9):1913-1917.
- 75 Woods, SA; Cole, ST. A rapid method for the detection of potentially viable *Mycobacterium leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett*, 1989; 53(3):305-309.
- 76 Banerjee, S; Ray, D; Bandopadhyay, D; Gupta, S; Ghosal, C; Biswas, N; Bhatta-charya, S; Dutta, RN; Bhattacharya, B. Development and application of a new efficient and sensitive Multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR) in a diagnosis of leprosy. *J Indian Med Assoc*, 2008,106:436-440.
- 77 Banerjee, S; Sarkar, K; Gupta, S; Mahapatra, PS; Grupta, S; Guha, S; Band-hopadhyay, D; Ghosal, C; Paine, K; Dutta, RN; Biswas, N y Bhattacharya, B. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts- apilot study from India. *MBC Infect Dis*, 2010;10:252.
- 78 Martinez, AN; Ribeiro-Alves, M; Sarno EN Moraes, MO. Evaluation of qPCRBased Assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Negl Trop Dis*,2011a;5(10):e1354.
- 79 Jadhav , RS; Kamble, RR; Shindle, VS; Edward, S. and Edward VK. Use of reverse transcription polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in the slit-skin smears of leprosy patients. *Indian J lepr*, 2005;77(2):116-127.
- 80 Kamble, RR; Shindle, VS; Madhale, SP; Kamble, AA; Ravikumar, BP and Jadhav, RS. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. *Indian J Med Microbiol*, 2010;28 (1):57-59.
- 81 Phetsuksiri, B; Rudeeaneksin, J; Supapakul, P; Wachapong, S; Mahotarn, K; Brennan, PJ. A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2006; 48(3):319-328.
- 82 Banerjee, S; Sarkar, K; Gupta, S; Mahapatra, PS; Grupta, S; Guha, S; Band-hopadhyay, D; Ghosal, C; Paine, K; Dutta, RN; Biswas, N y Bhattacharya, B. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts-apilot study from India. *MBC Infect Dis*, 2010;10:252.
- 83 Pattyn SR, Ursi D, Ieven M, Grillone S, Raes V. Detection of *Mycobacterium leprae* by the polymerase chain reaction in nasal swabs of

leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1993;61(3): 389-393.

84 Patrocínio, LG; Goulart, IM; Goulart, LR; Patrocínio, JA; Ferreira, FR; Fleury, RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2005;44:311-316.

85 De Wit, MY; Douglas, JT; McFadden J. y; Klatser, PR. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J Clin Microbiol*, 1993;31(3):502-506

86 Job, CK; Jayakumar, J; Kearney, M; Gillis, TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg*, 2008;78:518-521.

87 Klatser, PR; van Beers, S; Madjid, B; Day, R; de Wit, MY. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. *J Clin Microbiol*, 1993;31(11):2947-2951.

88 Van Beers, S.M; Izumi, S; Madjid, B; Maeda, Y; Day, R; Klatser, P.R. An epidemiological study of leprosy infection by serology and polymerase chain reaction. *Int J lepr*, 1994; 62(1): 1-9.

89 Hatta, M; Van Beers, SM; Madjid, B; Djumadi, A; de Wit, MYL; Klatser, PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among the population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995;89(4):381-385.

90 Beyene, D; Aseffa, A; Harboe, M; Kidane, D; Macdonald, M; Klatser, PR; Bjune, GA; Smith, WC. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. *Epidemiol Infec*, 2003;131:841-848.

91 Santos, AR; Balassiano, V; Oliveira, ML; Pereira, MA; Santos, PB; Degraeve, WM; Suffys, PN. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood of individuals, eight years after completion of anti-leprosy therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2001; 96(8):1129-1133.

92 Almeida, EC; Martinez, AN; Maniero, VC; Sales, AM; Duppre, NC; Sarno EN; Santos, AR; Moraes, MO. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by polymerase chain reaction in the blood and Nasal Secretion of Brazilian household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2004;99(5):509-512.

93 Araújo, S; Lobato, J; Reis Ede, M; Souza DO Gonçalves, MA; Costa, AV; Goulart LR; Goulart, IM. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2012;107(1):55-59.

- 94 Jamil, S; Keer, JT; Lucas, SB; Dockrell, HM; Chiang, TJ; Hussain, R; Stoker, NG. Use of polimerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. Lancet, 1993;342:264-268.
- 95 Job, CK; Jayakumar, J; Williams, DL; Gillis, TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. Int J Lepr, 1996;65:461-464.
- 96 Parkash, O; Singh, HB; Rai, S; Pandey, A; Katoch, VM; Girdhar, BK. Detection of Mycobacterium leprae DNA for 36-kDa protein in urine from leprosy patients: a preliminary report. Rev Inst Med Trop São Paulo, 2004; 46:275-277.
- 97 Caleffi, KR; Hirata, RDC; Hirata, MH; Caleffi, ER; Siqueira, VLD; Cardoso RF. Use of the polymerase chain reaction to detect Mycobacterium leprae in urine. Braz J Med Biol Res, 2012;45(2):153-157.
- 98 Organización Mundial de la Salud(OMS) Guía para la Eliminación de la Lepra como problema de Salud Pública.[internet].1ª ed. Suiza: OMS; 2000. Disponible en: http://www.who.int/lep/resources/Guide_S.pdf
- 99 WHO Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion 2016,91,405-420
- 100 Global leprosy strategy 2016–2020: accelerating towards a leprosy-free world. New Delhi, World Health Organization, Regional Office for South-East Asia, 2016. Available at: http://www.wpro.who.int/leprosy/documents/globalleprosy_strategy2016-2020.pdf
- 101 Programa Nacional de Control de la Lepra Paraguay disponible en:www.vigisalud.gov.py/documentos/30-06-2016
- 102 Coordinación Nacional de Lepra y Enfermedades en Eliminación (CGHDE) SVS/MS Brasil junio 2016.
- 103 Pautas sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la lepra .Versión preliminar 2012 Ministerio de salud de la Nacion.Disponible en: www.msal.gov.ar
- 104 Boletín Epidemiológico Argentina MSN.2013 disponible en www.msal.gov.ar
- 105 Confederal de lepra 2017 Reunión en el Ministerio de Salud de la Nacion con los referentes provinciales. Buenos Aires Argentina junio 2017
- 106 Confederal de lepra 2015 Junio 2015.
- 107 Boletín de vigilancia Pcia de Misiones. Programa Pcial de Lepra - 2012 disponible en www.misionesalud.com.ar

