

PRUEBAS INMUNOLOGICAS EN EL PACIENTE CON ENFERMEDAD DE HANSEN

Dr. Ricardo J. Sayegh Carreño*
 Dr. Leonardo García Rivas**
 Dra. María Elisa Rangel Lazo***

Sayegh C.R. J., García R. L., Rangel L. M.E. **Pruebas Inmunológicas del paciente con enfermedad de Hansen.** Derm. Venez. 1994; 32: 54 – 58

RESUMEN

Se realiza la revisión bibliográfica de las pruebas para el diagnóstico de Hansen, desde la reacción de Rubino hasta los más sofisticados métodos inmunológicos para poder detectar la enfermedad precoz.

ABSTRACT

A bibliographic revision of test for Hansen's disease is made, from the Rubino reaction to the most sophisticated immunological methods which permit detection of early disease.

INTRODUCCIÓN

La importancia actual para el control de la lepra se basa en la detección precoz y tratamiento eficaz de la enfermedad.

Los estudios inmunológicos constituyen una de las áreas más activas e importantes en la investigación de la lepra. La respuesta inmunológica del huésped frente a la microbacteria determina las características clínicas e histopatológicas de la enfermedad, así como también la progresión de la infección hacia una expresión clínica.

Los procedimientos inmunológicos son herramientas muy impor-

tantes para la evaluación de muchos aspectos de la enfermedad.

En este trabajo se revisan los métodos empleados para el diagnóstico de lepra desde el punto de vista inmunológico, que se han usado para la detección y control de la enfermedad.

Igualmente se mencionan algunos métodos inmunológicos que no se usan actualmente pero que dieron paso a los actualmente empleados^{1,2,3}.

LAS PRUEBAS DEL PASADO

Alrededor del año 1900, las pruebas de fijación del complemento

fueron introducidas para el diagnóstico de varias enfermedades tales como sífilis y fiebre tifoidea, etc. Debido a que esta prueba era negativa en lepra tuberculoides o paucibacilares en lepra indeterminada, no era útil en el diagnóstico de esta afección, sin embargo, pasaron muchos años antes que otras pruebas aportaran más información^{4,5}. En el año 1.926 Rubino dio a conocer la reacción que lleva su nombre, consistente en poner en suspensión sueros de enfermos de lepra y de sujetos sanos con hemáties formolados de carnero obteniéndose la sedimentación rápida en algunos minutos en los sueros de pacientes de lepra y la gradual en los individuos sanos. Según otros autores esto se debía a una sustancia específica en los sueros que se fija sobre los glóbulos formolados originando la aglutinación de ellos.

Esta reacción se utilizó durante muchos años, pero no tenía utilidad en

* Adjunto del Servicio de Dermatología Instituto de Biomedicina, M.S.A.S. Caracas - Venezuela.

** Adjunto del Departamento de Dermatología Sanitaria. Instituto de Biomedicina, M.S.A.S. Caracas - Venezuela.

*** Coordinadora Ambulatorio Urbano Tipo 1 de Medicina General, M.S.A.S. Caracas - Venezuela.

los casos paucibacilares y en los multibacilares no avanzados, por lo que se continuó en la búsqueda de pruebas más sensitivas y específicas para el diagnóstico precoz de la enfermedad en su fase subclínica, para reducir la transmisión, identificación de los grupos de alto riesgo, estudio del pronóstico, evaluación de la terapéutica y detección de las recidivas¹⁵.

El siguiente paso fué el desarrollo de hemoaglutinación descritas en 1948 por Middlebrook y Dubos. Esta prueba confirmó principalmente los hallazgos previos observados con la prueba de fijación del complemento, entre ellos, la habilidad de algunos pacientes con lepra para producir anticuerpos, la diferenciación de pacientes con LL y LT y la demostración de reactividad cruzada con otras micobacterias en el suero de los pacientes de Hansen.⁴.

La prueba de hemoaglutinación era negativa en una alta proporción de sueros de pacientes con LT, mostró resultados variables con suero de contactos de pacientes de lepra y se evidenció reactividad cruzada con la mayoría de otras micobacterias.

