

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* EN PACIENTES
SOSPECHOSOS DE PADECER ENFERMEDAD DE HANSEN**

HERNANDO YESID ESTUPIÑÁN VELÁSQUEZ



**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2014**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* EN PACIENTES
SOSPECHOSOS DE PADECER ENFERMEDAD DE HANSEN**

HERNANDO YESID ESTUPIÑÁN VELÁSQUEZ

Trabajo de grado para optar al título de
MAGISTER EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Director

WELLMAN RIBÓN

Bacteriólogo y Laboratorista Clínico. MSc.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2014

... Dedicado sin duda alguna, a Dios y mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Inicialmente a Dios, porque sin él nada sería posible.

A mi familia quien ha observado desde el horizonte inmutable e incansable cada uno de los pasos que he dado para lograr la presentación de este trabajo, permitiéndome robarles cada segundo de su tiempo para hacer lo que mi espíritu y alma necesitan, a mi esposa e hija quienes con su esfuerzo, alegría, calma y sabiduría han soportado mis emociones y ausencias durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Wellman Ribon, director, asesor y amigo, por todo su tiempo, apoyo incondicional e incansable necesidad de vernos cada día mejores personas, investigadores y gerentes hoy.

A mis compañeros de grupo Nelson, Laura, Jhon, Jhonner y Bladimir por cada una de sus opiniones, argumentos, discusiones y deliberaciones durante el desarrollo de este trabajo. A Lorena y Ximena, compañeras y amigas de tesis, gracias por tantos momentos de trabajo y dificultades compartidas, por sus puntos de vista, opiniones dispersas y apoyo incondicional.

Al Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, por abrirme sus puertas y permitirme hacer hechos cada uno de los sueños personales, por enseñarme a construir conocimiento de calidad y por ofrecerme un espacio de crecimiento profesional.

El CES Medellín, especialmente a la Dra. Nora Cardona Castro y el profesional Juan Camilo BeltránÁlzate, que me han abierto las puertas de su laboratorio, para el conocimiento y entendimiento de la identificación molecular.

Al Laboratorio de Biología Molecular Aplicada a Micobacterias – Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ, especialmente a la Dra. Amanda Nogueira Brum Fontes, quien me ha permitido asistir a un entrenamiento en genotipificación del *M. leprae*.

A la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas y la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico que me han otorgado la financiación y tiempo para las asistencias a los laboratorios nacionales e internacionales.

A cada una de las personas que quisiera enumerar y se encuentran ocultas en cada una de las palabras y resultados mostrados en este trabajo de tesis, compañeros de laboratorio, amigos y familiares que con sus opiniones y comentarios han permitido que este trabajo sea actualmente un hecho. Mil gracias a todos por cada espacio aportado en este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	17
1. OBJETIVOS	20
1.1 OBJETIVO GENERAL	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
2. MARCO TEÓRICO	21
2.1 AGENTE ETIOLÓGICO	21
2.2 GENOMA DEL <i>Mycobacterium leprae</i>	22
2.3 TRASMISIÓN DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN	24
2.4 MECANISMO DE PATOGÉNESIS	25
2.5 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD	26
2.6 DIAGNÓSTICO	28
2.7 TRATAMIENTO	31
2.8 ESTIGMA Y ENFERMEDAD	33
3. MATERIALES Y MÉTODOS	36
3.1 OBJETIVO 1 Y 2	36
3.1.1 Diseño del Estudio	36
3.1.2 Población de Estudio 1	36
3.1.3 Tipo de Material Analizado	36
3.1.4 Extracción de Ácidos Nucléico	41
3.1.4.1 Linfa Procedente de Lámina Para Baciloscopia de Hansen	41
3.1.4.2 Moco Obtenido por Hisopado Nasal	41
3.1.4.3 Biopsia de Piel	41
3.1.5 Identificación Molecular del <i>M. leprae</i>	42

3.1.6 Establecimiento de Genotipos	43
3.2 OBJETIVO 3	45
3.2.1 Población de Estudio 2 y 3	45
3.2.2 Tipo de Material Analizado	45
3.3 ANÁLISIS DE DATOS	53
4. CONSIDERACIONES ÉTICAS	54
5. RESULTADOS	55
5.1 ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL <i>M. leprae</i> .	56
5.2 ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BASADOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO NÚMERO 1.	59
5.2.1 Análisis de Identificación Basados en la PCR Directa	60
5.2.1.1 Muestras de Linfa Extraídas a Partir de Láminas Para Baciloscopia	60
5.2.1.2 Muestra de Moco Nasal Obtenida por Hisopado	64
5.2.1.3 Muestras de Biopsia de Piel	64
5.2.1.4 Análisis de Resultados por PCR Directa	65
5.2.2 Análisis de Identificación Basados en la PCR Anidada	66
5.2.2.1 Muestras de linfa extraídas a partir de láminas para baciloscopia	67
5.2.2.2 Muestra de Moco Nasal Obtenida por Hisopado	67
5.2.2.3 Muestras de Biopsias de Piel	67
5.2.2.4 Análisis de Resultados PCR Anidada	67
5.2.3 Análisis Complementarios	70
5.2.3.1 Identificación por 16S rRNA	70
5.2.3.2 Establecimiento de Genotipos Basados en la Variabilidad Genética de los Polimorfismos de Único Nucleótido	72

5.3 ANÁLISIS DE FACTORES SOCIALES QUE PODRÍAN FAVORECER LA PERSISTENCIA DE LA ENFERMEDAD BASADOS EN LAS POBLACIONES DE ESTUDIO NÚMERO 2 Y 3.	77
5.3.1 Análisis de Conocimientos	77
5.3.2 Temores, Actitudes y Estigmas de la Enfermedad	81
5.3.2.1 Temores y Actitudes	81
5.3.2.2 Estigma y Enfermedad	85
6. DISCUSIÓN	89
7. DIFUSIÓN, PARTICIPACIÓN EN EVENTOS Y PASANTÍAS DE INVESTIGACIÓN	100
7.1 DIFUSIÓN	100
7.2 PARTICIPACIÓN EN EVENTOS	100
7.3 PASANTÍAS DE INVESTIGACIÓN	101
BIBLIOGRAFÍA	102
ANEXOS	113

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Clasificación del espectro clínico e inmuno-patológico de la lepra.	27
Figura 2. Instrumento de recolección de información “Población no afectada”	47
Figura 3. Instrumento de recolección de información “Población afectada”	49
Figura N° 4. Gradiente de temperatura de anillamiento para PCR directa.	57
Figura N° 5. Gradiente de temperatura de anillamiento para PCR anidada.	57
Figura N° 6. Límite de detección para PCR directa.	58
Figura N° 7. Límite de detección para PCR anidada.	59
Figura N° 8. Selección de muestra para extracción de ADN de baciloscopia.	61
Figura N° 9. Electroforesis de PCR directa para RLEP en muestras de linfa.	63
Figura N° 10. Electroforesis de PCR directa para muestras de moco nasal.	64
Figura N° 11. Electroforesis de PCR directa para biopsias de piel.	65
Figura N° 12. Comparación por identificación microbiológica y molecular - PCR directa.	66
Figura N° 13. Electroforesis de PCR anidad para linfa y moco nasal.	68
Figura N° 14. Electroforesis de PCR anidad para biopsias de piel.	69
Figura N° 15. Comparación por identificación microbiológica y molecular – PCR directa y anidada.	69
Figura N° 16. Electroforesis de PCR 16SrRNA para biopsias de piel.	70
Figura N° 17. Electroforesis de PCR para genotipificación por SNP.	72
Figura N° 18. Electroforesis de PCR para SNP en la posición 2’935.685.	73
Figura N° 19. Electroforesis para amplificado digerido de SNP 2’935.685.	74
Figura N° 20. Propuesta de diagrama de flujo para la identificación de <i>Mycobacterium leprae</i> .	76
Figura N° 21. Grupos de conocimiento por población.	80
Figura N° 22. Identificación de signos y síntomas en los grupos C y D.	81

Figura N° 23. Temores de la población 2 frente a la enfermedad.	82
Figura N° 24. Actitudes inducidas por el temor en la población 3.	84
Figura N° 25. Actitudes de ocultamiento presentes en la población 2.	85
Figura N° 26. Actividades en las que participa la población 2	86
Figura N° 27. Condición laboral y estigma.	87

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1. Registro de hallazgos determinados para la población con sospecha clínica utilizada en la identificación de <i>M. leprae</i> .	38
Tabla N° 2. Secuencias para determinación de genotipos por SNP en <i>M. leprae</i> .	44
Tabla N° 3. Características sociodemográficas de la población con sospecha clínica de enfermedad de Hansen “población 1”.	55
Tabla N° 4. Identificación molecular en muestras de baciloscopia para Hansen	62
Tabla N° 5. Identificación de especies o géneros según secuencias del 16S rRNA.	71
Tabla N° 6. Características socioeconómicas de la población enferma “población 2”.	78
Tabla N° 7. Características socioeconómicas de la población no enferma “población 1”.	79

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Aprobación comité de ética	113
Anexo B. Portada de revista que publicó memorias ponencia internacional	114
Anexo C. Memorias ponencia internacional	115
Anexo D. Certificado ponencia internacional	116
Anexo E. Portada de revista que publicó memorias poster internacional	117
Anexo F. Memorias poster internacional	118
Anexo G. Certificados asistencias a eventos o pasantías adicionales	119
Anexo H. Certificados asistencias a eventos o pasantías adicionales	120
Anexo I. Certificados asistencias a eventos o pasantías adicionales	121

RESUMEN

Título: DETECCIÓN MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* EN PACIENTES SOSPECHOSOS DE PADECER ENFERMEDAD DE HANSEN.*

Autor: Hernando Yesid Estupiñán Velásquez.**

Palabras claves: Lepra, enfermedad de Hansen, PCR, identificación molecular, conocimientos y estigma.

DESCRIPCIÓN:

Resumen. La lepra o enfermedad de Hansen producida por el *M. leprae*, es una enfermedad infecciosa con el potencial de generar discapacidad y estigma, con la presencia de 232.857 casos nuevos durante el 2012 cuando aún es considerada una enfermedad de interés en salud pública. En Colombia la enfermedad de Hansen se estableció como un evento en eliminación, pero Departamentos como Santander reportaron 1 y 4 casos por cada 100.000 habitantes, con un constante aumento en el número de casos diagnosticados con discapacidad, por lo tanto ha existido la necesidad de adopción y ejecución de las actividades de control establecidas por la OMS y el Plan nacional, que tienen por objetivo la identificación temprana y la reducción de discapacidad grado 2.

Materiales y métodos. Este trabajo ha sido desarrollado a partir del análisis de 3 poblaciones, ha permitido la implementación de una metodología de identificación molecular usando como blanco la región RLEP del *M. leprae* y ha establecido mediante el empleo de dos instrumentos de recolección de información los conocimientos, temores y actitudes presentes en la población enferma y no enferma de Hansen, como inductores de estigma en la enfermedad.

Resultados y conclusiones. Las actividades enmarcadas en este trabajo han resultado ser una alternativa de identificación del bacilo en muestras de moco nasal, linfa y biopsia de piel, que presentó límites de detección de 0,3 bacilos/μl, superior a las metodologías convencionales y ha establecido puntos de partida para la comprensión de las actitudes y temores inductores de estigma de la enfermedad, identificando como estrategia probable el abordaje de los conocimientos presentes en el enfermo y su entorno en búsqueda de generar conocimientos adecuadas que permitan el diagnóstico clínico temprano y reduzcan la aparición de aislamiento, ocultamiento y estereotipización, factores probablemente promotores de la cadena de transmisión y discapacidad.

* Proyecto de grado

** Facultad de Salud. Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico. Director: Wellman Ribón

ABSTRACT

Title: MOLECULAR DETECTION OF *Mycobacterium leprae* IN PATIENTS SUSPECTED OF HAVING HANSEN DISEASE.*

Author: Hernando Yesid Estupiñán Velásquez.**

Key words: Leprosy, Hansen disease, PCR, molecular identification, knowledge, stigma.

DESCRIPTION:

Abstract. Leprosy or Hansen disease caused by *M. leprae*, is an infectious disease with the potential to generate disability and stigma, it has caused 232,857 new leprosy cases in 2012 and is considered a disease of public health interest. In Colombia, Hansen disease was considered as an eliminatory event, even though Departments like Santander reported 1 and 4 cases per 100.000 habitants and constantly increase of disability cases. That is because there has been the need for adoption and execution of the control activities established by OMS and the National Plan that aim early detection of the disease and reduction of the grade two disabilities.

Materials and methods. This work has been developed from the analysis of three populations, it has allowed the implementation of a molecular identification methodology using RLEP of *M. leprae* as the target and it has established using two instruments for data collection about knowledge's, fears and attitudes in the Hansen diseased and not-diseased population as inducers of the disease stigma.

Results y conclusions. The activities of this work are an alternative for the identification of the microorganism in nasal mucus, lymph and skin biopsy, the methodology had a sensibility of 0,3 microorganism/ μ l, better than conventional methodologies and it has established starting points for understand the attitudes and fears related to disease stigma, identifying as a probable strategy addressing the patient knowledge and his family to facilitate early clinical diagnosis and reduce the appearance of isolation, concealment and stereotyping, probably promoters factors of the transmission chain and disability.

* Project for the degree

** Faculty Health. School of Bacteriology and Clinical Laboratory. Director: Wellman Ribón, MSc

INTRODUCCIÓN

La lepra o enfermedad de Hansen es una infección crónica causada por el *Mycobacterium leprae*, un patógeno intracelular obligado con actividad nociva sobre las células de Schwann que provoca alteraciones sensitivas y motoras que en ocasiones generan deformidad de la extremidad afectada, estableciendo tres diferentes grados de discapacidad en ojos, manos y pies. Desde su registro en épocas bíblicas ha sido una enfermedad estigmatizada y múltiples esfuerzos han sido guiados hacia la identificación temprana de la infección y la instauración de un tratamiento oportuno y continuo que permita la disminución de la discapacidad durante la enfermedad.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2012 se presentó una prevalencia de 4,00 casos de enfermedad de Hansen por cada 100.000 habitantes, 115 países registraron 232.857 enfermos y se consideró a la Lepra endémica en muchas regiones. El continente con el mayor número de casos reportados fue Asia con 166.445 casos presentes en 11 países, en las Américas 28 países incluido Colombia reportaron 36.178 casos nuevos, África reportó 20.599 enfermos y 20 países pertenecientes al Este del Mediterráneo con 31 del Oeste del Pacífico reportaron 4.235 y 5400 casos nuevos respectivamente (2013), por lo tanto para 2012 se observó un aumento en más de 6.000 casos nuevos y 1000 diagnosticados con discapacidad grado 2 en contraste con la reducción anual durante el 2005 a 2011 (2011; 2013). En este sentido se evidenció la necesidad inmediata de adopción y ejecución de actividades de control establecidas de acuerdo a los lineamientos del Plan de Reducción de la Carga de Morbilidad Debida a la Lepra 2011-2015, propuesto por la OMS con el objeto de reducción del 35 % de la tasa mundial de casos nuevos con discapacidad grado II por 100.000 habitantes al finalizar el 2015 en comparación con la línea base de 2010 (Pannikar 2009).

En el continente Americano para 2012 el país que reportó el mayor número de casos nuevos fue Brasil con 33.303 casos, seguido de Argentina con el 60.7% de casos multibacilares y 11.3% de casos con discapacidad grado 2. Colombia reportó en 2012 un total de 392 casos nuevos de lepra a la semana 50 de 2013 el Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) registró 446 casos, aumento que se observó en los 31 a 41 casos identificados en los años previos con discapacidad grado 2 (2011; 2013), por lo tanto Colombia como otros países endémicos en el mundo ha presentado un escenario de transmisión activa de lepra, que debido a los casos diagnosticados con discapacidad grado 2 evidenció dificultades durante la identificación temprana del enfermo y la presencia de estigma social o barreras de acceso a los servicios de salud. Situación para la cual Santander no fue ajeno, siendo considerado un escenario de alta carga de la enfermedad al reportar 31 casos enfermos de Hansen para el 2012, en contraste con los 56 casos reportados hasta la semana 50 de 2013 (SIVIGILA, 2013), observación que puede ser interpretada como evidencia de transmisión activa, dificultades de identificación temprana y presencia de posibles barreras de acceso.

En este sentido para la lepra ha existido la necesidad inmediata de adopción y ejecución de actividades de control novedosas e integrales, dirigidas a la identificación temprana del enfermo, promoción de un tratamiento oportuno e ininterrumpido, acortando la cadena de transmisión y la aparición de discapacidad grado 2. Por lo tanto este trabajo se implementó en base al protocolo de identificación molecular de *M. leprae*, aplicado a múltiples muestras procedentes de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Hansen, como una estrategia para la identificación temprana del enfermo aumentando el límite de detección usado. Adicionalmente se identificó la presencia de actitudes que podrían provocar en el enfermo estigmas que retardan el diagnóstico o interfieren en el tratamiento y posiblemente promueven la evolución a la discapacidad grado 2.

En Colombia es la primera vez en la que se aborda el diagnóstico molecular en diferentes tipos de muestras de uso rutinario en el enfermo de Hansen en conjunto con el análisis de los factores sociales que interfieren con el desarrollo de la terapéutica para lepra, sugiriendo la necesidad de implementar estrategias en los programas regionales o nacionales, con el propósito de realizar un diagnóstico e intervención social con calidad y oportunidad disminuyendo la cadena de transmisión e identificación antes de la aparición de discapacidad en el enfermo de Hansen perteneciente a las zonas que aún presentan un total de casos superior a la meta de eliminación propuesta por la OMS.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante el empleo de un método molecular la presencia de *M. leprae* en muestras de pacientes sospechosos de padecer la enfermedad de Hansen.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementación de una metodología de identificación molecular de *M. leprae* en muestras de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Hansen.
- Identificación molecular del *M. leprae* en muestras provenientes de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Hansen.
- Estudiar los factores sociales de los pacientes analizados que podrían favorecer la persistencia de la enfermedad en Santander.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

La lepra enfermedad infecto-contagiosa denominada también enfermedad de Hansen en honor al descubridor de su causa en 1873 el Noruego Armauer Hansen Bergen, es provocada por el *M. leprae*, bacilo del género *Mycobacterium*, orden *Actinomycetales*, bacteria con forma de bastón ligeramente curvado e inmóvil, no formador de endospora y clasificado como Bacilo Acido Alcohol Resistente (BAAR) por la tinción de Ziehl Neelsen (ZN). Presenta una pared celular compuesta principalmente por un complejo de peptidoglicano-arabinogalactano-acidos micólicos, una familia de dos fosfatidilinositol manósidos, polímeros de lipomanano, lipoarabinomanano y se caracteriza por presentar un glicolípido fenólico 1 (PGL-1) específico de su especie(Rastogi, Legrand et al. 2001)

El *M. leprae* es un bacilo de crecimiento lento y de multiplicación cada 14 días, no cultivable en medio artificial y del cual se creía que el hombre era su único hospedero natural(Rees 1969).Su multiplicación en otro animal se inicio por primera vez en el cojinete plantar de ratones Balb/c tras realizarse inoculación generalizada(Shepard 1962).En los años 70 se describe un método de infección artificial y se observainfección natural en el armadillo *Dasypus novemcinctus* (Kirchheimer and Storrs 1971; Filice, Greenberg et al. 1977), pero ningún modelo obtuvo mejor utilidad experimental hasta el desarrollo de un método de inoculación en cojinete plantar murino nu/un (Truman and Krahenbuhl 2001; Lahiri, Randhawa et al. 2005), por lo tanto el trabajo con el bacilo en los laboratorios de investigación e identificación actualmente representa un reto y la necesidad de implementación de modelos con animales de experimentación o el empleo de métodos moleculares sobre muestras clínicas.

2.2 GENOMA DEL *Mycobacterium leprae*

La comprensión de la incapacidad de crecimiento de *M. leprae* en medios de cultivo artificiales fue descrita como parte de la reducción de su material genético (Eiglmeier, Parkhill et al. 2001), hallazgo determinado durante la secuenciación del genoma del *M. leprae* y posterior comparación con la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole, Brosch et al. 1998) (Cole, Eiglmeier et al. 2001). El análisis bioinformático y la comparación de secuencias estableció la reducción de aproximadamente 2000 genes en *M. leprae* con actividad metabólica y funcional en *M. tuberculosis* (Gomez-Valero, Rocha et al. 2007). El genoma del *M. leprae* está compuesto por 3'268.203 pares de bases (pb), con un total de 1604 genes codificantes de proteínas y 1116 considerados como pseudogenes (Cole, Eiglmeier et al. 2001). Los pseudogenes son altamente expresados en transcritos de RNA y sus niveles de expresión varían durante la etapa de infección del macrófago (Suzuki, Nakata et al. 2006).

M. leprae también posee en su genoma cerca de un 2% de regiones repetitivas dispersas agrupadas en cuatro familias, RLEP con alrededor de 37 copias de repeticiones dispersas, REPLEP con aproximadamente 15 copias y las secuencias LEPREP y LEPRPT con 8 y 5 copias cada una respectivamente (Cole, Supply et al. 2001). Las secuencias repetitivas son componentes comunes en los genomas de organismos eucariotas y procariotas, se encuentran ampliamente distribuidos variando en talla y estructura. En las micobacterias unas de las secuencias inicialmente reportadas han sido las inserciones IS900 en *M. paratuberculosis* (Green, Tizard et al. 1989) e IS6110 en *M. tuberculosis* (Thierry, Brisson-Noel et al. 1990).

En *M. leprae* la primera copia de una secuencia repetitiva fue descrita como un residuo del fragmento digerido por *XhoI-Eco* a 1,6Kb del gen *groE-L* (Grosskinsky, Jacobs et al. 1989) y localizado en la librería genómica presente en el plásmido

lambda gt11 (Thole, Stabel et al. 1990). El ADN de 10 clonas de *M.leprae* fue preparado y analizado mediante digestión con *EcoRI* por Mehra et al. en 1986, siete de estos fragmentos fueron descartados por talla e inserciones idénticas derivadas del gen *groE-L* denominado RLEP 1, quedando tres fragmentos distintos de 1,1, 0,9 y 0,8 Kb de longitud denominados posteriormente como RLEP 2, 3 y 4.

Las secuencias RLEP se distribuyen 28 veces en el cromosoma del *M. leprae*, están constituidas por un segmento central conservado de 545 pb, bordeado a la izquierda en RLEP 1 y 3 por una secuencia variable de 100 nucleótidos y a la derecha en RLEP 1, 3 y 4 por una secuencia de 44 pb. Son elementos repetitivos que se constituyen como marcadores genéticos debido a su abundancia, alto polimorfismo y facilidad para la tipificación.

Las repeticiones en tándem están organizadas como secuencias repetidas de más de un nucleótido, donde los microsatélites corresponden a unidades repetidas que varían de 2 a 6 pb conocidas también como STR (del inglés *Short tandem repeats*), los minisatelites son más extensos en longitud dado que poseen repeticiones de 10 a 100 pb, denominados como VNTR (del inglés *VariableNumber of Tandem Repeats*) (Lupski, Roth et al. 1996). *M. tuberculosis* posee repeticiones de 40 a 100 pb que son utilizadas para genotipificación, estudios filogenéticos y filogeográficos, se encuentran ubicados como regiones dispersas en posiciones intergénicas de su genoma y se conocen como MIRU-VNTR (del inglés *Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit*) (Supply, Lesjean et al. 2001; Sun, Bellamy et al. 2004; Sun, Lee et al. 2004).

En *M. leprae* múltiples secuencias han sido utilizadas para la determinación y diferenciación del bacilo, ARN ribosomal 16S y 23S, *poIA* y *rpoT* (de Wit and Klatser 1994; Fsihi and Cole 1995; Matsuoka, Maeda et al. 2000), pero solo hasta el estudio de la totalidad de los VNTR, se sugiere a las regiones repetitivas como

posibles marcadores de diferenciación entre los aislamientos de *M. leprae*. Kimura y col. en 2009 realizan un análisis de múltiples VNTR mediante la implementación de una PCR *multiplex*, con oligonucleótidos marcados por fluorescencia que son utilizados para que el número de copias de cada repetición sea determinado por el análisis de fragmentos de longitud FLA (del inglés *Fragment Length Analysis*) (Kimura, Sakamuri et al. 2009).

El análisis de variación de único nucleótido también ha permitido la determinación de la diversidad del bacilo, debido a que en 2005 Monot y col. identificaron la existencia de tres SNP (del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) en las posiciones 14.676 (C-T), 1'642.875 (G-T) y 2'935.685 (A-C), que permiten la clasificación del *M. leprae* en 4 diferentes genotipos (Monot, Honore et al. 2005).

