

Frecuencia de infección por *Mycobacterium Leprae* en convivientes de pacientes con lepra, Antioquia 2001-2002

NORA CARDONA CASTRO* , CAMILO BELTRÁN**

Proyecto realizado en el Instituto Colombiano de Medicina Tropical.-CES

Financiación: Dirección Seccional de Salud de Antioquia e Instituto Colombiano de Medicina Tropical-CES

RESUMEN

Se detectó la infección por *Mycobacterium leprae* y se evaluó la respuesta inmune en convivientes de pacientes con lepra multibacilar (MB) registrados en el Departamento de Antioquia en 2001 y 2002. Se estudiaron 61 convivientes de 16 pacientes con lepra multibacilar (MB) de los municipios de Apartadó, Marinilla, Cauca, Puerto Berrío, Nechí, Bello, Amalfi, Chigorodó y Medellín. Los convivientes se evaluaron con examen físico para detectar signos clínicos de lepra y documentar cicatriz BCG, Ziehl Neelsen y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en muestras de moco nasal y linfa para detectar *M. leprae*, ELISA para detectar anticuerpos IgM anti glicolípido fenólico 1 (PGL-1) y aplicación de lepromina A con lectura de reacción de Mitsuda a los 21-28 días.

La edad de los convivientes fluctuó entre 4 a 76 años, el promedio de edad fue de 31.3 años, 55.7% de sexo femenino, el promedio de tiempo de contacto con el paciente fue de 16 años; 10% presentaron IgM anti PGL1 positiva, 54% Mitsuda positiva. Las baciloscopias y PCR fueron

* Miembro del Grupo de Investigación del Instituto Colombiano de Medicina Tropical – CES. Médica Especialista en Medicina de Laboratorio. Correspondencia: ncardona@ces.edu.co

** Miembro del Grupo de Investigación del Instituto Colombiano de Medicina Tropical – CES. Laboratorista Clínico.

negativas. De acuerdo a estos resultados, los convivientes se clasificaron como infectados, no infectados, de bajo y alto riesgo de desarrollar lepra.

PALABRAS CLAVE

Conviviente

Lepra

MB

PCR

SUMMARY

Infection and immune response to Mycobacterium leprae were detected in household contacts of leprosy patients diagnosed in Antioquia State during 2001 and 2002. Sixty-one household contacts of 16 patients from Apartadó, Marinilla, Caucasia, Puerto Berrío, Nechí, Bello, Amalfi, Chigorodó and Medellín were studied. Household contacts were evaluated through physical examination to detect signs of leprosy and document BCG scar, Ziehl Neelsen stain, polymerase chain reaction (PCR) in nasal and peripheral lymph, ELISA to detect IgM anti PGL-1, lepromine A to evaluate Mitsuda reaction at 21-28 days.

Age of the household contacts had a range of 4 to 76 years, mean of the age was 31.3 years, 55.7% female, mean of the time of contact was 16 years; 10% had positive IgM anti PGL1, 54% Mitsuda reaction positive. All of Ziehl Neelsen stain and PCR were negative. According to results, household contacts were classified as infected, non-infected, low and high risk to develop leprosy.

KEY WORDS

Household contact

Leprosy

MB

PCR

INTRODUCCION

La Lepra es una enfermedad infecciosa, granulomatosa crónica producida por *Mycobacterium leprae* patógeno intracelular obligado, ácido alcohol resistente. La imagen de esta enfermedad ha permanecido a través del tiempo; aún hoy se asocia con mutilaciones, deformidad física y segregación (1). La enfermedad afecta principalmente al sistema nervioso periférico, la piel, los ojos, testículos y laringe. La mayor parte de las incapacidades de los pacientes con lepra tienen su origen en el compromiso del sistema nervioso periférico, lo cual conduce a pérdida progresiva y traumática de manos y pies y a daño ocular grave (2). Los programas de control de lepra en el mundo establecen como una de sus prioridades el manejo y la detección temprana de los pacientes con formas clínicas aún leves, con la finalidad de disminuir sus incapacidades físicas. A pesar de esto entre el 25 y el 30% del total de los pacientes con lepra del mundo presentan complicaciones neurológicas que conllevan a la aparición de deformidades físicas notables (2).

La diseminación de la infección en una comunidad depende de las oportunidades de contacto con la bacteria y de la respuesta inmunológica de cada individuo expuesto. Actualmente se conoce que la infección subclínica por *Mycobacterium leprae* en áreas endémicas es muy frecuente, pero el porcentaje de individuos que llega a tener la enfermedad es del 5 al 10% (3).

