



BACILOSCOPIA DE LA LEPRA

Prof. Odelaissy Suárez Moreno, MSc.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Ciudad Habana, Cuba 2007

INDICE

| | |
|--|---|
| Introducción | 1 |
| Toma de muestras para el examen bacteriológico | 2 |
| Baciloscopía de piel | 2 |
| Técnica de obtención de muestra | 2 |
| Baciloscopía del mucus nasal | 3 |
| Precauciones en la recolección de muestras | 3 |
| Procesamiento de las muestras | 4 |
| Fijado | 4 |
| Coloración | 4 |
| Lectura de la baciloscopía | 5 |
| Índice bacteriológico | 6 |
| Índice morfológico | 6 |
| Globis | 6 |
| Índice del paciente | 7 |
| Anexos | 8 |

INTRODUCCIÓN

La Lepra es una enfermedad infecciosa difundida por todo el mundo, causada por una bacteria con forma de bastón, el *Mycobacterium leprae*. Este bacilo fue descubierto por Gerhard Armauer Hansen en 1873 en Bergen, Noruega, pero no fue hasta 7 años después que se aceptó gracias al alemán Albert Neisser que logró teñir las mycobacterias. *Mycobacterium leprae* nunca se ha logrado cultivar, se produce solamente en vivo en los macrófagos de la piel (histocitos) y en el de los nervios (células de Schwann).

Estas células que habitualmente constituyen una de las barreras de defensa del organismo contra las infecciones, fracasan en el paciente de Lepra por causas de su inmunocompetencia, permitiendo además que se multiplique dentro de ellas y finalmente son destruidas por el bacilo. De este modo las lesiones se extienden principalmente a la piel y los nervios periféricos. La destrucción de estos últimos produce lesiones tanto motoras (parálisis) como sensitivas (anestesia, pérdida de sensibilidad, especialmente al frío y calor).

La Lepra es la más compleja y crónica de todas las enfermedades bacterianas del hombre. No se conoce exactamente la vía de contagio, se supone que la forma más probable de contagio sea el contacto prolongado e íntimo con un enfermo y la vía de entrada del bacilo al huésped sea por vía respiratoria, esta vía también es la de salida del paciente infectante así como la piel erosionada.

El principal reservorio es el individuo enfermo sin tratamiento, siendo más significativo el paciente con Lepra Multibacilar, aunque también se ha encontrado en la naturaleza armadillo, chimpancé y monos mangabey y macaco mulata con una enfermedad sistémica muy similar a la lepra lepromatosa del hombre, y el bacilo responde idénticamente al *M leprae* aislado en nódulos humanos, por lo que ellos se consideran en algunos países como otros reservorios.

Se ignora el papel que puedan desempeñar los contactos con serología positiva, portadores sanos en la transmisión de la enfermedad, pero se han encontrado bacilos en la sangre de un gran número de contactos de pacientes de Lepra. En Argentina la Dra. Rita Waisman y el Dr. Manuel Giménez han realizado importantes estudios con sangre de personas aparentemente sanas, residentes en la zona endémica, encontrando bacilos en un alto porcentaje de las muestras.

El diagnóstico de la enfermedad está basado en el examen clínico, la baciloscopía y la biopsia de piel.

TOMA DE MUESTRAS PARA EL EXAMEN BACTERIOLOGICO

BACILOSCOPIA DE PIEL.

La extracción de muestras para baciloscopia requiere un cuidadoso examen previo de la piel del paciente. En muchos casos, una acertada elección de la zona para realizar la toma, es la determinante para un diagnóstico exitoso. Se dará preferencia a las lesiones recientes, razón por la cual es conveniente interrogar al enfermo sobre este aspecto.

En toda lesión circunscripta el corte se realizará en el borde. Si la misma tuviera una zona central sana (lesiones en escarapela) se elegirá entre el borde interno y el externo aquel que presente un aspecto más difuso.