Punto de partida para la realización de estudios en búsqueda de la determinación de los genotipos de *M. leprae*, con el objetivo de comprender los mecanismos de diseminación del bacilo entre las personas de los diferentes países llevó a determinar como posible origen de la enfermedad el este de África, con diseminación hacia Europa y Asia por el comercio de esclavos a partir de África Central. En las Américas se propuso la posibilidad de migración de genotipos a través del Estrecho de Bering, pero otros estudios asociados a la determinación de los VNTR deben ser implementados para la identificación de los diferentes genotipos en el sur de América y establecimiento de las posibles rutas de transmisión y diseminación de la enfermedad en el mundo (Monot, Honore et al. 2005; Cardona-Castro, Beltran-Alzate et al. 2009; Cardona-Castro, Beltran-Alzate et al. 2013).

2.3 TRASMISIÓN DE LA ENFERMEDAD DE HANSEN

El contagio y la transmisión de la enfermedad de Hansen entre los humanos posee como mecanismo probable el contacto constante y prolongado con secreciones o partículas aerolizadas portadoras del bacilo procedente de las vías respiratorias y

mucosa nasal de personas enfermas (Noordeen 1994). La proximidad a pacientes enfermos de Hansen y el tiempo de exposición al mismo, es un determinante muy importante de transmisión de la enfermedad, que varía en términos de riesgo, si se está expuesto a un paciente con lepra tuberculoide (LT) o lepra lepromatosa (LL)(Noordeen 1994; van Beers, Hatta et al. 1999).

Otras alternativas probables de contagio han sido sugeridas por autores que han reportado la presencia de ADN de *M. leprae* en la superficie de la piel de personas enfermas, en armadillos o en agua, sugiriendo estos reservorios o ambientes como fuentes probables de infección (Matsuoka, Izumi et al. 1999; Job, Jayakumar et al. 2008; Lavania, Katoch et al. 2008).

2.4 MECANISMO DE PATOGÉNESIS

El *M. leprae* procedente del interior de las partículas aerolizadas por el enfermo de Hansen, ingresa a las vías respiratorias de la persona sana para ser fagocitado por el macrófago alveolar, promueve su fagocitosis celular mediante la interacción de ligandos como el lipoarabinomano y la lipoproteína de 19 KDa con receptores de tipo Toll, receptores de manosa, receptores de proteínas surfactantes o receptores carroñeros presentes en el macrófago, que desencadena tras su ingreso una cascada de segundos mensajeros productores de la activación del factor de transcripción NFκB(Krutzik, Ochoa et al. 2003). Dentro del macrófago *M. leprae* induce sus mecanismos de supervivencia mediante bloqueos del estallido respiratorio, inhibe la unión fagolisosoma, e inhibe la presentación antigénica mediante el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (Moura, de Mattos et al. 2012). Adicionalmente aunque se desconoce su mecanismo, *M. lepra* modula la respuesta inmune Th1 o Th2 produciendo Lepra paucibacilar (PB) y multibacilar (MB) respectivamente.

Una vez presente a nivel periférico, *M. leprae* se adhiere a las células de Schwann usando como ligando la laminina- $\alpha 2$ e invade el sistema nervioso mediante el empleo del receptor α -dístroglican (Rambukkana 2001; Rambukkana, Zanazzi et al. 2002), otras moléculas como la proteína HLP (del inglés Histone Like Protein) y el PGL-1 también generan invasión en el hospedero, mediada por receptores de manosa y proteínas de unión a ligando 21 o CR1-4 y CR3 (Shimoji, Ng et al. 1999; Vidal Pessolani, Marques et al. 2003). Tras la infección el bacilo inicia su proliferación en las células de Schwann dando comienzo al proceso de desmielinización, proceso caracterizado por diferentes postulados que apuntan a múltiples vías productoras de la neuropatía, desde la desmielinización como consecuencia de la exposición del terminal axónico con el bacilo, las interacciones entre la mielina y el PGL-1 o presencia de ligandos en *M. leprae* inductores de desmielinización en ratones inmunodeficientes, pero estos postulados y aproximaciones no son suficientes para concluir como se genera la neuropatía periférica producto de la infección con el *M. leprae*, por lo tanto aún se desconocen aspectos del mecanismo fisio-patológico de la lepra (Rambukkana, Zanazzi et al. 2002).

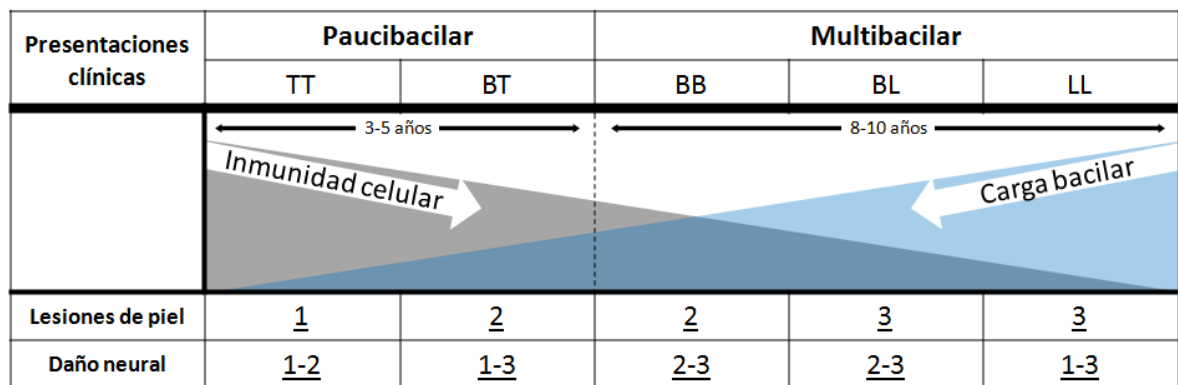
2.5 PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA ENFERMEDAD

Producto de la infección y patogénesis del *M. leprae* se desarrollan dos presentaciones clínicas de la enfermedad, la LT y LL (Ridley and Jopling 1966). La clasificación tuberculoide se ha caracterizado por la observación de una fuerte reacción inmunológica tipo Th1, con predominante producción de citoquinas como el IFN γ , favoreciendo la formación del granuloma y la posibilidad de aparición de un resultado positivo en el Test de Mitsuda o reacción a la lepromina. El enfermo de Hansen clasificado con lepra lepromatosa posee diferentes lesiones en piel, caracterizadas por la presencia de regiones hipopigmentadas y anestésicas, con predominio por alta carga bacilar y respuesta inmunológica de linfocitos tipo Th2, con infiltrado celular T – CD8⁺ y granuloma ausente (Van Voorhis, Kaplan et al.

1982). No obstante la mayoría de personas enfermas están ubicadas en presentaciones intermedias denominadas clasificaciones *Boderline*, reconocidas como grupos definidos según la aproximación a las clasificaciones lepromatosa o tuberculoide.

Por lo tanto una clasificación simplificada con fines de utilidad terapéutica fue establecida por la OMS, diferenciando únicamente dos categorías de la enfermedad, “Multibacilar” y “Paucibacilar”; la presentación MB se caracteriza por numerosas lesiones de piel y una alta carga bacilar, agrupando la presentación LL, borderline lepromatosa (BL) y borderline tuberculoide (BT); la clasificación PB presenta lesiones en piel esporádicas con una baja carga bacilar o indetectable, como LT y borderline tuberculoide (BT) (1982; Britton and Lockwood 2004), ver figura 1.

Figura 1. Clasificación del espectro clínico e immuno-patológico de la lepra.



1: leve, 2: moderado, 3: severo. Ridley y Jopling, 1966

La presentación clínica en la enfermedad de Hansen continúa siendo la estrategia diagnóstica, a pesar de ser una enfermedad infecciosa y la identificación del bacilo se establece como un método de apoyo basado en la visualización de BAAR en moco y linfa, en casos PB la confirmación es deficiente dado que la prueba utilizada requiere un número muy elevado de bacilos (Shepard and McRae 1968),

provocando falsos negativos en personas con clínica inespecífica y sin confirmación microbiológica, casos en los que probablemente se observe la aparición de discapacidad.

La discapacidad en la enfermedad de Hansen está establecida en la Guía de Atención de la Lepra publicada por el Ministerio de la Protección Social bajo tres grados de evaluación 0, 1 y 2, utilizando como indicadores de discapacidad la aparición de hallazgos característicos en ojos, manos o pies, donde: el grado 0 indica ausencia de discapacidad en el enfermo de Hansen, discapacidad grado 1 indica la presencia de anestesia en ojos, manos o pies y discapacidad grado 2 indica la presencia de lesiones en ojo (lagofthalmos, iritis o queratitis, opacidad de la córnea, pérdida de la visión parcial o total), en manos (úlceras y heridas, dedos en garra, reabsorción ósea o parálisis radial) o pies (perforante plantar, reabsorciones o anquilosis de tobillo).

Los casos reportados en 2012 con discapacidad grado 2 debida a la enfermedad de Hansen en el mundo fueron 14.409, motivo por el cual continua la promoción del Plan de Reducción de la Enfermedad 2011-2015 que pretende disminuir el tiempo de diagnóstico para la administración oportuna del tratamiento y consecuentemente la desaparición del grado de discapacidad, disminuyendo a su vez la cadena de transmisión de la enfermedad

2.6 DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad de Hansen establecido por la OMS está determinado por un examen clínico cuidadoso y detallado, en búsqueda de signos o lesiones características de la enfermedad, manchas o marcas hipopigmentadas con la presencia de zonas hipoestésicas, acompañadas de pérdida de la percepción de la temperatura, el dolor y engrosamiento o ensanchamiento del nervio periférico. Otro tipo de pruebas pueden ser implementadas como apoyo

diagnóstico en la enfermedad de Hansen bien sea por visualización del bacilo en la baciloscopia de linfa y moco nasal, el Test de Mitsuda o reacción intradérmica a la lepromina y el examen histopatológico.

El examen por baciloscopia tiene por objetivo la visualización de BAAR mediante microscopia en objetivo a 100x, en muestras procedentes de moco nasal o linfa de los lóbulos de las orejas, codos o lesión mas reciente. El método de visualización del bacilo está basado en la coloración normalizada de ZN y la cuantificación de BAAR según la escala logarítmica de Ridley y Jopling en 1962. Para la cuantificación se calcula el índice bacilar (IB) según la sumatoria de cruces observadas divididas en el número de muestras analizadas, teniendo en cuenta el número de bacilos visualizados en 100 campos usando una escala de 0 a 6 +, donde:

0+: no hay bacilos en 100 campos microscópicos observados.

1+: 1 a 10 bacilos en 100 campos microscópicos observados.

2+: 1 a 10 bacilos en 10 campos microscópicos observados.

3+: 1 a 10 bacilos en cada campo microscópico observado.

4+: 10 a 100 bacilos en cada campo microscópico observado.

5+: 100 a 1000 bacilos en cada campo microscópico observado.

6+: Más de 1000 bacilos en cada campo microscópico observado.

La reacción intradérmica a la lepromina es una prueba inmunológica que evalúa la capacidad de generar una respuesta granulomatosa mayor a 5mm posterior a 3 semanas de la inyección del bacilo no viable, existen 2 diferentes purificados de bacilos obtenidos de leproma humano o de armadillo, denominados tradicionalmente como lepromina H y lepromina A respectivamente. La dificultad obtenida con este tipo de prueba es la ausencia de hallazgos inflamatorios en pacientes con LL y BL por lo tanto serían considerados como falsos negativos a la reacción(Saad, Medeiros et al. 1991).

Otra alternativa de apoyo diagnóstico establecida para la enfermedad de Hansen está basada en la determinación de la respuesta humoral hacia el glicolípido fenólico 1, mediante la cuantificación por el método de ELISA (del inglés *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) que determina anticuerpos IgM específicos contra el antígeno PGL-1, herramienta que resulta muy útil para la clasificación de pacientes lepromatosos o tuberculoides, dado que el paciente lepromatoso presenta altos títulos de anticuerpos (seropositividad del 80-100%) en contraste con el paciente tuberculoides (seropositividad 30-60%) (Buhner-Sekula, van Beers et al. 2008; Moura, Calado et al. 2008; Buhner-Sekula, Illarramendi et al. 2009; Zenha, Ferreira et al. 2009).

Técnicas de biología molecular basadas en *Southern Blot* PCR (del inglés *Polymerase Chain Reaction*) representaron la implementación de nuevas estrategias de identificación de *M. leprae*. El *Southern Blot* permitió la identificación del bacilo en muestras clínicas procedentes de pacientes multibacilares pero no en pacientes paucibacilares, a diferencia de la PCR, una técnica altamente sensible y específica propuesta como alternativa de apoyo diagnóstico para la amplificación de ácidos nucleicos de diferentes blancos moleculares (Woods and Cole 1989). Las primeras aproximaciones realizadas para la enfermedad de Hansen con PCR se basaron en secuencias procedentes de los genes que codifican para las proteínas de 65 kDa, 36 kDa, 18 kDa, así como las secuencias repetitivas RLEP (Plikaytis, Gelber et al. 1990; Kampirapap, Singtham et al. 1998; Donoghue, Holton et al. 2001). Estas reacciones fueron implementadas en muestras clínicas procedentes de linfa, moco nasal, sangre y biopsias de piel pertenecientes a pacientes PB, MB y personal no enfermo, con utilidad en la identificación temprana o determinación subclínica del bacilo de Hansen (de Wit, Douglas et al. 1993; Pattyn, Ursi et al. 1993; Santos, De Miranda et al. 1993).

La implementación de la PCR en la enfermedad de Hansen permitió el análisis de diferentes secuencias sobre el genoma del bacilo (*Donoghue, Holton et al. 2001*;

Kramme, Bretzel et al. 2004; Phetsuksiri, Rudeeaneksin et al. 2006), determinando para algunas de las pruebas, límites de detección de cientos de bacilos hasta menos de un bacilo (0,3) por microlitro (Donoghue, Holton et al. 2001), superior al límite establecido por el método de identificación convencional por baciloscopia, que demostró la identificación de $3,1 \times 10^7$ BAAR/ml (Shepard and McRae 1968). Por lo tanto, la implementación en este trabajo de los métodos moleculares como estrategia de determinación del bacilo, permitió a la población santandereana sospechosa de Hansen acceder a una alternativa de identificación de *M. lepraem* más sensible que los métodos convencionales, con la probable identificación temprana e ingreso a tratamiento de los casos falsos negativos para métodos convencionales antes de la aparición de discapacidad grado 2.

2.7 TRATAMIENTO

El tratamiento de los casos de Hansen ha sido propuesto por la OMS en 1982 como un protocolo de Multi-Drogo-Terapia (MDT), presente en la Guía para Tratamiento de la Lepra, de acuerdo con la clasificación y edad del paciente. En el cual el paciente multibacilar se le debe administrar rifampicina (600mg, mes), clofazimina (300mg, mes y 50mg día) dapsona (100mg día) durante un año y al paciente paucibacilar rifampicina (600mg, mes) y dapsona (100mg día) durante 6 meses. Cuando no sea posible la utilización de clofazimina o dapsona se deben administrar agentes de segunda línea como las fluoroquinonas, ofloxacina, moxifloxacina, pefloxacina, minociclina, macrolido y claritomicina (Britton and Lockwood 2004).

Durante la ocurrencia crónica de la enfermedad y posterior a la culminación de la poliquimioterapia es posible que ocurran reacciones que podrían favorecer el daño eventual del nervio periférico. Se han descrito dos diferentes tipos de reacciones; reacción de tipo 1, conocida como reacción reversa (RR) y reacción de tipo II o eritema nodoso leproso (ENL), la RR ocurre con mayor frecuencia en pacientes

con clasificación de BT, BB y BL, a diferencia del ENL que ocurre frecuentemente en presentaciones clínicas de Hansen tipo BL y LL (Lienhardt and Fine 1994) Aunque estos dos tipos de reacciones raramente requieren de hospitalización, es muy importante determinarlas a tiempo dado que tienden a causar inflamación del nervio periférico como causa de la deformidad irreversible.

La RR se caracteriza por la formación de edema en manos, pies y cara, con la presencia de eritema de las lesiones existentes, aparición de nuevas lesiones de piel, neuritis y pérdida sensitivo-motora. Este tipo de reacción presenta un infiltrado inflamatorio caracterizado por linfocitos T-CD4 y macrófagos diferenciados. El ENL, está caracterizado por la aparición de eritema, la presencia de nódulos subcutáneos en piel aparentemente normal y sintomatología sistémica como fiebre, adenopatías, pérdida de peso, artralgias y edema. Adicionalmente cuenta con la presencia de altos niveles de citoquinas proinflamatorias de tipo TNF- α , IL-6 e IL-1 β (Sarno, Grau et al. 1991; Khanolkar-Young, Rayment et al. 1995).

En la actualidad a pesar del programa de MDT impulsado por la OMS la prevalencia de *M. leprae* nivel mundial se encuentra en 4 casos por cada 100.000 habitantes, considerándose como una enfermedad de interés en salud pública (2013). En Colombia debido a que la prevalencia nacional es inferior a 1 caso por cada 10.000 habitantes, la enfermedad de Hansen es considerada un evento en eliminación, pero 11 departamentos entre ellos Santander demostraron 0,12 a 4,73 casos por cada 100.000 habitantes, por lo tanto existen zonas al interior del territorio nacional como Santander que ameritan el estudio de nuevos factores que pueden estar asociados a la cadena de transmisión y promueven la permanencia de la enfermedad (Cardona-Castro 2013).

2.8 ESTIGMA Y ENFERMEDAD

El diagnóstico de la enfermedad de Hansen induce la aparición de factores que influyen la constitución de estigma en el enfermo, de tal manera que tan solo el uso de la denominación “Lepra” conlleva para el individuo una connotación amenazadora, que desde los años 50 y debido a los esfuerzos llevados a cabo por Stanley Stein se propone el cambio de Lepra por enfermedad de Hansen (John 2013). Esto no solo representó un cambio conceptual en la denominación de la enfermedad sino también la aparición de un conjunto de componentes que modificaron las conductas y actitudes procedentes del enfermo y la sociedad, dependientes del entorno, los conocimientos apropiados sobre la enfermedad y el origen de dichos conocimientos (Ana Esmérica Delisle Griñán 2011) (Hasselblad 1975).

En la enfermedad de Hansen en el estigma se han definido 4 componentes, la aparición de miedos y temores por ser portador de una enfermedad estigmatizada, el establecimiento de condiciones o actitudes que promueven el ostracismo o aislamiento del enfermo, la aparición de signos y síntomas que inducen al ocultamiento de la enfermedad y la generación de posibles estereotipos del enfermo de Hansen o estereotipización (Quiles 2000; Rafferty 2005), donde:

- **Miedos y temores**, determinado por la necesidad de inclusión social y modificado por la sensación de temor al rechazo durante su intento. Estos son evidentes durante el establecimiento de contacto con otro, involucrando como probabilidad la transmisión de su enfermedad (Salvador Álvarez M de J 2002).
- **Ocultamiento**, se define como una expresión conductual guiada hacia la generación de un enmascaramiento y encubrimiento de la enfermedad, evitando dar a conocer atributos físicos típicos del enfermo, precisando la información sin mostrar verdades y sin poner en evidencia el estado

diagnóstico de la enfermedad, cambiándola a denominaciones de enfermedades menos estigmatizantes(Salazar 2001).

- **Ostracismo o aislamiento**, condición que afecta las actitudes del intercambio social del enfermo, por la influencia de la representación social que se da a la enfermedad o por auto identificación, provocando expresiones de desconfianza, depresión y ansiedad que progresivamente generan pérdida o reducción del interés de generar interacción social(Kazeem and Adegun 2011).
- **Estereotipización**, establecido por la presencia o ausencia de signos y síntomas visibles de la enfermedad, se caracteriza por dos estereotipos, el desacreditado que no posee signos visibles pero es un diagnóstico confirmado de Hansen y el desacreditado con signos evidentes.(Romero-Salazar, Parra et al. 1995; Roosta, Black et al. 2013)

Cada uno de estos componentes del estigma juega un papel fundamental en la progresión de la enfermedad, dado que interfieren en la instauración de un tratamiento oportuno, promoviendo la permanencia de la cadena de transmisión y la progresión a la discapacidad grado 2. Las actitudes y el estigma pueden ser modificados mediante la apropiación del conocimiento adecuado y dirigido a la identificación de la enfermedad, por lo tanto las publicaciones basadas en el análisis del estigma promueven la evaluación de sociedades aledañas a enfermos de Hansen y su capacitación como alternativa de intervención social (Ramirez-Soltero 1990; Valera 2006; Ana Esmérida Delisle Griñán 2011; Fundora 2011).

Este trabajo estableció la identificación de bacilo en casos sospechosos de padecer enfermedad de Hansen, mediante la amplificación del fragmento RLEP 3 del ADN de *M. leprae*, usando la estrategia molecular en muestras de interés clínico como linfa, moco nasal y biopsia de piel, mejorando el límite de detección de las pruebas microbiológicas y reduciendo la probabilidad de aparición de casos falsos negativos por identificación convencional. Adicionalmente se estableció por primera vez en Colombia mediante este trabajo de grado los casos que una vez

identificados podrían experimentar actitudes que según su comprensión y conocimiento de la enfermedad favorecerán la presencia de temores, inducidos por las percepciones o estigmas que tenga sobre su enfermedad la población que lo rodea, provocando en ellos un aumento de la probabilidad de aparición de la discapacidad grado 2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

La lepra es considerada como un problema de salud pública y actualmente las estrategias de la OMS están dirigidas al diagnóstico temprano y disminución de la discapacidad, por lo tanto este estudio analiza la enfermedad basado en dos abordajes complementarios, la identificación molecular de *M. leprae* en muestras clínicas usadas como apoyo diagnóstico y el análisis del entorno social, desde el enfermo como papel fundamental para la resorción de la enfermedad o desde la sociedad como estrategia de identificación de la lepra. Por lo tanto para el análisis en este trabajo y cumplimiento de los objetivos se estableció:

3.1 OBJETIVO 1 Y 2

Implementación e identificación de *M. leprae* en muestras de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Hansen.

3.1.1 Diseño del Estudio. Estudio de corte transversal desarrollado en la Zona Metropolitana de Bucaramanga durante los años 2012 y 2013.

3.1.2 Población de Estudio 1. Compuesta por 46 personas sintomáticas de piel consospecha clínica de padecer enfermedad de Hansen que fueron captadas por el “*Mycobacterium*” Laboratorio de Investigación y Extensión adscrito a la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

3.1.3 Tipo de Material Analizado. Por medio del “*Mycobacterium*” Laboratorio de Investigación y Extensión se realizaron campañas de muestreo en el Laboratorio Clínico y en el Laboratorio de Patología de la Universidad Industrial de Santander, se obtuvieron muestras clínicas procedentes de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Hansen correspondientes a linfa de las láminas para

baciloscopia de Hansen, moco nasal obtenido por hisopado y biopsia de piel obtenida por sacabocados. Las muestras que no fueron obtenidas para cada individuo se debieron a que no existió necesidad por identificación por baciloscopia o a la negación del material durante el muestreo por parte del participante.

- 44 láminas para baciloscopia fueron identificadas, marcadas, coloreadas por ZN y leídas en búsqueda de BAAR, las muestras de linfa fueron conservadas para la posterior extracción de ácidos nucleicos e identificación molecular.
- 24 muestras de moco nasalextraído por hisopado fueron obtenidas de los pacientes sospechosos de Hansen y conservadas a -20° C, hasta su posterior extracción de ácidos nucleicos e identificación molecular.
- 28 biopsias de piel embebidas en alcohol al 70 % fueron registradas y almacenadas en congelación a -70° C hasta su posterior maceración, extracción de ácidos nucleicos e identificación de *M. leprae* por pruebas moleculares en el Laboratorio Central de Investigaciones de la UIS.

Un registro de la identificación del paciente, edad, procedencia, clasificación, condición de ingreso, baciloscopia de ingreso, condición de tratamiento durante el estudio, estado de discapacidad y tipo de muestra obtenida, puede ser visualizado en la tabla N° 1.

Tabla N° 1. Registro de hallazgos determinados para la población con sospecha clínica utilizada en la identificación de *M. leprae*.

