

Respuesta serológica frente a marcadores micobacterianos en una zona hiperendémica de lepra. Venezuela (Años 2008-2011)

ELSA RADA SCHLAEFLI¹, MERCEDES FERNÁNDEZ MESTRE², NACARID ARANZAZU³, JOSÉ MORALES⁴, RAMÓN SOSA⁴, JOSÉ RAMÓN GUEVARA⁵.

Resumen:

La lepra es una enfermedad infecciosa, causada por *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepromatosis*, caracterizada por un amplio espectro de manifestaciones clínicas e histopatológicas, reflejando la naturaleza de la respuesta inmunitaria del hospedero ante este microorganismo. En el presente trabajo se determinó la respuesta de anticuerpos dirigida hacia el conjugado ND-o-LID-1 y sus componentes individuales LID-1 y ND-o- HSA en individuos del Caserío Mamaría ubicado en el Estado Portuguesa. Se incluyeron 167 individuos, clasificados en casos y contactos. La determinación de los anticuerpos se realizó a través del ensayo inmunoenzimático, establecido previamente por Rada E, 1999 y Duthie MS, 2009. Clínicamente se confirmaron 37,1% casos (62/167), de los cuales 71 % (44/62) eran paucibacilares y 29% (18/62) multibacilares. Al comparar la respuesta de anticuerpos entre los casos de Hansen y contactos, se observó una diferencia estadísticamente significativa (16,13% versus 5.7%, respectivamente, $p=0.013$). Al determinarse la filiación familiar de los individuos incluidos en el estudio, se detectaron tres familias (F) de interés: C, T y H. Los casos de Lepra presentes en las tres familias representan el 42 % de los casos totales, registrándose en la familia C todas las formas clínicas de esta enfermedad. Los resultados obtenidos sugieren que los marcadores empleados en este trabajo sirven de gran utilidad para ser empleado como herramienta auxiliar para el diagnóstico de la enfermedad de Hansen en los casos multibacilares.

Palabras clave: enfermedad de Hansen, anticuerpos, área hiperendémica

Serological response to mycobacterial markers in hyperendemic leprosy area. Venezuela (2008-2011)

Summary:

Leprosy is an infectious disease caused by *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* with a broad spectrum of clinical and histological manifestations driven by the host's immune response. It was the aim of this study to use the antibodies against the ND-o-LID-1 and its individual components LID-1 and ND-o-HAS in the diagnosis of leprosy in patients from Mamaría Village, Portuguesa state. The group studied was

1. PhD Inmunoparasitología. Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit
2. PhD Inmunología. Centro de Medicina Experimental, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC)
3. MD Dermatóloga. Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit
4. Lcdo. en Salud Pública. Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit
5. MD Coordinador del Programa Nacional de control de la Lepra. Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit

Autor para correspondencia:
Dra. Elsa Rada: e-mail:
elsa.rada@gmail.com

formed of 167 cases and contacts. The test was done by immunoassay described by Rada, 1999 and Duthie, 2009 and the results were as follows: 37.1% cases of leprosy were confirmed from which 71% /44/62) were paucibacillary and 29% (18/62) multibacillary. Comparing the response to antibodies between cases of leprosy and contacts, a statistically significant difference was observed (16.13 % Vs 5.7%) respectively, $p=0,013$. When the familial relationship of the individuals included in the study was disclosed, three families caught our attention: C, T, and H. This was because the cases of leprosy in these families represented 42% of all cases evaluated in the study and family C showed all the clinical forms of leprosy. Our results suggest that mycobacterial markers used in this study are very useful as an auxiliary tool in the diagnosis of Hansen's disease in multibacillary cases.

Key words: Hansen's disease, antibodies, hyperendemic area

Introducción

La lepra es una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepromatosis*, caracterizada por un amplio espectro de manifestaciones clínicas e histopatológicas, que van desde las formas tuberculoideas [Lepra Indeterminada (LI), Borderline Tuberculoide (BT), Lepra Tuberculoide (LT)] hasta las formas lepromatosas [Borderline Lepromatosa (BL), Lepra Lepromatosa (LL)]. En las tres últimas décadas, a pesar de los avances en el control de la Enfermedad de Hansen, continúa la detección de nuevos casos en países endémicos, constituyéndose en uno de los grandes desafíos para reducir la carga de la enfermedad como problema de Salud Pública. Después de la introducción de la terapia multidroga (TMD), como tratamiento de la enfermedad, en el año 2017 se notificaron menos de 200.000 casos, a nivel mundial¹. Hasta la fecha la estrategia clave para reducir la transmisión consiste en realizar una detección precoz y garantizar un tratamiento completo. En Venezuela para el año 2010 se detectó un promedio anual de 638 casos nuevos de Lepra, con una tasa de incidencia de 0,22, es decir, menos de un paciente por cada 10.000 habitantes. Para el año 2017 se notificaron 332 nuevos casos, observándose una disminución histórica en la tasa de detección, de 16,7 (1959) a 0,11 (2017) por 10.000 habitantes²⁻⁴. Sin embargo, se han mantenido tasas superiores a $0,5 \leq 1$ en el estado Portuguesa y entre 0,2- 0,5 en Apure, Barinas, Cojedes y Guárico. Los casos nuevos se detectaron principalmente en zonas rurales y urbanizaciones no consolidadas, siendo la forma multibacilar la más prevalente¹. Considerando el crecimiento poblacional y la existencia de una prevalencia oculta de lepra, es importante realizar una búsqueda temprana en estos estados.

En la mayoría de los casos el diagnóstico clínico de la lepra o enfermedad de Hansen es tardío, ya que solo es posible realizarlo una vez que se ha iniciado la sintomatología, con la presencia de lesiones cutáneas y el daño a los nervios comprometidos⁵. De esta manera, la lepra es la enfermedad infectocontagiosa con mayor número de casos de discapacidad física permanente⁶, por lo que muchos de los estudios que se encuentran en la literatura mundial, van orientado hacia la búsqueda de una prueba ideal, es decir, sensible, específica y rápida, que pueda utilizarse a gran escala para el diagnóstico precoz, seguimiento o detección de riesgo de recaídas, habiéndose conseguido importantes avances al respecto, no obstante, esto continúa siendo un reto en la actualidad⁷.