La lepra continúa siendo un problema real de salud pública, en el año 2003 la Organización Mundial de la Salud reportó una disminución del número de pacientes con lepra de 6.000.000 de pacientes en 1985 a 534.311 de casos para ese año. La India es el país donde hay mayor número de casos y Brasil

es el segundo en el mundo (4). En el año 2000 Colombia aparece con 20.338 casos de los cuales hay 12.363 lepromatosos y 7.975 tuberculoides; considerándose este país de mediana endemicidad en lepra con regiones de prevalencias altas como los Santanderes, Arauca y Boyacá (5).

En el departamento de Antioquia el número de casos nuevos en los años 2001 y 2002 fue de 16, distribuidos en varias zonas del departamento. Estos casos nuevos están asociados a personas de alto riesgo de sufrir la enfermedad, como son los convivientes. Se calcula que cada caso nuevo pueda tener en promedio 3-5 convivientes o contactos, lo cual nos da un número total de 51 a 73 convivientes en riesgo de estar infectados con *M. leprae* y que pueden en un momento de su vida padecer lepra.

La incidencia de lepra en Antioquia ha fluctuado desde 1982 a 2002, entre 0.19 a 0.93 por 100.000 habitantes (6). De acuerdo con estos datos y según la OMS, el control de esta enfermedad está en la etapa de posteliminación, es decir que ya no representa un problema de salud pública para la región (7); sin embargo, el largo período de incubación de la enfermedad hace posible la aparición de casos nuevos en la población de alto riesgo, los convivientes, aún después de haber realizado el tratamiento con poliquimioterapia del caso índice (8).

El programa de control de lepra a nivel nacional, establece un seguimiento clínico periódico de estos convivientes (7); este instrumento tiene dificultades pues únicamente detecta convivientes que tengan lesiones clínicas y lo ideal sería detectar personas infectadas con riesgo de desarrollar la enfermedad.

Hay interés de la OMS en conocer el porcentaje de convivientes infectados con riesgo de desarrollar la enfermedad y que pueden ser detectados a través del uso de métodos clínicos, bacteriológicos, serológicos y de tecnología de biología molecular que indiquen un período anterior a la aparición de la infección clínica (9).

Una de las principales limitaciones para el control epidemiológico exitoso de la lepra es la carencia de un método de diagnóstico para casos subclínicos. El largo período de incubación de la enfermedad, la liberación y diseminación de *M. leprae* durante los estadios subclínicos y principalmente en casos de pacientes multibacilares no tratados, constituyen la fuente principal de infección (10).

El diagnóstico precoz de lepra permitiría un tratamiento oportuno y con ello se disminuirían la incapacidades de estos enfermos. El diagnóstico de lepra está dado por los hallazgos anormales a la exploración de la sensibilidad superficial, el engrosamiento de los nervios periféricos y el hallazgo de la micobacteria en frotis de moco nasal, linfa y biopsia de la lesión cutánea (11).

Estas ayudas diagnósticas son solo útiles en pacientes con cambios físicos, es decir cuando ya son sintomáticos, quedando por fuera los contactos infectados, bacilíferos y que aún no tienen sintomatología.

La evaluación del estado inmunitario de los enfermos con lepra se hace mediante la prueba de hipersensibilidad retardada a antígenos del bacilo causal, lepromina (12). La lepromina puede obtenerse de lepromas de pacientes LL, lepromina H y de lepromas de armadillos infectados, lepromina A. Para la prueba se aplican intradérmicamente 0.1 cc del antígeno y se hace la lectura a las 24 horas (reacción de Fernández) y a los 21 días (reacción de Mitsuda) (7). Esta prueba es positiva en pacientes con las formas tuberculoides y negativa en los que tienen formas lepromatosas (12). El fundamento de la reacción de Mitsuda está en la inmunidad mediada por células, la cual está deprimida en la forma lepromatosa y exaltada en la tuberculoides (8).

La producción de antígenos sintéticos a partir del análisis del PGL-1 ha permitido diseñar pruebas de tipo ELISA, que detectan anticuerpos específicos contra *M. leprae* lo cual representa una ayuda de

importancia para el diagnóstico temprano de personas infectadas o con "alto riesgo" de enfermar (13). Las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos contra el PGL-1 son de gran utilidad en pacientes con alta carga bacilar en quienes se detectan niveles altos de anticuerpos tipo Ig M pero tienen limitaciones en los casos paucibacilares (14).