N°	Edad en años		Municipio	Clasificación según la OMS	Condición de ingreso	Baciloscopia de ingreso	Tratamiento durante el estudio	Grado de discapacidad	Muestra		
	F	M							Baciloscopia	Moco nasal	Biopsia de piel
1	34	SD	Piedecuesta	MB	Nuevo	1	En tratamiento	0	1	SM	SM
2	SD	40	Piedecuesta	MB	Nuevo	1	En tratamiento	0	1	SM	SM
3	SD	56	Mogotes	Multibacilar	Recidiva	0,8	En tratamiento	1	1	SM	1
4	SD	38	Mogotes	Multibacilar	Nuevo	No registró	En tratamiento	0	1	SM	1
5	SD	74	Mogotes	Multibacilar	Nuevo	2,8	En tratamiento	1	1	SM	1
6	SD	73	Cimitarra	Multibacilar	Nuevo	No registró	En tratamiento	1	1	SM	1
7	SD	47	Cimitarra	Multibacilar	Nuevo	2	En tratamiento	0	1	SM	1
8	SD	22	Cimitarra	Multibacilar	Nuevo	2,6	En tratamiento	0	1	SM	
9	SD	50	Cimitarra	Multibacilar	Nuevo	2	En tratamiento	1	1	SM	1
10	40	SD	Cimitarra	Paucibacilar	Contacto	No registró	Apoyo diagnóstico	0	1	SM	SM
11	SD	46	El Carmen	Paucibacilar	Nuevo	0	En tratamiento	2	1	SM	SM
12	SD	84	El Carmen	Paucibacilar	Nuevo	0	En tratamiento	2	1	SM	SM
13	53	SD	El Carmen	Multibacilar	Nuevo	2,2	En tratamiento	0	1	SM	SM
14	56	SD	El Carmen	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	SM	SM
15	SD	75	Barrancabermeja	Multibacilar	Nuevo	0,6	En tratamiento	0	1	SM	SM
16	SD	35	Barrancabermeja	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	SM	SM
17	32	SD	Barrancabermeja	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	SM	SM
18	SD	51	Barrancabermeja	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	SM	SM
19	72	SD	Bucaramanga	Paucibacilar	Nuevo	0	En tratamiento	0	1	1	1
20	SD	40	Piedecuesta	Multibacilar	Nuevo	1	En tratamiento	0	1	1	1

N°	Edad en años		Municipio	Clasificación según la OMS	Condición de ingreso	Baciloscopia de ingreso	Tratamiento durante el estudio	Grado de discapacidad	Muestra		
	F	M							Baciloscopia	Moco nasal	Biopsia de piel
21	SD	NR	Bucaramanga	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	1	1
22	60	SD	Bucaramanga	Paucibacilar	Nuevo	0	En tratamiento	0	1	1	1
23	SD	66	Barrancabermeja	Multibacilar	Nuevo	2,2	En tratamiento	0	1	1	1
24	46	SD	Bucaramanga	Multibacilar	Nuevo	No registró	En tratamiento	0	1	1	1
25	SD	81	Bucaramanga	Multibacilar	Recidiva	2,2	En tratamiento	2	1	1	1
26	67	SD	Girón	No registró	Nuevo	No registró	En tratamiento	0	1	1	1
27	57	SD	Puerto Guiches	Paucibacilar	Nuevo	0	En tratamiento	0	1	1	1
28	69	SD	Floridablanca	Multibacilar	Nuevo	2,4	En tratamiento	0	1	1	1
29	SD	10	Bucaramanga	Multibacilar	Nuevo	0,8	En tratamiento	0	1	1	1
30	SD	60	Bucaramanga	Multibacilar	Nuevo	No registró	En tratamiento	No registró	1	1	1
31	35	SD	Piedecuesta	Multibacilar	Nuevo	1	En tratamiento	0	1	1	1
32	63	SD	Aratocha	Multibacilar	Nuevo	0,2	En tratamiento	0	SM	SM	1
33	SD	66	Ocamonte	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	SM	1
34	SD	37	Ocamonte	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	SM	1
35	SD	43	Ocamonte	Multibacilar	Nuevo	No registró	En tratamiento	1	1	SM	1
36	SD	42	San Gil	Paucibacilar	Contacto	0	Apoyo diagnóstico	0	1	1	1
37	SD	73	Contratación	Multibacilar	Recidiva	No registró	En tratamiento	2	1	1	1
38	SD	51	Contratación	Multibacilar	Nuevo	1,6	En tratamiento	1	1	1	1
39	SD	38	Contratación	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	1	1
40	SD	58	Contratación	Multibacilar	Nuevo	2	En tratamiento	0	1	1	SM
41	SD	68	Contratación	Multibacilar	Nuevo	2,6	En tratamiento	2	1	1	SM
42	SD	18	Contratación	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	1	1	SM
43	60	SD	Contratación	No registró	Nuevo	No registró	No registró	No registró	SM	1	SM
44	SD	38	Girón	No registró	Contacto	0	Apoyo diagnóstico	0	1	1	SM

N°	Edad en años		Municipio	Clasificación según la OMS	Condición de ingreso	Baciloscopia de ingreso	Tratamiento durante el estudio	Grado de discapacidad	Muestra		
	F	M							Baciloscopia	Moco nasal	Biopsia de piel
45	SD	48	Girón	No registró	Contacto	0	Apoyo diagnóstico	0	1	1	SM
46	SD	37	Vereda San Benito-Playon	Paucibacilar	Contacto	0	Apoyo diagnóstico	0	1	1	1

SD: sin dato, NR: no registró, SM: sin muestra.

3.1.4 Extracción de Ácidos Nucléico

3.1.4.1 Linfa Procedente de Lámina Para Baciloscopia de Hansen. Se empleó el protocolo descrito por Van der Zanden AG y col. en 1998 (van der Zanden, Hoentjen et al. 1998) y modificado por Fontes AN y col. en 2012 (Fontes, Gomes et al. 2012), donde se utilizó la adición de 25 µl agua ultra pura a cada una de las muestras fijadas en la lámina para microscopio, posteriormente se retiró el material de la lámina por raspado y se traspasó a un vial que contenía una mezcla en partes iguales de Chelex-100 (SIGMA-Aldrich) al 15%, la mezcla se incubó 30 minutos a 99 °C y se centrifugó a 14.462 g por 10 minutos, el sobrenadante extraído correspondió al ADN que fue almacenado a -20° C hasta que se utilizó para la identificación de *M. leprae* por métodos moleculares.

3.1.4.2 Moco Obtenido por Hisopado Nasal. Se empleó el protocolo de extracción de ácidos nucleicos descrito por Guerrero M I y col. en 2002 (Guerrero, Arias et al. 2002), constituido por la suspensión del hisopo de algodón en 1,5 ml de TRIS-HCl 1mM y la separación en tres viales de 1,5 para su almacenamiento a -20° C hasta su posterior empleo en los métodos de identificación molecular.

3.1.4.3 Biopsia de Piel. Se empleó el protocolo descrito por Van Soolingen (van Soolingen, Hermans et al. 1991) modificado durante la fase de lisis celular y degradación de proteínas, constituida por tres periodos de incubación, 37 °C por 24 horas, 37 °C - 2 horas y 65 °C - 15 minutos, a cada una de estas muestras se les adicionó 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml), 50 µl de lisozima (10mg/ml) y la mezcla de 100 µl de SDS 10% con 10 µl de proteinasa K respectivamente. La fase de separación de componentes fue desarrollada según lo descrito por Van Soolingen en la cual se utiliza CTAB, NaCl, cloroformo y alcohol isoamílico (24:1), la precipitación de ácidos nucleicos fue llevada a cabo mediante el empleo de isopropanol absoluto y etanol al 70%, el ADN extraído fue almacenado a -20° C hasta que se utilizó para la identificación del *M. leprae* por métodos moleculares.

3.1.5 Identificación Molecular del *M. leprae*. Se realizó una PCR anidada basada en la secuencia RLEP 3, usando los iniciadores descritos por Donogue y col. en 2001. Los iniciadores empleados para la amplificación del fragmento inicial de 129 pb fueron LP1 5'-TGCATGTCATGGCCTTGAGG-3' y LP2 5'-CACCGATAACCAGCGGCAGA A -3', las muestras o ADN que no presentaron amplificación para la primera reacción fueron empleadas en la segunda reacción, para ello se utilizaron 2 µl de una dilución 1:400 del amplificado inicial. Los iniciadores utilizados para la amplificación del segundo fragmento de 99 pb fueron, LP3 5'-TGAGGTGTCGGCGTGGTC-3' y LP4 5'-CAGAAATGGTGCAAGGGA-3', los amplificados de cada reacción fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2.5%, 0,5 mg de Bromuro de Etidio y un corrido electroforético de 1 a 2 horas a 90 mV.

Para la reacción se empleó el estuche para Mezcla Maestra de PCR (2x) número de catalogo K0172 presente en el catalogo comercial de *FERMENTAS*, se utilizaron 12.5 µl de mezcla de reacción, 4.5 µl de agua, 0.5 µl de iniciador a 10 µM y 2 µl correspondientes aproximadamente a 40 ng de ADN, el protocolo de amplificación se desarrolló en el equipo BIO RAD utilizando un ciclo inicial a 94°C (2 min), 40 ciclos de 94°C (30 seg), 61°C (45 seg) 72°C (30 seg) y un ciclo de extensión final a 72°C (5 min).

Como control positivo se utilizó el ADN de la cepa Thai-53 y el ADN extraído de Lepromina A, que contenía $4.0 \cdot 10^7$ bacilos por 10 ml producida por el *Schieffelin Institute Of Health – Research & Leprosy Centre*, Karigiri – India, amablemente provistos por el Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Rio de Janeiro Brasil y la Universidad CES, Medellín Colombia, respectivamente. El control negativo de la amplificación fue preparado con agua y todas las muestras en las que se observó un resultado de amplificación negativo fueron evaluadas aumentando la concentración de ADN por reacción y se realizó un control de inhibidores por muestra.

Aquellos fragmentos que fueron negativos para la amplificación por RLEP fueron amplificados para el 16S rRNA, los iniciadores utilizados para tal efecto fueron provistos por E. Tortoli en 2013, las secuencias de los iniciadores para la amplificación del fragmento de 500 pb fueron ET1 5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3' y ET2 5'-AAGAGTTTGATCATGGCTCAG -3', las condiciones de amplificación fueron llevadas a 50 µl de volumen final, constituidos por 5 µl de tampón, 0.2 µl de Taq platinum (5 U/µl), 1 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl de cada iniciador (10 µM), 4 µl de dNTP (2.5 mM) y 31.8 µl de agua, para cada reacción se emplearon 4 µl de ADN. Una vez obtenido el amplificado fue enviado a CORPOGEN, empresa comercial encargada de la secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron alineadas en BLAS nt en la plataforma WEB del NCBI y se seleccionó la secuencia de la cual se obtuvo el mayor porcentaje de similitud e identidad procedente del análisis del 16S rRNA.

3.1.6 Establecimiento de Genotipos. En las muestras de biopsia de piel en que se determinó la presencia de ADN de *M. leprae* mediante RLEP, se implementó un protocolo de genotipificación basado en la variabilidad genética de 3 SNP, que permitan la clasificación del *M. leprae* en 4 genotipos. (Monot, Honore et al. 2005)

Para ello se amplificaron mediante PCR las secuencias de los SNP ubicados en las posiciones 14.676, 1.642.875 y 2.935.685, utilizando como iniciadores para la amplificación de la posición 14.676 el 5'-AATGGAATGCTGGTGAGAGC-3' y 5'-CAATGCATGCTAGCCTTAATGA-3', para el SNP en la posición 1.642.875 el 5'-TGCTAGTTTAACCGAGTACTGCTA-3' y 5'-GTAGTAGTCTTCCAAGTTGTGGTG-3', para el SNP en la posición 2.935.685 el iniciador 5'-ATCTGGTCCGGGTAGGAATC -3' y 5'-ACCGGTGAGCGCACTAAG -5'. Las secuencias, los amplificados y el SNP están ubicados en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2. Secuencias para determinación de genotipos por SNP en *M. leprae*.

ID.	Amplificado de 194 pb de <i>M.leprae</i> TN posición 14528-14721
Secuencia	AATGGAATGCTGGTGAGAGCTTCACGCGGCGTATAGCGACCAGATCCCCCA TCTGAGTGAAGTACGAATTCGTTGAACAGTCTCGTAACCGTGTTCGACGA AGTACTTTATTGTGTTAACAACGCTGCCGGTCTTCTAATGGAGACCTGAGAA TAGACTTTTCCAAGCCTTCATTAAGGCTAGCATGCATTG
ID	Amplificado de 189 pb de <i>M.leprae</i> TN posición 1642737-1642925
Secuencia	TGCTAGTTTAACCGAGTACTGCTAGTTTAACTGGGCGCAGAGGAACAGTTGC AAGGCGGCATGTGCGGCTTCATGGCTCGTCACAAATCCGAGTTTGAATGCG ACCAAACGTA CTTTCTGAATTTTCGGCACGATCGGCCTGCTGGGAGCTGATC ATGCTCGAGGGCACCACTTGAAGACTACTAC
ID	Amplificado de 180pb de <i>M.leprae</i> TN posición 2935537-2935716
Secuencia	ATCTGGTCCGGGTAGGAATCCTTGACCGACTCGGAGAAATTTCTATGCAAGTT TGAGGTACGGTGGTGTGCGGTCTCCATCCAGATTAATCGACTAACGGCGCA TAGATTTTTGCCCGAGCGATACAGAGCTCGATGCCGTTCTTGGCGAGGTAG AAACCGCCCTTAGTGCGCTCACCGGT

Fuente: Monot, Honore et al. 2005

El contenido de la reacción fue llevado a 25 µl de volumen final, constituidos por 2.5 µl de tampón, 0,5 µl de Taq platinum (5 U/µl), 0.75 µl MgCl₂ (50 mM), 0.5 µl de cada iniciador (10 µM), 0.2 µl de dNTP (2.5 mM) y 18,05 µl de agua, para cada reacción se emplearon 2 µl correspondientes aproximadamente a 40 ng/µl de ADN. Las condiciones del programa para la amplificación fueron:denaturación inicial a 94°C (3 min), seguido de 45 ciclos de 94°C (60 seg), 55°C (60 seg), 72°C (120 seg) y un ciclo de extensión final de 72°C (10 min).

El producto de la amplificación para la variación ubicada en la posición 2.935.685 fue digerido utilizando 5 unidades (U) de la enzima de restricción *Bst*UI (5'...CG□CG...3') durante 1 hora a 60°C. La presencia de digestión identificó los genotipos 3 y 4, por lo tanto para su discriminación se amplificó la región de la variación 14.676, su amplificado fue digerido utilizando 5 U de enzima de restricción *Sml*I(5'...C□CTGAG...3') durante 1 hora a 55°C, la presencia de

digestión determinó el genotipo 4 y la ausencia el genotipo 3. La identificación de los genotipos 1 y 2 establecidos por la ausencia de digestión con *BstUI*, se llevó a cabo mediante la secuenciación del amplificado que contenía el polimorfismo en la posición 1.642.875. La electroforesis para visualización de los amplificados y sus digestiones fue en un gel de agarosa al 2.5%, 0.5 mg de Bromuro de Etidio y un corrido electroforético de 1 hora a 90 mV.

3.2 OBJETIVO 3

Estudio de los factores sociales de la población analizada que podrían favorecer la persistencia de la enfermedad en Santander.

3.2.1 Población de Estudio 2 y 3. El análisis de los factores sociales se desarrolló sobre 2 poblaciones denominadas población 2 y 3, constituidas por personal afectado y no afectado por la enfermedad de Hansen.

- Población 2: compuesta por 54 personas previamente diagnosticadas con enfermedad de Hansen y asistentes al centro de apoyo de la Enfermedad en Bucaramanga – Santander.
- Población 3, constituida por 120 personas no enfermas seleccionadas por el método aleatorio simple que han cumplido con los siguientes criterios de inclusión, ser residentes en la Zona Metropolitana de Bucaramanga, no padecer enfermedad de Hansen, no tener parentesco con personas afectadas y haber residido en una comunidad donde se hubiese diagnosticado por lo menos un caso de Hansen.

3.2.2 Tipo de Material Analizado. Para la identificación de los factores sociales que podrían ser determinantes en la permanencia de la enfermedad se diseñó una herramienta de recolección de información aplicada a la población afectada y no afectada por la enfermedad de Hansen, que fue empleada garantizando la

confidencialidad de la información y anonimato del participante, según lo establecido en la Ley Estatutaria 1581 de 2012 de Colombia y Reglamentada Parcialmente por el Decreto Nacional del Congreso Colombiano 1377 de 2013. Cada participante firmó el registro de consentimiento informado y aceptó su participación voluntaria.

El instrumento de recolección de información con su instructivo de diligenciamiento se validó mediante una prueba piloto.

El instrumento empleado en la población no afectada contenía 43 preguntas distribuidas de la siguiente manera:

- 8 preguntas relacionadas con la identificación y caracterización social de los participantes.
- 16 preguntas con el objetivo de evaluar los conocimientos sobre diagnóstico, transmisión, tratamiento de la enfermedad, estableciendo cuatro grupos de conocimiento para el análisis de la información:
 - Grupo A: conoce o ha escuchado la enfermedad llamada lepra.
 - Grupo B: conoce o ha escuchado la enfermedad llamada lepra y además conoce el mecanismo de contagio.
 - Grupo C: conoce o ha escuchado la enfermedad llamada lepra, conoce el mecanismo de contagio y además identifica los primeros síntomas y diagnóstico de la enfermedad.
 - Grupo D: conoce o ha escuchado la enfermedad llamada lepra, conoce el mecanismo de contagio, identifica los primeros síntomas y diagnóstico de la enfermedad y además reconoce la existencia de tratamiento.

La fuente de los conocimientos acerca de la enfermedad se estableció mediante preguntas sobre la adquisición de información a partir de instituciones académicas, medios de comunicación como radio, prensa y televisión, información

recibida voz a voz por parte de terceras personas, lectura de la biblia y la variable de desconocimiento u otros.

- 19 preguntas dirigidas a determinar la presencia de componentes del estigma:
- El temor, en el cual se establecieron dos poblaciones para estudiar los participantes; población temerosa y población no temerosa de contraer la enfermedad.
- El ocultamiento de la enfermedad y establecimiento de condiciones promotoras de ostracismo o aislamiento del enfermo.
- La estereotipización, definida mediante dos imágenes dependientes de la presencia de síntomas visibles en el enfermo, utilizando la palabra “leproso” como la persona diagnosticada sin síntomas visibles con estereotipo desacreditable o la palabra “deforme” como la persona diagnosticada con síntomas visibles y de estereotipo desacreditado. (Hasselblad 1975; Quiles 2000; Salazar 2001)

Figura 2. Instrumento de recolección de información “Población no afectada”

Control de diligenciamiento de la encuesta:		Inicio (hora militar) (hh:mm)		Número de consecutivo de la encuesta	
Fecha de diligenciamiento		Día	Mes	Año	Ciudad de realización de la encuesta:
1	Identificación personal: Nombres:			Apellidos:	
Documento de identidad		C.C.	T.I.	R.C.	P.A.
Fecha de nacimiento		Día	Mes	Año	Género
				Masculino	Femenino
2	Ubicación: Municipio de residencia:			Departamento:	
Cód. municipio		3 Localización:		Cabecera municipal	Centro poblado
				Rural disperso	
Dirección:		Teléfono:		Nombre del centro poblado barrio o vereda:	
3	Estrato	Uno	Dos	Tres	Cuatro
		Cinco	Seis	No sabe	Sin estrato
4	Grupo étnico	Afrocolombiano		Raizal del archipiélago	
				Indígena	ROM o Gitano
		Otro:			
5	Grupos poblacionales	Desmovilizados	Desplazados		Discapacitados
		Campeños		Tribus urbanas	Infancia, adolescencia y juventud
		Otro:			
6	Escolaridad	0°	1°	2°	3°
		4°	5°	6°	7°
		8°	9°	10°	11°
Estudios superiores		Si	No	¿Cuáles?	
		Nivel universitario		Técnico	Tecnólogo
		Profesional		Carrera:	
Nivel de postgrado		Postgrado sin título	Postgrado con título		¿Cuántos años de estudios superiores ha realizado y aprobado
7	Ocupación	Ama de casa	Estudiante	Pensionado	Cesante
		Trabajador		(lo siguiente sólo aplica para esta opción)	
Labor que desempeña:		Término del empleo		Temporal	Fijo
		disponibilidad		Medio tiempo	
Tiempo completo		Salario mensual	No gana dinero	Menos de un mínimo	
				Entre 1 y 2 mínimos	Más de 2 mínimos
8	Estado civil	Soltero	Casado	Divorciado	Unión libre
				Viudo	

Preguntas (conocimiento de enfermedad)												
9	¿Usted conoce o ha oído hablar sobre una enfermedad llamada lepra?										Si	No
10	¿Cómo se enteró?		Alguien le contó	Personal de salud le informó	En la escuela	Universidad	Internet					
	Libros o revistas	Televisión	No lo recuerda	La comunidad	La Biblia	Otro:						
11	¿Usted ha oído hablar de la enfermedad Hansen?										Si	No
12	¿Usted ha oído hablar del mal de Lázaro?										Si	No
13	¿La enfermedad de los intocables?										Si	No
14	¿Con qué otro nombre conoce a la lepra?		Enfermedad de Hansen	Mal de Lázaro	Enfermedad de los intocables							
	No sabe	Otro:										
15	¿Usted sabe cómo se contagian las personas de lepra?*		Por herencia	Por maldición	Por aire	Por tocar enfermos						
	Por agua o alimentos	Por contacto con animales	Por vivir con enfermos	Por falta de higiene	No Sabe	Otra:						
16	¿Qué piensa usted de la lepra?											
17	¿Usted cree que una persona que padezca de lepra se puede curar?										Si	No
18	¿Qué cree usted que está pasando con la lepra en Colombia?		Ya desapareció por completo	Está a punto de desaparecer								
	Falta mucho para que desaparezca	No sabe	Otro:									
19	¿Cuáles de las siguientes palabras relaciona usted con la lepra?*		Pobreza	Hacinamiento	Bajo nivel educativo							
	Aislamiento	Castigo bíblico por malas conductas	Deformidades	Otras:								
20	¿Cómo llama usted a las personas que padecen lepra?		Leprosos	Enfermo de Hansen	No sabe	Otro:						
21	¿Cuáles son los primeros síntomas de la lepra?		Ronchas	Ampollas	Dolor articular	Se le caen pedazos						
	Manchas blancas	Manchas rojas	Úlceras y llagas	Nariz tapada	Hormigueo	Caída de cejas						
	Erupciones	Cara hinchada	No siente una parte de su cuerpo	No sabe	Otros:							
22	¿Qué cree usted se debe hacer con una persona con lesiones que parezcan lepra?*		Llevarla al médico	Llevarla al curandero								
	Aislarla en otro lugar	Esconderla	No sabe	Otra:								
23	¿Qué haría usted si un familiar o usted mismo tiene una lesión que pudiera ser lepra?					Esconderse (esconderlo)						
	Ir al médico (llevarlo al médico)	Ir al curandero (llevarlo al curandero)	No sabe	Otra:								
24	¿Las personas que padecen de lepra mueren por otras causas diferentes a la lepra?										Si	No
Preguntas (estigma de la enfermedad)												
25	¿Visitaría usted la casa de una persona que padezca de lepra?										Si	No
26	¿Invitaría usted a su propia casa a una persona que padezca de lepra?										Si	No
27	¿Compartiría usted vasos, platos y cubiertos con una persona que padezca lepra?										Si	No
28	¿Cocinaría usted en el mismo sitio donde lo hace una persona que padezca de lepra?										Si	No
29	¿Se daría un baño de cuerpo completo en el mismo lugar donde lo hace una persona que padezca de lepra?										Si	No
30	¿Lavaría usted la ropa en el mismo lugar donde lo hace una persona que padezca de lepra?										Si	No
31	¿Comería alimentos cocinados en una casa donde habita una persona que padece de lepra?										Si	No
32	¿Asistiría a un lugar público con personas que padezcan lepra?										Si	No
33	¿Saludaría de mano a una persona que padezca lepra?										Si	No
34	¿Abrazaría, daría besos y/o caricias a una persona que padezca lepra?										Si	No
35	¿Bailaría con una persona que padezca lepra?										Si	No
36	¿Compartiría sitio de trabajo con una persona que padezca lepra?										Si	No
37	¿Compartiría oficina con una persona que padezca de lepra?										Si	No
38	¿Compartiría el taxi con una persona que padezca de lepra?										Si	No
39	¿Asistiría al mismo salón de clases con una persona que padezca lepra?										Si	No
40	¿Tomaría en un autobús el mismo asiento que dejó libre una persona que padezca lepra?										Si	No
41	¿Le preocupa contagiarse si tiene contacto con una persona que padezca lepra?*										Si	No
42	¿Usted considera la lepra una enfermedad como cualquier otra (neumonía, HTA, diabetes, cáncer, etcétera)										Si	No
43	¿Ha oído burlas con respecto a la condición de discapacidad o deformidad de personas afectadas por lepra?										Si	No

El instrumento empleado en la población afectada contenía 145 preguntas distribuidas de la siguiente manera:

- 5 preguntas relacionadas con la identificación y caracterización social de los participantes.
- 15 preguntas con el objetivo de evaluar en el conviviente o familiar del paciente los conocimientos sobre diagnóstico, transmisión, tratamiento de la enfermedad, con el objetivo de establecer los 4 grupos previamente enunciados.