- 108 World Health Assembly resolution WHA44.9 on Leprosy. Geneva, World Health Organization, 1991. Available at http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_44.9_Eng.pdf, accessed August 2016
- 109 Análisis de la Situación de Salud (ASIS 2014) PDF Elaborado por: Sala de Situación. Ministerio de Salud de la Provincia de Misiones.
- 110 Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas.2010.web INDEC-Población/Censos/Censo2010.www.indec.gov.ar
- 111 Organización Sanitaria de la Provincia de Misiones. Disponible en :www.misionesalud.gov.ar
- 112 Resumen de gestión. Servicio de Estadísticas Hospital Samic Eldorado
- 113 Landis JKoch G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*. 1977;33(1):159
- 114 Richardus JH, Habbema JD 2007. The impact of leprosy control on the transmission of *M. leprae*: is elimination being attained? *Lepr Rev* 78: 330-337
- 115 Shen JP, Zhang GC, Chen XS, Zhou M, Yu MW, Yan LB 2008. A long-term evolution on the epidemiological characteristics of leprosy, towards the goal of its elimination in 1949-2007 in China. *Chin J Epidemiol* 29:1095-1100.
- 116 Fischer EAJ, de Vlas SJ, Habbema JDF, Richardus JH 2011. The long term effect of current and new interventions on the new case detection of leprosy: a modeling study. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1330
- 117 Cybele A. Renault y Joel D. Esnst. *Mycobacterium leprae* en Mandell, Douglas y Bennett. *Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica*. Séptima edición. Ed Elsevier. 2012. Cap 251:3162-3173.
- 118 Avaliação dos indicadores epidemiológicos e operacionais para a hanseníase em municípios prioritários no estado do Paraná, 2001 a 2010 Keurilene Sutil de Oliveira, Jhenifer de Souza, Regiane Bezerra Campos Adriana Zilly Reinaldo Antonio Silva-Sobrinho. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 24(3):507-516, jul-set 2015
- 119 Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, et al. Risk factors for developing leprosy—a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev* 2006;77:48-61
- 120 Oramas Fernández, DK y col. Comportamiento de la lepra en dos policlínicos del municipio La Lisa. *Revista cubana de Medicina General Integral* v.25 n.4 Ciudad de la Habana oct-dic.2009

- 121 Ulrich M, Zulueta AM, Caceres G, Sampson C, Pinardi ME, Rada EM, Aranzazu N, Leprosy in Women: characteristics and repercussions. Instituto de Biomedicina de Caracas Venezuela. SocSciMed 1993;Aug37(4) 445-456
- 122 Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, et al. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. J Infect Dis 2006;193:346-53).
- 123 Lana FCF, Lima RFD, Araujo MG, Fonseca PTS. Situacao epidemiologica da hanseniose no municipio de Belo Horizonte/MG periodo 92-97. Hansen Int 2000;25(2):121-23
- 124 Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Franzblau SG 1988. Leprosy. Clin Microbiol Rev 1:330-348.
- 125 Carvalhal Frazao Correa. Aspectos epidemiológicos, clínicos y operacionales de portadores de hanseniose atendidos en un servicio de referencia del estado de Maranhao. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Vol 45 no1. Uberaba Jan/feb. 2012
- 126 Longo JCM, Cunha RV, Perfil clínico epidemiológico dos casos de hanseniose atendidos no hospital universitario em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, de janeiro de 1994 a julho de 2005. Hansen Int. 2006;31:9-14
- 127 Goncalvez SD, Sampaio RF, Antunes CMF. Ocorrencia de neurite em pacientes com hanseniose: analise de sobrevida e fatores preditivos. Rev Soc Bras Trop 2008;41:464-469
- 128 Andrea K, Boggild JD, Corriea JS, Keystone KCK, Leprosy in Toronto: an analysis of 184 imported cases. Can Med Assoc J 2004;1:170
- 129 Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, et al. Risk factors for developing leprosy—a population-based cohort study in Indonesia. Lepr Rev 2006;77:48-61.
- 130 WHO-World Health Organization 1982. Chemotherapy of leprosy for control programmer. WHO Tech Rep Ser 675: 1-33.
- 131 Martinez AN, Britto CF, Nery JA, et al. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. J Clin Microbiol 2006;44:3154-9).
- 132 Ruiz-Fuentes JL, Diaz-Garcia A, Suarez Moreno O, Torres P, Acosta Soto L Evaluación de diferentes muestras para la detección molecular de M leprae en Cuba. Original.
- 133 Scollard, David M, Am J Trop. Med. Hyg, 95(3), 2016, pp 500-501.

- 134 Han XY, Letter to the Editor Am J Trop. Med. Hyg. 96(1).2017.
- 135 Acosta L, Ferrer C, Torres P. Utilidad del diagnóstico molecular de Mycobacterium-leprae y seguimiento de pacientes diagnosticados en Fontilles de 2011 a 2014. Fontilles, Rev.Leprol., 2014;29(5):409-421.
- 136 Matsouka M, Drugresistance in leprosy. Jpn.J.Infect.Dis.,63,1-7,2010.
- 137 Diório S M y col. Resistência a dapsona e rifampicina no Estado de São Paulo, Hansenologia Internationalis 30 (1):09.14.2005.
- 138 Sales AM, Leon AP, Dupree NC, Hacker MA, Nery JAC, Sarno EN, Penna MLF 2011. Leprosy among patient contacts: a multilevel study of risk factors. PLoS Negl Trop Dis 5: e1013.
- 139 Patrocínio LG, Goulart IM, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN 2005. Detection of Mycobacterium leprae in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. FEMS Immu-nol Med Microbiol 44:311-316.
- 140 Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM 2011. Oral mucosa as a source of Mycobacterium leprae infection and transmission and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. Clin Microbiol Infec 17:1653-1658.
- 141 Lastoria JC, Morgado de Abreu MAM. Leprosy (part1): review of the epidemiological, clinical and etiopathogenic aspects. AnBrasDermatol. 2014;89(2):205-18.
- 142 Goulart IM, Bernardes Souza DO, Marques CR, Pimenta VL, Gonçalves MA, Goulart LR 2008. Risk and protective factors for leprosy development determined by epidemiological surveillance of household contacts. Clin Vaccine Immunol 15:101-105.

ANEXOS.

ANEXO I. Modelo de consentimiento informado.

Documento de Consentimiento Informado para participantes en estudio y diagnóstico de Lepra

Nombre del Investigador Principal: Sandra Roginski

Nombre de la Organización: Universidad Nacional de Misiones.

Nombre del Patrocinador: Universidad "Miguel Hernández" de Elche, Universidad Nacional de Misiones.

Nombre de la Propuesta: "SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON LEPROA DIAGNOSTICADOS EN EL HOSPITAL SAMIC DE ELDORADO, BÚSQUEDA ACTIVA DE NUEVOS CASOS ENTRE CONVIVIENTES Y ESTUDIO DE CONTACTOS SOCIALES"

Sujetos de 18 o más años: Obtener consentimiento informado del individuo.

Sujetos de menos de 18 años: Obtener consentimiento informado del padre o tutor y cuando correspondiera en menores de 11 a 17 años el asentimiento del individuo participante.

El presente documento de Consentimiento Informado tiene dos componentes:

- Parte 1: Hoja de Información para el sujeto participante de 18 años o más y para el padre o tutor de menores de 18 años (proporciona información sobre el estudio)
- Parte 2: Formulario de Consentimiento (para firmar si está de acuerdo en participar)

Los responsables del proyecto entregan una copia del documento completo de Consentimiento Informado al sujeto participante o al padre o tutor del menor de 18 años.

Parte 1: Hoja de información

Somos un equipo de investigadores de: Hospital SAMIC Eldorado, la Universidad Nacional de Misiones y de la Universidad Miguel Hernández de Elche (España) que se propone estudiar a partir de esta visita domiciliaria el estado de salud actual de los pacientes que disponen un diagnóstico confirmado de Lepra en el Hospital SAMIC de Eldorado (Misiones) y también de aquellos convivientes de los pacientes, en los que luego de una entrevista profesional, resulten con sospecha de la enfermedad.