La especificidad y sensibilidad de estas pruebas es determinada por la comparación de resultados en personas sanas con los resultados obtenidos en pacientes con lepra. De esta manera se ha reportado una especificidad del 98% y una sensibilidad del 80 al 100% para detección de anticuerpos en pacientes multibacilares y de 30 a 60% para pacientes paucibacilares (14). La variación entre los reportes de sensibilidad, depende principalmente de la población donde fue estudiada y de la diferencia clínica y terapéutica de los pacientes. Los convivientes y contactos de pacientes pueden ser también seropositivos, como resultado de infección. En conclusión, cuando los resultados detectan anticuerpos, indican presencia de infección con *M. leprae*, sin embargo puede haber o no signos clínicos de dicha infección. Esto podría aclarar que estas pruebas serológicas son útiles cuando son consideradas junto con otras herramientas de diagnóstico. Las pruebas serológicas se han usado además como una medida cuantitativa para evaluar el efecto de la terapia en pacientes con lepra MB (13,14).

El uso de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), ha permitido mejorar el diagnóstico en aquellos casos en que los métodos convencionales no son útiles (15-17). También se ha utilizado para medir la eficacia de la quimioterapia en pacientes bajo tratamiento (16).

Solamente si se detectan los infectados por *M. leprae* podríamos en el contexto de posteliminación, identificar el grupo de riesgo para hacer un seguimiento.

MATERIALES Y METODOS

Población estudiada.

61 convivientes de 16 pacientes MB diagnosticados en 2001 y 2002. A cada individuo se le aplicó el formulario con las variables de interés y se tomaron muestras de sangre, moco y linfa previo consentimiento escrito.

Con respecto al caso índice: fecha de ingreso al programa de control, sexo, edad, índice bacilar al ingreso y actual, estado actual del tratamiento, posición en la familia, escolaridad, estrato socioeconómico.

Con respecto al conviviente: edad, peso, talla, sexo, cicatriz de vacunación con BGC, tiempo de convivencia con el caso índice, escolaridad, estrato socioeconómico, parentesco con el caso índice, niveles de anticuerpos IgM, resultado de baciloscopia en moco y linfa, resultado de PCR en moco y linfa, prueba de lepromina.

Definición de términos

Conviviente: persona que vive bajo el mismo techo que el caso índice, durante 2 años o más y el examen físico es clínicamente normal, sin signos ni síntomas de lepra (7).

Caso índice: paciente con diagnóstico de lepra multibacilar inscritos en el programa de control de Hansen en 2001-2002 (7).

Infectado: conviviente con anticuerpos IgM anti PGL1 positivos.

No infectado: conviviente negativo para anticuerpos IgM contra PGL1, PCR negativo y baciloscopia negativa.

Análisis de datos

Se aplicó estadística descriptiva, en forma de medidas de frecuencia y de tendencia central.

Serología para detección de anticuerpos IgM anti PGL I

El antígeno sintético PGL-1 fue suministrado por el Dr. Patrick Brennan de la Unidad de Micobacterias de Colorado State University, USA. PGL-1 fue utilizado a una concentración de 2.0 ug/ml y fue diluido 1:1000. Se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos marca Dynatech®, a cada pozo se le adicionó 50 ul de antígeno diluido. Se incubó el plato a temperatura ambiente toda la noche (14-18 horas). Se descartó el sobrenadante y se adicionó 100ul de solución bloqueadora (1% albúmina sérica bovina en PBS). Se incubó por 1 hora a 37° C. Se descartó el sobrenadante y se adicionó 50ul de suero del conviviente diluido 1:300 en 0.5% BSA-PBS. Se incubó por 1 hora a 37°C, se lavó 4 veces con PBS y se adicionaron 50ul de anticuerpo anti IgM humana conjugado diluido en 0.5% BSA-PBS. Se incubó a 37° C por 1 hora. Se lavó el plato 4 veces con PBS y se adicionó 50ul de TMB solución de sustrato a cada pozo. Se incubó 10-15 minutos a 37° C, se paró la reacción adicionando 50ul de H2SO4 2.0M. Se leyó la absorbancia con filtro 450 nm.