- 57 preguntas dirigidas a determinar la presencia de los componentes del estigma, previamente enunciados.
- 33 preguntas dirigidas al establecimiento de presencia de las barreras de acceso al sistema de salud.
- 35 preguntas que permitían evaluar la presencia de discapacidad en el enfermo de Hansen.

Figura 3. Instrumento de recolección de información “Población afectada”

Control de diligenciamiento de la encuesta:										Inicio (hora militar) (hh:mm)		Número de consecutivo de la encuesta		
Fecha de diligenciamiento		Día	Mes	Año		Ciudad de realización de la encuesta:								
Identificación:		Paciente		Conviviente		¿De qué paciente?		No. consecutivo de paciente						
Nombres:						Apellidos:								
Documento de identidad	C.C.	T.I.	R.C.	P.A.	C.E.	No.								
Municipio de residencia:			Departamento:			Cód. departamento		Cód. municipio						
Fecha de nacimiento		Día	Mes	Año		Género		Masculino		Femenino				
Lugar de nacimiento:						Nacionalidad:								
Municipios de residencia en los últimos 5 años, donde haya vivido mínimo 6 meses:														
Vive solo		Vive acompañado		¿Cuántas personas viven con usted?				¿Cuántas tienen discapacidad?						
¿Tiene personas a cargo?		Si	No	No. de personas mayores de 60 años		No. de personas menores de 12 años								
Grupo étnico		Afrocolombiano		Raizal del archipiélago		Indígena		ROM o Gitano		Otro:				
Grupos poblacionales		Desmovilizados		Desplazados		Discapacitados		Adulto mayor		Mujeres		LGBT		
Campesinos		Tribus urbanas		Infancia, adolescencia y juventud				Otro:						
Afilación al sistema general de seguridad social en salud:				Subsidiado		contributivo		Vinculado		Régimen especial				
No afiliado		No sabe		Nombre de la ARS/EPS o SS:										
Características sociodemográficas:														
1	Escolaridad		0°	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°
Colegio:				Universidad:				Carrera:						
Completo		Incompleto		Estudios en curso		Estudios suspendidos		No. de semestres cursados						
2	Ocupación		Ama de casa		Estudiante		Cesante		Pensionado		Trabajador (lo siguiente sólo aplica para esta opción)			
Labor que desempeña:						Horario (hora militar)		Desde:		Hasta:				
Salario mensual:			No gana dinero		Menos de un mínimo		Entre uno y dos mínimos		Más de dos mínimos					
Zona de trabajo:		Rural	Urbano		Término del empleo:		Temporal	Fijo	Paga ARP		Si	No		
3	Estado civil		soltero			Casado		Divorciado		Unión libre		Viudo		
4	Ayudas económicas		Subsidio del estado		Pensión		Ayuda de familiares		Ayuda de otros:					
5	Vivienda:		Casa	Apartamento		Cuarto en inquilinato		Cuarto en otro tipo de estructura		Institución Pública				
Institución Privada		Vivienda Indígena		Otro tipo de vivienda:										
¿Cómo tiene la vivienda?		Arriendo		Propia y la está pagando		Propia totalmente pagada		Un familiar si pagar arriendo						
Un tercero sin pagar arriendo		Otra:												
Localización:		Cabecera Municipal		Centro poblado		Rural disperso		Dirección:						
Nombre del centro poblado, barrio o vereda:														

Materiales/ Componentes	PC	TB	TZ	Ladrillo	Lata	Plástico	Baldosa	Cemento	Madera	Tierra	Tela	Otro (especifique)					
Techo																	
Paredes																	
Divisiones Int.																	
Pisos																	
¿Cuentan con los siguientes servicios?				Luz eléctrica		Gas natural		Acueducto		Alcantarillado		Recolección de basuras					
Teléfono fijo		Internet		Televisión		Otro:											
¿Con qué cocinan en su casa?		Gas		Leña		Carbón		Gasolina		Otro:							
¿Cuántos grupos de personas (familias) que residen en otras viviendas cocinan sus alimentos en el mismo lugar donde lo hace usted?																	
¿De dónde sacan el agua?		Acueducto		Aljibe		Rio		Lluvia		Pila pública		Carrotanque	Otro:				
¿Hierven el agua para el consumo humano?		Si		No		¿Almacenan el agua para el consumo humano?		Si		No							
No. De veces en el año que lavan el recipiente de almacenamiento de agua para el consumo humano																	
Eliminación de aguas negras:		Alcantarillado		Pozo séptico		Arrojan al rio		Otra:									
Eliminación de basuras:		Pasan a recogerlas		Las queman		Las arrojan al rio		Las entierran		Otra:							
¿Hay animales domésticos?		Si		No		¿Cuáles?(cuantifique)											
Lugar de mayor permanencia del animal en la casa:								Tiempo de permanencia en promedio (horas)									
¿Presencia de plagas?		Roedores		Cucarachas		Murciélagos		Moscas		Ninguna		Otras:					
¿Cuántas veces en la semana hacen aseo en la casa?						Productos de limpieza usados:		Agua y jabón		Solventes (barsol)							
Límpido		Líquido para pisos		Abrasivos		Otros:											
Espacios individuales en la casa (cuantifique)		Sala-comedor		Cocina		Baño		Patio		cuartos							
No. De divisiones Internas		No. De ventanas		No. De puertas al exterior		No. De pisos o plantas											
No. Veces al día que abren las ventanas		No. Veces al día que abren las puertas		Tiempo promedio que duran abiertas (horas)													
Presencia de olores desagradables **		si		No		Áreas verdes		Si		No		Estrato de la vivienda (0-6)					
Dimensión de área construida (mts²)						Dimensión de área no construida (mts²)											
El sector donde vive cuenta con:		Alumbrado público		Andenes peatonales		Canecas de basura		Áreas de recreación									
Preguntas (Conviviente) (conocimiento de enfermedad)																	
6	¿Usted conoce o ha oído hablar sobre una enfermedad llamada lepra?											Si	No				
7	¿De qué forma la conoció?		Alguien le contó	Personal de salud le dijo	Escuela	Universidad	Internet										
Libros o revistas													Telesión	No lo recuerda	Comunidad	Otro:	
8	¿Usted ha oído hablar de la enfermedad Hansen?											Si	No				
9	¿Usted ha oído hablar del mal de Lázaro?											Si	No				
10	¿La enfermedad de los intocables?											Si	No				
11	¿Con qué otro nombre conoce a la lepra?		Enfermedad de Hansen	Mal de Lázaro	Enfermedad de los intocables												
No sabe													Otro:				
12	¿Usted sabe cómo se contagian las personas de lepra?*		Por herencia	Por maldición	Por aire	Por tocar enfermos											
Por agua o alimentos													Por contacto con animales	Por vivir con enfermos	Por falta de higiene	No Sabe	Otra:
13	¿Qué piensa usted de la lepra?																
14	¿Usted sabe si la lepra tiene cura?											Si	No				
15	¿Tiene dentro de sus conocidos alguien enfermo de lepra?											Si	No				
16	¿Qué es esa persona para usted?		Familiar	Amigo	Compañero de trabajo	Conocido	Vecino	Otro:									
17	¿Vive con alguien que tenga lepra?											Si	No				
18	¿Le preocupa contagiarse de lepra?											Si	No				
19	¿Cuáles son los primeros síntomas de la lepra?		Ronchas	Ampollas	Dolor articular	Se le caen pedazos											
Manchas blancas													Manchas rojas	Úlceras y llagas	Nariz tapada	Hormigueo	Caída de cejas
Erupciones													Cara hinchada	No siente partes del cuerpo	No sabe	Otros:	
20	¿Qué cree usted se debe hacer con una persona que padezca de lepra?*		Llevarlo al médico	Llevarlo al curandero													
Aislarla en otro lugar													Esconderla	No sabe	Otra:		
Preguntas (Paciente)																	
21	¿Usted sabe si tiene lepra?											Si	No				
22	¿Convive con personas con parentesco familiar?											Si	No				
23	Estado civil		Soltero	Casado	Divorciado	Unión libre	Viudo										
24	¿Con quién convive?		Esposo(a)	Hijos	padres	Hermanos	Tíos	Abuelo(a)	Otros:								
25	¿Quién sabe de su enfermedad?		Esposo(a)	Hijos	Hermanos	Tíos	Abuelo(a)	Nadie	Otro:								
26	Número de hijos:		Masculino	Femenino	Total												
27	Número de personas que dependen del paciente afectado por lepra		Masculino	Femenino	Total												
28	¿Su familia lava la ropa en otra parte diferente a donde la lava usted?											Si	No				
29	¿Su familia se sienta a comer con usted?											Si	No				
30	¿Su familia comparte cubiertos con usted?											Si	No				
31	¿Alguien de su familia lo acompaña a los controles?											Si	No				
32	¿Recibe motivación por parte de su familia?											Si	No				
33	¿Le preocupa que su familia se contagie de lepra?											Si	No				
34	¿Tiene pareja sentimental?											Si	No				
35	¿Su pareja sabe que usted padece de lepra?											Si	No				
36	¿Usted y su pareja comparten la cama?											Si	No				
37	¿Cuántas personas duermen con usted en el mismo cuarto o recinto?																
38	Usted duerme en el mismo cuarto o con:		Esposo(a)	Hijo(s)	Hermano(s)	Abuelo(a)	Otro(s)										
39	¿Su pareja comparte con usted toallas cobijas y almohadas?											Si	No				

40	¿Son menos frecuentes las caricias abrazos y besos entre usted y su pareja desde que se entero que usted tiene lepra?					Si		No															
41	¿En su localidad saben que usted tiene lepra?					Si		No															
42	¿Sus vecinos lo invitan a usted a la casa?					Si		No															
43	¿Sus vecinos entran a su casa?					Si		No															
44	Actividades en las participa:					Con la familia			Con amigos			Con la comunidad			Deportivas o de recreación								
	Productivas			Culturales			Religiosas			Educación no formal			Políticas			Ninguna			Otras:				
45	¿Usted participa activamente en la junta de acción comunal de su barrio o vereda?					Si		No															
46	Usted pertenece o está incluido en:					Grupos de autoayuda			Redes sociales			Asociaciones para pacientes afectados por lepra											
	Ninguno			Otras:																			
47	¿Le gustaría ser integrante de algún grupo o asociación?					Si		No	Cual:														
48	¿Participa en las celebraciones organizadas en su comunidad?					Si		No															
49	¿Le preocupa que otros que no conozcan de su enfermedad se enteren de ello?					Si		No															
50	¿Su grupo de amigos sabe que usted está enfermo de lepra?					Si		No															
51	¿Juega algún deporte con sus amigos?					Si		No															
52	¿Sus amigos evitan el contacto físico con usted?					Si		No															
53	¿Alguno de sus amigos visita su casa?					Si		No															
54	¿Usted va a casa de sus amigos?					Si		No															
55	¿Actualmente desempeña alguna ocupación?					Si		No															
56	¿En donde trabaja o estudia saben que usted tiene lepra?					Si		No															
57	¿Se ha ausentado de su trabajo o de sus estudios?					Si		No															
58	¿Si usted trabaja, que sucedió cuando su jefe supo que usted tenía lepra?					Lo despidieron			Conservó su trabajo														
	Conservó su trabajo por un tiempo y luego lo despidieron								No aplica														
59	¿Sus compañeros de trabajo o estudio evitan el contacto físico con usted?					Si		No															
60	¿Comenta a los demás que padece de lepra?					Si		No															
61	¿Por qué no comenta a los demás sobre su enfermedad?																						
62	¿Cambia u omite información sobre su enfermedad a los demás?					Si		No	¿Cuál?														
63	¿Oculta alguna(s) parte(s) de su cuerpo a los demás? **					Si		No															
64	¿Qué parte(s) oculta?					Mano(s)			Brazo(s)			Pie(s)			Cara			Otra:					
65	¿Se siente débil físicamente?					Si		No															
66	¿Se ha sentido poco útil frente a los demás?					Si		No															
67	¿Usted se cohíbe de hacer algunas cosas?					Si		No	¿Cuáles?														
68	¿Le han dicho que se ha vuelto una persona de mal genio?					Si		No															
69	¿Siente que usted se ha vuelto una persona de mal genio?					Si		No															
70	¿Le han dicho que se ha vuelto desconfiado?					Si		No															
71	¿Siente usted que se ha vuelto desconfiado?					Si		No															
72	¿Normalmente como se siente? *					Alegre			Nervioso			Triste			Enfermo			¿Por qué?					
73	¿Usted tiene contacto físico cercano con las demás personas? (Abrazos, besos, caricias)					Si		No															
74	¿Le preocupa contagiar de lepra a las personas que tengan contacto con usted?					Si		No															
75	¿Visita sitios públicos después de que supo que tiene lepra?					Si		No															
76	¿Le preocupa de que por su condición de enfermo de lepra lo saquen de un sitio público?					Si		No															
77	¿Qué dicen las demás personas de su enfermedad? ***																						
Preguntas (barreras de acceso)(salud)																							
78	¿Quién le dijo a usted que tiene lepra?					Médico			Enfermera			Bacteriólogo			Otro:								
79	¿Hace cuanto sabe que tiene lepra?(años)																						
	Fecha del diagnóstico		Día		Mes		Año		Inicio de la sintomatología		Día		Mes		Año								
80	¿Actualmente está recibiendo tratamiento para lepra?					Si		No															
81	Duración del tratamiento					6 meses			12 meses (1año)			24 meses (2 años)			Más de 24 meses (2años)								
82	¿Sabe y comprende la forma de tomar el medicamento?					Si		No															
83	¿Se toma el tratamiento según las indicaciones?					Si		No															
84	¿Se siente bien tomando el medicamento?					Si		No															
85	¿Es oportuna la entrega de medicamentos por parte de la institución de salud?					Si		No															
86	¿Asiste usted a los controles en la institución de salud?					Si		No															
87	¿Cada cuanto asiste usted a los controles en la institución de salud?(días)																						
88	Ha recibido apoyo de:					Trabajadora social			Psicólogo			Fisioterapia			Enfermera			Auxiliar			Médico		
	Comunidad religiosa			Ninguno			Otro:																
89	¿Cómo se llama la institución a la cual usted acude a los controles?																						
90	¿Quién le realiza los controles?					Médico general			Dermatólogo			Enfermera			Otro:								
91	¿Cuánto tiempo pasó desde que usted consulto por primera vez, hasta que le dijeron que tenía lepra?(días)																						
92	¿Siente usted que es mucho tiempo?					Si		No															
93	¿Cuánto tiempo pasó desde que usted consulto por primera vez, hasta que empezó el tratamiento para lepra?(días)																						
94	¿Siente usted que es mucho tiempo?					Si		No															

95	¿Qué vías de acceso existen para llegar al lugar donde asiste a sus controles?	Fluvial	Marítima	Aérea	Férrea		
	Terrestre (¿Cuál?)	Carreteras primarias	Carreteras secundarias	Carreteras terciarias	Afirmadas	Pavimentadas	
	Terreno plano	Terreno ondulado	Terreno montañoso	Terreno escarpado			
96	¿Cómo calificaría el estado de las vías de acceso a dicho lugar?	Buena	Regular	Mala	Muy mala		
97	¿Cuánto se gasta en promedio para llegar al lugar donde asiste a sus controles?(horas)						
98	¿Siente usted que es mucho tiempo?				Si	No	
99	¿Ha recibido algún tipo de capacitación sobre lepra?				Si	No	
100	¿Quién realizó la capacitación?	Médico	Enfermera	Bacteriólogo	Auxiliar	Otro:	
101	¿De qué tema(s) le hablaron en la capacitación?						
102	¿Qué miembros de su familia han recibido capacitación?						
103	¿Tiene alguna pregunta sobre su enfermedad?	Si	No	¿Cuál?			
104	¿Alguien de su familia lo han examinado para descartarle la enfermedad?	Si	No				
105	¿Alguien más en su familia le han diagnosticado la enfermedad?	Si	No				
106	¿Cuántas personas que conviven con usted les han diagnosticado la enfermedad?						
107	¿Hace cuanto fue la última vez que acudió al médico? (Días)						
108	¿Le gustaría tener consejería sobre VIH?	Si	No				
109	¿Le gustaría saber si tiene VIH?	Si	No				
110	¿Le gustaría practicarse la prueba para VIH?	Si	No				
Preguntas (evaluación de discapacidad)							
111	Por su enfermedad tiene alteraciones permanentes en:	Sistema nervioso	Ojos	Oídos	Piel	Manos	
	Pies	Genitales y sistema reproductivo	Ninguna (pase a la 109)	Otra:			
112	¿En qué actividades de la vida cotidiana presenta dificultades permanentes?	Retener o expulsar orina	Tener hijos				
	Tener relaciones sexuales	Percibir la luz	Distinguir objetos o personas aún usando gafas	Caminar, correr o saltar			
	Mantener piel uñas y cabello sanos	Relacionarse con las demás personas	Utilizar, llevar mover objetos con las manos				
	Alimentarse asearse y vestirse por sí mismo	Ninguna	Otra:				
113	¿En su casa o en su comunidad hay personas que tienen actitudes negativas que le impiden llevar su actividad diaria con autonomía?						
	Familiares	Amigos o compañeros	Vecinos	Funcionarios	Nadie	Otras:	
114	¿Ha tenido problemas con sus ojos? (recientes o pasados)				Si	No	
115	¿Usted tiene ojos rojos, rasquiña o dolor en los ojos?				Si	No	
116	¿Usted tiene dificultad para pestañear o cerrar los ojos?				Si	No	
117	¿Usted tiene limitaciones visuales?				Si	No	
118	¿Usted tiene cicatrices en sus ojos o heridas permanentes?*				Si	No	
119	¿Algún dato adicional sobre problemas en sus ojos?						
120	¿Ha tenido problemas en sus manos o en sus dedos?				Si	No	
121	¿Usted tiene problemas de sensación en sus manos o sus dedos?				Si	No	
122	¿Qué alteraciones tiene?	Adormecimiento	Pérdida de la sensibilidad	Piquiña	Hormigueo	Otra:	
123	¿Usted tiene disminución de la fuerza en sus manos o en sus dedos?				Si	No	
124	¿Usted tiene rigidez en las articulaciones de sus manos o de sus dedos?				Si	No	
125	¿Usted tiene heridas o ampollas en sus manos o en sus dedos?				Si	No	
126	¿Usted tiene enrojecimiento, dolor, calor, o hinchazón en sus manos o en sus dedos?				Si	No	
127	¿Lo han operado de sus manos o de sus dedos?				Si	No	
128	¿Tiene acortamiento de los dedos de la mano?*				Si	No	
129	¿Usted siente que le hace falta alguna parte de sus manos o sus dedos?				Si	No	
130	¿Algún dato adicional sobre problemas en sus manos o en sus dedos?						
131	¿Ha tenido problemas en sus pies?				Si	No	
132	¿Usted tiene problemas de sensación en sus pies en los dedos de sus pies?				Si	No	
133	¿Qué alteraciones tiene?	Adormecimiento	Pérdida de la sensibilidad	Piquiña	Hormigueo	Otra:	
134	¿Usted tiene disminución de la fuerza en sus pies o en los dedos de sus pies?				Si	No	
135	¿Usted tiene rigidez en las articulaciones de sus pies o de los dedos de sus pies?				Si	No	
136	¿Usted tiene grietas en la piel de sus pies o de los dedos de sus pies?				Si	No	
137	¿Usted tiene seca la piel de sus pies o de los dedos de sus pies?				Si	No	
138	¿Usted tiene enrojecimiento, dolor, calor, o hinchazón en sus pies o en los dedos de sus pies?				Si	No	
139	¿Usted tiene heridas o ampollas en sus pies o en los dedos de sus pies?				Si	No	
140	¿Usted tiene callo en sus pies o en los dedos de sus pies?				Si	No	
141	¿Lo han operado de sus pies o de los dedos de sus pies?				Si	No	
142	¿Usted tiene acortamiento de los dedos de los pies?*				Si	No	
143	¿Usted siente que le hace falta alguna parte de sus pies o de los dedos de sus pies?				Si	No	
144	¿Usted usa zapatos hechos por encargo o zapatos especiales?				Si	No	
145	¿Sus pies están siendo tratados o regularmente revisados por un médico?				Si	No	

3.3 ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó mediante la herramienta de cálculo guiado por ordenador “Excel 2007” presente en la licencia de la Universidad Industrial de Santander ofrecido por Microsoft Office 2007.

4. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Estudio aprobado por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander garantizando la confidencialidad de la información y anonimato del participante, según lo establecido en la Ley Estatutaria 1581 de 2012 de Colombia y Reglamentada Parcialmente por el Decreto Nacional del Congreso Colombiano 1377 de 2013. Cada participante firmó el registro de consentimiento informado y aceptó su participación voluntaria en el estudio.

Las muestras aquí utilizadas son rutinarias para el diagnóstico de Hansen en la Guía de Atención de la Lepra y no representaron una molestia mayor para el participante. El personal investigador contó con el equipo de protección personal, afiliación a una aseguradora de riesgos profesionales (ARP) y el cubrimiento en salud por parte de una Entidad Promotora de Salud. El “*Mycobacterium*” Laboratorio de Investigación y Extensión adscrito a la Escuela de Bacteriología y Laboratorio Clínico y el Laboratorio Central de Investigaciones de la Universidad Industrial de Santander, lugares en los que se realizaron los procedimientos respectivos, cuentan con la infraestructura requerida para garantizar la bioseguridad y biocontención del microorganismo.

5. RESULTADOS

La población seleccionada para el análisis de identificación es la población número 1, está compuesta por 44 participantes procedentes de 14 municipios de Santander, con mayor concentración de casos en los municipios de Bucaramanga y Contratación, un análisis del número de casos, edad promedio y porcentajes según género, clasificación y discapacidad puede ser observado en la tabla N° 3.

Tabla N° 3. Características sociodemográficas de la población con sospecha clínica de enfermedad de Hansen “población 1”.

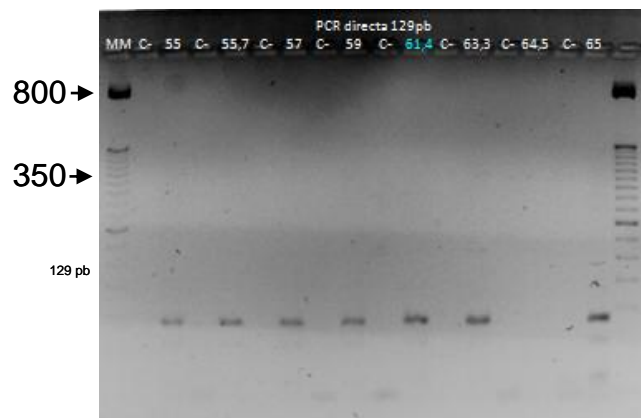
Total de individuos (44)	Número de Individuos por procedencia														Edad promedio	% por género		% según clasificación al ingreso			% según ingreso		% de muestras obtenidas					
Característica Socio-demográfica	Bucaramanga	Floridablanca	Piedecuesta	Girón	Barrancabermeja	Contratación	El Carmen	Ocamonte	Aratoca	Cimitarra	Playón	Puerto Wiches	San Gil	Mogotes	Femenino	Masculino	Femenino	Masculino	No registró	Paucibacilar	Multibacilar	Grado 1 y 2	Nuevo	Contacto	Recidiva	Baciloscopia	Moco	Biopsia
Individuos	7	1	2	3	5	7	4	3	1	5	1	1	1	3	53	50	30	70	30	18	52	25	82	11	7	100	55	64

5.1 ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL *M. leprae*.

Objetivo cumplido número 1: implementación de una metodología de identificación molecular de *M. leprae* en muestras de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Hansen.