Si el paciente no presenta lesiones activas en el momento del examen, se pueden efectuar incisiones en los lóbulos de las orejas y codos.

TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE MUESTRA

La muestra ideal es la linfa por ella viajan los elementos del sistema inmunológico y su color permite distinguir el bacilo teñido.

El microbiólogo debe tener listo el material que utilizará antes de entrar el paciente. La lámina nueva que ha sido desgrasada y lavada debe tener los círculos rotulados con lápiz de punta de diamante con el orden de AI, AD, CI, CD en el extremo izquierdo colocará el número que corresponde a la orden del paciente también con el lápiz de punta de diamante. Debe tener la pinza preparada, las torundas de algodón, el alcohol y la hoja de bisturí. El uso de guantes es obligatorio para el procedimiento.

Antes de realizar la incisión para la obtención de linfa, se debe efectuar una meticulosa desinfección de la piel con alcohol etílico 70°. Una vez seca la zona, se pinzará con una pinza preparada para ello o puede pinzarse con los dedos pulgar e índice, y en ambos casos se comprime el tejido para anemizarlo. Manteniendo la presión, se realiza un corte de aproximadamente 5 mm de longitud y 2 ó 3 mm de profundidad, con un bisturí de hoja desechable pequeña No.15. Una vez efectuada la incisión se raspan los bordes internos de la misma con la punta del bisturí colocado transversalmente al corte, para que fluya la linfa con el tegumento y con el borde no filoso con un rápido movimiento se recoge el material que inmediatamente se extiende con el mismo instrumento dentro del círculo en el portaobjeto, la linfa se distribuye uniformemente en un área de 6 ó 7 mm de diámetro, mediante movimientos circulares suaves.

La hoja debe ser descartada en un recipiente con fenol al 5 % una vez terminada la última toma del paciente. La pinza y el mango si se utiliza deben ser esterilizados, lavados y secados. (Ver anexo 1)

BACILOSCOPIA DE MUCUS NASAL

Los bacilos de Hansen generalmente no se encuentran en el mucus nasal si están ausentes en las lesiones cutánea, y cuando comienza el tratamiento, el frotis de mucus nasal se negativiza antes que el de las lesiones tegumentarias, por ello no se realiza cuando el paciente ya está bajo tratamiento.

En los enfermos **vírgenes de tratamiento** se suele encontrar un mayor número de bacilos sólidos en el mucus nasal que en la piel. El mucus nasal puede ser obtenido por exudado. Con hisopo, esta es la técnica más simple, además permite recolectar abundante material, útil en casos de secreciones escasas o muy secas.

Se emplea un hisopo estéril humedecido en solución fisiológica, estéril, con él que se realiza el raspado de ambas caras del tabique nasal. Se frota el hisopo sobre un portaobjetos para depositar el material obtenido, siempre formando un círculo de 6 ó 7 milímetros de diámetro. (Ver anexo 2).

PRECAUCIONES EN LA RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Es importante reiterar que no se debe reutilizar portaobjetos que hayan sido empleados previamente en baciloscopías, salvo que se los someta a un prolongado y exhaustivo lavado con mezcla sulfocrómica, ya que en muchos casos se ha comprobado la persistencia de elementos teñidos en portaobjetos lavados con agua y jabón.

Los portaobjetos nuevos deben ser lavados y desengrasados esto último se logra almacenando las láminas en alcohol/éter, alcohol/acetona o alcohol/ácido antes de su uso, en el momento de utilizar una lámina debe ser lavada y secada.

En cada portaobjeto se pueden colocar hasta 6 muestras de un mismo paciente, debidamente rotulados con lápiz de diamante. Las láminas pueden rotularse y almacenarse en los alcoholes antes mencionados de esta forma serán desengrasada y se evita su contaminación por hongos.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

FIJADO

Una vez realizados los frotis, se dejan secar al aire y luego se fijan pasando los portaobjetos (sostenido con la mano) sobre una llama débil, de modo que se caliente el lado contrario al que contiene las muestras.