Estamos promoviendo, además, mediante charlas informativas sobre la enfermedad, el conocimiento de esta y los beneficios del diagnóstico y tratamiento temprano de la Lepra.

Si hay palabras que no se entienden o si Ud. necesita hacer preguntas para un mayor conocimiento, nos tomaremos el tiempo para explicárselo.

Se le ofrece que Ud. como paciente con diagnóstico de Lepra o individuo en el que nuestros profesionales del equipo de trabajo sospechen de la enfermedad participe en el proyecto "SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON LEPROA DIAGNOSTICADOS EN EL HOSPITAL SAMIC DE ELDORADO, BÚSQUEDA ACTIVA DE NUEVOS CASOS ENTRE CONVIVIENTES Y ESTUDIO DE CONTACTOS SOCIALES", que es patrocinado por los siguientes organismos: Universidad "Miguel Hernández" de Elche,

Ministerio de Salud de Misiones (Dirección de Atención Primaria de la Salud), Hospital SAMIC de Eldorado y Universidad Nacional de Misiones.

Este estudio requerirá realizar las siguientes intervenciones: 1) la evaluación clínica del médico del proyecto para identificar lesiones en la piel características de la enfermedad, 2) una muestra de linfa del lóbulo de la oreja y/o del borde de lesiones activas o antiguas y/o material de tejido (biopsia) y/o moco nasal para estudios de laboratorio a realizarse en el Hospital SAMIC y/o en la Universidad Nacional de Misiones para estudiar la presencia del organismo (bacteria) que produce esta enfermedad.

Con posterioridad al estudiar de sus muestras de linfa y/o lesiones activas y/o tejidos (biopsia) y/o moco nasal, se le entregarán y explicarán los resultados y en caso de detectarse la infección o enfermedad Lepra se procederá a dar cumplimiento a los tratamientos que correspondan de modo gratuito en los servicios sanitarios del Ministerio de Salud de Misiones, como establecen los reglamentos del Ministerio de Salud.

Nos comprometemos a facilitarle el acceso a los servicios del Ministerio de Salud para los estudios complementarios que fuesen necesarios, el tratamiento y seguimiento de la evolución de la enfermedad para su control y/o cura definitiva.

La participación en esta investigación es totalmente voluntaria. Usted puede aceptar participar o no. Tanto si elige participar como no hacerlo, continuará recibiendo todos los servicios gratuitos del Ministerio de Salud Pública.

Esta investigación se desarrollará desde diciembre 2014 por un año. Las muestras serán destruidas al finalizar el estudio. Ni las muestras ni los datos derivados de las mismas serán comercializados.

Como en toda toma de muestra de material biológico que exige una punción o extracción de tejido existe un riesgo físico considerado bajo o muy bajo de molestias menores como ser: enrojecimiento de la zona o dolor breve y pasajero. Para minimizar aún más ese riesgo, un profesional con experiencia supervisará la obtención de la muestra.

Nos comprometemos a no compartir la identidad de quienes participen en este estudio. La información que recojamos por este proyecto de investigación se mantendrá confidencial. Los datos acerca de Ud. que se recogerán durante el desarrollo de las actividades se guardarán de manera que sólo los investigadores puedan verlos. Cualquier información acerca de Ud. se identificará por un número, no por el nombre. Sólo los investigadores sabrán cuál es su número y se mantendrá esta información en un lugar bajo llave. No será compartida ni entregada a nadie, excepto al médico que lo atiende y en forma codificada a los investigadores de la Universidad Nacional de Misiones, Universidad "Miguel Hernández" de Elche, Hospital SAMIC de Eldorado y Ministerio de Salud Pública de Misiones.

Los resultados de los análisis se compartirán con Ud. antes de que se hagan disponibles de otra forma al público o a la comunidad científica. No se compartirá información confidencial, como su identidad. La información que sobre Usted se obtenga como producto de la participación de este estudio podrá ser empleada en ámbitos científicos para favorecer el conocimiento de las acciones preventivas sobre Lepra, y mejorar la capacidad de los servicios asistenciales frente a esta enfermedad, bajo la condición de que se preservará el carácter de confidencialidad de su persona y de cualquier dato vinculante a la identidad de la misma.

Usted puede retirarse voluntariamente del estudio sin dar razones, sin que esto afecte la relación con los investigadores, o los centros de salud y hospitales donde se atiende. Además, podrá presentar quejas o preguntas en cualquier momento de la investigación. Para evacuar consultas posteriores, el Director del proyecto se domicilia en Avda. Mariano Moreno 1375, Posadas, teléfono 376 4435118. El estudio fue revisado y aprobado en sus aspectos éticos por un Comité de Bioética del Hospital Provincial de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro". Este es un comité que tiene la tarea de asegurarse que se protege de daños a los participantes de la investigación.

Los investigadores de este proyecto están en un todo de acuerdo y adoptan los principios éticos, legales y jurídicos para las investigaciones médicas en seres humanos descritas en las normas bioéticas nacionales (Disp. ANMAT 1480/11) e internacionales (Código de Núremberg, Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y sus modificaciones, Declaración de los Derechos Humanos de la UNESCO (1997), Convención de Ginebra (CIOMS) sobre los derechos del niño (1982), Ley 26061 de protección integral de los derechos de niñas, niños y adolescentes (2005), Ley 26529 de derecho del paciente (2009).

Los investigadores del proyecto manifiestan no haber identificado posibles conflictos de intereses.

Parte 2: Formulario de consentimiento

Por medio del presente documento y teniendo plena capacidad de mis facultades mentales, doy mi consentimiento y ofrezco voluntariamente la autorización a participar en el proyecto "SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON LEPROA DIAGNOSTICADOS EN EL HOSPITAL SAMIC DE ELDORADO, BÚSQUEDA ACTIVA DE NUEVOS CASOS ENTRE CONVIVIENTES Y ESTUDIO DE CONTACTOS SOCIALES", que es patrocinado por los siguientes organismos: Ministerio de Salud Pública de Misiones, Universidad "Miguel Hernández" de Elche y Hospital SAMIC Eldorado Universidad Nacional de Misiones y que se desarrollará desde Diciembre 2014 por un año. El estudio fue revisado y aprobado en sus aspectos éticos por el Comité de Bioética del Hospital Provincial de Pediatría "Dr. Fernando Barreyro".

Dejo explícito que se me ha puesto en conocimiento del significado de mi participación voluntaria, la duración y finalidad del estudio, los métodos diagnósticos a ser empleados y el alcance de los resultados a ser obtenidos. He sido informado que las molestias y riesgos de perjuicio por la toma de muestra de: linfadel lóbulo de la oreja y/o del borde de lesiones activas o antiguas y/o material de tejido (biopsia) y/o moco nasal para estudios de laboratorio, son mínimos. También fui informado de los beneficios para mi persona, y que no recibiré ningún pago por participar en la investigación.

Así mismo he tenido la oportunidad de realizar preguntas referidas a este estudio y las respuestas recibidas han sido todas satisfactorias. Se me ha proporcionado el nombre de un investigador que puede ser fácilmente contactado usando el nombre y la dirección que se me ha dado.

Apellidos y nombres del **participante**

.....
.....

Apellidos y nombres del joven menor (11 a 17 años)

.....

Firma de asentimiento:.....

Apellidos y nombres del **padre, tutor o representante legal**, de jóvenes de 11 a 17 años:

.....
.....