Cálculo del punto de corte

El punto de corte para la interpretación de la lectura fue calculado usando 75 sueros de población sana pertenecientes al departamento de Antioquia que no son contactos de pacientes con lepra. El promedio de la lectura de estos sueros mas la suma de 3 desviaciones estándar fue considerado el punto de corte. El cual correspondió a 0.115 de absorbancia leída a 450 nm, el mismo filtro utilizado para la lectura de las pruebas.

PCR para detección de *M. leprae*

La PCR se realizó utilizando reactivos marca Promega Inc, USA., y el equipo de amplificación MJ

Research PT 100, utilizando los primers 18kd-1 y 18kd-2 específicos de *M. leprae* y el protocolo de amplificación descritos por Scollard et al (18).

Los productos de la PCR, se corrieron en un gel de agarosa al 2%, para comprobar si hubo amplificación.

Baciloscopia

Se realizó coloración de Ziehl Neelsen en muestras de moco y linfa, de acuerdo a la metodología ya descrita (19).

Prueba de lepromina

Esta prueba intradérmica se realizó con lepromina A, antígeno preparado a partir de lepromas de armadillo. La lectura e interpretación de la induración se realizó teniendo como base un punto de corte de 4mm, siendo positiva si es igual o mayor (19).

Interpretación de prueba de lepromina

Reacción de Mitsuda: fue leída 21 a 28 días después de la aplicación. Una prueba positiva significa que si la persona se infecta con *M. leprae* tendrá una respuesta inmune adecuada que podría controlar la infección o desarrollar una lepra tuberculoides. Una prueba de Mitsuda negativa significa que si existe infección, la persona desarrollará una lepra lepromatosa (19).

RESULTADOS

La edad de los convivientes estudiados fluctuó entre 4 a 76 años, el promedio de edad fue de 31.3 años, 55.7% de sexo femenino, el promedio de tiempo de convivencia fue de 16 años. De los convivientes estudiados, 10% presentaron IgM anti PGL1 positiva, 54% Mitsuda positiva. Las baciloscopias y PCR de moco y linfa fueron negativas para todos los convivientes.

Los convivientes se clasificaron en 4 grupos teniendo como base los resultados de las pruebas realizadas.

- Grupo 1: 1 conviviente con respuesta inmune similar a lepra lepromatosa, Mitsuda negativa y anticuerpos IgM positivos.
- Grupo 2: 27 convivientes con respuesta inmune similar a lepra tuberculoide, Mitsuda positiva y anticuerpos IgM negativos.
- Grupo 3: 20 convivientes no infectados, anticuerpos IgM negativos y Mitsuda negativa.
- Grupo 4: 4 convivientes con anticuerpos IgM anti PGL1 positivos y Mitsuda positiva.
- Grupo 5: 7 convivientes que no asistieron a la lectura de la lepromina, 6 de ellos con títulos de anticuerpos anti IgM negativos y 1 positivo.

CONCLUSIONES

Evaluar desde varios aspectos (examen físico, estado bacteriológico e inmunológico) a los convivientes de pacientes con lepra, es de gran utilidad para la detección de infectados, de casos nuevos, y para la determinación de la respuesta inmune como indicador de susceptibilidad a desarrollar variables clínicas de lepra en esta población de riesgo.

La búsqueda activa de casos en Antioquia donde la prevalencia de lepra ha fluctuado desde 1986 a 1998, entre 0.2 a 1.8 por 100.000 habitantes, es de gran importancia para mantener esta enfermedad en estado de eliminación como problema de salud pública, pues la prevalencia actual es igual a la planteada por la OMS que define eliminación cuando la prevalencia alcanza niveles de menos de un caso por 10.000 habitantes.

El seguimiento de esta población de riesgo favorecería la detección temprana de casos nuevos de lepra, además, ayudaría a la consecución del objetivo de la eliminación de la lepra y de pacientes con secuelas graves e irreversibles.

La estandarización de una prueba de ELISA no comercial para la detección de anticuerpos IgM contra antígeno PGL1 de *Mycobacterium leprae* es un resultado adicional de nuestra investigación, además de aportar una solución diagnóstica y de seguimiento en estos pacientes y convivientes ya que la prueba comercial no existe.