PRUEBAS INMUNOLOGICAS UTILIZADAS

Las principales pruebas usadas en lepra desde la reacción de Rubino hasta las más recientes son:

- 1.- Prueba de Mitsuda o Lepromina.
- 2.- Antígeno Soluble.
- 3.- La prueba de C.C.B.
- 4.- Prueba de absorción de anticuerpo fluorescente de lepra (FLA - ABS)
- 5.- Prueba de transformación del linfocito (LTT)
- 6.- Ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA)
- 7.- Inmunolectroferénesis cruzada

- 8.- Radio - inmunoensayo sólido (sRIA)
- 9.- Test de hemoaglutinación pasiva (PHA)
- 10.- Glicolípido fenólico ELISA (GPL - 1)
- 11.- Test de aglutinación de partículas de M. Leprae (MLPA)
- 12.- Test de competencia del anticuerpo sérico (SACT)
- 13.- Reacción en cadena a la polimerasa (PCR)

Las pruebas más recientes (FLA - ABS, RIA, PHA, ELISA, GLP-1, MLPA, SACT y PCR) son prácticamente 100% positivas en pacientes multibacilares y 50% en paucibacilares, siendo el FLA-ABS más útil para la detección de las formas subclínicas, ya que es ligeramente más positivo. Todas estas pruebas recientes no parecen ser útiles en la detección de formas sub-clínicas ni en el comportamiento de la enfermedad^{11,13}.

Se considera que el PCR podría ser la solución para la detección precoz de la enfermedad¹⁵.

LAS PRUEBAS INTRADERMICAS

Una prueba intradérmica es la aplicación de una sustancia que pueda provocar una reacción inflamatoria local y se realiza con dosis creciente de la sustancia potencialmente dañina. La reacción de hipersensibilidad que se obtiene con esas pruebas nos permite identificar algunos aspectos importantes con relación a la sustancia que se está usando: a)- Es inmunogénico b)- Es antigénico c)- Los sujetos que responden han estado expuestos previamente a ese antígeno y se han sensibilizado d)- La reacción es específica para ese antígeno¹⁷.

Las pruebas intradérmicas son una de las herramientas más útiles del inmunólogo clínico.

Estas reacciones, junto con el

número de linfocitos circulantes periféricos y las concentraciones de inmunoglobulinas en el suero, son los elementos iniciales, más indicados para evaluar los pacientes con desórdenes inmunológicos.

Las pruebas intradérmicas son una forma económica y efectiva de evaluar la inmunidad celular en pacientes. Sin embargo existen pocos antígenos bien caracterizados para usar en estas reacciones. No hay métodos de estandarización que sean aceptados uniformemente¹⁷.

PRUEBA DE MITSUDA O LEPROMINA

Es una prueba intradérmica que evalúa la inmunidad celular del paciente, descrita por Mitsuda y Hayasi en 1919. Esta intradérmica se utiliza para la clasificación del enfermo de lepra, pronóstico de la enfermedad y para el estudio inmunológico de contactos y sujetos sanos expuestos a contraer la enfermedad. No se trata de una prueba diagnóstica.

La lepromina se prepara de M. leprae muertos por calor tomados de biopsias de lesiones de pacientes con LL, y del material de armadillo infectado con Bacilo de Hansen.

La lepromina tiene una concentración de 40 y 160 millones de bacilos de Hansen por c.c. la primera se usa en personas sanas y contactos la segunda para clasificar a los pacientes con Hansen.

La aplicación de la prueba es sencilla. Previa asepsia con alcohol isopropílico se procede a inyectar 0.1 c.c. del antígeno por vía intracutánea en el tercio superior del antebrazo derecho.

La introducción de este material en el organismo humano provoca tres respuestas: una respuesta temprana, la reacción de Fernández, la cual ocurre 24-48 horas después de la inyección y una respuesta tardía, la reacción de Mitsuda, la cual generalmente se lee a las 4 semanas o hasta

9 semanas de aplicar el antígeno.