Firma de consentimiento:

Huella dactilar (en caso de padres o tutores analfabetos).....

He sido testigo de la lectura exacta del documento de consentimiento para el potencial participante y el individuo ha tenido la oportunidad de hacer preguntas. Confirmando que el individuo ha dado consentimiento libremente.

Apellidos y nombres del **testigo**:

.....
....

Firma:

Apellidos y nombres del **investigador**:

Firma:

Fecha:

Ha sido proporcionada al participante una copia de este documento de consentimiento informado.

|

ANEXO II. Ficha del examen clínico.

MINISTERIO DE SALUD Y ACCIÓN SOCIAL PROGRAMA DE CONTROL DE LEPROSA FICHA DE REGISTRO

Fecha Reg: .../.../....

Nº Registro* Provincia.....

Fecha Detección: ... /.../...

Apellido y

Nombre.....

Nº documento..... **Tipo**.....

Fecha de Nacimiento:..... **Edad:**..... **Sexo:** 1-M 2-F 9-S/E

Lugar de Nacimiento: Depto: Pcia.....

País.....

Lugar de Residencia: Calle y nº.....

Localidad..... Dpto.....

Provincia..... País.....

Cod Postal..... Zona: 1- Urbana 2-Rural 9- S/E

Clasificación: Ridley y Joplin 1-I 2-TT 3-BT 4-BB 5-BL 6-LL 9-S/E
OMS 1-MB 2-PB

Baciloscopia: Lóbulo: 0 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+ 9-S/E IM:

Lesión: 0 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+ 9-S/E IM:

Mucus: 0 1+ 2+ 3+ 4+ 5+ 6+ 9-S/E IM:

Biopsia: Histopatología: 1-Si 2-No

PCR: 1-Si 2-No

Tratamiento previo: 1-Si Lugar..... 2- No 9-S/E

Fecha de inicio de tratamiento: .../.../....

Tipo de tratamiento: 1-SR supervisado 2- SRC supervisado

3-Otros: ¿Cuál?..... 9-S/E

PQM Monoterapia

Fecha primeros síntomas:.../.../....

Reacción: 1-Si con Talidomida 2- Si sin talidomida 3-No 9-S/E

Tipo de ingreso al sistema: 0-Nuevo 1-Recidiva PQT 2-Recidiva Mono

3- Reingreso 4-Transferido 9-S/E

Método de detección: 1-Notificación 2-Voluntario 3-Exámen de contactos

4- Examen masivo de población 5- Operativos especiales 9-S/E

Contacto de otro caso de lepra:

1-Si Grado de parentesco..... Forma clínica..... 2-No 9-S/E

No Contactos:

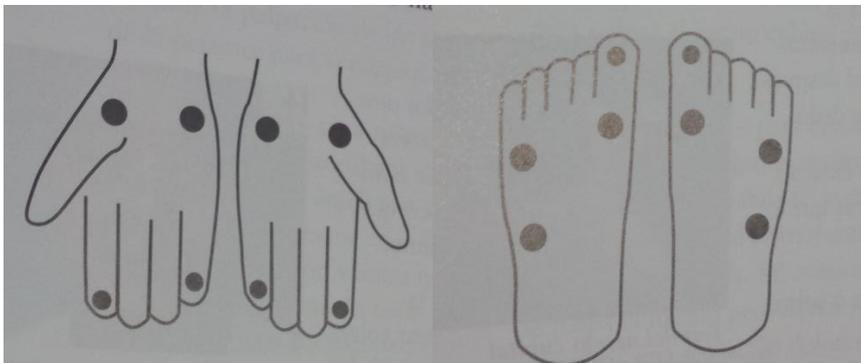
Nº de lesiones: única 2-5 6-15 >15

Registro de discapacidades:

Grado	Mano		Pie		Ojos	
	IZDA	DCHA	IZDO	DCHO	IZDO	DCHO
0						
1						
2						

Test de sensibilidad: /-siente X-no siente

Mano: 1 2 3 4 Frío-Calor/Táctil/ Punción Pie: 1 2 3 4 Frío-Calor/Táctil/Punción



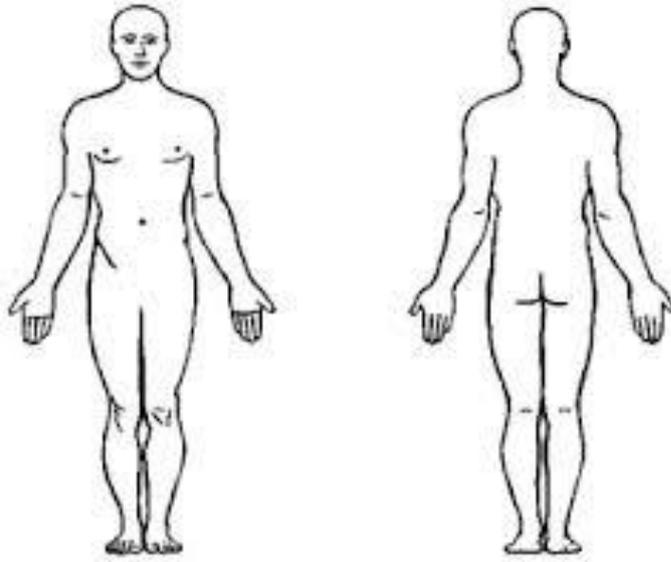
Alopecia/anhidrosis

Otras: Laríngeas: 1-Si 2-No Aplastamiento de nariz: 1-Si 2-No

Parálisis facial 1-Si 2-No Alopecia cejas 1-Si 2 No

Otras observaciones:

.....



ANEXO III. Baciloscopia (Ziehl-Neelsen modificado).

Para la tinción, observación mediante microscopía óptica e interpretación de resultados, se siguieron las recomendaciones de la ILEP 2003.

A. Tinción:

Coloración: Una vez depositada la muestra, se fija con calor al portaobjetos. Antes de teñir, hay que filtrar con papel de filtro la solución de carbolfucsina al 1% (1). Y se cubre el portaobjetos con esta solución. Se calienta el portaobjetos suavemente con un mechero hasta la emisión de vapores (2) y se repite el proceso tres veces cada 5 min. La carbolfucsina no debe hervir. Si se seca la muestra hay que añadir más solución y calentar de nuevo.

Seguidamente, se lava la muestra con agua corriente hasta que la muestra quede incolora (3). La baciloscopia permanece rojo oscuro.

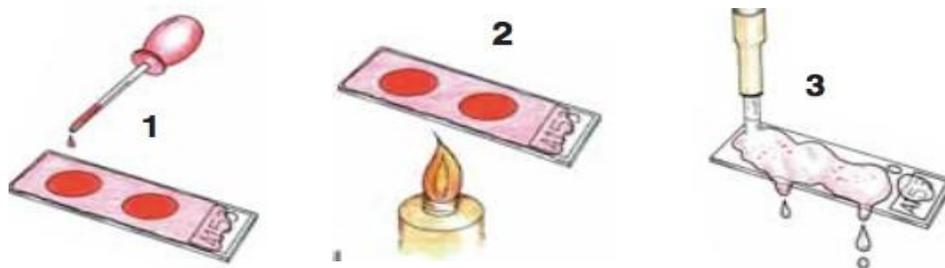
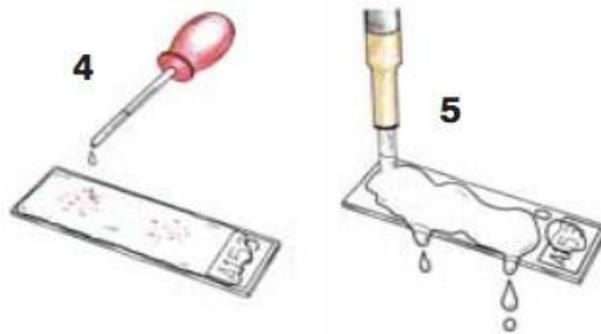


Figura 21. Procedimiento de coloración.

