

PRUEBAS INTRADERMICAS Y BACILOSCOPIA EN EL DIAGNOSTICO DE LA LEPRO

María E. Pinardi*
Carlos Santaella*

El uso de pruebas intradérmicas para medir hipersensibilidad retardada a antígenos específicos y la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en extendidos de linfa constituyen dos herramientas muy útiles en el diagnóstico de la lepra. A continuación describimos los tipos de preparaciones que se usan generalmente como antígenos para pruebas intradérmicas en lepra y la metodología a seguir para tomar y leer extendidos de linfas.

1. PREPARACIONES USADAS COMO ANTIGENOS EN PRUEBAS INTRADERMICAS

a) Antígeno particulado:

Se consideran antígenos particulados aquellas preparaciones que contienen partículas en suspensión de tamaño mayor de 0,1 micras. En esta categoría existe un preparado básico de amplio uso en leprología, la lepromina integral, que durante mucho tiempo se denominó Antígeno de Mitsuda, ya que fue este investigador quien lo desarrolló.

Originalmente este antígeno se preparaba con lesiones de pacientes con lepra lepromatosa, usando una suspensión de tejido en suero fisiológico al 1% p/v esterilizada por autoclave. Posteriormente, cuando se desarrollaron métodos de re-cuento de bacilos, se comenzó a preparar contando la cantidad de bacilos por mililitro de suspensión. Después de numerosas experiencias en el campo, se establecieron dos tipos de lepromina para estudios clínicos, un tipo que contiene 1.6×10^5 y otro que contiene $40 \times 0.4 \times 10^8$ bacilos

por mililitro. La primera se usa generalmente para diagnóstico para diferenciar entre pacientes con lepra lepromatosa y con otros tipos de lepra y la segunda se usa más generalmente para estudio de hipersensibilidad retardada en contactos de pacientes con lepra.

Actualmente la lepromina se prepara con tejido humano o con tejido de armadillos infectados experimentalmente con lepra. Cuando se usa tejido de armadillo, por la gran cantidad de bacilos que estos animales desarrollan en sus lesiones, se preparan dos tipos de lepromina: 1) la lepromina integral, en la cual se usa el tejido de armadillo completo, y 2) la lepromina bacilar, donde el tejido de armadillo se somete previamente a purificación y luego se prepara el antígeno con bacilos casi completamente limpios de tejido. También en el caso de lepromina de armadillo se usan las dos concentraciones mencionadas. En algunas ocasiones, para trabajos experimentales, se pueden preparar antígenos más concentrados o más diluidos, que se usan para diversos fines.

Generalmente la lepromina se inyecta en un volumen de 0,1 ml en la superficie interna del antebrazo y se lee a las 48 horas, que constituye la reacción de Fernández, y a los 30 días, que constituye la reacción de Mitsuda propiamente tal. Siempre se recomienda cuidado al hacer la lectura, la que debe hacerse palpando cuidadosamente, ya que debe leerse la induración y no el eritema, que también se observa normalmente. Universalmente se considera que ambas reacciones son positivas cuando tienen un diámetro trans-

verso de induración igual o mayor de 10 mm para la reacción de Fernández y de 6 mm para la reacción de Mitsuda. En el primer caso, las reacciones menores de 10 mm se consideran negativas y en el segundo caso, un Mitsuda entre 3-5 mm se puede considerar como débilmente positivo.

La reacción de Fernández positiva indica sensibilización previa del individuo al *Mycobacterium leprae*. Se considera que alrededor de 75% de las personas tienen una reacción de Mitsuda positiva. Es en el 25% restante donde se encontrarán los pacientes con lepra multibacilar, ya que no tienen mecanismos de defensa bien desarrollados contra el *Mycobacterium leprae*. La reacción de Mitsuda puede considerarse como una microvacunación, ya que cuando es positiva a los 30 días, generalmente la reacción de 48 horas de Fernández también se vuelve positiva.

b) Antígeno soluble

El otro tipo de preparado usado en el diagnóstico de la lepra es una solución proteica derivada de bacilos de lepra purificados obtenidos de lesiones experimentales de armadillo. Este antígeno se prepara concentrando una suspensión de *M. leprae* purificado el cual se rompe por medio de presión, liberando los antígenos intracelulares. La suspensión se centrifuga, se separan las partículas y el sobrenadante se filtra para obtener la porción de peso molecular por debajo de 30 kDa. El principal problema de este antígeno es que es difícil de estandarizar, ya que su actividad no depende totalmente de la concentración de proteína. Generalmente se estandariza in vivo, contra un patrón de actividad previamente establecido.

* Laboratorio de Leprología, Instituto de Biomedicina, Caracas, Venezuela.

Este antígeno se aplica por vía intradérmica en la zona interna de uno de los antebrazos y se lee a las 48 horas, cuando da una reacción tipo tuberculina. Se ha establecido a través de extensas pruebas de campo una medida de positividad de 10 mm de induración o más. Las pruebas de 9 mm o menos son consideradas negativas. La reacción producida por este antígeno es comparable a la reacción de Fernández con lepromina, con la ventaja que no produce cicatriz.