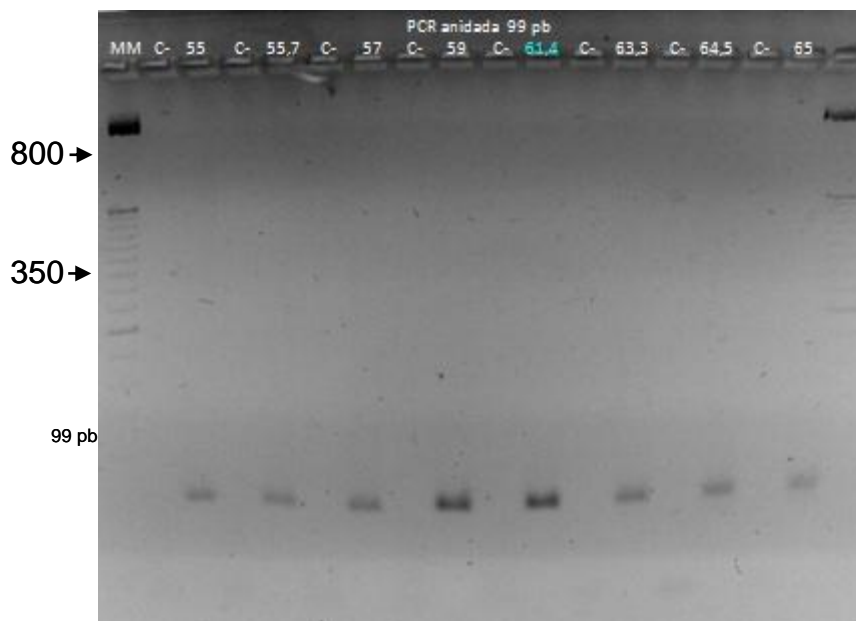
Para la implementación de la metodología molecular de identificación se estandarizó un protocolo de identificación basado en la reacción y los iniciadores propuestos por Donogue y col. en 2001, pero usando como reactivos para PCR el estuche comercial de *FERMENTASPCR* mezcla maestra (2x), donde la enzima, el cloruro de magnesio, el tampón de reacción estaban incluidos en una mezcla maestra de reacción. El proceso de estandarización se inició según las condiciones del fabricante con un volumen de 50 µl por reacción y se optimizó hasta un volumen de 20 µl, en el que se usaron 12,5 µl de mezcla maestra, 4.5 µl de agua, 0.5 µl de iniciador y 2 µl ADN por muestra. El protocolo de amplificación fue modificado variando la temperatura de anillamiento de los iniciadores mediante el empleo de un gradiente de temperatura de 55°C a 65°C para la PCR directa y la anidada, se estableció como protocolo de reacción un ciclo inicial a 94°C (2 min), 40 ciclos de 94°C (30 seg), 61°C (45 seg) 72°C (30 seg) y un ciclo de extensión final a 72°C (5 min). El amplificado fue visualizado en un gel de agarosa al 2,5 % durante 1 hora a 90 mV. figura N° 4 y 5.

Figura N° 4. Gradiente de temperatura de anillamiento para PCR directa.



C-: control negativo (Agua). MM: marcador de peso (50 pb).

Figura N° 5. Gradiente de temperatura de anillamiento para PCR anidada.

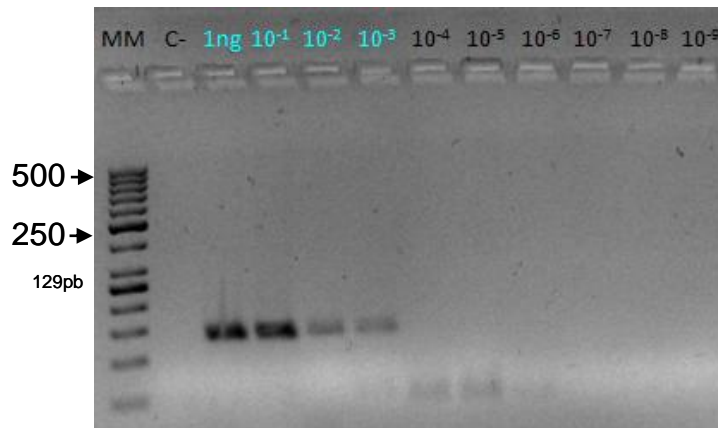


C-: control negativo (Agua). MM: marcador de peso (50 pb).

Para cada una de las reacciones se estableció el límite de detección mediante la realización de diluciones seriadas de 1 ng de ADN control perteneciente a la cepa de *M. leprae* Thai-53. En la PCR directa se determinó un amplificado positivo a la

dilución correspondiente a 1×10^{-3} ng, equivalente a 1 picogramo de ADN de *M. leprae* que representa un total de 312 bacilos aproximadamente.

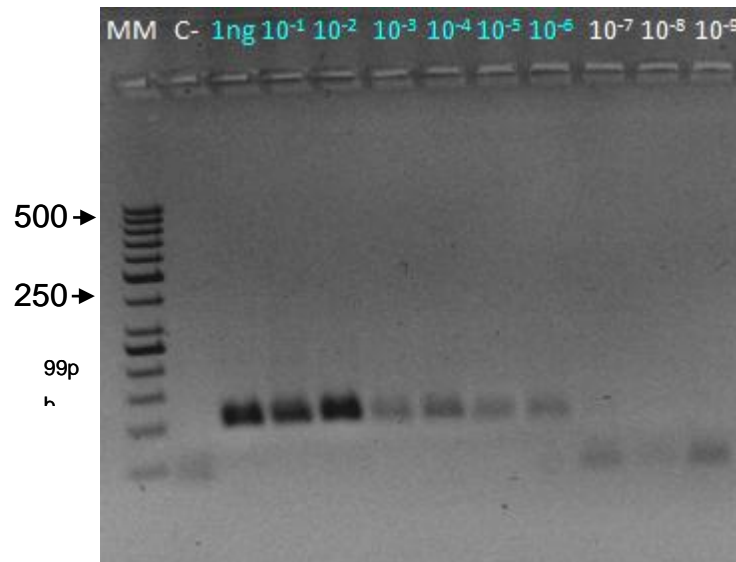
Figura N° 6. Límite de detección para PCR directa.



C-: control negativo (Agua). MM: marcador de peso (50 pb).

En la PCR anidada se determinó un amplificado positivo en la dilución correspondiente a $1 \text{ ng} * 10^{-6}$, equivalente a 1 femtogramo de ADN de *M. leprae* que representa menos de un bacilo es decir 0,3 bacilos.

Figura N° 7. Límite de detección para PCR anidada.



C-: control negativo (Agua). MM: marcador de peso (50 pb)

5.2 ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE IDENTIFICACIÓN MOLECULAR BASADOS EN LA POBLACIÓN DE ESTUDIO NÚMERO 1.

Objetivo cumplido número 2: identificación molecular del *M. leprae* en muestras provenientes de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Hansen.

La metodología de identificación molecular estuvo dirigida hacia la búsqueda del bacilo en muestras presentes en la Guía de Atención de la Lepra, perteneciente a las guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en salud pública. Una vez se estableció la muestra de interés, se preguntó al paciente sospechoso de Hansen si aceptaba voluntariamente su participación en el estudio, mediante su aceptación del consentimiento informado y la toma de muestras de linfa para baciloscopia de Hansen, moco nasal por hisopado y biopsia de piel. Se obtuvieron un total de 44 láminas para baciloscopia de Hansen, 24 mocos nasales por hisopado y 28 biopsias de piel.

Las muestras fueron sometidas a análisis de identificación de *M. leprae*, mediante la amplificación de las secuencias RLEP por el empleo de la técnica de PCR anidada, que consta de una primera reacción denominada PCR directa que amplifica un fragmento inicial de 129 pb, seguidos de una segunda reacción denominada PCR anidada que amplifica un fragmento de 99 pb y usa como DNA el producto de la reacción directa diluido 1:400.

5.2.1 Análisis de Identificación Basados en la PCR Directa

5.2.1.1 Muestras de Linfa Extraídas a Partir de Láminas Para Baciloscopia.

Las láminas obtenidas fueron coloreadas por ZN y leídas según la escala logarítmica de Ridley y Jopling en 1962, las muestras presentes en cada lámina correspondieron a moco nasal, linfa de lóbulo de oreja izquierda (LLI), linfa de lóbulo de la oreja derecha (LLD), linfa de codo izquierdo (LCI) y linfa de codo derecho (LCD).

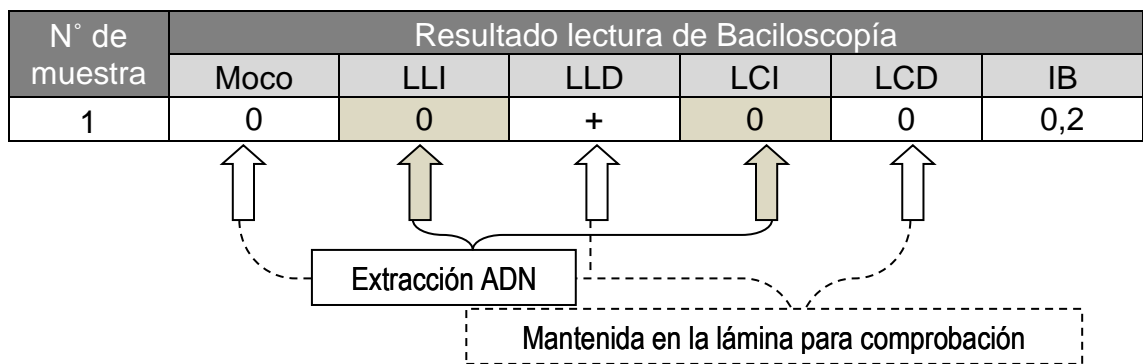
La lectura de cada una de las láminas permitió establecer que 20/44 presentaron un IB = 0, en un total de 21/44 se observó un IB entre 0,1 y 1,0 y tan solo en 3/44 muestras analizadas se identificó un IB superior a 1 pero no superior a 3. Por lo tanto en el 45 % de los participantes que poseían lámina para ZN se obtuvo un IB = 0, clasificados como casos PB, donde los hallazgos clínicos terminan siendo la única alternativa de identificación de la enfermedad, que ante la sospecha de un caso con clínica inespecífica no confirmado por la presencia de BAAR, podría corresponder a un caso falso negativo para Hansen.

El número de bacilos encontrados por muestra en 21/44, estuvo en promedio en 1 a 10 bacilos por 100 campos, correspondiente a los casos con IB entre 0,1 y 1,0. Ahora bien si para garantizar una buena lectura de cada una de las baciloscopias en este estudio no se leyeron estrictamente 100 campos, sino un mayor número de campos correspondientes a la totalidad de la muestra presente

en la lámina, la probabilidad de encontrar un bacilo (correspondiente a IB = 0,2) sería menor durante la lectura convencional llevada a cabo en tan solo 100 campos, reduciéndose aun más la capacidad de confirmar la enfermedad. Ver tabla N° 4.

Para cada una de las láminas se realizó extracción de ácidos nucleicos teniendo en cuenta las siguientes especificaciones: personas con dos láminas obtenidas en mismo momento, una de ellas fue utilizada para lectura y la otra se utilizó para extracción de ácidos nucleicos: personas con una lámina se utilizó para lectura por ZN, posteriormente se seleccionó 2 de las cuatro muestras de linfa en la lámina para la realización de extracción de ácidos nucleicos, garantizando que la identificación de los BAAR se mantuviera en por lo menos una de las muestras visualizadas por lámina, para su posterior comprobación. Ver figura N° 8.

Figura N° 8. Selección de muestra para extracción de ADN de baciloscopia.



Color gris: muestra usada para extracción de ADN. 0: ausencia de BAAR.

Tabla N° 4. Identificación molecular en muestras de baciloscopia para Hansen

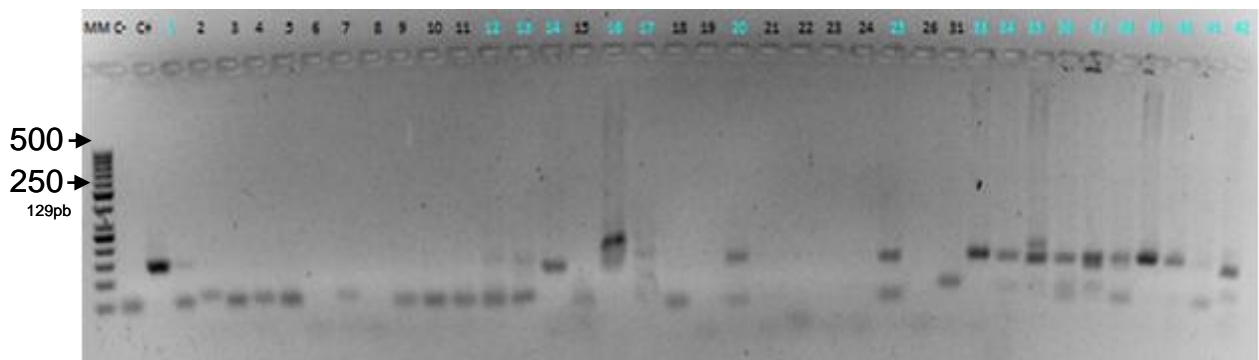
N° de muestra	Resultado lectura de Baciloscopia						RLEP	
	Moco	LLI	LLD	LCI	LCD	IB	Directa	Anidada
1	0	++	+	+	++	1,2	Positivo	Positivo
2	0	+	+	+	+	0,8	Negativo	Negativo
3	0	0	0	0	0	0	Negativo	Positivo
4	0	0	0	0	+	0,2	Negativo	Positivo
5	0	0	+	0	+	0,4	Negativo	Negativo
6	0	0	+	0	+	0,4	Negativo	Negativo
7	+	0	0	0	+++	0,8	Negativo	Negativo
8	0	0	0	0	0	0	Negativo	Positivo
9	0	+++	+	0	+	1	Negativo	Negativo
10	0	0	0	0	0	0	Negativo	Positivo
11	0	+++	0	0	0	0,6	Negativo	Negativo
12	+	0	0	0	0	0,2	Positivo	Positivo
13	0	+	+	0	0	0,4	Positivo	Positivo
14	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
15	0	+	0	0	0	0,2	Negativo	Negativo
16	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
17	+	0	0	0	0	0,2	Positivo	Positivo
18	+++	+++	+++	+++	+++	3	Negativo	Positivo
19	0	0	0	0	0	0	Negativo	Positivo
20	0	+++	0	0	0	0,8	Positivo	Positivo
21	+++	0	0	+	++	1,2	Negativo	Positivo
22	0	0	0	0	0	0	Negativo	Negativo
23	0	+	+++	0	0	0,8	Negativo	Negativo
24	0	+	+	0	0	0,4	Negativo	Positivo
25	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
26	0	0	0	0	0	0	Negativo	Positivo
27	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
28	0	0	++	+	+	0,8	Positivo	Positivo
29	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
30	0	0	0	0	0	0	Negativo	Negativo
31	0	+	0	+	0	0,4	Negativo	Positivo
33	0	0	0	+	++	0,6	Positivo	Positivo
34	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
35	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
36	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
37	0	0	0	0	+	0,2	Positivo	Positivo
38	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo

N° de muestra	Resultado lectura de Baciloscopía						RLEP	
	Moco	LLI	LLD	LCI	LCD	IB	Directa	Anidada
39	0	++	+	+	+	1	Positivo	Positivo
40	0	0	0	0	0	0	Positivo	Positivo
41	0	0	0	0	+	0,2	Positivo	Positivo
42	0	0	+	0	0	0,2	Positivo	Positivo
44	0	0	0	0	0	0	Negativo	Negativo
45	0	0	0	0	0	0	Negativo	Negativo
46	0	0	0	0	0	0	Negativo	Negativo

Celda color gris: muestra usada para extracción de ADN. 0: ausencia de BAAR.

Una vez leídas y extraídos los ADN de cada una de las láminas, se realizó la identificación del *M. lepraepor* RLEP, la amplificación de un fragmento de 129 pb representó el amplificado inicial por PCR directa y su visualización fue indicativa de la presencia de *M. leprae* en la muestra analizada. El resultado del amplificado de 129 pb para las muestras de linfa fue visualizado en un gel de agarosa al 2,5 % y registrado en la tabla N° 4 como RLEP, baciloscopía PCR directa positivo. El número de muestras en el que se identificó *M. leprae* por PCR directa fue de 21/44 (40 %). Las muestras 27 - 29 fueron previamente identificadas como positivas y la muestra 30 como negativa en el Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ. Ver figura N°9

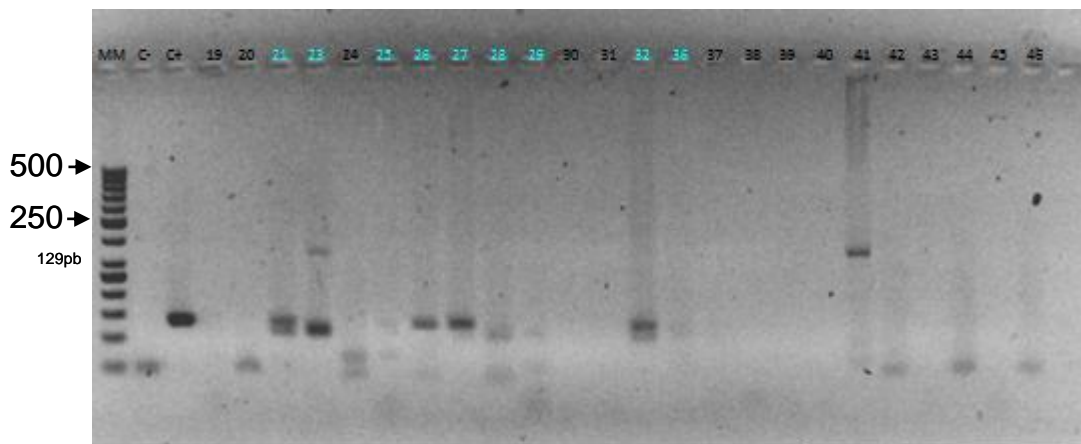
Figura N° 9. Electroforesis de PCR directa para RLEP en muestras de linfa.



C-: control negativo (Agua). C+: control positivo (Cepa Thai-53). MM: marcador de peso (50 pb).

5.2.1.2 Muestra de Moco Nasal Obtenida por Hisopado. De la población número 1 se obtuvieron un total de 24 muestras de moco nasal mediante el empleo de hisopado, cada una de las muestras fue sometida a extracción de ácidos nucleicos usando TRIS-HCl 1mM y su producto fue utilizado para la identificación de *M. leprae* mediante la reacción directa. El producto de la amplificación fue visualizado por electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % y del total de las muestras analizadas 9/24 (38 %) fueron positivos para la amplificación por PCR directa. Ver figura N° 10. El resultado del análisis se encuentra registrado en la figura N° 12.

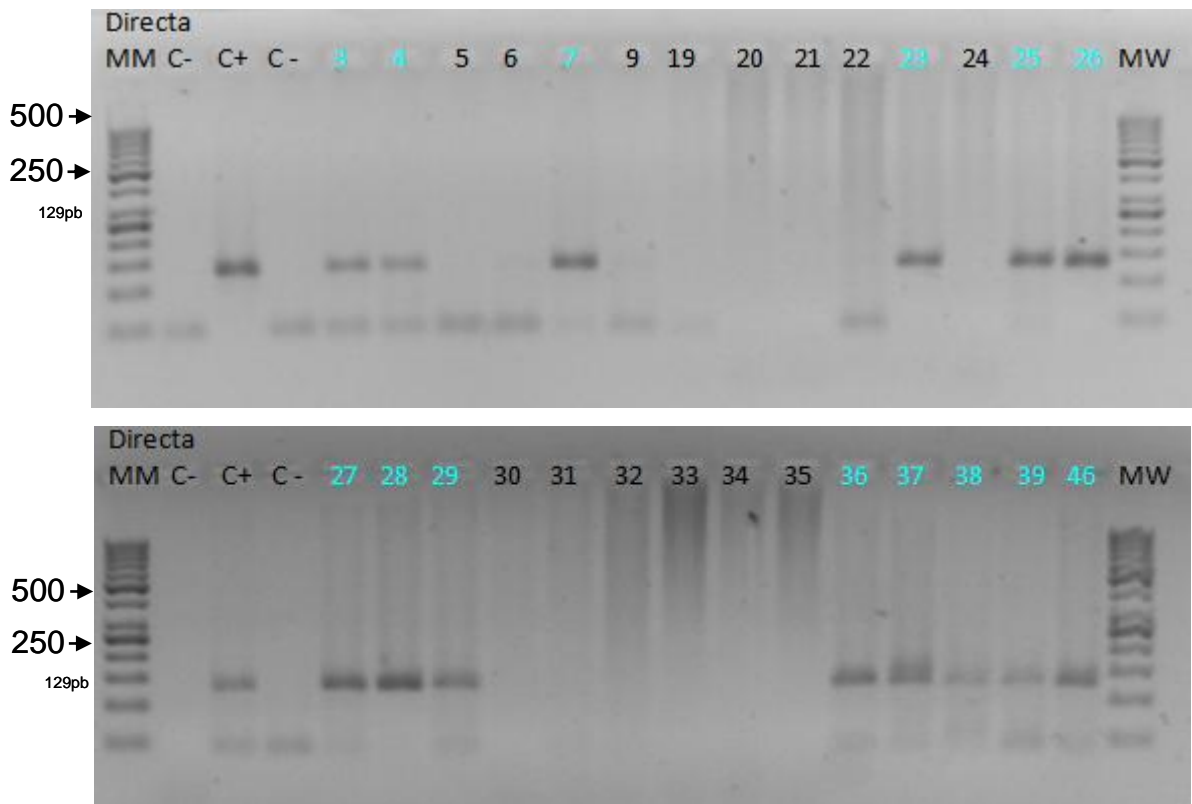
Figura N° 10. Electroforesis de PCR directa para muestras de moco nasal.



C-: control negativo (Agua). C+: control positivo (Cepa Thai-53). MM: marcador de peso (50 pb).

5.2.1.3 Muestras de Biopsia de Piel. Las 28 biopsias de piel rotuladas y almacenadas a -70°C , fueron utilizadas para extracción de ácidos nucleicos, el producto de este material fue usado para la identificación de *M. leprae* por PCR directa, el resultado del amplificado de 129 pb fue visualizado en un gel de agarosa al 2,5 %. Ver figura N° 11. El resultado positivo de los amplificados fue obtenido para 14/28 (50 %) biopsias de piel durante la realización de la PCR directa. Registrado en la figura N° 12.

Figura N° 11. Electroforesis de PCR directa para biopsias de piel.



C-: control negativo (Agua). C+: control positivo (Cepa Thai-53) MM: marcador de peso (50 pb).

5.2.1.4 Análisis de Resultados por PCR Directa. La PCR directa fue realizada en las muestras pertenecientes a las 44 personas y se observó que la identificación molecular por PCR directa superó en un 11 % la identificación microbiológica por visualización del BAAR por baciloscopia, adicionalmente se identificaron 13 / 44 muestras positivas por métodos moleculares que fueron negativas para la visualización de BAAR por baciloscopia y se observó que 8 / 44 casos positivos para BAAR no presentaron amplificación por PCR directa. Ver figura N° 12.

Figura N° 12. Comparación por identificación microbiológica y molecular - PCR directa.

Muestra		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	
BK		+	+		+	+	+	+				+	+	+		+		+	+		+	+		+	
PCR Directa	Bk		+										+	+	+		+	+			+			+	
	M																						+		+
	Bp			+	+			+																	+
Muestra		24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	
BK		+				+			+		+				+		+		+	+					
PCR Directa	Bk		+		+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
	M		+	+	+	+	+			+				+											
	Bp		+	+	+	+	+						+		+	+	+							+	

N° de muestra		Positivos	Total
BK		24 / 44	55 %
PCR Directa	Bk	21 / 44	29 / 44 (66 %)
	M	9 / 24	
	Bp	14 / 28	

(+): Resultado positivo para amplificación por PCR directa.(Celda Gris) Paciente con *M. leprae* identificado por cualquier tipo de muestra. (Celda blanca) Paciente negativo para la identificación (Bk): resultado por baciloscopia. (M): resultado para moco nasal. (Bp): resultado para biopsia de piel.

5.2.2 Análisis de Identificación Basados en la PCR Anidada. Una vez obtenido el amplificado para la PCR directa, éste se diluyó 1:400 para ser utilizado en la PCR anidada, aquellas muestras que fueron negativas para la PCR directa en baciloscopia, moco nasal y biopsia de piel fueron corridas en la PCR anidada.El resultado del segundo amplificado correspondió a una banda de 99 pb que se visualizó en un gel de agarosa al 2,5 %. Ver figura 13 y 14.