Decoloración: Cubrir con ácido-alcohol al 1% durante 10 segundos (4) y lavar suavemente con agua (5).

Figura 22. Procedimiento de decoloración.



Contraste: Se cubre la muestra con azul de metileno 0.2% durante 1 a 3 min (6) y se lava con agua corriente (7). Se deja secar y la muestra está lista para el examen microscópico (8).

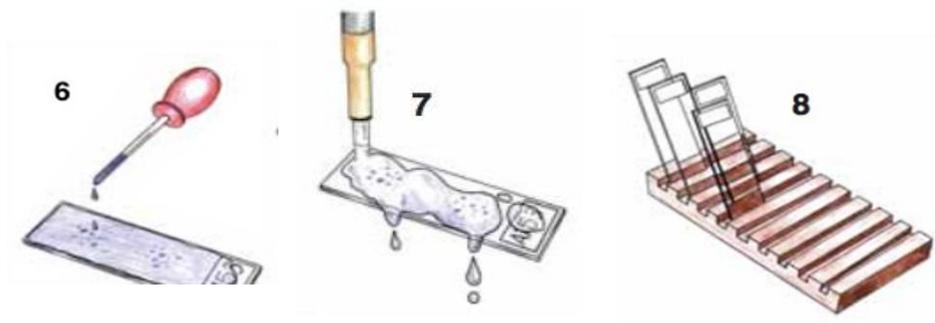


Figura 23. Tinción de contraste.

B. Observación:

La muestra se observa en un microscopio óptico con aceite de inmersión (100x). Hay que detectar los bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), que tendrán forma de bastón rojo sobre un fondo de color azul, que pueden ser rectos o de forma curvada y estar uniformemente teñidos en el caso de estar enteros, o estar desigualmente teñidos si están fragmentados (Véase la Figura 24). Hay que examinar aproximadamente 100 campos.

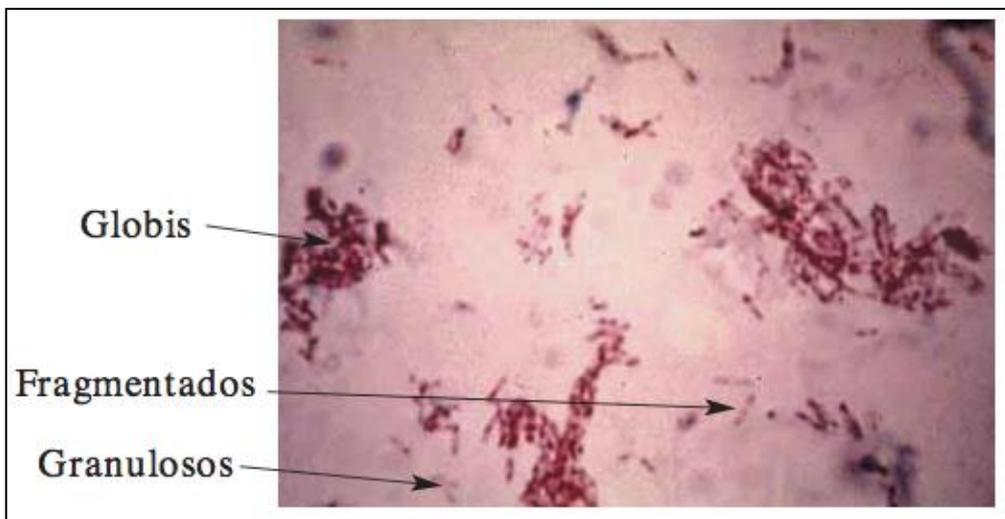


Figura 24. Imágenes de baciloscopias donde se pueden observar BAAR enteros y agrupaciones en globis (arriba), fragmentados, granulosos y globis (abajo. ILEP, 2003).

C. Interpretación:

Los BAAR que se detecten deben de ser cuantificados siguiendo la escala del **Índice Bacteriológico (IB)**, que se calcula, como indica la Tabla II.1 en función del número de BAAR que se encuentran en los 100 campos.

Tabla 16. Índice bacteriológico (IB) según la ILEP. En la izquierda aparece la escala del índice que se asigna en función del número de bacilos que se encuentren tal y como se indica en la parte derecha.

INDICE BACTERIOLÓGICO (IB)	
Escala	Número de bacilos
0	0 en 100 campos
1 +	1-10 en 100 campos
2+	Promedio de 1-10 en 10 campos
3+	Promedio de 1-10 por campo
4+	Promedio de 10-100 por campo
5+	Promedio de 100 por campo
6+	Promedio > 1000 por campo

ANEXO IV. Métodos moleculares: Extracción de los ácidos nucleicos.

A. Pre-lisis de las muestras

El protocolo utilizado varía en función del tipo de muestra (Acosta, 2014):

- Hisopos: se utiliza el protocolo adaptado por la OMS. A cada hisopo se le corta la varilla y se introduce en un tubo de 1,5 ml. A continuación se le añaden 500 µl de PBS 1X (120 mMNaCl; 2,0 mMKCl; 100 mM Na₂ HPO₄; 6mM KH₂ PO₄, pH 7,3), y se deja en agitación a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido el tiempo se centrifuga durante 15 min a 14.000 rpm. El sobrenadante es eliminado y el sedimento resuspendido en 180 µl del tampón buffer de lisis proporcionado por el kit de extracción de ácidos nucleicos RealPure Spin Kit (Ref: RMEGS01; Durviz s.l., Valencia, España).
- Frotis teñidos (Extensiones): Se siguieron las recomendaciones de Al-Jawabreh y col., (2006), así como modificaciones aportadas por nuestro laboratorio. Para eliminar las trazas de aceite de inmersión, las extensiones fueron sumergidas en xylol durante 15 min. Tras el lavado se dejaron secar al aire hasta que se hubo eliminado cualquier traza de xylol. Se añadió sobre el portaobjetos 50 µl de NET10 pH 8,0 (10 mMNaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl) y con la ayuda de la punta de una pipeta se rascó la superficie de la muestra para despegarla del cristal. Con una micropipeta se recogió el líquido con la muestra y fue transferido a un tubo de 1,5 ml. Este procedimiento se repitió otras 3 veces, de manera que se realizaron cuatro lavados y se obtuvo un volumen final de NET 10 más la muestra problema de unos 200 µl.
- Biopsias en etanol al 70%: con un bisturí desechable se cortan las muestras en una placa Petri hasta conseguir pequeños trozos. La muestra se pasa a un tubo de 1,5 ml con 500 µl de PBS al 1X anterior. Tras un pulso en el agitador, se deja en agitación a temperatura ambiente 30 min. Posteriormente se centrifuga a 14.000 rpm durante 15 min. Se elimina el sobrenadante y se añaden 180 µl del tampón buffer de lisis proporcionado por el kit de extracción de ácidos nucleicos RealPure Spin Kit (Ref: RMEGS01; Durviz s.l., Valencia, España).