Cuando la reacción de Fernández es positiva puede anticipar el resultado de la reacción de Mitsuda o reacción tardía la cual mide el grado de resistencia del individuo hacia la enfermedad.

Los criterios de positividad se evalúa de Leve - Moderado - Fuerte se han designado para ambas reacciones basados en el diámetro de la induración y no del eritema, en el sitio de la reacción.

Tal clasificación es de utilidad para el clínico con el objeto de clasificar al paciente. La validez científica de tal clasificación es más cuestionable. Un paciente con una reacción de Mitsuda de 5mm. de diámetro se designa como positivo débil, mientras que un paciente de una lesión de 6mm. es designado positivo moderado. Hay autores que han propuesto que se considere una reacción positiva cuando se produce ulceración lo cual disminuiría drásticamente el número de enfermos normales con Mitsuda positivo. Existe una tercera reacción inter-media entre la temprana y tardía, que consiste en la formación precoz de tubérculo, a los 7 días, pero es de difícil observación, por lo que la mayoría de los observadores se limitan a las reacciones Fernández y de Mitsuda 6,9

ANTIGENO SOLUBLE

Es una prueba de sensibilidad que se compara con la reacción de Fernández pero no es igual. También se utiliza para obtener información inmunológica del paciente frente al *M. leprae*¹⁸.

Se aplica inyectando 0.1 c.c. de la fracción proteica del *M. leprae*, se obtiene cuando bacilos purificados se someten a fraccionamiento en una prensa especial por el método de Draper.

En la fracción citoplásmica soluble hay mayor especificidad antigénica de diferentes especies de

micobacterias. La reacción se lee a las 48 horas midiendo la induración. Los resultados se interpretan de la siguiente forma:

0 -9 mm: reacción mala

10 -15 mm: reacción buena

15 -29 mm: reacción óptima

30 ó más: hiperreactores

Esta reacción se utiliza para estudio epidemiológico de gran cantidad de personas que han tenido con-tacto o no con el *M. leprae*.

LA PRUEBA DEL C.C.B.

Es una prueba intradérmica más fina que se desarrolló para demostrar si una persona es capaz de eliminar o no *M. leprae* del sitio de inyección. El CCB contiene cuatro veces más cantidad de bacilos que la lepromina 160, es decir, es una lepromina que contiene 640 millones por bacilos por c.c. Esta concentración de bacilos tan elevada al ser inyectados hace que se forme un granuloma visible aún en los pacientes LL, generalmente a las 4 semanas. Al realizarla biopsia en los pacientes LL se observa que los bacilos no han sido destruidos, lo que significa incompetencia para destruir al bacilo.

La aplicación consiste en la inyección de 0,1 c.c., en cara anterior del antebrazo. El uso de esta prueba radica principalmente para decidir cuando suspender el tratamiento a pacientes con LL o BL, que han permanecido bajo tratamiento por varios años con bacteriología negativa.

PRUEBA DE ABSORCIÓN DE ANTICUERPO FLUORESCENTE DE LEPRA (FLA)

La prueba de FLA - ABS fue utilizada en los habitantes de las islas Mikayo donde se conocía que habían áreas hiperendémicas de lepra en Japón, con la finalidad de detectar infección subclínica.

El fundamento de la prueba es el examen microscópico con la técnica de fluorescencia directa del suero de personas mezclado y pretratado con anticuerpos de *M. leprae* haciendo las lecturas con el sistema de filtro BV. En este sistema los criterios para la lectura son los siguientes:

4+: fluorescencia muy fuerte para casi todos los bacilos

3+: fluorescencia fuerte para la mayoría de los bacilos

2+: muchos bacilos muestran fluorescencia pero también se observan bacilos con fluorescencia débil.

1+: pocos bacilos con fluorescencia, la mayoría débiles.

=/-: pocos bacilos y con débil fluorescencia.

- : bacilos sin fluorescencia específica.