El método diagnóstico es la biopsia de lesiones cutáneas, la cual es una prueba compuesta que amerita la intervención de varias especialidades, por lo tanto, no puede ser considerada una prueba rápida⁸, ni de fácil utilización en trabajos de campo, a diferencia de la bacteriología en los pacientes multibacilares. Por lo tanto, hasta la fecha no hay una única prueba de laboratorio para diagnóstico de la lepra, prevaleciendo, esencialmente, el diagnóstico clínico. Sin embargo, no todos los galenos han tenido la oportunidad de atender a un enfermo de Hansen durante el ejercicio de su carrera, lo que el diagnóstico clínico para muchos no es tan sencillo.

Las micobacterias, incluyendo *Mycobacterium leprae*, producen una amplia gama de moléculas que participan en diversos puntos de la enfermedad (adherencia, neutralización, penetración, multiplicación, etc.), permitiendo la invasión de la célula hospedera, preferencialmente la célula fagocítica. Actualmente, hay una serie de proteínas del *Mycobacterium leprae* bien caracterizadas, purificadas y secuenciadas, que

modulan la respuesta inmunitaria del hospedero, por lo tanto, son objeto de gran interés para el desarrollo de vacunas y pruebas diagnósticas, así como también para el conocimiento de su papel en la patogenia de la enfermedad⁷.

Gracias al análisis de la cubierta del *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), se ha conocido que uno de sus mayores componentes es el glicolípido fenólico (GLP-1), el cual es a su vez es uno de los más estudiados. En vista de lo anteriormente expuesto, se han utilizado pruebas diagnósticas, basadas en la detección de anticuerpos dirigidos contra el GLP-1, como la técnica de Ensayo por Inmuno-Absorción Ligado a Enzimas (ELISA), sin embargo, su valor diagnóstico es limitado para detectar todas las formas clínicas⁹. El GLP-1 posee entre un 65% y 75% de especificidad, debido a la reactividad cruzada que presenta frente a otras micobacterias, por lo tanto, el papel de otros componentes, entre ellos las proteínas micobacterianas y su interrelación con el sistema inmunológico, presentan importantes avances en la comprensión de la enfermedad^{7,10-12}. Se ha evidenciado que GLP-1 presenta un segmento disacárido externo, el cual se puede sintetizar en el laboratorio, pero que requiere ser sometido a múltiples variaciones químicas para hacerlo capaz de unirse a la albumina bovina (BSA), dando lugar a lo que se conoce hoy en día como di o trisacárido natural octil ligado a albúmina de suero bovino (ND-o-BSA o NT-o-BSA)¹³.

Recientemente, se han descrito y propuesto proteínas novedosas como herramientas para el serodiagnóstico de la lepra, pudiendo detectarse la presencia de anticuerpos del tipo IgG dirigidos hacia estas proteínas micobacterianas, en los diversos espectros clínicos de la enfermedad. La asociación con la carga bacilar revela altos títulos de anticuerpos en las formas multibacilares (MB) y pocos en las de escasos bacilos o formas paucibacilares, (PB)^{12,14}. Por lo tanto, estas nuevas proteínas pueden ser consideradas candidatas para el desarrollo de pruebas serológicas, con un incremento en la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico, aportando herramientas para la clasificación de la enfermedad y para la evaluación de la eficacia del tratamiento. Entre estas proteínas podemos mencionar la proteína de fusión LID-1, que incorpora a las proteínas MI0405 y a la MI2331. La primera una proteína conservada de 394 aminoácidos y un tamaño de 25.3 kDa, la segunda una proteína de secreción de 26.5 kDa, ambas proteínas pueden ser utilizadas conjuntamente con el GLP-1^{10,14,15}.

El Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit" se ha esforzado en la búsqueda de estrategias que permitan controlar la lepra, a través del diagnóstico precoz. En pacientes tratados del Caserío Mamaría, Estado Portuguesa, zona hiperendémica para Hansen, se realizaron estudios de seguimiento serológico utilizando la proteína de fusión LID-1, como método de detección temprana de la

enfermedad¹⁴. Desde la década de los 80, se han realizados estudios utilizando el GLP-1, específicamente el epítipo disacárido unido a albúmina de suero bovino (ND-o-BSA), así como su uso en estudios de recaídas de los pacientes durante su tratamiento¹⁶⁻¹⁸.

En virtud de ello, el Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit" propuso estudiar la respuesta de anticuerpos, dirigida hacia el conjugado ND-o- LID-1 y de sus componentes individuales: LID-1 y HSA-ND, en individuos del Caserío Mamaría del Estado Portuguesa, con el propósito de determinar si pueden ser utilizados como marcadores de diagnóstico temprano de la enfermedad.

Materiales y Métodos

Se realizó un estudio descriptivo y experimental. Para la recolección de las muestras se realizaron varias salidas de campo al caserío, durante un período de tres años (2008-2011). El caserío Mamaría se localiza en el estado Portuguesa encabezando a nivel nacional uno de los estados con una mayor tasa de detección de casos (Figura 1).