B. Lisis de las muestras y extracción de los ácidos nucleicos: a las todas las muestras anteriores se les añaden 40 μl de SDS (duodecil sulfato sódico) al 10%, 20 μl de proteinasa K (30mg/ μl) y 6 bolas de cristal de 3 mm de diámetro. Tras una breve agitación en el vórtex, se incuban las muestras overnight (>18 horas) a 60°C y en agitación continua. Pasado este tiempo, las muestras son congeladas a -80°C durante 15 min y calentadas a 95°C durante 10 min.

C. Purificación y precipitación de los ácidos nucleicos: la purificación y precipitación de los ácidos nucleicos de las muestras anteriores se realiza siguiendo las instrucciones del kit de extracción de ácidos nucleicos Real Spin kit (Ref: RMEGS01; Durviz s.l., Valencia, España).

Se añaden 200 μl del tampón de lisis/unión y tras un pulso en agitador se incuban los tubos a 70°C durante 10 min. A continuación se añaden 100 μl de isopropanol, se mezcla bien en el vórtex y el lisado se traspasa al reservorio de la columna "MicroSpin" con un tubo de recogida. Se centrifugan los tubos a 8.000 rpm durante 1 min y se elimina el filtrado. Se añaden 500 μl de tampón de desinhibición y tras centrifugar a 11.000 rpm durante 1 min se vuelve a eliminar el filtrado. Se adicionan 500 μl de tampón de lavado, se centrifugan los tubos a 12.000 rpm durante 1 min y tras eliminar el filtrado se repite el último proceso a 14.000 rpm. Una vez desechado el filtrado, se centrifuga a 14.000 rpm durante 2 min para eliminar el etanol residual y la columna "MicroSpin" se cambia a un nuevo tubo de recogida. Finalmente, la elución de los ácidos nucleicos se realiza añadiendo 100 μl de tampón de elución precalentado a 70°C y dejando las columnas en agitación durante 5 min. Tras un centrifugado a 14.000 rpm durante 2 min, se filtra el ADN y se traspasa a un tubo de 1,5 mL.

ANEXO V. Amplificación de ácidos nucleicos de *Mycobacterium leprae* mediante la reacción en cadena por la polimerasa (PCR).

La amplificación se llevó a cabo mediante una PCR anidada (nPCR) que amplifica un fragmento multicopia (RLEP) del ADN genómico de *M. leprae*, descrito por primera vez por Yoon y colaboradores (Yoon y col., 1993) y adaptado y modificado por Donoghue y colaboradores (Donoghue y col., 2001).

La primera reacción se lleva a cabo con los cebadores LP1 (avance) y LP2 (regresión) y se amplifica una región de 129 pb (pares de bases), en la segunda reacción se observa un producto de 99 pb y se utilizan los cebadores LP3 LP3 (avance) y LP4 (regresión) (Véase la Tabla 17).

Tabla 17. Cebadores usados para la amplificación de la región RLEP.

DIANA	CEBA- DORES	SECUENCIA 5'-3'	Pb*	Tf* (°C)	Ta*(°C)
RLEP	LP1	TGC ATG TCA TGG CCT TGA GG	129	69,6	64
	LP2	CAC CGA TAC CAG CGG CAG AA		70,5	
	LP3	TGA GGT GTC GGC GTG GTC	99	69	57
	LP4	CAG AAA TGG TGC AAG GGA		62,4	

Pie de tabla: *Pb: Pares de bases. Tf: Temperatura de fusión. Ta: temperatura de anidación.

Los componentes de la reacción de amplificación son: Taq&Go 1X (Ref: EPTAG100, MP Biomedicals LLC, California, USA) que contiene el tampón de reacción, los deoxinucleósido trifosfato (dNTP) y la enzima polimerasa, y 0,3 μ M de cada par de iniciadores (LP1 y LP2 para la primera reacción; LP3 y LP4 para la segunda reacción). En la primera reacción se añadieron 5 μ L del ADN

problema y en la segunda 2 μL del producto de la primera PCR y agua bidestilada estéril ($\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$) hasta un volumen final de 25 μL .

En ambos casos, en la primera muestra y en la penúltima muestra el ADN problema fue sustituido por $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ estéril como control negativo de reactivos y manipulación respectivamente. La última muestra fue siempre una dilución del ADN genómico purificado de *M. leprae* obtenido a partir de un inóculo en armadillo en $\text{H}_2\text{O}_{\text{bd}}$ a una concentración final de 4 $\text{pg}/\mu\text{L}$ como control positivo (Aislado: NHDP-63).

En ambas reacciones las temperaturas de amplificación fueron las mismas: las muestras fueron sometidas a una temperatura de desnaturalización inicial de 94°C durante 1 min, posteriormente a 30 ciclos de amplificación con una temperatura de desnaturalización de 94°C durante 30 seg, anidamiento a 58°C durante 30 seg y extensión a 72°C durante 30 seg, finalmente 5 min a 72°C. El termociclador utilizado fue el modelo FTC3/02 TC-3000 ThermalCyclerRange (Techne, BibbyScientific Ltd., Staffordshire, UK).

La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo en un gel de agarosa al 2 % (AGAROSA LM SIERVE, Conda, Pronadisa, Madrid, España) en TBE 1X (Ref: RBMT02, REAL, Durviz, s.l Valencia, España) con 0,942 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Real Safe Nucleotid Acid Staining Solution (Ref: RBMSAFE. REAL, Durviz, s.l Valencia, España). La electroforesis se llevó a cabo en el PowerStation 300 (Labnet International Inc., Edison, USA) durante 45 min a 150 vóltios y 400 amperios.

ANEXO V. Análisis de resistencia a antibióticos. GenoType LepraeDR. Test de genética molecular para la identificación de resistencia a Rifampicina, Ofloxacino y Dapsona.

El ensayo GenoType LepraeDR es un test cualitativo para la identificación de *Mycobacterium leprae* y su resistencia a rifampicina y/o ofloxacino y/o dapsona a partir de biopsias de piel con baciloscopia positiva. La identificación de la resistencia a la rifampicina es posible mediante la detección de las mutaciones más relevantes en el gen *rpoB* (que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa). Para la detección de la resistencia al ofloxacino u otras fluoroquinolonas, se examinan las mutaciones más significativas del gen *gyrA* (que codifica la subunidad A de la DNA girasa). Para la resistencia a la dapsona, se examina la región pertinente del gen *foIP1* (que codifica para la dihidropteroato sintetasa).