Con la prueba de FLA-ABS se han detectado anticuerpos anti - *M. leprae* en más del 90% de pacientes con la enfermedad activa. Dado que esta prueba es bastante sensible y específica para la infección por *M. leprae*, la reacción positiva en caso de personas sanas puede ser considerada como un indicador de infección subclínica.

El principal propósito de detectar la infección sub-clínica de lepra es el de identificar a los individuos que se han infectado y que tienen probabilidad de desarrollar lepra multibacilar. La prueba de FLA-ABS por sí sola difícilmente llena este propósito. Es posible resolver esta dificultad combinando este método con la prueba de lepromina. Una combinación de FLAABS positiva y un Mitsuda negativo indica que el individuo ha sido infectado con *M. leprae*, pero que la inmunidad mediada por las células no ha sido inducida. Estos individuos tienen más probabilidades de desarrollar lepra multibacilar necesitan ser urgente-

mente protegidos 12,

PRUEBA DE TRANSFORMACION DEL LINFOCITO (LTT)

Introducida en 1963, esta prueba in vitro que evalúa la inmunidad mediada por células, se fundamenta en la capacidad de los linfocitos de diferenciarse en linfoblastos al ser enfrentados a un antígeno el cual ha sido sensibilizado a un contacto previo, en otras palabras, se basa en la observación de que un evento inicial en la respuesta inmune es una multiplicación selectiva de linfocitos con receptores para un antígeno dado. La capacidad de diferenciación se encuentra conservada en LT y muy disminuida en LL.

Los antígenos que se emplean en la prueba son específicos como BOG, extracto soluble de *M. Leprae*, bacilo purificado de *M. leprae* y pueden ser inespecíficos como la fitohemaglutinina y el mitógeno concanavalina A.

Los resultados se presentan bajo la forma de índice de estimulación. Un índice de estimulación mayor de 3 refleja la presencia de linfocitos sensibilizados frente a los antígenos específicos. Una respuesta normal frente a los mitógenos Concanavalina A, fitohemaglutinina normalmente da un índice de estimulación por encima de 20.

Cuando se introdujo la prueba de LTT en lepra se observó que en los pacientes LT había respuesta linfocitaria positiva, mientras que en pacientes LL eran casi universalmente negativas.

La prueba LTT es costosa, sujeta a errores técnicos y a diferentes variaciones. Pueden haber variaciones del estado clínico o infección subclínica, fase del ciclo menstrual, otras enfermedades asociadas, deficiencias nutricionales e incluso la hora del día en que se toma la muestra.

Los linfocitos deben ser preparados tan pronto como sea posible

después de la recolección de la muestra sanguínea o cuidadosamente almacenada como sangre completa a temperatura ambiente durante menos de 12 horas.

Esta prueba no es de utilidad para investigación de grupos individuos¹⁰.

ENSAYO INMUNOABSORBENTE UNIDO AENZIMA(ELISA)

Es una prueba serológica muy útil en lepra y en áreas endémicas de lepra, ELISA ha sido utilizada para demostrar IgA, IgM e IgG, anticuerpos ant-*M. tuberculosis* en el suero de pacientes con tuberculosis, sarcoidosis y enfermedad de Crohn. ELISA ha sido usado para el ensayo de IgG e IgM contra *M. leprae* en el suero humano.

Se utiliza suero del paciente y como antígeno el glicolípido fenólico 1 el cual es específico para *M. leprae*.

En los pacientes los anticuerpos contra glicolípidos fenólicos están en relación con el número de bacilos, por lo tanto, es alto cuando hay muchos bacilos y bajo cuando hay pocos.

La lectura se realiza entre 0 y 10, variando de la siguiente forma: menos de 2: negativo entre 2 y 3: dudoso entre 3 y 7: positivo mayor de 8: fuertemente positivo

La técnica ELISA puede ser útil en los programas de control de la lepra, tanto para identificar a los candi-datos de tratamiento preventivo, como para evaluar la respuesta al tratamiento^{7,8}.