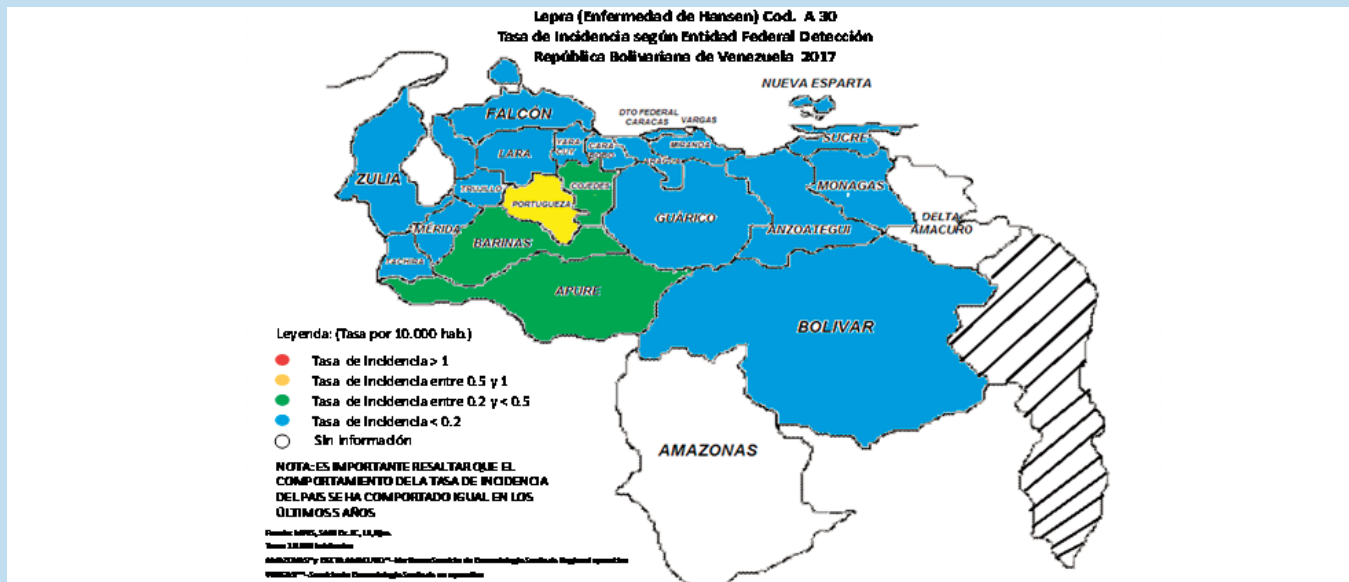
El Municipio Ospino está organizado políticamente por tres Parroquias; Parroquia Capital Ospino, Parroquia La Estación y Parroquia La Aparición. Tiene una superficie de 1.675 Km², representando el 11,01 % del total del Estado Portuguesa. El Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit posee el registro histórico de la enfermedad de Hansen del caserío Mamaría, localizado en la Parroquia La Aparición y ubicado entre el caño Guache y Marador (Figuras 2 y 3).

En el año 1997 la población censada fue de 664 personas, con un registro de 37 casos de Hansen. Entre los años 1998-2004 se registraron 89 casos y entre los años 2005-2015, 27 casos más. En mayo del año 2009 la población censada por los Consejos Comunales fue de 498 habitantes. En los registros del año 2010, la población de Mamaría estaba conformada por 568 personas, con un registro de 103 casos de Hansen, diagnosticados y tratados. Para ese año se censaron 165 familias, representando el grupo etario 0 a 24 años el de mayor frecuencia (> 50%).

Sujetos

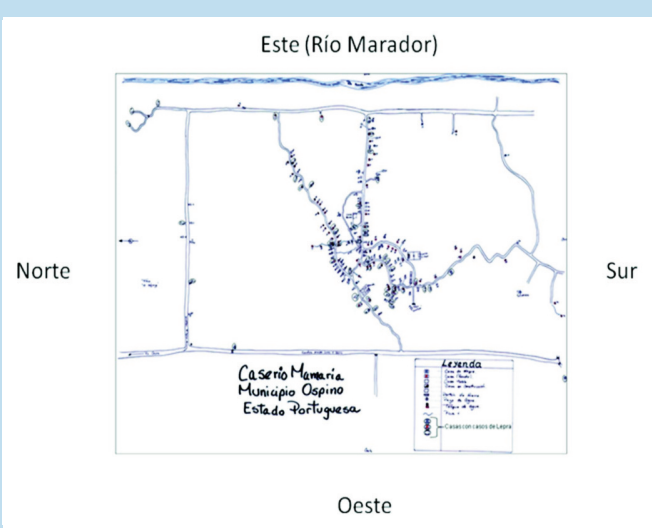
Se incluyó una población de 167 individuos, a quienes se les realizó una encuesta que incluía datos demográficos, antecedentes personales, así como aspectos clínicos, histopatológicos y bacteriológicos de la enfermedad. Conjuntamente la Dra. Mercedes Fernández, investigadora del IVIC, realizó una encuesta familiar por casa, información que permitió establecer la genealogía de cada familia.

Figura 1. Enfermedad de Hansen. Tasa de Incidencia según Entidad Federal. Fuente: Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit 2017.



Fuente: Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit 2017.

Figura 2. Croquis a mano alzada del Caserío Mamaría.



Fuente: Lcdo. Ramón Sosa, 2006

Figura 3. Localización del caserío Mamaría en Google map. 2012



Fuente: www.google.co.ve/maps/@9.2266574,-9.2923277,3142m/data=!3m1!1e3

Estudio Serológico

A cada individuo se les extrajo 5 mL de sangre periférica, para posteriormente evaluar la respuesta humoral a través de un ensayo inmunoenzimático (ELISA), según metodología previamente establecida^{19,20}. La proteína recombinante (LID-1) y los conjugados (LID-1-o-ND y HSA-o-ND) fueron facilitados por el Dr. Malcolm Duthie del Instituto de investigación de enfermedades infecciosas. (IDRI), Seattle-USA.