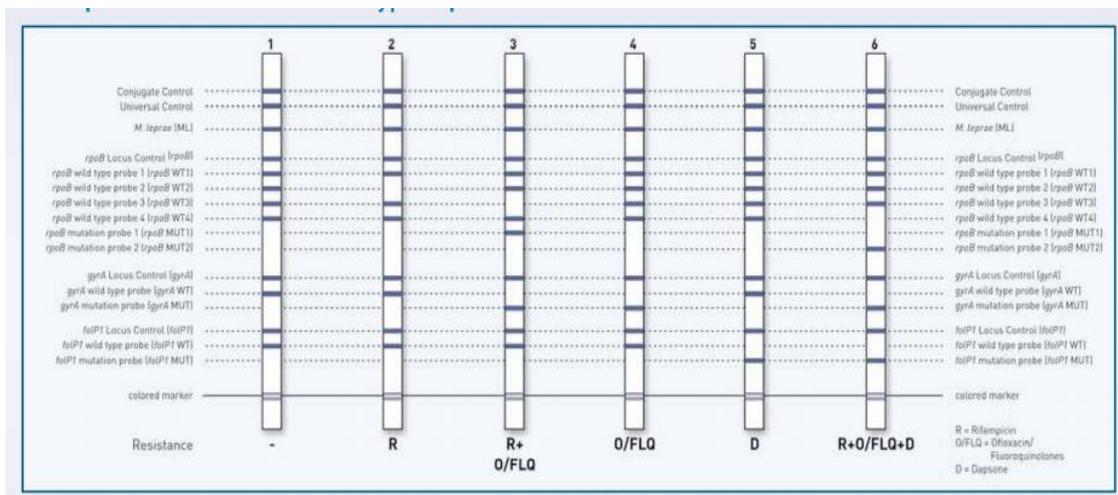


Figura 25. Posibles resultados tras el análisis de hibridación.

Amplificación

Prepare la mezcla de amplificación (45 µl) en una habitación libre de DNA contaminante. La muestra debe añadirse en un área separada. Es crucial el empleo de una polimerasa hot start.

Prepare para cada muestra:

- 35 µl de PNM – suministrado
- 5 µl 10x de tampón para incubación de polimerasa – no suministrado.
- x µl de solución MgCl₂¹¹ – no suministrado
- 1-2 unidades de DNA polimerasa termoestable (consulte el manual) – no suministrado
- y µl de agua para obtener un volumen de 45 µl (sin considerar el volumen de enzima) – no suministrado.
- Añada 5 µl de solución de DNA para obtener un volumen final de 50 µl (sin considerar el volumen de enzima).

¹¹ Dependiendo del sistema enzima/tampón usado, la concentración óptima de MgCl₂ puede variar entre 1,5 y 2,5 mM. Tenga en cuenta que algunos tampones para incubación ya contienen MgCl₂.

La evaluación del rendimiento del ensayo **GenoType LepraeDR** fue realizada utilizando la Polimerasa HotStarTaq DNA de Qiagen. Las cantidades necesarias por muestra cuando utilice esta enzima son las siguientes:

- 35 µl de PNM – suministrado
- 5 µl 10x PCR Buffer de la HotStarTaq (contiene 15 mM de MgCl₂) – no suministrado
- 2 µl 25 mM de solución MgCl₂ – no suministrado
- 0,2 µl (1 U) de HotStarTaq – no suministrado
- 3 µl de agua (para uso en biología molecular) – no suministrado
- 5 µl de solución de DNA (añada el DNA en una zona distinta)

La concentración final de MgCl₂ en la mezcla de amplificación será de 2,5 mM.

Determine el número de muestras a amplificar (número de muestras a analizar más las muestras de control). Por ejemplo, un control de contaminación contiene 5 µl de agua en lugar de solución de DNA. Prepare una mezcla que contenga todos los reactivos excepto la solución de DNA y mezcle con cuidado pero con fuerza. No utilice vortex. Alicuote la mezcla madre en volúmenes de 45 µl en tubos preparados de PCR.

Perfil de amplificación²¹:

Cuando utilice un termociclador de Hain Lifescience previamente instalado, seleccione el protocolo "HOT40".

15 min 95°C	1 ciclo
30 seg 95°C 2 min 58°C	} 10 ciclos
25 seg 95°C 40 seg 53°C 40 seg 70°C	
8 min 70°C	1 ciclo

²¹ Aplicable a la taq polimerasa utilizada para la validación. Cuando se utilicen otras DNA polimerasas hot start, el intervalo de tiempo del primer paso puede ser reducido (consulte el manual de la enzima).

Los productos de amplificación pueden almacenarse entre +8 y -20°C.

Hibridación

Cuando utilice un aparato de hibridación de Hain Lifescience, por favor, consulte el documento "Overview equipment programs" disponible en www.hain-lifescience.com para localizar el protocolo de hibridación preinstalado a usar.

El siguiente protocolo describe la hibridación manual utilizando un baño de agua o un **TwinCubator**.

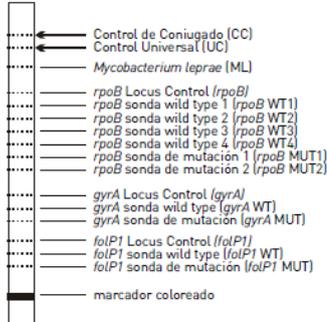
Preparación

Pre caliente en baño de agua con agitación a **45°C** (la máxima desviación tolerada en la temperatura idónea es de $\pm 1^\circ\text{C}$) o poner en marcha el **TwinCubator**. Pre caliente las soluciones HYB y STR a **37-45°C** antes de usar. Los reactivos han de estar libres de precipitado (tenga en cuenta, no obstante que la solución CON-D es opaca). Mezcle si fuera necesario. Caliente a temperatura ambiente los restantes reactivos, con la excepción del CON-C y el SUB-C. Usando un tubo adecuado, diluya el Conjugado Concentrado (CON-C, naranja) y el Sustrato Concentrado (SUB-C, amarillo) 1:100 con sus tampones respectivos (**CON-C con CON-D, SUB-C con SUB-D**) en las cantidades necesarias. Mezcle bien y equilibre a temperatura ambiente. Para cada tira añada 10 μl de concentrado a 1 ml de los respectivos tampones. Diluya el CON-C antes de cada uso. El SUB-C diluido es estable durante 4 semanas si se almacena a temperatura ambiente y se protege de la luz.