INMUNOELECTROFORESIS CRUZADA (CIE)

Esta técnica fue introducida por Laurell en 1965 en estudios de proteínas séricas humanas.

La CIE separaba los bacilos de *M. leprae* en 7 u 8 componentes antigénicos para el uso de suero de pacientes LL.

Esta prueba ha sido empleada para: a) Detectar componentes antigénicos en preparaciones de *M. leprae*. b) Demostrar reacciones cruzadas entre *M. leprae* y otras bacterias. c) Demostrar actividad de anticuerpo en suero de pacientes con lepra. CIE no detecta ningún cambio en el patrón de precipitación del suero de pacientes LL que han sido tratados con DDS antes y después de 12 meses. d) Demostrar determinantes específicos para *M. lepra* en uno de los componentes antigénicos de *M. leprae*.

RADIOINMUNOENSAYO (RIA)

Es una prueba sensible para la demostración y cuantificación de anticuerpos contra un componente antigénico de la micobacteria antígeno 7, desarrollando así un espectro de actividad de anticuerpo con la menor actividad en suero de contactos, me-diana actividad en suero de pacientes LT no tratados, y máxima actividad en pacientes LL no tratados.

La actividad de anticuerpos contra el antígeno 7 de *M. leprae* ha sido determinado en un número limitado de sueros de pacientes con lepra y con-tactos. Por consiguiente, esta prueba debería ser aplicada a un número de sueros provenientes de pacientes con lepra, pacientes portadores de otras micobacteriosis y contactos de pacientes de lepra y contactos, especialmente de áreas sin lepra, con la finalidad de evaluar el uso de esta técnica en el serodiagnóstico de lepra¹⁴.

RADIOINMUNOENSAYO SOLIDO (SRIA)

Fue desarrollado por Melson para la demostración de IgG anticuerpos ant-*M. leprae*. Estos anticuerpos aumentaban su actividad a lo largo del espectro de la enfermedad siendo la menor actividad en contactos, la mediana actividad para LT no tratada y la máxima actividad para LL no tratada. El SRIA es principalmente utilizado para la demostración de anticuerpos a los antígenos que reaccionan cruzadamente con los componentes de *M. leprae*.

Esta técnica ha dado nueva información a la serología de la lepra. Los pacientes pueden producir anticuerpos IgA anti - M leprae. Tales anticuerpos IgA han sido detectados en muestras de sangre y en la leche de mujeres con enfermedad de Hansen.

El significado de anticuerpos IgA anti - M. leprae es desconocido, pero podría ayudar a detenerla invasión de M. leprae a lo largo de las mucosas como una defensa inicial de la lepra¹⁴

PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA (PHA)

El PHA fue descrito por Jagannath y colaboradores en 1981. Esta prueba en comparación con FLAABS y ELISA tiene más especificidad para la detección de anticuerpos específicos contra M. leprae¹⁵.

GLICOLIPIDO FENOLICO ELISA (GPL-1)

El antígeno GLP -1, descubierto por Brenan y Hunter en 1981, es específico de M. leprae, se encuentra en la cápsula del bacilo y en los tejidos, y se obtiene en gran cantidad de material de armadillos infectados con M. leprae teniendo los sueros de enfermos de lepra anticuerpos IgM contra este antígeno, lo que se evidencia mediante la técnica ELISA y se utilizan también sus derivados, los disacáridos y trisacáridos terminales, que son los antigénicamente activos o inmunodominantes¹⁵.

PRUEBA DE AGLUTINACION DE PARTICULAS DE M. LEPRAE (MLPA)

Es una prueba desarrollada en 1990 por Izumi, Fujiwara y colaboradores, para detectar anticuerpos anti-GLP-1 usando partículas de látex sensibilizadas¹⁵.

La realización de esta prueba es más fácil que ELISA y más conveniente para evaluar poblaciones para infecciones por M. leprae. Además permite manejar más muestras por día.