Las placas de fondo plano (Dynatech, Immunolon 2) se sensibilizaron con distintos antígenos: 0.1 µg /mL LID-1-o-ND, 1µg /mL de la proteína LID-1 y 1µg /mL de HSA-o-ND, respectivamente, en un volumen de 50 µL/pozo. Se incubaron a 4°C durante la noche y luego se añadió 100 µL de buffer de bloqueo a cada pozo, se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación suave. Posteriormente, se lavaron las placas (4 veces) con la solución de lavado PBS/ Tween-20 y luego con PBS (2 veces). A continuación, se añadió el suero de los pacientes, a una dilución de 1:200 (50 µL) en solución

diluyente de anticuerpos. Luego, se añadió el suero secundario anti-IgG/IgM humano conjugado con peroxidasa (Fc específica, Sigma), previamente titulado y diluido en PBS-T-20/BSA (1:200.000). Se incubó durante dos horas a temperatura ambiente, en agitación suave. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se lavaron las placas con la solución de lavado y se añadió 50 μ L del sustrato, peróxido de hidrógeno (H_2O_2 30%, Merck) junto con el cromógeno ortofenilendiamino-2HCl (Sigma), dejó incubar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos y se detuvo la reacción con una solución de H_2SO_4 1 N (25 μ L). Finalmente, las placas se leyeron en un lector de ELISA (*LabSystemsMultiskan EX, type 355*, Finlandia) utilizando un filtro a 492 nm. Los valores de anticuerpos IgG/IgM circulantes dirigidos hacia los antígenos recombinantes fueron expresados en densidad óptica. Un valor de densidad óptica (D.O.) ≥ 0.2 se interpretó como positivo. Para establecer el criterio de positividad en los ensayos ELISA (punto de corte), se evaluaron muestras de sueros de individuos aparentemente sanos. Este punto se determinó tomando la media de las densidades ópticas de los sueros negativos más tres desviaciones estándar de dichos valores. Cada muestra fue evaluada por duplicado.

Tratamiento estadístico

Los datos fueron recolectados en una base de datos Excel y se calcularon las medidas de tendencia central (Promedio) y de dispersión (Desviación estándar). Los análisis descriptivos (frecuencias) se realizaron con el paquete estadístico SPSS Statistics 17 (Nie, N., Hull, H., Bent, D. 2011. SPSS. Chicago: IBM). La significancia estadística de las diferencias de frecuencias entre los grupos (casos versus contactos) y la eficacia de los marcadores micobacterianos fue estimada por la prueba de ji cuadrado (X^2), usando tablas de contingencia 2 x 2. Los valores de (p) se consideraron significativos cuando el valor era menor o igual a 0,05.

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit (CB-2015-01) y del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (CD-1552), con cumplimiento de las pautas de confidencialidad y ética de la información.

Resultados

De los 167 individuos participantes, 98 eran del sexo masculino (58,70%) y 69 del sexo femenino (41,30%). El promedio de edad fue de 31,48 \pm 18,87 años, siendo la edad mínima 6 años y la máxima 81 años. De los 167 individuos,

62 (37,1%) eran casos de Hansen confirmados y 105 (62,9 %) eran contactos. Los individuos con enfermedad de Hansen fueron clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas e histopatológicas, observándose en la comunidad una mayor frecuencia de lepra paucibacilar. De acuerdo a la clasificación microbiológica, 71 % (44) de los casos eran paucibacilar (LI, BT, LT) y 29 % (18) multibacilar (BB, BL y LL) (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación clínica, histopatológica y microbiológica de los pacientes con enfermedad de Hansen

Clasificación clínica histopatológica	Casos confirmados %
Lepra Indeterminada (LI)	22.6 (14)
Borderline Tuberculoide (BT)	17.7 (11)
Lepra Tuberculoide (LT)	30.6 (19)
Borderline Borderline (BB)	12,9 (8)
Borderline Lepromatosa (BL)	9,7 (6)
Lepra Lepromatosa (LL)	6.5 (4)
Total	62
Clasificación microbiológica	Casos confirmados %
Paucibacilar (PB)	71 (44)
Multibacilar (MB)	29 (18)
Total	62

Fuente: historias clínicas del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit

En la Tabla 2 se muestran la frecuencia de individuos seropositivos (respondedores) a los diferentes marcadores empleados (LID-1, LID-1-o-ND y HSA-o-ND). De los 62 casos de Hansen evaluados, 16,13 % (10) respondieron a los marcadores micobacterianos. En contraste, 5,7 % (6) de los contactos respondieron a estos marcadores. Al establecer comparaciones entre ambos grupos (casos versus contactos), con respecto a la respuesta de anticuerpos dirigidos contra los marcadores micobacterianos, se observó una diferencia significativa (OR: 3,20, IC: 95%: 1,10-9,30, $p = 0.013$).

El 75 % (3/4) de los pacientes con LL y el 16,7 % (1/6) de los pacientes con BL respondieron a los tres marcadores. En contraste, 7,14 % (1/14) de los pacientes con LI, 5,26 % (1/19) de los pacientes con LT y 16,7 % (1/6) de los pacientes con BL respondieron a dos marcadores. Mientras, que un 6,25 % (1/6) de los pacientes con BT, 5,26 % (1/19) de los pacientes con LT y 7,14 % (1/14) de los pacientes con LI respondieron a un solo marcador. Finalmente, al comparar la eficacia de los marcadores micobacterianos evaluados, no se observaron diferencias significativas.

Cabe destacar que el 28 % (5/18) de los pacientes multibacilar y el 11,4 % (5/44) de los paucibacilar mostraron serología positiva.

Tabla 2. Frecuencia de individuos respondedores a los marcadores micobacterianos LID-1, LID-1-o-ND y HSA- ND

Marcadores	LI (n=14)	BT (n=11)	LT (n=19)	BB (n=8)	BL (n=6)	LL (n=4)	Casos (n=62)	Contactos (n=105)
LID-1/ LID-1-o-ND/ HSA-ND	0	0	0	0	1	3	4	0
LID-1/ LID-1-o-ND	0	0	0	0	1	0	1	1
LID-1-o-ND/ HSA-ND	1	0	1	0	0	0	2	3
LID-1-o-ND HSA-ND	0	1	1	0	0	0	2	2
HSA-ND	1	0	0	0	0	0	1	0
Total	2	1	2	0	2	3	10	6