1. **Dispense 20 μl de la Solución de Desnaturalización (DEN, azul) en una esquina de cada uno de los pocillos usados.**
2. **Añada a la solución 20 μl de muestra amplificada, pipetea arriba y abajo para mezclar bien e incube a temperatura ambiente durante 5 minutos.**
Entre tanto, saque tiras de sus tubos usando pinzas e identifíquelas marcando bajo el marcador coloreado con un lápiz. Lleve siempre guantes cuando manipule tiras.
3. **Añada cuidadosamente a cada pocillo 1 ml de Tampón de Hibridación (HYB, verde) precalentado. Agite suavemente la bandeja hasta que la solución tenga un color homogéneo.**
Tenga la precaución de no derramar solución en los pocillos cercanos.
4. **Ponga una tira en cada pocillo.**
Las tiras tienen que quedar completamente cubiertas por la solución y el lado con la sonda hacia arriba (identificable por el marcador coloreado próximo al extremo inferior). Usando pinzas, de la vuelta a las tiras que pudieran haberse girado durante su inmersión. Limpie cuidadosamente las pinzas después de cada uso para evitar contaminación. Ello, es también de aplicación en los pasos siguientes.
5. **Ponga la bandeja en el baño de agua con agitación o en el TwinCubator durante 30 minutos a 45°C.**
Ajuste la frecuencia de agitación del baño de agua para que realice una mezcla completa y constante de la solución. Para obtener una adecuada transferencia de calor, la bandeja debe estar sumergida en el agua, al menos, 1/3 de su altura.
6. **Aspire completamente el Tampón de Hibridación.**
Por ejemplo, use una pipeta Pasteur conectada a una bomba de vacío.
7. **Añada 1 ml de Solución de Lavado Astringente (STR, roja) a cada tira e incube durante 15 minutos a 45°C en un baño con agitación o TwinCubator.**
8. **Desde este paso, en adelante, trabaje a temperatura ambiente. Elimine completamente la Solución de Lavado Astringente.**
Deseche la Solución de Lavado en un contenedor y elimine todo el líquido restante volcando la bandeja y golpeándola suavemente sobre un papel absorbente. Ello es también de aplicación a todos los demás pasos de lavado.
9. **Lave una vez cada tira con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) sobre la plataforma de agitado del TwinCubator (elimine el RIN después de la incubación).**
10. **Añada 1 ml de Conjugado diluido (ver más arriba) a cada tira e incube durante 30 minutos sobre la plataforma de agitado del TwinCubator.**
11. **Elimine la solución y lave cada tira dos veces durante 1 minuto con 1 ml de Solución de Aclarado (RIN) y de nuevo durante 1 minuto aproximadamente con 1 ml de agua destilada (ej.: botella de lavado) sobre la plataforma de agitación del TwinCubator (deseche la solución cada vez).**
Asegúrese de eliminar cualquier resto de agua después del lavado anterior.
12. **Añada 1 ml de sustrato diluido (ver más arriba) a cada tira e incube sin agitación y protegiéndolas de la luz.**
Dependiendo de las condiciones del test (por ej. la temperatura ambiente), el tiempo de incubación del sustrato, es decir, el tiempo hasta que las bandas son claramente visibles, puede variar entre 3 y 20 minutos. Tiempos prolongados de incubación del sustrato pueden conducir a una tinción incrementada del fondo y podría dificultar la interpretación de los resultados.
13. **Detenga la reacción cuando las bandas sean claramente visibles, aclarando brevemente por dos veces con agua destilada.**
14. **Usando pinzas, saque las tiras de la bandeja y séquelas entre dos capas de papel absorbente.**

Evaluación e Interpretación de Resultados

Pegue las tiras y almacénelas protegidas de la luz. Con cada kit se proporciona un formulario de evaluación. Cuando se utilice este formulario de evaluación, pegue las tiras reveladas en los campos marcados, alineando las bandas CC y UC con las respectivas líneas del formulario. Determine el estado de la resistencia y anote en las respectivas columnas. La plantilla suministrada también sirve como ayuda para evaluación y ha de ser alineada con las bandas UC y CC de la tira. No todas las bandas de una tira han de mostrar la misma intensidad. Cada tira tiene un total de 16 zonas de reacción (ver esquema).



Nota: La tira no se muestra a tamaño original.

Control de Conjugado (CC)

Debe aparecer una línea en esta zona, documentando la eficacia del conjugado unido y la reacción del sustrato.

Control Universal (UC)

Esta zona detecta, como es conocido, todas las micobacterias y miembros del grupo de bacterias gram-positivas con alto contenido de G+C. Solamente han de considerarse aquellas bandas cuyas intensidades sean tan fuertes, o más fuertes, que la intensidad del Control Universal.

Mycobacterium leprae (ML)

Esta zona de reacción documenta, hasta donde se conoce, la presencia de una cepa de *M. leprae*. La intensidad de esta banda varía dependiendo de la concentración de DNA inicial. Si ésta zona es negativa, la bacteria analizada no es *M. leprae* y la muestra no puede ser evaluada con este sistema.

Locus Control (*rpoB*, *gyrA* y *folP1*)

Las zonas del Locus Control detectan una región del gen específica para cada respectivo locus y siempre han de ser positivas, cuando la banda de ML haya documentado la presencia de *M. leprae*. Si no aparecen ni los controles de locus ni las sondas para los wild type ni las sondas para las mutaciones, de uno de los 3 genes examinados, el ensayo no puede ser evaluado.

Sondas wild type

Las sondas wild type comprenden las áreas de resistencia más importantes de los genes respectivos (ver figura 1, tabla 1, 2 y 3). Cuando todas las sondas wild type de un gen son positivas, no se detectan mutaciones en las regiones examinadas. La cepa testada es sensible para el respectivo antibiótico. En caso de una mutación, el respectivo amplicón no puede unirse a la correspondiente sonda wild type. La ausencia de señal en al menos una de las sondas wild type indica, por tanto, resistencia de la cepa testada al respectivo antibiótico.

Solamente han de considerarse aquellas bandas cuyas intensidades sean tan fuertes, o más fuertes, que la intensidad del Control Universal. Cada patrón que se desvíe del patrón del wild type indica resistencia de la cepa testada. El patrón de bandas obtenido con las sondas *rpoB* permite establecer una conclusión acerca de la resistencia a rifampicina de la cepa analizada, el patrón de bandas obtenido con las sondas *gyrA* permite establecer una conclusión acerca de la resistencia a ofloxaciná u otras fluoroquinolonas, y el patrón de bandas obtenido con las sondas *folP1* permite establecer una conclusión acerca de la resistencia a dapsona de la cepa analizada, respectivamente.

REFERENCIAS DE ANEXOS

- Acosta L, Ferrer C, Torres P. Utilidad del diagnóstico molecular de *Mycobacterium leprae* y seguimiento de pacientes diagnosticados en Fontilles de 2011 a 2014. Fontilles, Rev. Leprol., 2014;29(5):409-421.
- Al-Jawabreh A, Schoenian G, Hamarsheh O, Presber W. Clinical diagnosis of cutaneous leishmaniasis: a comparison study between standardized graded direct microscopy and ITS1-PCR of Giemsa-stained smears. Acta Trop, 2006; 99(1): 55-61.
- Donoghue HD, Holton, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. J. Med. Microbiol., 2001;50(2):177-182.
- International Federation of Anti-Leprosy Associations (ILEP). *Procedimientos para efectuar una baciloscopia para la lepra: guía de aprendizaje número 3*. Londres: ILEP, 2003b. Disponible en: http://www.ilep.org.uk/fileadmin/uploads/Documents/Learning_Guides/Ig3sp.pdf
- Yoon K-H, Cho S-N, Lee M-K, Abalos RM, Cellona RV, Tranquilino TF, Laarni SG, Eduardo CC, Gerald PW, Kim J-D. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. J. Clin. Microbiol., 1993;31:895-899.

COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARCIALES EN FOROS ACADÉMICOS Y CIENTÍFICOS.

- Reunión Confederal de Lepra Ministerio de Salud de la Nación Buenos Aires Junio 2015.
- IX Congreso de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEM-TSI). Calpe (Alicante), España. 22-24 de Octubre 2015.
- IX Jornadas Científico-Tecnológicas de la Facultad de Cs Exactas, Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones. Posadas (Misiones), Argentina. 28-30 de octubre de 2015.
- 19th International Leprosy Congress, Beijing China, Setiembre 2016.
- Reunión Confederal de Lepra Ministerio de Salud de la Nación Buenos Aires Junio 2017.
- Este proyecto de Investigación fue beneficiado con la Beca Oñativia-Carrillo del MSPN 2015.
- Proyecto Lepra GT Saude Itaipu 2017 (Hospital Menonita km. 81, Departamento La Cordillera, Paraguay; Foz de Iguazu, Toledo, Brasil).