El flameado no debe ser excesivo, ya que puede interferir la coloración. Tres o cuatro pasajes sobre la llama son suficientes.

En caso de contar con una plancha termostataada, los portaobjetos se dejan durante cinco minutos a una temperatura de 60° C.

En el trabajo de campo, si no se cuenta con personal entrenado o equipo adecuado, el fijado por calor puede ser reemplazado por el fijado con vapores de formol. En este caso se debe disponer de un vaso de Coplin, una caja plástica para portaobjetos, o caja de petri, dentro debe colocarse una motica de algodón embebida en formol 40%. En ellas se colocan las láminas con los frotis ya secos, donde permanecerán un tiempo no menor a 15 minutos con la tapa cerrada, luego de esta exposición se pasan a otro recipiente tapado. Este fijado protege los frotis por 72 horas hasta la llegada al laboratorio, donde se podrá completar el fijado por calor.

COLORACIÓN

Los frotis se cubren con una solución al 1% de fucsina y se deja actuar durante 25 a 35 minutos, se lavan con abundante agua corriente. Se cubren con una mezcla de ácido clorhídrico al 1% en etanol al 96° que se deja actuar uno o dos minutos, según el espesor del frotis, hasta la decoloración, lavamos con agua corriente y cubrimos con solución acuosa de azul de metileno al 1% y se deja actuar durante 1 minuto. (Informe: WHO/CDS/LEP/86.4).

Por último se lavan con abundante agua corriente y se dejan secar al aire. Se observan al microscopio con objetivo de inmersión.

En nuestro país utilizamos los colorantes elaborados por la empresa Carlos J Finlay es importante tener en cuenta que por el tiempo de almacenamiento pudiera crear cristales y es recomendable siempre filtrar las soluciones de fuschina y azul antes de usarla.

LECTURA DE LA BACILOSCOPIA

La observación de los frotis se realiza con objetivo de inmersión de 100x. En el frotis pueden encontrarse cuatro tipos de elementos ácido alcohol resistente que se describen a continuación.

| | |
|--|--|
| (S) Bacilos sólidos | Son bacterias que muestran una tinción uniforme en su totalidad |
| (F) Bacilos fragmentados | Muestran una coloración irregular, con zonas mal coloreadas que les confieren un aspecto apolillado, pero no impiden delinear los contornos del bacilo. Simulan la metacromásia observada en ciertas bacterias en la coloración de Gram |
| (G) Bacilos granulosos | Se observan zonas no teñidas en el espesor de los bacilos, perdiéndose el contorno de los mismos. En la mayoría de los casos sólo se ven como gránulos alineados. |
| (A) Bacilos en acumulo o globi, característico solo del <i>M. leprae</i> | Esta es una agrupación bacilar es típica de la forma lepromatosa. El globis es el contenido de un macrófago en el que los bacilos se han multiplicado hasta reemplazar totalmente su citoplasma. Al observarlo no se visualiza la forma celular, sino un paquete apretado de 50 a 100 bacilos o más, en los que resulta imposible ver la morfología individual |

La primera información de las baciloscopía se realiza mediante el índice baciloscópico (IB) y el índice morfológico (IM) como se indica a continuación. (Ver anexo 3 y 4)

INDICE BACTERIOLÓGICO

Se utiliza la escala logarítmica de Ridley, que va del 0 al 6+, que se basa en el promedio de bacilos observados en el frotis, contando los sólidos, los fragmentados y los granulados.