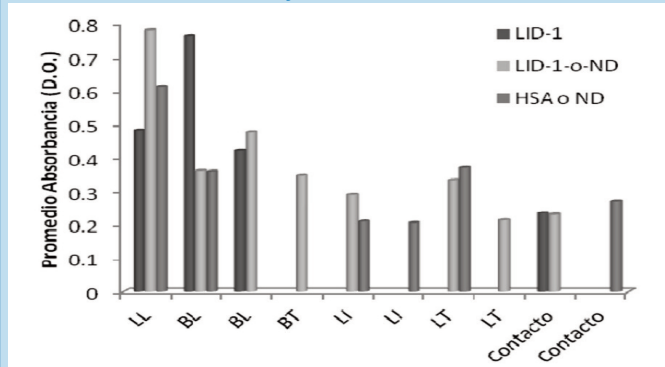
Fuente: historias clínicas del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit

En la figura 4 se visualiza la respuesta de anticuerpos contra los marcadores micobacterianos (LID-1, conjugado LID-1-o-ND y HSA-o-ND) en pacientes con enfermedad de Hansen (n = 10), agrupados de acuerdo a las manifestaciones clínicas, y en los contactos (n=6).

A partir de la encuesta familiar por casa, se estableció la genealogía de cada familia. Destacándose tres familias (F), designadas como: C, T y H. Como se puede observar en la Tabla 3, los casos de Lepra presentes en las tres familias representan el 42 % de los casos totales, registrándose en la familia C todas las formas clínicas de esta enfermedad.

Al analizar la respuesta de anticuerpos, se observó que dos casos multibacilar (LL) y uno (BL) de la familia C (Figura 5) y un caso paucibacilar de la familia T (BL: 1) respondieron a los tres marcadores micobacterianos utilizados. En contraste, no se observaron casos y contactos seropositivos en la familia H.

Figura 4. Respuesta serológica positiva frente a marcadores micobacterianos en los casos de Hansen agrupados de acuerdo a la clínica y en los contactos



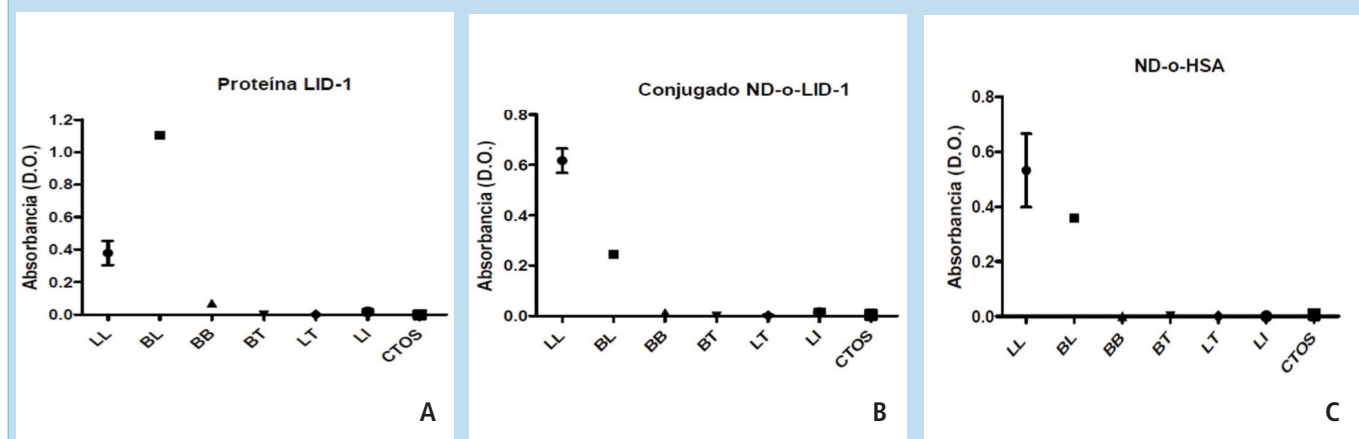
Fuente: historias clínicas del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit

Tabla 3. Frecuencia de individuos con enfermedad de Hansen y contactos de las familias C, T y H

Familias	LI	BT	LT	BB	BL	LL	Casos	Contactos
C	2	1	2	1	1	2	9	7
T	1	3	3	2	1	0	10	16
H	2	1	3	1	0	0	7	23

Fuente: historias clínicas del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit

Figura 5. Respuesta serológica frente a marcadores micobacterianos en la Familia C, Caserío Mamaría, Estado Portuguesa.



Fuente: historias clínicas del Instituto de Biomedicina Dr. Jacinto Convit

Nota. Se indica el número de casos, clasificados de acuerdo a las formas clínicas de Lepra (LL: 2, BL: 1, BB: 1, BT: 1, LT: 2, LI: 2), y los contactos (CTOS; n= 7) de la familia C. Un valor de D.O. > 0.2 es considerado positivo.

Discusión

La enfermedad de Hansen es una enfermedad crónica, infectocontagiosa, no hereditaria y endémica en algunos países. El mecanismo exacto de transmisión es desconocido, sin embargo, se cree que la diseminación ocurre por vía respiratoria, ya que la secreción nasal y la saliva de los enfermos multibacilares no tratados contiene gran cantidad de bacilos (se pueden eliminar 200.000 bacilos en 10 minutos). Por otra parte, se ha observado que el bacilo se mantiene viable hasta 24 horas fuera del organismo. No se ha documentado la transmisión a través de la placenta o por contacto sexual y los fómites (objetos usados por los enfermos), debido a la labilidad del bacilo y la necesidad de recibir una gran cantidad de bacilos para causar la infección²¹. Aunque el ser humano es el hospedero y reservorio del *M. leprae*, es posible encontrar otros reservorios no humanos como los suelos, el agua, vegetales, amibas y artrópodos. Se han realizado pocas investigaciones para búsqueda de *M. leprae* en estos lugares, sin embargo, en 1986 Kazda notificó haber aislado *M. leprae* de suelos de Bombay²², siendo confirmado en el 2006 por Lavania, cuando detectó, por la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el DNA de *M. leprae* en suelos de la India²³. Wheat y colaboradores demostraron en el 2014 que el *M. leprae* puede permanecer viable por largo tiempo en amibas libres en el medio ambiente, conservando su virulencia y encontrando un reservorio distinto al humano²⁴. Este hallazgo tiene gran importancia epidemiológica y es de urgencia profundizar la búsqueda de reservorios no humanos que pudieran mantener la transmisibilidad de la lepra, principalmente en zonas que se dedican a la actividad agrícola y pecuaria.