5.2.2.1 Muestras de linfa extraídas a partir de láminas para baciloscopia. En 21 muestras de linfa analizadas se identificó la presencia de *M. leprae* por PCR directa, al realizar la PCR anidada el número de identificaciones aumentó a 31 / 44 (70 %) y 5 nuevos casos negativos para BAAR fueron positivos por RLEP en linfa. Ver figura N° 13 A.

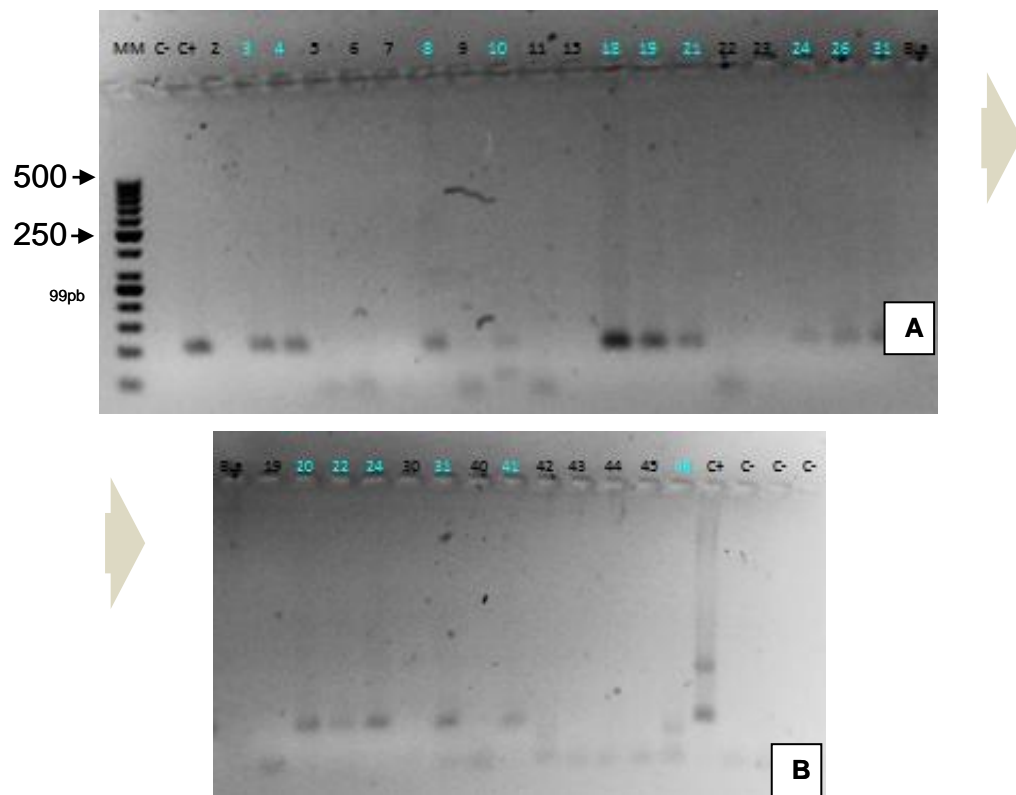
5.2.2.2 Muestra de Moco Nasal Obtenida por Hisopado. Los casos positivos para *M. leprae* aumentaron de 9 a 15 / 24 (63%), indicando un aumento de la presencia de bacilos en las vías respiratorias que podrían ser considerados como posibles casos promotores de transmisión del bacilo de Hansen, asociación propuesta por (Job, Jayakumar et al. 2008). Figura N° 13 B.

5.2.2.3 Muestras de Biopsias de Piel. La identificación de las biopsias de piel evidenció un aumento en el número de casos obtenidos pasando de 14 casos en PCR directa a 18 / 28 (64%) por PCR anidada. Los casos identificados por biopsia de piel fueron también determinados al utilizar la PCR de RLEP en linfa para baciloscopia y moco nasal. Figura N° 14.

5.2.2.4 Análisis de Resultados PCR Anidada. La PCR anidada demostró un porcentaje de identificación de *M. leprae* superior al 23 % de los resultados obtenidos por PCR directa, 29 / 44 (66 %) sobre 39 / 44 (89 %). La diferencia inicial obtenida entre el análisis microbiológico por visualización del BAAR y la PCR directa fue del 11 % y tras la implementación de la reacción anidada se aumenta su potencial al 34 %. Adicionalmente con la implementación en conjunto de las dos reacciones directa y anidada se logró identificar 19 casos que fueron reportados como falsos negativos por la lectura de la baciloscopia, dado que su IB fue igual a 0. Ver figura N° 15. Los casos identificados con el número 11 y 15 fueron los únicos en los que se determinó la presencia de BAAR por baciloscopia pero se obtuvo resultado negativo durante la identificación por RLEP. Los casos negativos para la visualización de BAAR y a su vez para la identificación de *M.*

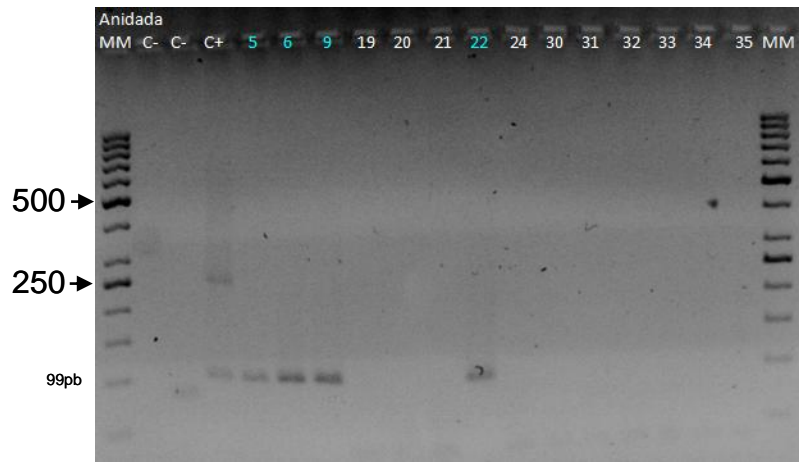
leprae por pruebas moleculares fueron 4, correspondientes a un caso masculino de 60 años de edad que se encontraba en tratamiento, un caso femenino de 60 años de edad que aún no había ingresado a tratamiento y dos casos asintomáticos, convivientes de un caso diagnosticado.

Figura N° 13. Electroforesis de PCR anidad para linfa y moco nasal.



C-: control negativo (Agua). C+: control positivo (Cepa Thai-53) MM: marcador de peso (50 pb). Bla: blanco. **A**: amplificados de linfa correspondientes a resultados negativos para PCR directa. **B**: amplificados de moco nasal correspondientes a resultados negativos para PCR directa.

Figura N° 14. Electroforesis de PCR anidada para biopsias de piel.



C-: control negativo (Agua). C+: control positivo (Cepa Thai-53) MM: marcador de peso (50 pb).

Figura N° 15. Comparación por identificación microbiológica y molecular – PCR directa y anidada.

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
BK	+	+		+	+	+	+				+	+	+		+		+	+		+	+		+
PCR		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+
PCR anidada	Bk			+	+			+		+									+	+		+	
	M																			+			+
	Bp					+	+		+													+	
Muestra	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
BK	+				+			+		+				+		+		+	+				
PCR	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				+
PCR anidada	Bk	+		+				+															
	M	+						+										+					+
	Bp																						

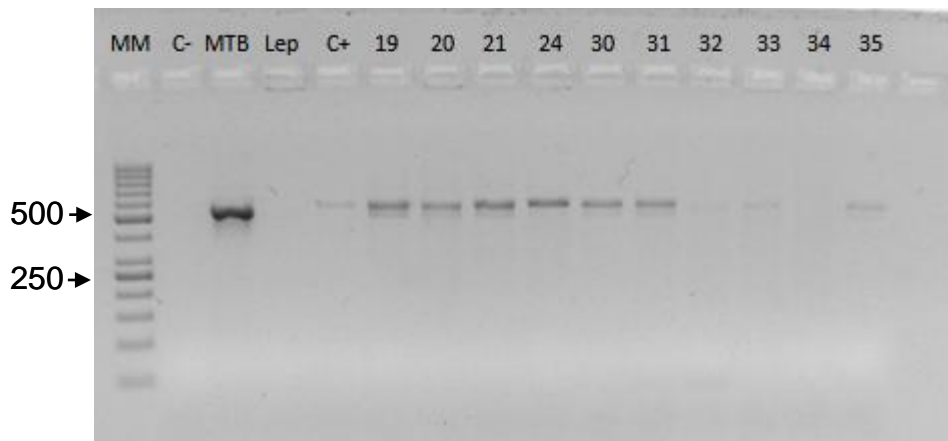
N° de muestra		Positivos	Total
BK		24 / 44	55 %
PCR Directa y anidada	Bk	31 / 44	39 / 44 (89 %)
	M	15 / 24	
	Bp	18 / 28	

(+): Resultado positivo para amplificación por PCR directa. (Celda Gris) Paciente con *M. leprae* identificado por cualquier tipo de muestra. (Celda blanca) Paciente negativo para la identificación (Bk): resultado por baciloscopia. (M): resultado para moco nasal. (Bp): resultado para biopsia de piel.

5.2.3 Análisis Complementarios

5.2.3.1 Identificación por 16S rRNA. Las biopsias de piel que fueron negativas para la identificación molecular por RLEP (19, 20, 21, 24, 30, 31, 32, 33, 34 y 35), fueron sometidas a identificación por secuenciamiento del 16SrRNA, como resultado de la amplificación se obtuvo un fragmento de 500 pb, los amplificados de cada una de las biopsias fueron visualizadas en una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Ver figura N° 16.

Figura N° 16. Electroforesis de PCR 16SrRNA para biopsias de piel.



C-: control negativo (Agua). C+: control positivo (Cepa Thai-53). Lep: control de lepromina A. MTB: control de *M. tuberculosis*. MM: marcador de peso (50 pb).

Para las ampliaciones obtenidas se solicitó el servicio de secuenciación a CORPOGEN y las secuencias en los dos sentidos de cada uno de los amplificados fueron comprobadas con lo electroferogramas, a partir de su alineamiento se generó una secuencia consenso que fue utilizada para realizar un BLASTnt en búsqueda del microorganismo con el mayor porcentaje de identidad de la secuencia analizada.

El resultado del análisis y los porcentajes de identidad de cada amplificado se encuentran registrados en la tabla N° 5

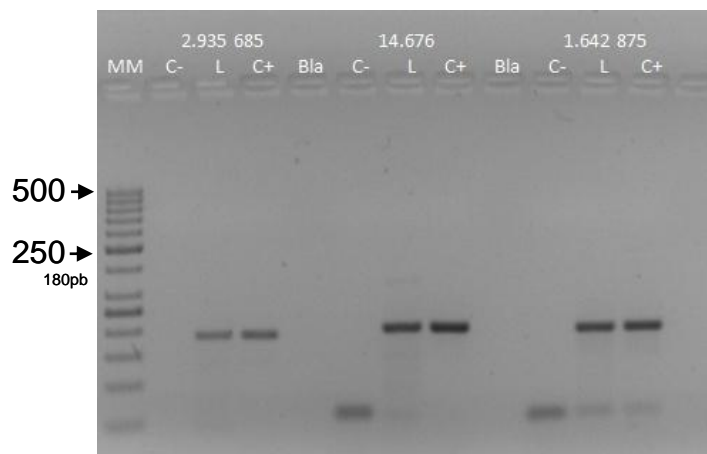
Tabla N° 5. Identificación de especies o géneros según secuencias del 16S rRNA.

Identificación según secuenciación de 16S ARN										
Identificación	19	20	21	24	30	31	32	33	34	35
Microorganismo identificado	Burkholderia sp.	Burkholderia sp.	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Bacillus</i> sp.	No se encontró ningún porcentaje representativo de similitud	No se encontró ningún porcentaje representativo de similitud	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>	<i>Rastonia insidiosa</i>
% de Identidad	93%	94%	83%	94%	0%	0%	94%	85%	91%	98%

5.2.3.2 Establecimiento de Genotipos Basados en la Variabilidad Genética de los Polimorfismos de Único Nucleótido. En las biopsias de piel donde fue posible identificar la presencia de *M. leprae*, mediante RLEP, se procedió a realizar la genotipificación basada en la presencia de los SNP en las posiciones 14.676, 1.642.875 y 2.935.685. La estandarización de los amplificadores fue inicialmente establecida utilizando como sustratos para la reacción el ADN de lepromina A y la cepa de *M. leprae* Thai-53.

La fotografía de los amplificadores de control bajo condiciones ideales para el SNP en la posición 2.935.685 (180 pb), 14.676 (194 pb) y 1.642.875 (189 pb) se puede observar en la figura N° 17.

Figura N° 17. Electroforesis de PCR para genotipificación por SNP.

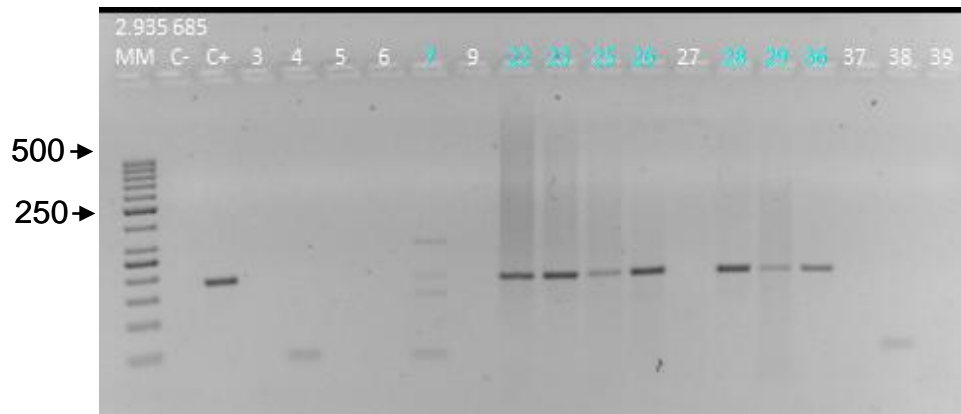


C-: control negativo (Agua). C+: control positivo (Cepa Thai-53). L: control de lepromina MM: marcador de peso (50 pb).

Las biopsias analizadas para los estudios de genotipificación fueron la de los participantes 3, 4, 5, 6, 7, 9, 22, 23, 25, 26, 27, 28, 29, 36, 37, 38 y 39, cada una de ellas fue sometida a varios pasos de amplificación y digestión según el genotipo que fuese identificado. Inicialmente se realizó una amplificación del fragmento de 180 pb correspondiente a la secuencia donde se ubica la variación

presente en la posición 2.935.685, las muestras con resultado positivo fueron la de los participantes 7, 22, 23, 25, 26, 28, 29 y 36. Ver figura N° 18.

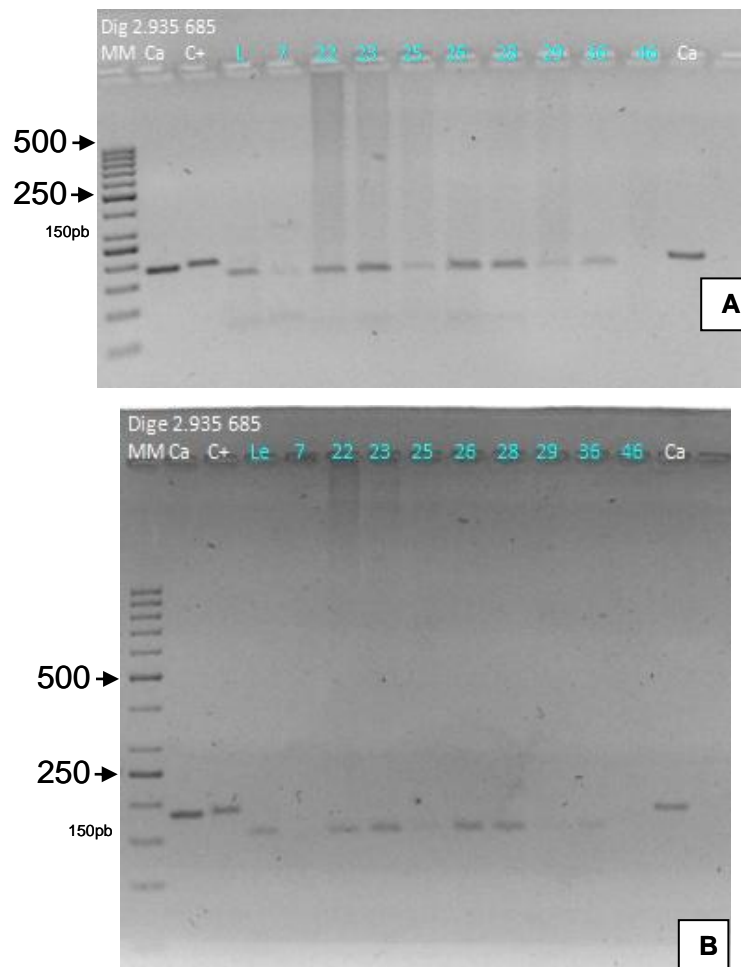
Figura N° 18. Electroforesis de PCR para SNP en la posición 2'935.685.



C-: control negativo (Agua). C+: control positivo (Cepa Thai-53). MM: marcador de peso (50 pb).

Todas las muestras que se sometieron a la amplificación y arrojaron un resultado positivo, fueron posteriormente digeridas por *BstUly* visualizadas en gel de agarosa al 2.5 %. El producto de la amplificación sin digerir solo fue observado en la cepa Thai-53 utilizada como control perteneciente al genotipo 1, las muestras 7, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 36 incluido el control de lepromina A presentaron digestión para el fragmento amplificado, indicativo de genotipos 3 y 4. Ver figura N° 19 A y B.

Figura N° 19. Electroforesis para amplificado digerido de SNP 2'935.685.

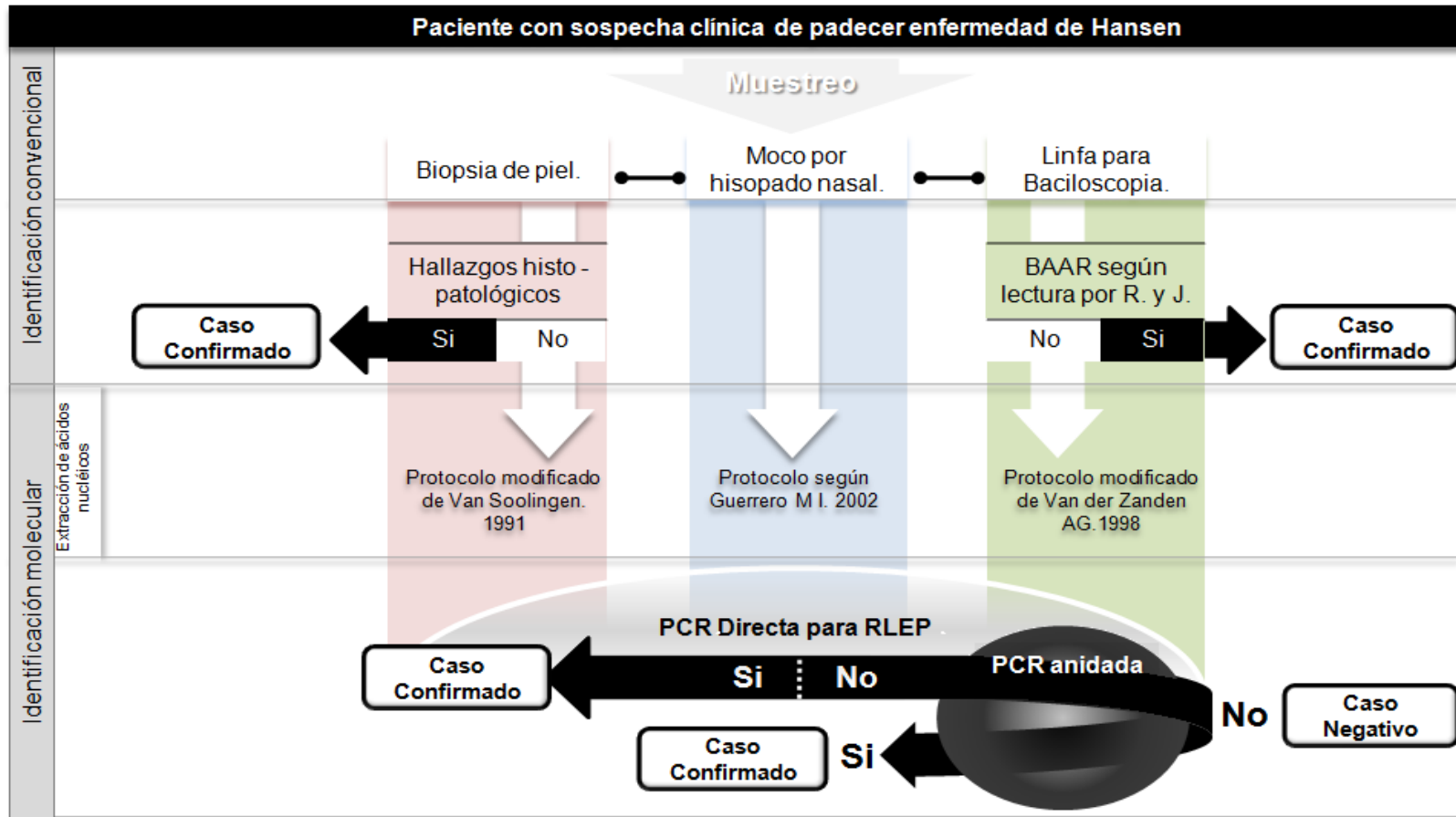


Ca: control de amplificado. C+: control positivo (Cepa Thai-53). L: control lepromina. MM: marcador de peso (50 pb). A: electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % corrido durante 1 hora. B: electroforesis en gel de agarosa al 2,5 % corrido durante 2 horas.

Basados en los resultados obtenidos y la positividad de identificación observada en este trabajo se puede establecer una propuesta de diagrama de flujo de identificación de *M. leprae* en laboratorios que cumplan con los requerimientos básicos para el desarrollo e implementación de técnicas de identificación por métodos moleculares. Ver figura N° 20.

Manteniendo como objetivo principal la importancia de seleccionar por paciente las muestras indicadas en la Guía de Atención de la Lepra presente en las guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública, dado que la utilización de las tres sitios de toma de las muestras con la identificación del *M. leprae* demostraron una positividad superior al 80 % en contraste con la identificación por métodos convencionales.

Figura N° 20. Propuesta de diagrama de flujo para la identificación de *Mycobacterium leprae*.



BAAR: bacilos ácido alcohol resistentes. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. R. y J.: cuantificación de BAAR según la escala logarítmica de Ridley y Jopling. Estupiñán H. 2014

5.3 ANÁLISIS DE FACTORES SOCIALES QUE PODRÍAN FAVORECER LA PERSISTENCIA DE LA ENFERMEDAD BASADOS EN LAS POBLACIONES DE ESTUDIO NÚMERO 2 Y 3.

Objetivo cumplido número 3: estudiar los factores sociales de los pacientes analizados que podrían favorecer la persistencia de la enfermedad en Santander. El análisis de los factores sociales está determinado desde dos percepciones poblacionales, constituidas por los conocimientos, temores, actitudes y estigmas que posee el enfermo de Hansen (denominado población 2) y la población que conforma su entorno (denominada población 3). Las características socioeconómicas de cada una de las poblaciones se establecieron y están registradas en las tablas N°6 y 7.

5.3.1 Análisis de Conocimientos. La caracterización y clasificación de los grupos analizados, estuvo basada en la profundidad de los conocimientos que posee cada uno de los participantes, determinando para ambas poblaciones 4 diferentes niveles de conocimiento A, B, C y D. Se evidenció que las dos poblaciones están ligeramente distribuidas hacia los grupos ubicados en los extremos, es decir en el grupo A y D.

Las personas que fueron clasificadas en el grupo D son el 41 y 22 % de los pertenecientes a la población 2 y 3 respectivamente, muy distantes en los conocimientos encontrados para la población 3 clasificada en el grupo A, donde el 45 % de la población en algún momento ha oído la enfermedad de Hansen, (ver figura N° 21). En la población 2, personal enfermo de Hansen, se observó que el 32 % de la población está clasificada en el grupo A. Existiendo un 18 % del personal enfermo a quien se le preguntó ¿conoce usted la enfermedad llamada Lepra? y la respuesta fue no, personal que fue clasificado como grupo A pero no cuenta con ningún tipo de conocimientos sobre Hansen y si conocen su estado de diagnóstico. Ver figura N° 21.

Tabla N° 6. Características socioeconómicas de la población enferma “población 2”.