Indice:

- 0 No se encuentra ningún bacilo en 100 campos observados con objetivo de inmersión (1000 X), Debe examinarse 100 campos horizontales y 100 verticales como mínimo.
- 1+ Se visualiza un promedio de 1 a 10 bacilos en 100 campos observados con objetivo de inmersión (1000 X). Deben examinarse 100 campos como mínimo.
- 2+ Se visualiza un promedio de 1 a 10 bacilos cada 10 campos observados con objetivo de inmersión (1000 X). Deben examinarse 100 campos como mínimo.
- 3+ Se visualiza un promedio de 1 a 10 bacilos por campo observados con objetivo de inmersión (1000 X). Deben examinarse 25 campos como mínimo.
- 4+ Se visualiza un promedio de 10 a 100 bacilos por campo observados con objetivo de inmersión (1000 X). Deben examinarse 25 campos como mínimo. Pueden observarse globis a partir de esta codificación
- 5+ Se visualiza un promedio de 100 a 1000 bacilos por campo observados con objetivo de inmersión (1000 X). Deben examinarse 25 campos como mínimo.
- 6+ Se visualiza un promedio de más de 1000 bacilos por campo observados con objetivo de inmersión n (1000 X). Deben examinarse 25 campos como mínimo.

(Ver anexo 5)

INDICE MORFOLÓGICO

Es el porcentaje de bacilos sólidos respecto al total de bacilos ácido alcohol resistente encontrados. Se calculan observando 100 bacilos aislados. La morfología de los bacilos agrupados es difícilmente apreciable.

GLOBIS

En el informe también debe mencionarse la presencia de globis. Debe recordarse que estos se originan al reproducirse los bacilos dentro de los macrófagos, a los que termina por destruir y por lo tanto demuestran la imposibilidad de estos últimos de defenderse del *M. leprae*. Su presencia es característica de la Lepra lepromatosa, forma polar de baja resistencia al bacilo.

INDICES DEL PACIENTE

Se puede construir el índice bacteriológico o morfológico global del paciente, calculando el promedio entre todas las lecturas o los IB e IM. Ej: AI=2, AD= 3 CI=3 CD=3; el promedio es 2,75 por lo que IB del paciente es 3 (se aproxima a la cifra superior).

Sin embargo el seguimiento del tratamiento se realiza mejor comparando los Indices individuales las tomas realizadas cada año en la misma zona, estos índices miden en cierta forma el efecto, bactericida de los antibióticos y por lo tanto brindan información acerca de los efectos del tratamiento y de las posibles resistencias a las drogas.

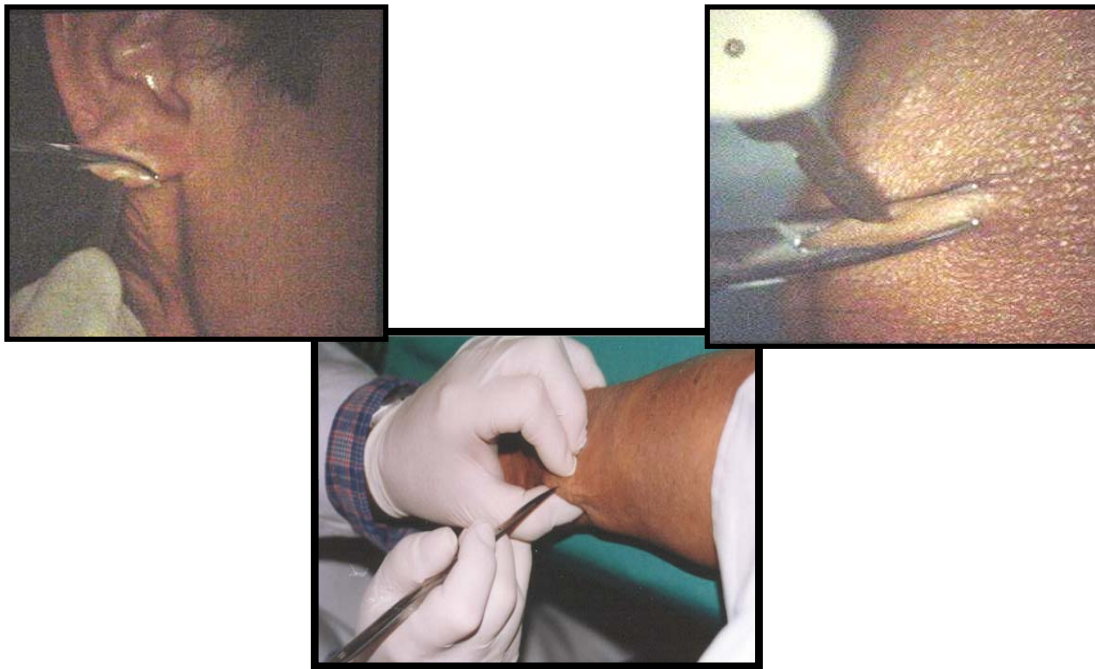
También se pueden calcular índices morfológicos de formas fragmentadas y de formas granuladas. Estos se calculan de un modo similar al IM, pero contando el porcentaje de bacilos fragmentados respecto al total de bacilos observados y el porcentaje de bacilos granulados respecto al total de bacilos observados, respectivamente.