En Venezuela en 1997, se alcanzó a nivel nacional la eliminación de la lepra como problema de salud pública (según OMS, tasa de prevalencia menor a uno por 10.000 habitantes), quedando regiones o estados hiperendémicos, siendo Portuguesa el estado con mayor tasa de incidencia >1/10.000 habitantes, luego Cojedes, Barinas, Apure con tasas entre 0,5 -1 y Distrito Capital y Guárico con tasas entre 0,2- 0,5. El resto de los estados presentan una tasa de incidencia < 0,2/10.000 habitantes²⁵.

Los estados con la prevalencia más alta han sido objeto de estudio de seguimiento durante los últimos diecisiete años. Como se indicó anteriormente el estado Portuguesa es el que posee la mayor tasa de incidencia, constituyéndose la comunidad Mamaría un área de estudio desde hace casi dos décadas.

La comunidad Mamaría perteneciente al estado Portuguesa, ubicada en los llanos centrales de Venezuela, presenta una estructura topográfica y geográfica de tipo

rural/dispersa, donde el mapa del comportamiento de la diversidad de indicadores de inequidad y desigualdad social conforman el escenario proclive para el desarrollo de diferentes patologías, en especial las llamadas enfermedades olvidadas y desatendidas (OMS-OPS), como la lepra.

Desde el año 2008 se iniciaron nuevas salidas de campo con la finalidad de determinar marcadores de susceptibilidad y/o protección a la enfermedad, así como establecer la data etnográfica de la comunidad, a través de registros fotográficos, de formas de vida, y datos de producción económica y social. Durante estas salidas se colectaron muestras de sangre periférica de 167 individuos, 58,70% del sexo masculino y 41,30% del sexo femenino, con edades comprendidas entre 6 y 81 años. De los 167 individuos, 37,1% eran casos de Hansen confirmados, con edades comprendidas entre 8 y 76 años, y 62,9 % eran contactos. Los individuos con enfermedad de Hansen fueron clasificados de acuerdo a las manifestaciones clínicas e histopatológicas en: LI, BT, LT, BB, BL y LL. Basados en la clasificación microbiológica, se observó una mayor frecuencia de lepra Paucibacilar (71 %) en la comunidad. Podemos mencionar similar comportamiento en estudios realizados en 7 comunidades del estado Cojedes donde encontramos un alto número de casos de la forma paucibacilar: LI (33,07%), BT (32,28%), LT (7,0%) y LL (2,36%)²⁶.

En los últimos años se han desarrollado y evaluado diferentes marcadores moleculares, específicos de la enfermedad de Hansen, para su detección temprana y así establecer medidas de control de la enfermedad.

En relación a la reactividad serológica, es bien sabido que dependiendo del espectro clínico de la enfermedad, los pacientes de lepra pueden caracterizarse por tener una reactividad elevada de anticuerpos (pacientes multibacilares: LL/BL/BB) y una respuesta celular disminuida dirigida a antígenos del *M. leprae*, siendo la reactividad inversa en los pacientes paucibacilares (LI/LT/BT).

Duthie y colaboradores demostraron que las proteínas micobacterianas: ML0405 y ML2331 son antígenos del *M. leprae* con un potencial diagnóstico de pacientes con lepra multibacilar, independiente de la ubicación geográfica y/o zonas endémicas. En Venezuela, utilizando estos marcadores proteicos se detectó una alta reactividad serológica en los pacientes, la cual disminuía al ser sometidos a la terapia multidroga. Conjuntamente, sintetizaron a partir de las proteínas ML0405 y la ML2331 una proteína de fusión llamada LID-1, la cual pudiese proporcionar una herramienta de diagnóstico antes de la aparición de signos y síntomas clínicos, con utilidad en el monitoreo de la eficacia del tratamiento y la presencia de recaídas en la enfermedad. Estas 3 proteínas se evaluaron en otras zonas endémicas de

Venezuela, como San Carlos, estado Cojedes, observándose la ausencia de reactividad serológica frente a las mismas en los individuos previamente vacunados o no con BCG (Bacillus de Calmette y Guérin), descartándose así la existencia de reacción cruzada con otras micobacterias¹⁴. En el presente trabajo se evaluó la respuesta serológica frente a componentes micobacterianos de *M. leprae*, en una población hiperendémica para la enfermedad de Hansen. De los 62 casos de Hansen evaluados, 16,13% respondieron a los marcadores micobacterianos, detectándose principalmente los casos multibacilar correlacionándose esta respuesta con la presencia de la carga bacilar^{9,19}. En concordancia con lo descrito previamente por Duthie y colaboradores, quienes encontraron una alta reactividad serológica en los pacientes multibacilares hacia las proteínas ML0405, ML2331 y LID-1, respuesta que desaparecía una vez tratado los pacientes¹⁴. Actualmente, existen varios estudios en que se está evaluando el GLP-1 sintético, el natural disacárido (ND), antigénicamente activo o inmunodominante, unido con la proteína de fusión LID-1. Cardoso y colaboradores, evaluaron este conjugado en pacientes multibacilares (MB) y paucibacilares (PB), contactos de zona endémica, pacientes con tuberculosis e individuos sanos, observando una mayor sensibilidad y especificidad del conjugado comparado con el GLP-1 nativo²⁷⁻²⁹.

Cabe destacar, que en el presente estudio un 5,7 % de los contactos respondieron a los marcadores LID-1, LID-1-o-ND y HSA-o-N, pudiéndose considerar este grupo de individuos como casos tempranos de la enfermedad, es decir, pacientes que aún no han mostrado las manifestaciones clínicas características de la enfermedad de Hansen. Por lo tanto, estos resultados sugieren la relevancia y utilidad de dichos marcadores como herramienta de diagnóstico temprano de la enfermedad en zonas hiperendémicas para Lepra.