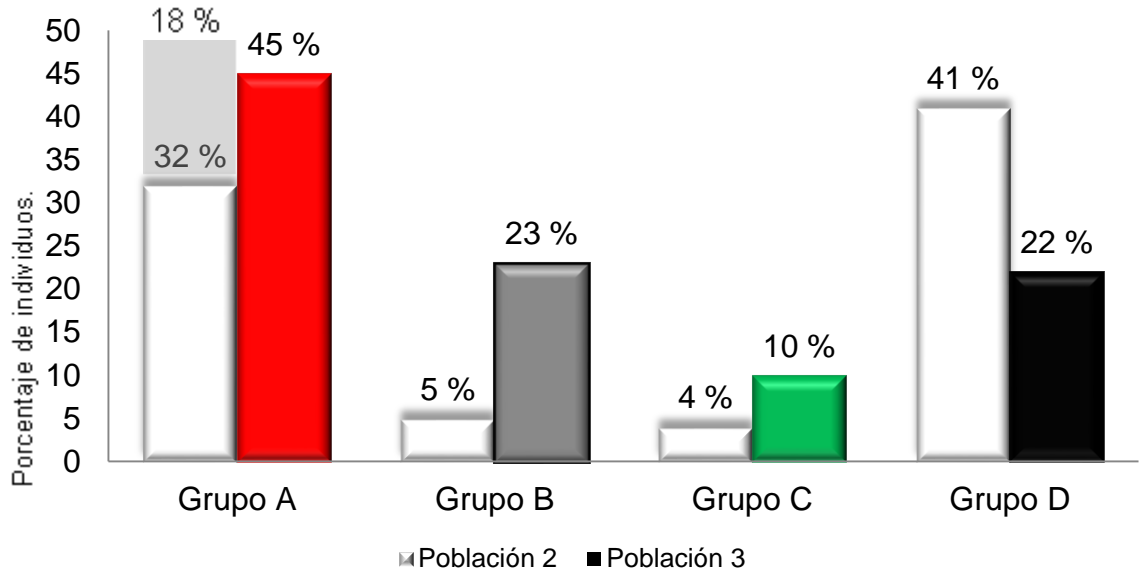
N° de participantes	Género		Estrato						Estudios superiores					Ocupación					Salario mínimo				Estado civil				
	Femenino	Masculino	1	2	3	4	5	6	Técnico	Tecnólogo	Universitario	Posgrado	No tiene	En casa	Estudiante	Pensionado	Cesante	Trabajador	No recibe	Menos de 1	Entre 1 y 2	Más de 2	Soltero	Casado	Divorciado	Unión libre	Viudo
Bucaramanga	10	12	6	6	6	2	0	2	1	0	0	0	21	7	1	4	4	6	10	6	6	0	6	8	3	1	4
Floridablanca	4	5	2	7	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0	4	4	2	2	5	0	5	1	1	2	0
Girón	2	4	3	1	2	0	0	0	0	0	0	0	6	1	0	1	3	1	2	0	4	0	2	2	0	1	1
Piedecuesta	2	6	1	4	3	0	0	0	1	1	0	0	6	2	1	0	0	5	3	2	1	2	3	2	1	2	0
*Otro	1	8	5	3	1	0	0	0	0	0	0	0	9	1	0	0	2	6	3	2	2	2	0	4	0	5	0
Subtotal	19	35	17	21	12	2	0	2	2	1	0	0	51	12	2	5	13	22	20	12	18	4	16	17	5	11	5
Total	54		54						54					54					54				54				

*Otro: personal perteneciente a municipios como Cimitarra, Barrancabermeja, Rio Negro, Mogotes y Ocamonte.

Tabla N° 7. Características socioeconómicas de la población no enferma “población 1”.

N° de participantes	Género		Estrato						Estudios superiores					Ocupación				Salario mínimo				Estado civil						
	Femenino	Masculino	1	2	3	4	5	6	Técnico	Tecnólogo	Universitario	Posgrado	No tiene	Ama de casa	Estudiante	Pensionado	Cesante	Trabajador	No recibe	Menos de 1	Entre 1 y 2	Más de 2	Soltero	Casado	Divorciado	Unión libre	Viudo	
Bucaramanga	51	25	0	9	33	29	5	0	16	8	25	6	21	18	25	6	3	24	41	9	19	7	37	23	5	7	4	
Floridablanca	16	6	0	12	8	1	1	0	6	3	5	0	8	5	7	0	0	10	10	2	6	4	7	9	3	2	1	
Girón	7	6	0	2	11	0	0	0	2	5	2	0	4	3	3	0	0	7	3	0	9	1	8	3	1	0	1	
Piedecuesta	5	3	0	1	6	1	0	0	3	1	1	0	3	1	2		1	4	4	0	3	1	6	0	0	2	0	
No responde
Subtotal	79	40	0	24	58	31	6	0	27	17	33	6	36	27	37	6	4	45	58	11	37	13	58	35	9	11	6	
Total	119		119						119					119				119				119						

Figura N° 21. Grupos de conocimiento por población.

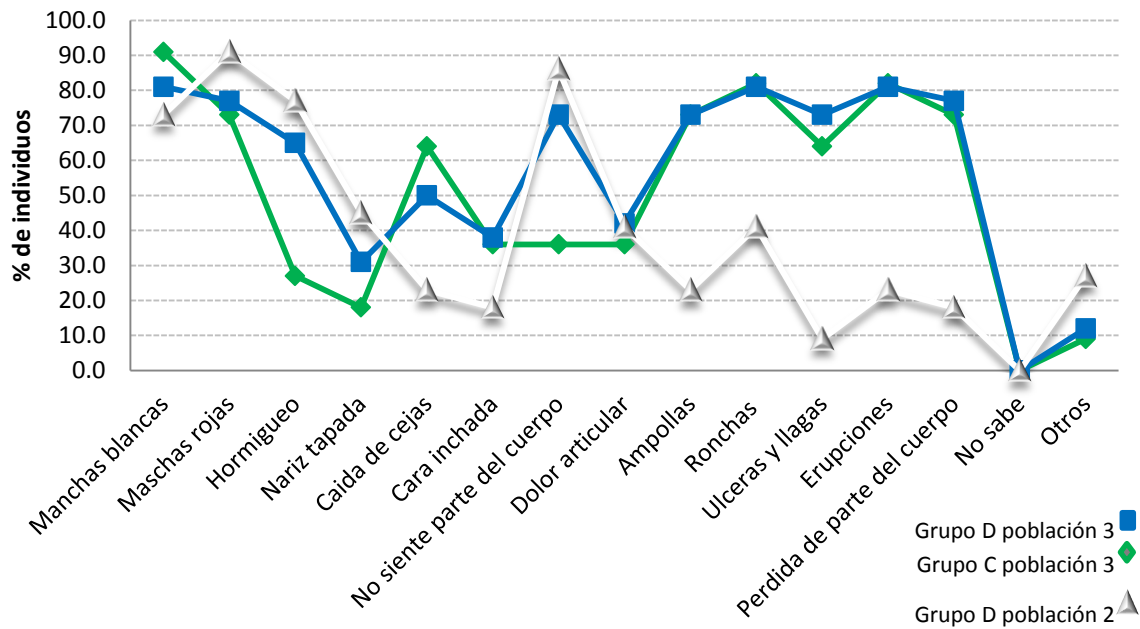


Los grupos B y C representan el 9 y 33% restante de las poblaciones 2 y 3 respectivamente, donde, el grupo B está conformado por personal que identifica y entiende el estado actual de trasmisión de la enfermedad de Hansen y el grupo C adicionalmente reconoce como primeros síntomas la aparición de manchas en la piely la pérdida de la sensibilidad. Grupos comoel C y D poseen conocimientos apropiados sobre los síntomas, diferenciándose por la identificación del estado de curación pos tratamiento conocido por el grupo D y desconocido por el C.

Existen características propias del enfermo de Hansen, que lo diferencian de la población no enferma, identificadas por el conocimiento de los síntomas, dado que la población 2 reconoce los síntomas característicos como las manchas, el hormigueo y adormecimiento de una parte del cuerpo y rechaza a su vez síntomas inespecíficos como las ampollas, úlceras erupciones o pérdida de partes del cuerpo, síntomas inespecíficos que si son reconocidos por la población no enferma. En el análisis de la población 2 no se incluye el grupo C dado que está

constituido por 2 individuos que no son representativos para este análisis. Ver figura N°22.

Figura N° 22. Identificación de signos y síntomas en los grupos C y D.



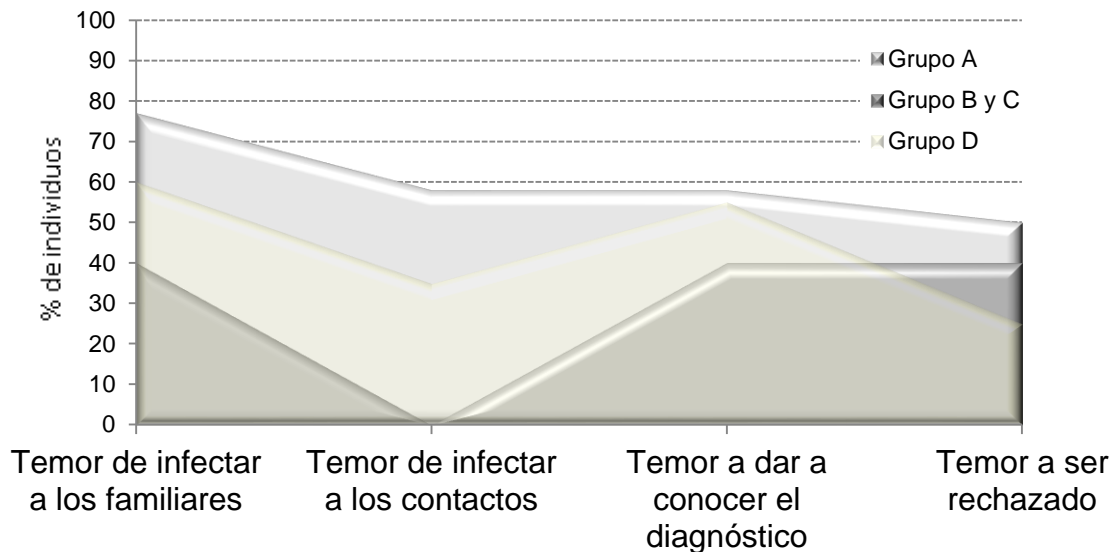
En la población 2 se encontró como fuente de los conocimientos la comunicación voz a voz a través del personal del salud en un rango del 65-82 % o de terceras personas (23-40 %), a diferencia de la población 3, que indicó como principal fuentesu conocimiento a los medios de comunicación del (61-81 %), seguido de información recibida voz a voz por parte de terceras personas (36-80 %) y la biblia (40-69 %).

5.3.2 Temores, Actitudes y Estigmas de la Enfermedad

5.3.2.1 Temores y Actitudes. La enfermedad desde sus orígenes e incluso en la actualidad es muy desconocida por la población, produciéndose en ellos conceptos errados que acarrear sobre síla adquisición de temores que inducen

actitudes estigmatizantes. El reflejo de ello se evidenció en la población 2, donde a medida que avanza el nivel de conocimiento sobre la enfermedad se redujo el porcentaje de individuos que expresaron tener temores sobre la trasmisión (77 al 40 %), la identificación (58 al 55 %) y el rechazo (50 al 25 %). Ver figura N°23.

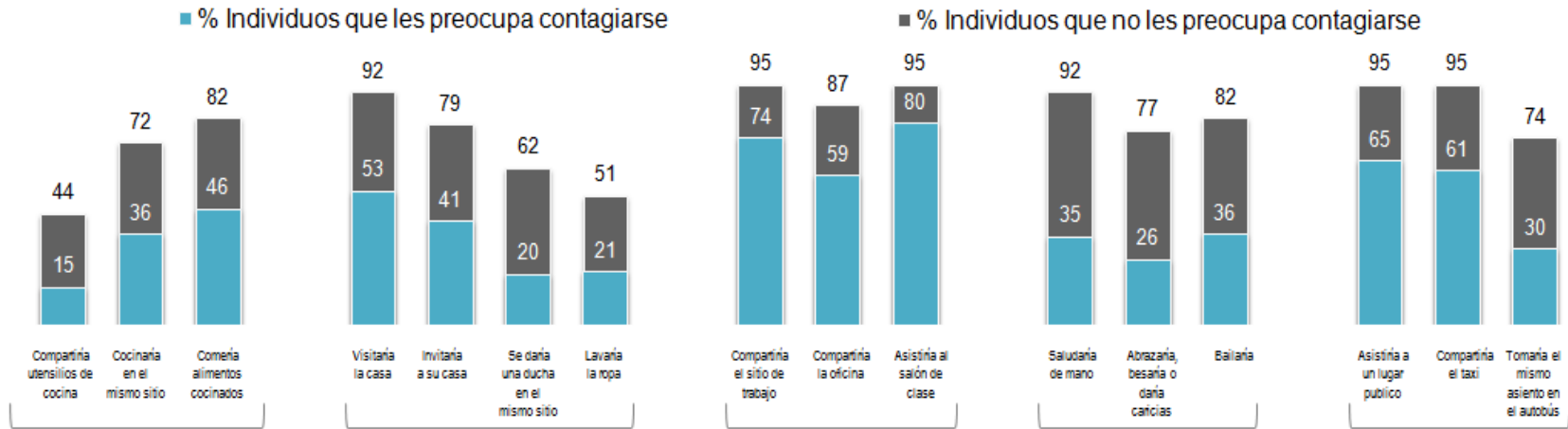
Figura N° 23. Temores de la población 2 frente a la enfermedad.



El temor también fue evidente en la población 3 y se expresó por la preocupación de contagio durante el contacto con el enfermo de Hansen, esto provocó en la población actitudes de rechazo. Las actividades de rechazo más frecuentes en la población de estudio ocurrieron durante la convivencia en el hogar y el contacto directo, donde actividades como compartir utensilios de cocina presentaron un porcentaje de rechazo del 85 % para la población temerosa de contagio y 56 % de la población no temerosa. Otros comportamientos de rechazo durante la convivencia se evidenciaron en actividades como usar el baño en el que un enfermo de Hansen ha tomado una ducha, el 80 % de la población temerosa del contagio no lo haría y el 79 % de la población expresa que lavaría su ropa en un

lugar diferente al empleado por el enfermo de Hansen. En cuanto al contacto directo, como por ejemplo saludar estrechando las manos, en la población temerosa y no temerosa el 65 % de la población temerosa no lo haría y el 8 % de la población no temerosa lo rechazaría, Ver figura N°24.

Figura N° 24. Actitudes inducidas por el temor en la población 3.



Convivencia en el hogar

Compartiría utensilios de cocina

		SI	NO
TEMOR	SI	15%	85%
	NO	44%	56%

Convivencia laboral o educativo

Saludaría de mano

		SI	NO
TEMOR	SI	35%	65%
	NO	92%	8%

Contacto directo

Se sentaría en el asiento del autobús

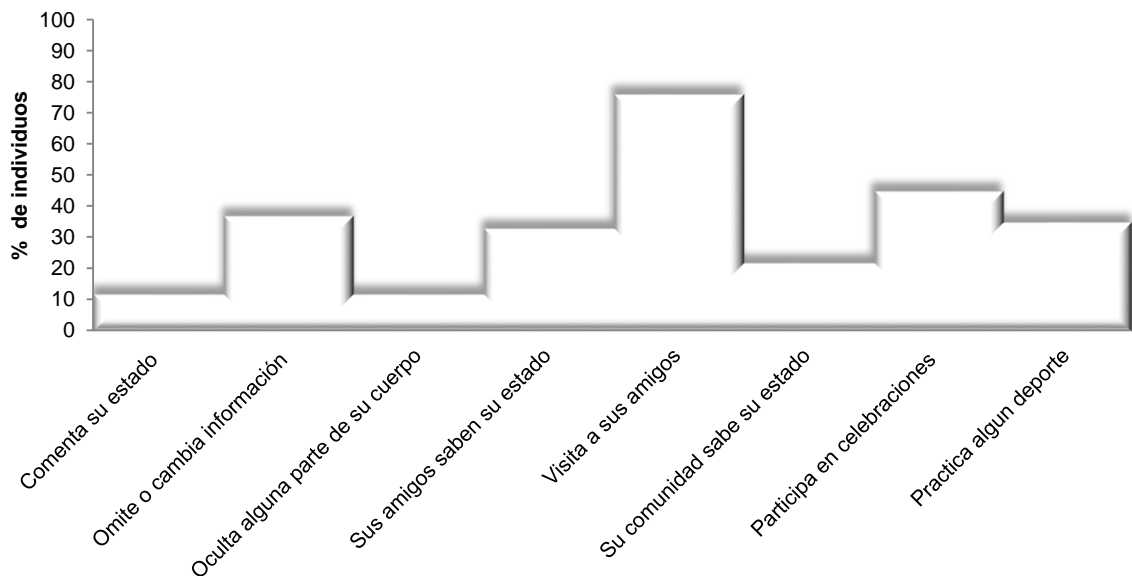
		SI	NO
TEMOR	SI	30%	70%
	NO	74%	26%

A- Porcentaje de individuos que respondieron si a las actitudes evaluadas y alegaron preocupación hacia el contagio. B. Citación de tres ejemplos de rechazo relacionas con el temor hacia la enfermedad de Hansen.

5.3.2.2 Estigma y Enfermedad. El estigma de la enfermedad se determinó con base en la descripción de cada uno de sus componentes, iniciando por el temor, presente en la población afectada e inductor en la población no afectada de actitudes previamente analizadas que provocan como consecuencia el ocultamiento del enfermo de Hansen.

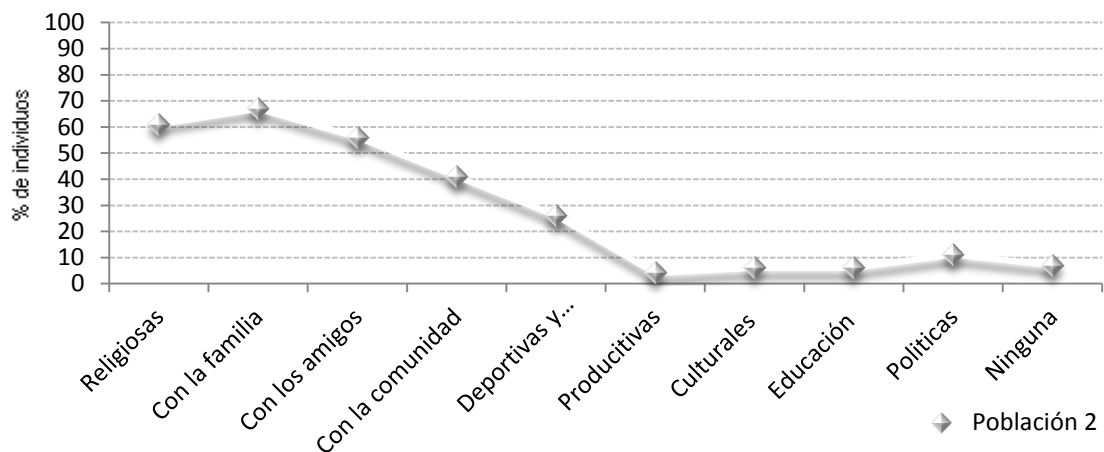
Las principales actitudes de ocultamiento evidenciadas en la población 2 están relacionadas con la identificación de su enfermedad tanto así que del total de individuos, el 46 % tiene pareja sentimental y el 25 % oculta su estado de enfermedad a ella, adicionalmente del total de la población tan solo el 15 % comenta su enfermedad y más del 60 % de la población omite o cambia información, evitando dar a conocer su estado a amigos o la comunidad. Un porcentaje superior al 50 % de la población se aísla evitando actividades individuales y grupales, colocando en evidencia notable la presencia de estigma relacionado con el aislamiento y ocultamiento de la enfermedad. Ver figura N° 25.

Figura N° 25. Actitudes de ocultamiento presentes en la población 2.



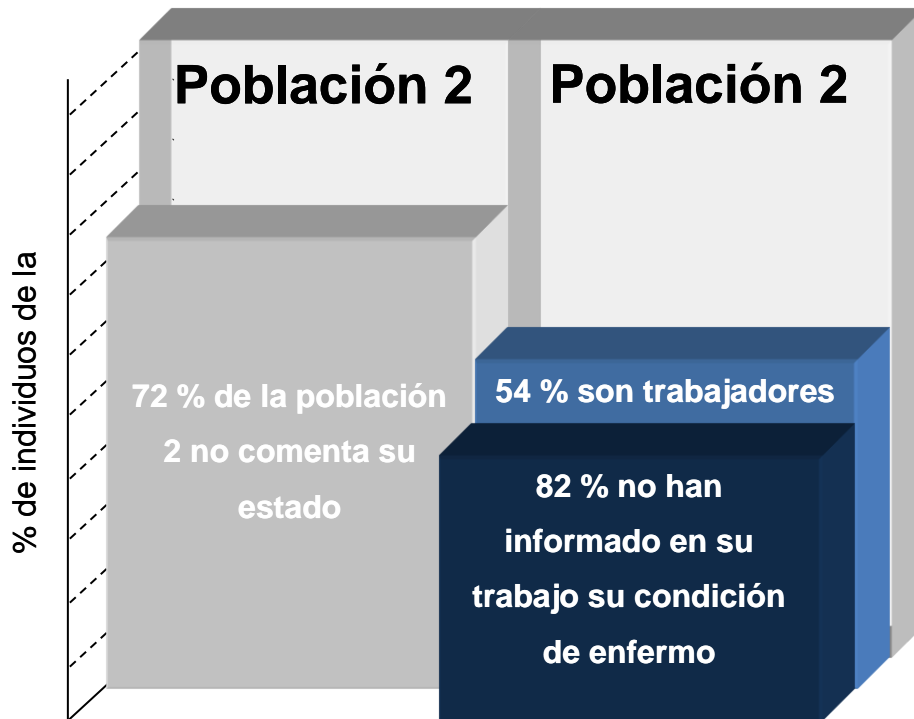
La participación del enfermo en actividades rutinarias para la población general también se ve reducida, observando para el enfermo una reducción clave desde el entorno familiar hasta la realización de actividades que tengan algún tipo de relación con la comunidad, siendo casi nulas o inferiores al 10 % las actividades de productividad económica, culturales de educación o políticas. Ver figura N°26.

Figura N° 26. Actividades en las que participa la población 2



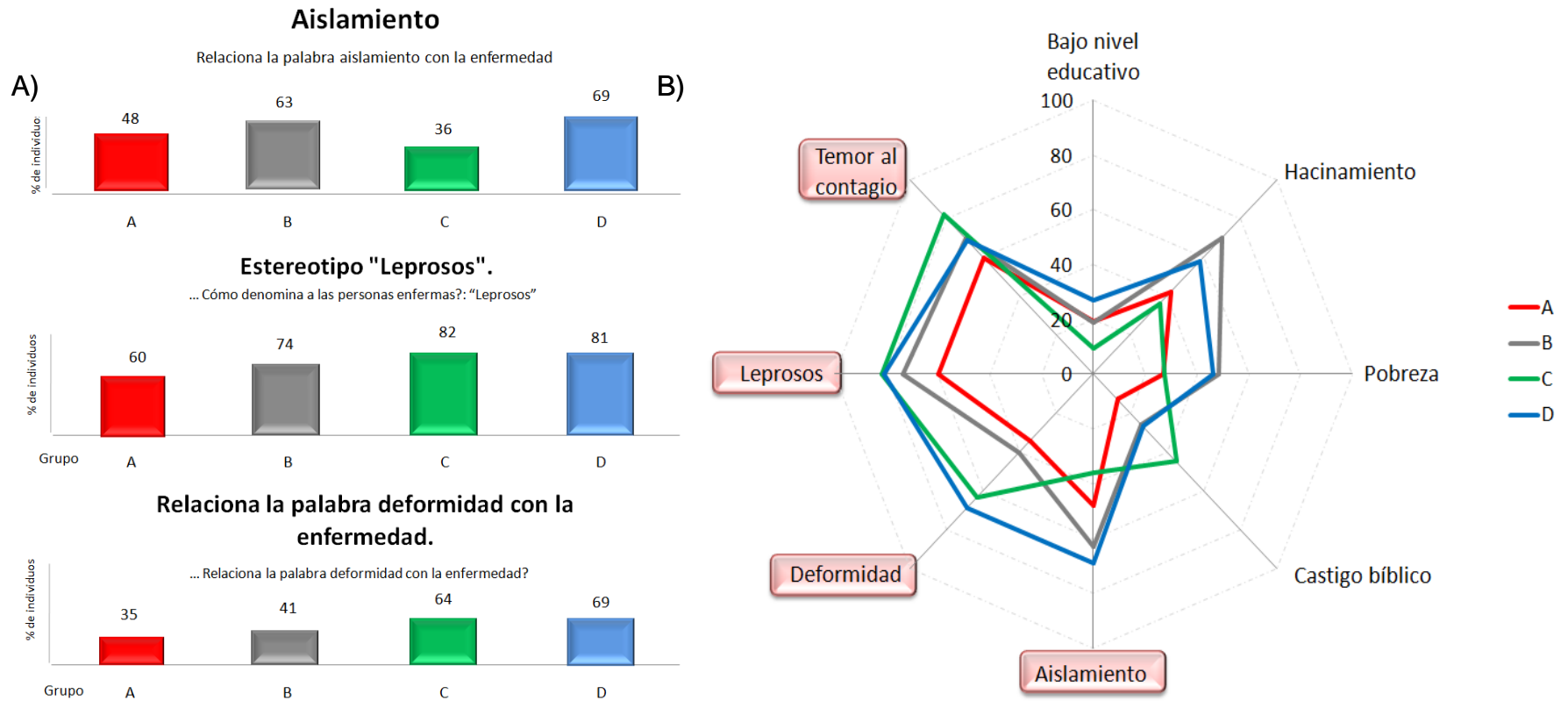
El 54 % de la población 2 posee trabajo y su situación laboral se ve afectada por sus temores y actitudes, debido que el 82 % de esta población no ha comentado su estado al personal presente en su entorno laboral, evidenciándose un claro ocultamiento de su enfermedad durante el desempeño de sus labores, adicionalmente el 72 % del total de la población 2 alega no comentar nada al respecto por miedo al rechazo, maltrato, critica, incursión en su intimidad, no le ve importancia, le da pena o no desea que adquieran asco hacia él, demostrando que el enfermo precisa o siente actitudes estigmatizantes desde la población general. Ver figura N°27.