La importancia de los índices morfológicos radica en la correspondencia entre los bacilos sólidos y los bacilos vivos, aunque algunos autores plantean que no todos los bacilos fragmentados están muertos.

El índice bacilosκόpicó desciende durante el tratamiento, mucho más lentamente que el morfológico, especialmente en los pacientes LL. **El IB disminuye un logaritmo anualmente, por lo que se recomienda hacer la baciloscopía de seguimiento anualmente, antes de este tiempo no es justificada.**

ANEXOS

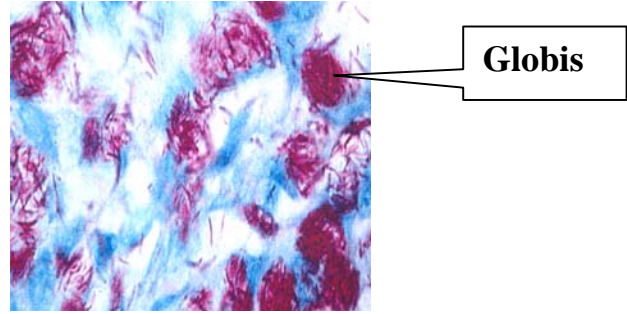
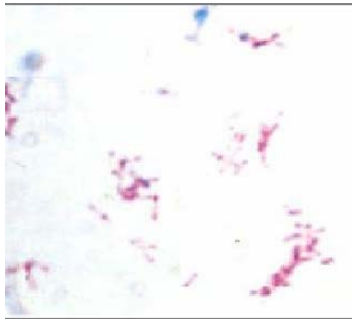
Anexo 1. Pinzado para animizar la zona y corte para obtención de linfa, en aurícula, codo y lesión



Anexo 2. Toma de muestra de mucus nasal

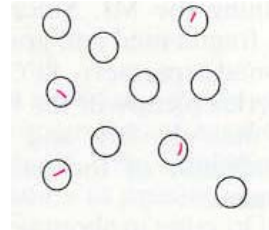
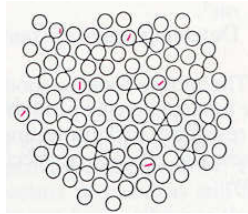


Anexos 3 y 4. Bacilos en la lámina y globis



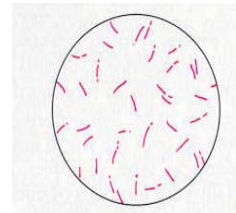
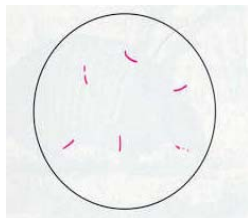
Anexo 5. Índice Bacteriológico

IB=1



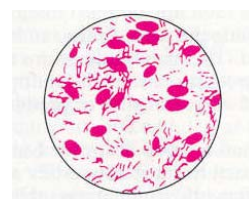
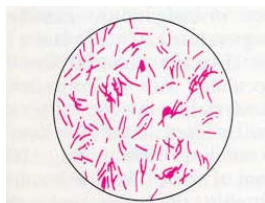
IB=2

IB=3



IB=4

IB=5



IB=6