La frecuencia de Lepra en niños es un indicador de la prevalencia de la enfermedad en la población general y su detección temprana ayuda a conocer la historia natural de la enfermedad, su período de incubación y la fuente. En los datos socioeconómicos del caserío Mamaria para el período en estudio, la mitad de la población era menor a los 18 años de edad. Es bien sabido, que algunas veces las lesiones en niños pasan desapercibidas y se confunden con otras patologías, como pitiriasis alba, pitiriasis versicolor, vitiligo, manifestándose la enfermedad tempranamente en la edad adulta con discapacidades³⁰. Contreras M, quién realizó un estudio retrospectivo, en cual evaluó 101 pacientes menores de 15 años de edad, en el Instituto de Biomedicina "Dr. Jacinto Convit" durante el período 1980-2010, describió que la forma BT era la más predominante, seguida de la forma lepromatosa³¹, similar a los resultados encontrado por otros autores³². En el presente estudio, de los 167 individuos incluidos, 34% (13 casos y 44 contactos) tenían un rango de edad comprendido

entre 6 y 19 años. Además, las formas paucibacilares son las más frecuentes (LT: 3, BT: 2, LI: 5). Es importante señalar, que de los contactos que dieron serología positiva para los marcadores micobacterianos utilizados, el 83 % tenían edades comprendidas entre 9 y 18 años. Por lo tanto, hay que tomar en cuenta estrategias de prevención, considerando la presencia de individuos susceptibles expuestos a individuos infectados. Igualmente, los niños son más susceptibles que los adultos en desarrollar la enfermedad cuando viven en zonas endémicas, debido a que su sistema inmunitario no se ha desarrollado y madurado completamente y por el contacto intra-domiciliario con familiares pertenecientes al polo lepromatoso³¹. Es importante reforzar la capacitación del personal para un diagnóstico y tratamiento temprano, lo que disminuiría a futuro las complicaciones y en consecuencia impactaría en la prevalencia de esta enfermedad. Por lo tanto, el diagnóstico precoz de la lepra, el adecuado manejo, tanto el tratamiento específico de la enfermedad, como el de la neuritis y los fenómenos reaccionales, contribuirán a la disminución de las secuelas discapacitantes y a su erradicación en la próxima década.

Al comparar, entre casos y contactos, la respuesta de anticuerpos dirigida contra los marcadores micobacterianos evaluados, se observó una frecuencia significativamente incrementada de casos que respondían a estos marcadores (OR: 3,20, IC: 95%: 1,10-9,30, p=0.013), permitiendo el diagnóstico de casos de lepra, principalmente las formas multibacilar. Es importante resaltar que la comunidad de Mamaria ha sido abordada por el Instituto de Biomedicina desde el año 1999, por lo tanto, es una población que ya ha sido sometida a tratamiento, de allí el bajo porcentaje de casos seropositivos a los antígenos micobacterianos evaluados. Por lo tanto, los casos seropositivos detectados fueron casos que no se sometieron o no cumplieron el tratamiento (n= 6) y casos nuevos (n= 4), estos últimos diagnosticados en el año 2011, año en que se realizaron las pruebas serológicas.

En relación al establecimiento del parentesco entre los miembros de esta comunidad parcialmente cerrada, se tomaron 167 muestras de sueros y componentes celulares, la primera para realizar estudios serológicos y la segunda para realizar posteriores estudios genéticos. Previamente a la toma de la muestra sanguínea se estableció la filiación familiar de la comunidad, bajo conocimiento informado, observándose tres familias de interés (C, T y H) para estudios genéticos futuros. Los casos de Lepra presentes en estas tres familias constituyen el 42 % (n= 26) de los casos totales, registrándose en la familia C todas las formas clínicas de Lepra y el caso índice de la enfermedad en la comunidad. Al analizar la respuesta de anticuerpos en las tres familias, se confirmaron por serología cuatro casos de los 8 casos multibacilares y ningún caso de los 18 paucibacilares. Cabe

destacar que ninguno de los tres marcadores permitió detectar casos de lepra Borderline Borderline (BB), pero si el caso Borderline Lepromatosa (BL) y Lepra Lepromatosa (LL), esta última forma caracterizada por altas concentraciones de anticuerpos circulantes contra *M. leprae*.

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio podemos sugerir que los marcadores micobacterianos evaluados, LID-1, LID-1-o-ND y ND-o-HSA, pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico de casos de lepra no tratados y de esta manera poder hacer un seguimiento de los mismos, ya que en los individuos sometidos a tratamiento la respuesta a estos marcadores micobacterianos disminuye a niveles indetectables. Asimismo, estos marcadores micobacterianos serían beneficiosos en el diagnóstico de casos tempranos en zonas endémicas, es decir, permitiría detectar aquellos casos que aún no han mostrado las manifestaciones clínicas características de la enfermedad de Hansen, pero que han estado en contacto con *M. leprae*. Finalmente estos marcadores, representarían a diferencia de la baciloscopia, en la cual se realiza la incisión de los lóbulos de ambas orejas, pliegues de ambas rodillas y de ambos codos para la obtención de linfa, y de la biopsia de piel, un método de diagnóstico rápido y menos invasivo.

Y por otra parte la finalidad de la estrategia mundial de eliminación de la lepra 2016-2020 tiene como objeto acelerar la acción hacia un mundo sin lepra. Su fundamento se basaría en implementar medidas gubernamentales para detener la enfermedad. Por lo tanto, entre otras medidas, es de gran ayuda centrarse en la detección temprana de los casos antes que aparezcan las deformidades visibles.