II EXAMEN MICROSCOPICO DE EXTENDIDOS DE LINF A O DE LESIONES

El examen de extendidos de linfa o de lesiones constituye uno de los métodos más antiguos y seguros para realizar un diagnóstico de lepra, ya que para el observador experimentado es fácil diferenciar el *M. leprae* del *M. tuberculosis* por su manera de teñirse, ubicación en el tejido y forma de agruparse. El *M. leprae* se tiñe en forma sólida o en forma fragmentada; generalmente se ubica dentro de las células y forma los llamados "globis", que son grupos de bacilos muy ligados entre sí y que sólo se ven en extendidos de *M. leprae*.

Mencionaremos brevemente los métodos para tomar, teñir y examinar los extendidos de linfas provenientes de pacientes con lepra presunta o diagnosticada.

a) Toma de muestras:

Generalmente para tomar los extendidos se eligen las zonas donde los vasos linfáticos son más superficiales, tal como los pabellones de las orejas, los codos y las rodillas. Con una pinza de Kocher se toma un pliegue de tejido y se hace presión hasta producir isquemia. Luego, con una hoja de bisturí se hace un corte muy superficial y se raspa el fondo del corte para tomar una mezcla de linfa con tejido. Este material se coloca sobre un portaobjeto de vidrio limpio y se extiende sobre el mismo con la misma hoja de bisturí. Se identifica la lámina y se deja secar al aire.

b) Tinción

—Fijación: Después que el extendido está seco, se fija, lo que se puede hacer dos formas, o por calor suave, flameando la lámina suavemente por el lado contrario a donde está el material, o con vapores de formol, para lo cual se colocan unas gotas de Formaldehído al 37% en un vaso de

Coplin, se mete la lámina en el vaso, se tapa y se deja durante 3 minutos.

—Tinción: El colorante que se usa de rutina es la Fucsina Fenolada de Ziehl-Neelsen, que consiste en una solución al 0,2% de Fucsina Básica en una solución de Formaldehído al 0,05%. Este colorante se deja actuar durante 20 minutos, flameando la lámina tres veces (cada 7 minutos) hasta que la fucsina emita vapor. Luego se bota la fucsina, se enjuaga la lámina con agua corriente y se decolora con alcohol-ácido (etanol o alcohol isopropílico al 70% en agua destilada más ácido clorhídrico al 1%); esta decoloración debe hacerse con cuidado y repetirse hasta que no salga más colorante de la lámina. Luego se aplica la coloración de contraste, que generalmente consiste en azul de metileno al 0,03% en etanol o alcohol isopropílico. Luego la lámina se enjuaga bien con agua corriente y se deja secar al aire.

—Examen microscópico: El extendido debe examinarse con objetivo de inmersión de 100 x y se debe recorrer completamente antes de poder decir que una lámina es negativa o positiva. El *M.*

leprae aparece teñido de color rojo intenso y cualquier otra bacteria que puede aparecer en el extendido se tiñe de color azul.

Los bacilos pueden teñirse de tres formas: 1) *bacilos* sólidos, que son los bacilos que se tiñen homogéneamente en toda su extensión y tienen forma de bastones, rectos o ligeramente curvos; 2) *bacilos fragmentados*, menos teñidos o teñidos en forma irregular; y 3) *bacilos granulados*, teñidos en forma de pequeños gránulos. A veces se ven "globis" o racimos de bacilos de diferentes tamaños, que generalmente aparecen teñidos en forma intensa. Se calcula que los globis grandes tienen alrededor de 100 bacilos, los medianos alrededor de 60 y los pequeños menos de 30 bacilos.

c) Índice bacteriológico

Este índice fue establecido en forma convencional por la Organización Mundial de la Salud para poder evaluar el grado de presencia de *M. leprae* en 100 campos microscópicos examinados con objetivo de inmersión de 100 x y consiste en los siguientes valores:

0	bacilos en 100 campos :	negativo
1-10	bacilos en 100 campos :	+
10-100	bacilos en 10 campos .	++
1-10	bacilos en cada campo :	+++
10-100	bacilos en cada campo :	++++
100-1000	bacilos en cada campo :	+++++
más de 1000	bacilos por campo	++++++

d) Índice Morfológico

Este índice se usa en algunos países del mundo para estimar el grado de viabilidad del *M. leprae*. Como este bacilo no se ha podido cultivar hasta ahora, no es fácil determinar si está vivo o muerto en las lesiones. Se ha considerado que los bacilos que se observan fragmentados o granulados en los extendidos son bacilos muertos. Por lo tanto, el índice morfológico consiste en examinar 100 bacilos en un extendido, registrando cuantos de ellos se tiñen en forma homogénea y completa y se pueden considerar como bacilos sólidos. Este índice se expresa en forma numérica como, por ejemplo, 20% de sólidos, o 35% de sólidos.

Este índice es usado por algunos clínicos e investigadores como una forma de

seguimiento del tratamiento, considerando que cuando el porcentaje de bacilos sólidos disminuye con el correr del tiempo, eso se puede interpretar como que el tratamiento es efectivo.

REFERENCIAS:

1. Mitsuda, K. (1916). Jap. Jour. of Urol. Derm.
2. Mitsuda, K. (1924). Proc. of III Internat. Lep. Conf. Strasbourg, 1924.
3. Fernández, J.M.M. (1939a). Rev. Brasileira. Leprol. 7:85.
4. Hayashi, F. Int. J. Lepr. 1933; 31:8.
5. Extendidos de Piel en Lepra. Thomas Nilsson, Gunilla Sparell, All Africa Leprosy & Rehabilitation Training Center, 1990.
6. Shepard, C. & McRae, D.H. (1968) Int. J. Lepr. 36:78.