Un conviviente presentó anticuerpos IgM positivos y reacción de Mitsuda negativa, lo cual significa que ya está infectado y que si desarrolla la enfermedad presentará una lepra lepromatosa, pues la respuesta inmune celular es ineficiente. Veinte y siete convivientes de los estudiados con anticuerpos IgM positivos presentaron prueba de Mitsuda positiva, indicando que están infectados con *M. leprae* y que si desarrollan la enfermedad probablemente sea lepra tuberculoide, pues la respuesta inmune celular es adecuada y presentan un perfil inmunológico similar al de los pacientes con lepra tuberculoide (12). Estos dos grupos de pacientes han sido identificados como los de mayor riesgo de sufrir la enfermedad en algún momento de sus vidas y deben ser evaluados periódicamente para detectar signos y síntomas tempranos de la enfermedad. Los convivientes no infectados, continuarán en riesgo de infectarse mientras estén en contacto con un paciente bacilífero.

El uso de la PCR en convivientes asintomáticos, es una práctica nueva que explora la posibilidad de detectar la micobacteria en muestras de moco nasal y linfa de esta población de alto riesgo.

Este estudio ayuda a justificar la estrategia de seguimiento a esta población de riesgo, utilizando al mismo tiempo varias herramientas diagnósticas para aumentar la sensibilidad del examen clínico.

De los resultados expuestos salen interrogantes importantes acerca de nuevas conductas terapéuticas o profilácticas en los convivientes infectados. La clasificación del conviviente de acuerdo a su estado de infección y de la respuesta inmune permite realizar una evaluación estrecha y adecuada, la cual podría implementarse como conducta de seguimiento en población de riesgo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Patrick Brennan por haber donado el antígeno PGL1 y la asesoría en la estandarización de la prueba para detección de anticuerpos.

BIBLIOGRAFIA

1. Trautman JR. A Brief History of Hansen's disease. The Star. 1990 Sep/Oct: 3.
2. Carranza HG, Ferra T, Pila PR. Estudio de las incapacidades causadas por la lepra. Fontilles de Leprología. 1990;17:548-49.
3. Lepra al Día. Boletín Eliminación de la Lepra en las Américas. División de Prevención y Control de Enfermedades Transmisibles OPS 1992;1:2.
4. WHO. The future incidence of leprosy: a scenario analysis. 2004. Disponible en: www.who.int/bulletin
5. Guerrero MI., Plazas N, León CI. Situación de la Lepra en Colombia: un análisis crítico. Informe Quincenal Epidemiológico Nacional. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, Mayo 30 de 2000.
6. Dirección Seccional de Salud de Antioquia. Diagnóstico de la Situación de Salud en Antioquia. Rev Epidemiol Antioquia 2.000; 5:146.
7. Ministerio de Salud. Guía de Atención Integral para la lepra. Ministerio de Salud, República de Colombia. Programa Patologías Infecciosas, Santafé de Bogotá D.C. 1997.
8. Ottenhoff T. Immunology of Leprosy: Lessons from and for Leprosy. Int J Leprosy. 1994; 62:108-21.
9. OMS. Comité de Expertos de la OMS en Lepra. Sexto Informe. Serie de Informes Técnicos, 768. OMS, Ginebra 1988.
10. Colston MJ. The Microbiology of *Mycobacterium leprae*, progress in the last 30 years. Trans Roy Soc Trop Med Hyg 1993 ;87:504-7.
11. OMS. Comité de Expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 874. Ginebra 1998.
12. Britton WJ. Immunology of Leprosy. Trans Roy Soc of Trop Med Hyg 1993;87:508-14.
13. Lafarte J, Abreu ES, Robaina R, Verez V. Ultramicroelisa para la detección de anticuerpos IgM anti *Mycobacterium leprae*. Inst Med Trop Sao Paulo 1991;33:491-5.
14. Mora N, Pérez M, Beroliche M. Determinación de Anticuerpos anti glicolípidos fenólicos I en población general de una área endémica de lepra. Fontilles Leprología 1992;17:587-9.
15. Santos AR, Nery JC, Duppre NC, Gallo ME, Filho JT, Suffys PN, et al. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. J Med Microbiol 1997;46:170-2.
16. Kampirapap K, Singtham N, Klatser PR, Wiriyawipart S. DNA amplification of detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1998;66:16-21.
17. Job CK, Jayakumar J, Williams DL, Gillis TP. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1997;65:461-4.
18. 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;109:642-6.
19. INS. El Laboratorio en Lepra: Bacteriología y Patología. Manual de Procedimientos básicos. Instituto Nacional de Salud. Santafé de Bogotá D.C., Diciembre 1992.