Otra ventaja es que no necesita de equipos especializados para hacer las mediciones, sino el ojo humano, por lo que se puede realizar investigación a nivel de campo y fuera del laboratorio^{15,16}

PRUEBA DE COMPETENCIA DEL ANTICUERPO SERICO (SACT)

Esta prueba es 100% positiva en los pacientes BL-LL activos, 87% en los BB, 47% en TT-BT y un 10% en los contactos sanos. En esta prueba se aplica la técnica de los hibridomas para detectar epítopes específicos del M. leprae mediante anticuerpos monoclonales. Se debe comparar con el ELISA PGL-1 y realizar Mitsuda en los casos positivos¹⁵.

REACCION EN CADENA A LA POLIMERASA(CPR)

Es muy útil en enfermedades infecciosas, particularmente en lepra, donde no se cultiva el agente causal, enfermedades oncológicas y genéticas, así como también en trasplantes.

Esta reacción consiste en analizar el DNA que se encuentra en todas las células y organismos patógenos. Con esta técnica se pueden detectar cantidades ínfimas de micobacterias, utilizando secuencias específicas de su DNA. Por lo tanto, es muy útil en la infección subclínica, formas iniciales y paucibacilares y también para diferenciar entre bacilos viables en tejidos, frotis cutáneos, nasales y sangre¹⁵.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Bloom, B: Esperando el fin. Una estrategia para la erradicación de la lepra. Seminario Bolivariano sobre el control de la lepra. OPS. 1983.
- 2.- Convit, J. Albornoz, R.: Algunos aspectos teórico-prácticos sobre inmunología de la lepra. Medicina Cutánea 1967; 3: 85 - 94.
- 3.- Levinson, A., Lisak, R., Zweiman, B: Immunologic Aspects of Leprosy. Int J. Dermatol. 1977; 2: 103 - 112.
- 4.- Editorial: Serodiagnosis of Leprosy. Int. J. Lepr. 1983; 2: 235 - 252.

- 5.- Kronvall, G.: The potential of immunological tests as tools in the epidemiology of leprosy. Lepr. Rew. 1981; 52: 207 - 220.
- 6.- Lefford, Nl.: Lepromin as an indicator and inducer of protective immunity. Lepr. Rew. 1981; 52: 221 - 230.
- 7.- Douglas, J. Naka. S. Lee, J.: Development of an ELISA for detection on antibody in leprosy. Int. J. Lepr. 1984; 1: 19 - 25.
- 8.- Douglas, J. Worth, R: Field evaluation of an ELISA to detect antibody in leprosy patients and their contacts. Int. J. Lepr. 1984; 1: 26 - 33.
- 9.- Editorial: Immunity to leprosy and the Mitsuda reaction. Int. J. Lepr. 1984; 1: 74 - 77.
- 10.- Bjune, G: The lymphocyte transformation test in leprosy with special reference to its use in epidemiology. Lepr. Rew. 1981: 52: 241 - 250.
- 11.- Matsuo, E. Skinsnes, O.: Immunologic identification of M. leprae. Int. J. Lepr. 1976; 3: 301 - 314.
- 12.- Abe, M: Subclinical infection in leprosy. its detection and control by FLA - ABS. Lepr. Rew. 1981; 52: 263 - 274.
- 13.- Serological tests for leprosy. Lancet, 1.986.
- 14.- Harboe, M.: Radioimmunoassay and serological test and their application in epidemiological work. Lepr. Rew. 1981; 52: 275 - 288.
- 15.- De las Aguas, Terencio: Serología de la Lepra. Revista de Leprología - FONTILLES 1992; 6: 637 - 644.
- 16.- Dhandayuthapani D. Bhatia V.: Evaluation of MLPA Test for the Serodiagnosis of Leprosy International J. of Leprosy.
- 17.- Buckley, E.: Manual of clinical Laboratory Immunology. Capítulo 37. 3a edición. American Society Microbiology, Washington, D.C.
- 18.- M.S.A.S. Departamento de Dermatología Sanitaria. Prueba intradérmica con antígeno de lepromina y antígeno soluble. Folleto. Caracas - Venezuela.