Agradecimiento

Al Dr. Malcolm Duthie del Instituto de Investigación en Enfermedades Infecciosas (IDRI), Seattle, Washington por facilitar los anticuerpos y el conjugado ND-o-LID-1, LID-1 y HSA-ND. Proyecto parcialmente financiado por el Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (FONACIT) con el número 2015000086

Referencias

- World Health Organization. Leprosy update. Weekly Epidemiological Record 2018; 93(35): 445-456.
- Convit J, Avilán R, Díaz D, et al. Control de la lepra en Venezuela después de 5 décadas de desarrollo. Revista Leprológica 1999; 21:145-162.
- Zulueta AM. La lepra: Evolución histórica, Epidemiología y medidas de control. Derm Venez 1994; 32(4): 181-190.
- Guevara JR, Ortega-Moreno ME, Rodríguez F y Sosa R. Actualización epidemiológica de la lepra en Venezuela. Periodo 2006-2016. Dermatol Venez 2017; 55(1): 21-25.
- Ottenhoff TH. Immunology of Leprosy: lessons from and for leprosy. Int J Lepr Other Mycobact Dis 1994; 62:108-122.
- World Health Organization. Global strategy for further reducing the leprosy burden and sustaining leprosy control activities 2011-2015 Operational guideline.
- Geluk A, Duthie M, Spencer J. Postgenomic Mycobacterium leprae antigens for cellular and serological diagnosis of M. leprae exposure, infection and leprosy disease. Lepr Rev 2011; 82:1-20.
- Scollard M, Adams LB, Gillis TP, et al. The Continuing Challenges of Leprosy. Clin Microbiol Rev 2006; 19:338-381.
- Buhrer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC et al. Simple and Fast Lateral Flow Test for Classification of Leprosy Patients and Identification of Contacts with High Risk of Developing Leprosy. J Clin Microbiol 2003; 41:1991-1995.
- Duthie MS, Goto W, Ireton GC, et al. Use of protein antigens for early serological diagnosis of leprosy. Clin Vacc Immunol 2007; 14: 1400-1408.
- Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. The Lancet 2004; 363:1209-1219.
- Rada E, Aranzazu N, Rodríguez V, et al. Reactividad serológica y celular frente a proteínas micobacterianas en la enfermedad de Hansen. Invest Clin 2010; 51(3):325-340.
- Brennan PJ, Chatterjee D, Fujiwara T, et al. Leprosy-specific neoglycoconjugates: synthesis and application to serodiagnosis of leprosy. Methds Enzymol 1994; 242: 27-37.
- Duthie MS, Hay MN, Rada EM, et al. Specific IgG antibody responses may be used to monitor leprosy treatment efficacy and as recurrence prognostic markers. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2011; 10: 1257-1265.
- Sayegh R, García L, Rangel M. Pruebas inmunológicas en el paciente con enfermedad de Hansen. Derm Venez 1994; 32:54-58.
- Hunter SW, Brennan PJ. A novel glycolipid from Mycobacterium leprae possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. J Bacteriol 1981; 147:728-735.
- Spencer J, Hee J, Wheat W, et al. Analysis of antibody responses to Mycobacterium leprae phenolic glycolipid I, Lipoarabinomannan and recombinant proteins to define disease subtype-especific antigenic profiles in leprosy. Clin Vaccine Immunol 2011; 18:260-267.
- Oskam L, Slim E, Buhrer-Sékula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. Lepr Rev 2003; 74 (3): 196-205.
- Rada E, Aranzazu N, Ulrich M, Convit J. Serologic response to mycobacterial proteins in Hansen's patients during multidrug treatment. Int J Lepr Other Mycobact Dis. 1999; 67(4): 414-421.
- Duthie MS, Ireton GC, Kanaujia GV, et al. Selection of antigens and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. Clin Vaccine Immunol 2008; 15:1590-1597.

21. Lastoria JC, Abreu MA. Leprosy: review of the epidemiological clinical and etiopathological aspects. *An Bras Dermatol* 2014; 89 (2): 205-218.
 22. Kazda J, Ganapati R, Revankar C, *et al.* Isolation of environment derived *Mycobacterium leprae* from soil in Bombay. *Lepr Rev.* 1986; 57 Suppl 3:201-208.
 23. Lavania M, Katoch K, Sachar P, *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* from soil samples by PCR targeting RLEP sequences, *J. Commun Dis.* 2006;38(3):269-273.
 24. Wheat WH, Casali AL, Vicent T, *et al.* Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cyst. *PLOS Neglected Trop Dis.* 2014; (8): 1-14.
 25. Guevara JR, Sosa RJ, Rodríguez F. Informe programa nacional Eliminación de la lepra, MPPS, SAIB Dr Jacinto Convit 2017: 2.
 26. Aranzazu N, Parra JJ, Cardenas M, Rada E, *et al.* Cojedes: a leprosy hyperendemic state. *Int J Dermatol* 2012; 51: 186-194.
 27. Cardoso PV, Dias RF, Freitas AA *et al.* Development of a quantitative rapid diagnostic test for multibacillary leprosy using Smart Phone technology. *BMC Infect Dis.* 2013;13:1-10.
 28. Rada E, Duthie MS, Reed SG, *et al.* Serologic follow-up of IgG responses against recombinant mycobacterial proteins ML0405, ML2331 and LID-1 in a leprosy hyperendemic area in Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012; 107:90-94.
 29. Amorin FM, Nobre ML, Ferreira LC, *et al.* Identifying Leprosy and those at risk of developing leprosy by detection of antibodies against LID-1 and LID-1-NDO. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(9): 1-17.
 30. Aranzazu N. Enfermedad de Hansen: Etiología, Clínica y Clasificación. *Dermatol Venezol* 1994; 32(4):145-151.
 31. Contreras M, Crespo I, Rada E, *et al.* Características clínicas, epidemiológicas, histológicas, bacteriológicas em Hansen infantil, Servicio Central de Dermatología, Instituto de biomedicina " Dr Jacinto Convit". *Dermatol Venez* 2014; 52 (1): 26-31.
 32. Santos SD, Penna GO, Costa Mda C, *et al.* Leprosy in children and adolescents under 15 years old in an urban Centre in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 2016; 111(6):359-364.
-