Figura N° 27. Condición laboral y estigma.



La población no enferma también expresa actitudes estigmatizantes hacia el enfermo, dado que se encontró un porcentaje de correlación entre aislamiento y enfermedad que varía desde el grupo C al D en un rango del 36 al 69 % respectivamente. Ver figura N° 28 a. La estereotipización también es evidente en la población 3, se observó para los estereotipos leproso y deforme que el 60 y 82 % de la población, relaciona en mayor proporción al estereotipo desacreditable “leproso” a diferencia del 35 y 69 % observado para el estereotipo desacreditado “deforme” ver figura N°28 a. Una relación de la determinación de los tipos de componentes del estigma y componentes indicadores de subdesarrollo han sido analizados en términos de porcentajes en la figura N°28 b, observando para la población de estudio una distribución dirigida hacia los componentes del estigma a diferencia de los indicadores de desarrollo, evidenciando que grupos como el C y D son quienes representan los mayores porcentajes de actitudes estigmatizantes hacia la población enferma. Ver figura N° 28 b.

Figura N° 28. Aislamiento y estereotipización presente en la población 3.



A- Relación entre los componentes del estigma "Aislamiento y estereotipización" para cada grupo de conocimiento. B. Establecimiento de relación entre los componentes del estigma y componentes de subdesarrollo.

6. DISCUSIÓN

La enfermedad de Hansen es una enfermedad milenaria donde históricamente se han reunido múltiples esfuerzos en búsqueda de su erradicación mediante el establecimiento de protocolos y alternativas terapéuticas, sin embargo el problema actual de la enfermedad de Hansen ha sido la identificación oportuna del enfermo para la instauración de un protocolo terapéutico temprano que acorte la cadena de transmisión y evite la discapacidad (Noordeen 1994; AGUAS 2001; Lockwood 2002; Scollard, Adams et al. 2006). Este trabajo implementó un protocolo de identificación molecular aplicable a cada una de las muestras clínicas procedentes de pacientes sospechosos de padecer enfermedad de Hansen, aumentando el límite de detección del bacilo y reduciendo a la mínima cantidad posible la identificación de casos con IB = 0 por los análisis de apoyo diagnóstico convencionales.

Las estrategias de apoyo diagnóstico de lepra en la actualidad están basadas en el hallazgo del bacilo mediante su visualización en linfa o biopsia, pero su determinación es incipiente y varía según la calidad de la muestra y el número de campos visualizados, obteniendo límites de detección del bacilo entre 0,8 a 3,1 x 10⁷ BAAR/ml (Shepard and McRae 1968), un número demasiado elevado para la presencia de casos paucibacilares o infecciones tempranas. Por lo tanto es importante seleccionar una metodología que permita la identificación del menor número de bacilos, en el mayor número de muestras posible, aproximaciones metodológicas de identificación que han variado en sensibilidad y especificidad.

En 1986 la primera estrategia basada en PCR fue propuesta e implementada en hígado de armadillo y almohadillas de ratón, usando como blanco molecular un fragmento de 370 pb ubicado en la región repetitiva RLEP y con una detección del *M. leprae* en muestras con un promedio de 10² bacilos (Woods and Cole 1989), posteriormente este mismo blanco fue usado en biopsia de piel humana con una

correlación del 80 y 70 % en pacientes no tratados MB y PB respectivamente (Yoon, Cho et al. 1993). El gen codificante de la proteína de 18 kDa también fue seleccionado como blanco molecular, permitiendo la amplificación de un fragmento de 360 pb en biopsias de piel infectadas voluntariamente y el gen codificante del antígeno rico en prolina fue utilizado para la amplificación de un fragmento de 530 pb y útil para casi la totalidad de los pacientes MB, pero con el 56% de positividad en biopsias de piel de pacientes PB (de Wit, Faber et al. 1991).

Posteriormente se fueron añadiendo modificaciones a los protocolos de identificación, incluyendo cambios en los mecanismos de visualización de ADN o modificaciones de la amplificación, por ejemplo la adición de un protocolo de hibridación al fragmento de 370 pb previamente publicado por Woods en 1986 para RLEP, aumentando su límite de detección a un máximo de identificación en diluciones de 1×10^{-18} gramos de ADN de pacientes no tratados ó la implementación de una PCR anidada que amplificaba el gen *groEL* presente en las micobacterias, que permitía identificar 1 femtogramo de ADN equivalente a 1 bacilo, con la dificultad de presentar reacción cruzada para otras micobacterias como el *M. lufu* y *M. simiae*(Kampirapap, Singtham et al. 1998), e incluso implementación de métodos colorimétricos para la detección de *M. leprae*(van der Vliet, de Wit et al. 1993; van der Vliet, Hermans et al. 1993).

Todas estas modificaciones representaron estrategias prometedoras para la identificación del *M. leprae* en pacientes MB y PB, pero cuando su población o tipos de muestras eran modificadas, estos métodos moleculares disminuían en su eficacia, bien sea, durante el empleo de muestras procedentes de paciente que han sido previamente tratados o muestras que han sufrido daño durante su manipulación, conservación con soluciones fijadoras o consecuencia del tiempo (Fiallo, Williams et al. 1992; Jamil, Keer et al. 1993; Rafi, Donoghue et al. 1995).

Como prueba de identificación en este trabajo se implementó el método usado por Donoghue et al. en 2001, que propone una reacción que permite la amplificación de un segmento repetido 28 veces en el cromosoma del *M. leprae*, aumentando la probabilidad de identificación dado el caso de existir daño en el genoma, la longitud de los fragmentos correspondientes a 129 y 99 pb adquieren mayor probabilidad de amplificación en contraste con aquellos de mayor longitud (Goulart, Cardoso et al. 2007) y la implementación de un protocolo anidado aumenta el límite de detección de la prueba, a menos de un bacilo por muestra analizada (Donoghue, Holton et al. 2001).

La prueba de identificación implementada en el Laboratorio Central de Investigaciones tuvo variaciones en el protocolo publicado por Donoghue en 2001, las condiciones de reacción cambiaron en búsqueda de optimizar el amplificado obtenido, implementándose para la reacción un estuche para PCR sin adición por separado de MgCl₂, tampón o enzima. Las temperaturas de anillamiento fueron modificadas para cada uno de los protocolos implementados de PCR directa y PCR anidada obteniendo el mejor amplificado posible para las muestras analizadas.

El límite de detección establecido para las dos pruebas estuvo en el orden de un picogramo y un femtogramo equivalentes a 312 y 0,3 bacilos de *M. leprae* en la PCR directa y anidada respectivamente, por lo tanto la sensibilidad de la prueba es superior a los protocolos de PCR implementados para RLEP, el gen codificante de la proteína de 18 kDa y el antígeno rico en prolina, pero similar a lo observado en el gen *groEL* e inferior a los análisis asociados a hibridación (Kampirapap, Singtham et al. 1998)(Woods and Cole 1989)(de Wit, Faber et al. 1991).

La implementación de la prueba en el extraído de ADN a partir linfa procedente de lámina para baciloscopia permitió identificar 31 / 44 (70 %) casos, de los cuales el 21 / 31 (68 %) se encontraban en tratamiento, adicionalmente mediante esta

prueba se identificaron 15 / 20 (75 %) casos paucibacilares, superior a los 15 / 46 (32 %) observados en estudios basados en identificación por PCR de 16SrRNA(Kamble, Shinde et al. 2010) y superando considerablemente el límite de detección de *M. leprae* por la prueba fenotípica 24 / 44 (55 %) casos (ver tabla N° 4). Por lo tanto esta prueba asociada a la lectura de la baciloscopia representa una estrategia de identificación temprana del paciente sospechoso de Hansen y con la presentación PB.

En cuanto a las muestras de moco nasal analizadas en la población de estudio, se determinó que el 63 % de las muestras fueron positivas para la identificación de *M. leprae*, detección superior a lo observado en otro estudio realizado en Colombia donde se encontró *M. leprae* en el 31 % de los pacientes analizados (Cardona-Castro, Beltran-Alzate et al. 2008), el personal positivo para *M. leprae* en moco nasal representa para la población actual según (Job, Jayakumar et al. 2008) un medio de propagación del bacilo y fuente de promoción de la cadena de transmisión. Por lo tanto es importante mantener el método de identificación de *M. leprae* en moco nasal como una herramienta de evaluación de la principal ruta de transmisión del bacilo, incluso en la población general residente en zonas endémicas de Hansen, tanto así que se ha logrado la identificación de *M. leprae* en el 16 % de los contactos del enfermo de Hansen (Guerrero, Arias et al. 2002; Almeida, Martinez et al. 2004) y en el 21 a 31 % de la población no enferma residente en zonas endémicas (Lavanaia, Turankar et al. 2013).

En el análisis de las biopsias de piel se encontró un porcentaje de identificación del 64 %, hallazgo inferior a lo observado en pruebas implementadas previamente por otras investigaciones que presentaron un porcentaje de determinación de *M. leprae* en el 82 % de la población (Banerjee, Biswas et al. 2011), probablemente debido a que fueron biopsias obtenidas de lugares carentes de lesión en el paciente o porque eran muestras procedentes de pacientes previamente tratados. Las biopsias de piel positivas para RLEP 8 / 17 (47 %) fueron identificadas como

genotipos 3-4 y todas las biopsias negativas para RLEP fueron sometidas a amplificación y secuenciación del 16S rRNA en búsqueda de otras bacterias sobre agregadas a la lesión.

Como resultados del análisis de 16S rRNA se determinó en las muestras 19-20 y 24 bacterias pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Bacillus*, considerados saprofitos que comprenden algunas especies como *Burkholderia mallei* y *Bacillus anthracis* causantes de la enfermedad del muermo y el carbunco respectivamente (Dominguez Carmona 2001; Khan, Wieler et al. 2013).

Para la muestra 21 y 35 se identificó la presencia de dos patógenos oportunistas para los seres humanos, la especie *Pseudomonas aeruginosa* con la mayor frecuencia de oportunismo y la especie *Ralstonia insidiosa* denominada actualmente como un oportunista emergente (Balasubramanian, Schneper et al. 2013; Ryan and Adley 2013).

En los pacientes identificados como 32 y 33 se determinó la presencia del *M. scrofulaceum*, una micobacteria no tuberculosa de crecimiento lento presente en agua y suelo, asociada a linfadenitis en niños e infecciones respiratorias y de piel en personas inmuno-suprimidas o inmuno-comprometidas (Marazzi, Chappier et al. 2010; Lai, Abbey et al. 2013)

Para la muestra 35 se determinó la presencia de 16SrRNA perteneciente al *Plasmodium falciparum*, hallazgo sugestivo de posible coinfección *P. falciparum* - *M. leprae* debido al resultado positivo para RLEP por PCR directa en baciloscopia, estos casos de coinfección fueron previamente documentados en pacientes con lepra que se encontraban bajo tratamiento con dapsona (Das, Barkakaty et al. 1982). Finalmente en las muestras 30 y 31 no fue posible asociar ningún tipo de microorganismo a la secuencia obtenida, probablemente por ausencia de infección sobre agregada o dificultades durante la obtención y secuenciación de los

fragmentos amplificados, dado que se observó que las secuencias poseían longitudes diferentes a lo esperado y los electroesferogramas no permitían resolver errores durante el alineamiento.

El protocolo de identificación implementado en este trabajo demostró su utilidad en todas las muestras de interés clínico para visualización del bacilo en la enfermedad de Hansen, observándose que para el total de casos analizados el 89 % de ellos fueron identificados como positivos para *M. leprae*, e incluso de los 5 contactos introducidos como casos sospechosos de la enfermedad se identificaron 3 casos positivos con IB: 0, que por identificación convencional seguirían siendo negativos y continuarían la cadena de transmisión de la enfermedad. Por lo tanto la prueba ha demostrado su aplicabilidad en muestras de moco nasa, linfa y biopsias de piel procedentes de poblaciones PB, MB que estén o no en tratamiento resolviendo un porcentaje de identificación superior al obtenido por los métodos convencionales.

Las herramientas moleculares son estrategias de apoyo diagnóstico basadas en la búsqueda del bacilo, pero la identificación por si sola de la enfermedad en un individuo sospechoso, implica múltiples variaciones en el estilo de vida de la persona y de la comunidad que lo rodea (Singh 2012). Dado que el diagnóstico de una enfermedad como la lepra conlleva desde mucho tiempo atrás una connotación estigmatizada (Kellersberger 1951; John 2013), que según el grado de conocimiento de la enfermedad podría inducir en el individuo o su entorno, actitudes que promuevan una resolución saludable de la enfermedad con disminución de la cadena de transmisión o por el contrario podría inducir la aparición de estigma, que se concluirá con un estado de enfermedad prolongado, con tratamiento inconstante y aparición temporal de la discapacidad.

Por ello este trabajo estableció su análisis desde dos grupo poblacionales, el grupo perteneciente al personal enfermo denominado población 2 y el grupo de

población general no enferma denominadas población 3. Cada uno de los grupos fue inicialmente sometido al establecimiento de sus conocimientos sobre la enfermedad de Hansen encontrando notables diferencias en la distribución de los mismos.

El mayor número de individuos conocedores de la enfermedad está en la población 2 con una diferencia del 41 sobre el 22 % de la población distribuida en el grupo D, resultado esperado si relacionamos la población 2 con el grupo de mayor contacto con la enfermedad por su condición. Lo observado para la población 2 en el grupo A es realmente interesante, dado que el 32 % de la población está realmente establecida en este grupo debió a su desconocimiento en profundidad de la enfermedad, pero el 18 % restante representa un grupo de individuos que alegaban no conocer la enfermedad y la niegan, pero cuando se les cuestionada sobre su diagnóstico no existía ninguna duda en ellos al responder que poseían lepra, por lo tanto este grupo aparenta expresar ocultamiento o resistencia durante el desarrollo de las preguntas correspondientes a la enfermedad.

La relación entre la profundidad y calidad de los conocimientos es evidente en las poblaciones 2 y 3, donde para términos de profundidad en la población 2 se puede observar como los individuos se distribuyen hacia los grupos de conocimiento A y D, es decir conocen o no sobre la enfermedad, a diferencia de lo observado en la población 3 que tiende a ser decreciente a medida que los grupos avanzan en profundidad de los conocimiento, situación que se evidencia incluso en sistemas de educación donde la información es insuficiente y las actitudes hacia la enfermedad son pobres (Graciano-Machuca, Velarde-de la Cruz et al. 2013). Ahora bien, para establecer las diferencias encontradas en términos de calidad se puede observar los resultados en las dos poblaciones correspondientes al conocimiento de los primeros síntomas de la enfermedad, donde la población 2 reconoce en casi un 100 % la aparición de manchas rojas y la pérdida de la sensibilidad como

primeros síntomas, a diferencia de lo observado en la población 3 que identifica signos más inespecíficos o estigmatizantes como las erupciones, las ronchas, úlceras y llagas o la pérdida de partes del cuerpo, por lo tanto, consideramos que probablemente el enfermo de Hansen podría ser el mejor promotor del diagnóstico e identificación oportuna de su enfermedad.

Los resultados obtenidos en este primer análisis para la población 3 son similares a lo registrado en el estudio realizado por Montenegro I. *et-al*, en el que determinó que el 17 % de la población perteneciente al Limonar - Cuba tiene conocimientos adecuados, sugiriendo la necesidad de una intervención educativa para la población analizada. Adicionalmente otros estudios en poblaciones universitarias, personal de salud e inclusive médicos tratantes, han demostrado la necesidad de establecer estrategias de educación que permitan identificar y reducir el nivel de ignorancia sobre la enfermedad y así promover actitudes que permitan la identificación de los enfermos (Ramirez-Soltero 1990; Valera 2006; Ana Esmérida Delisle Griñán 2011; Fundora 2011).

Para involucrar al enfermo como partícipe de un programa de identificación y prevención de la lepra, es necesario retirar de él y de su entorno, los temores actitudes y estigmas de la enfermedad, iniciando desde la fuente de sus conocimientos, para que no sea adquirido por personal de salud después del diagnóstico(65 - 82 %) o por los medios de comunicación (61 - 81 %), que sea un conocimiento dirigido y establecido desde un programa de control de la enfermedad aplicable inicialmente al entorno regional y porque nocontrascendencia nacional(Ana Esmérida Delisle Griñán 2011; Graciano-Machuca, Velarde-de la Cruz et al. 2013).

Los conocimientos adecuados en nuestro estudio demuestran que podrían ser una estrategia oportuna para la reducción del temor en el enfermo de Hansen bien sea dirigidos hacia la transmisión de la enfermedad 77 - 40%, la identificación 58 - 55

% o el rechazo 50 - 25 %, dado que el temor en el enfermo promueve ocultamiento y aislamiento más aún si se desconoce o se tienen conocimientos errados sobre su enfermedad, por lo tanto el sistema de salud pública es un participante importante en la educación del enfermo y su entorno, observándose en países desarrollados que la inclusión de la salud pública en la educación de Hansen reduce considerablemente el estigma y promueve la reinserción social del afectado(Roosta, Black et al. 2013).

Como consecuencia del estigma el enfermo analizado se ve afectado en sus relaciones personales, familiares, en la comunidad o actividades cotidianas, se observó una reducción constante de las actividades a medida que se amplía el espacio para compartir con la población general, hacia la inmersión única con familiares y amigos, característica observada en un porcentaje no mayor al 70 % de la población 2 y un descenso de las actividades deportivas, productivas, culturales y políticas por debajo de 10 % de la población analizada, influyendo considerablemente en el aislamiento social progresivo, probablemente inductor de desórdenes siquiátricos depresivos. Aspectos psicosociales revisados previamente por Singh GP en 2012 (Singh 2012).

Las condiciones laborales del enfermo son un aspecto importante para considerarlos como personas productivas y socialmente activas, pero solo el 54 % de la población poseen una condición laboral remunerada, de los cuales el 82 % presenta ocultamiento de su enfermedad como evidencia del estigma durante su entorno laboral. Adicionalmente el 72 % de la población 2 expresó dificultades en comentar su estado de enfermedad a los demás, alegando sentir la posibilidad de rechazo, maltrato, crítica, incursión en su intimidad, pena o asco por parte de la población general, por lo tanto el enfermo observa que la población no enferma tiene actitudes estigmatizantes hacia él por su condición, siendo de extrema importancia intervenir no solo a la población afectada sino a la población general,

con el interés de mejorar el entorno y la reinserción social del enfermo(Buckingham 2011).

Las actitudes estigmatizantes en la población general son evidentes en la figura N°24, donde mediante el establecimiento de la correlación entre el temor al contagio y el rechazo, se observó cómo la población 3 inducida por el temor modifica sus conductas sociales evitando realizar actividades compartidas con el enfermo de Hansen(Salvador Álvarez M de J 2002), hasta llegar al punto de no compartir la convivencia en el hogar, en la zona educativa o laboral y durante el contacto directo o contacto en áreas públicas, reduciendo el espacio de permanencia del enfermo y quedando como única opción el aislamiento, actitud aun observada en la actualidad y evidenciada cientos de años atrás (Buckingham 2011; Poestges 2011),

El aislamiento no solo es visible en las actitudes expresadas por la población 3, sino que por encima de 60 % de los grupos B y C lo consideran como parte de la enfermedad, adicionalmente el total de la población 3 establece para el enfermo su relación con 2 estereotipos: la denominación “leproso” indicada en más del 60% de la población 3 y presente en los cuatro grupos de conocimiento, como un estereotipo con la identificación de la enfermedad de Hansen en una persona que aun no posee síntomas visibles. La denominación “deforme” que es la representación directa de la presencia de discapacidad en el paciente enfermo de Hansen, para lo cual los grupos C y D de la población 3 lo relacionan en más del 60 % con la población enferma ver figura N° 28a. Análisis actuales sobre componentes del estigma y apariencias de los enfermos han sido desarrollados, pero asociaciones de los estereotipos con relación a los conocimientos de la población no enferma aun no han sido publicados(Rafferty 2005; Roosta, Black et al. 2013).

Como análisis final de la población 3 se realizó una comparación con distintos indicadores no asociados con el estigma, esto con el interés de establecer si la población de estudio asociaba a la enfermedad de Hansen con la pobreza, el hacinamiento, el bajo nivel educativo o el castigo bíblico y se observó la inclinación de los distintos grupos hacia los componentes e indicadores del estigma, concluyendo que la población santandereana que participó en este trabajo posee actitudes estigmatizantes hacia los enfermos de Hansen, las cuales aumentan a medida que se adquiere conocimiento de la enfermedad, desplazamiento de los grupos observado en el componente b de la figura N°28.

Este análisis permite postular la necesidad de direccionar los conceptos sobre la enfermedad hacia el objetivo del Plan Estratégico de Colombia para Aliviar la Carga de la Enfermedad y Sostener las Actividades de Control de Lepra 2010-2015 y el Plan de Reducción de La Carga de Morbilidad Debida a la Lepra 2011-2015 propuesto por la OMS, permitiendo a futuro orientar los conocimientos de la población sobre diagnóstico, transmisión y tratamiento hacia la identificación temprana del enfermo y reducción de la discapacidad.

Basado en los objetivos propuestos por la OMS, el Plan Nacional y los hallazgos obtenidos en este trabajo proponemos, la implementación rutinaria de la estrategia de identificación de *M. leprae* en muestras de moco, linfa y biopsia de piel, de la mano con la realización de intervenciones edu-comunicativas directas en un lenguaje claro y acorde con el interlocutor sobre la enfermedad de Hansen en la Zona Metropolitana de Bucaramanga, realizando énfasis en el diagnóstico, los mecanismos de transmisión, la identificación de los primeros síntomas y establecimiento del esquema de tratamiento, pretendiendo sensibilizar a la población sobre la importancia de identificación temprana del enfermo que permita la reducción de la discapacidad grado II y disminuir el número de casos multibacilares para contribuir al control de la enfermedad.

7. DIFUSIÓN, PARTICIPACIÓN EN EVENTOS Y PASANTÍAS DE INVESTIGACIÓN

7.1 DIFUSIÓN

- **International congress tuberculosis, leprosy and mycobacteriosis: back to biblical times, today solution. VI meeting of the SLAMTB 2012.**
Universidad Industrial de Santander.
Septiembre 26 – 28 2012
Expositor Oral “Social Leprosy of Santander”
- **34th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology.**
European Society of Mycobacteriology, Florencia, Italia
Junio 30 – 03 Julio de 2013
Poster “The disability in leprosy due to social stigma”

7.2 PARTICIPACIÓN EN EVENTOS

- **Curso: Infectious Substance Shipping Transportation**
Universidad Industrial de Santander
24 y 25 de Septiembre de 2012
Asistente
- **Curso: Conceptos generales y condiciones de manejo de las cabinas de bioseguridad.**
Universidad Industrial de Santander
25 de Septiembre de 2012
Asistente.

7.3 PASANTÍAS DE INVESTIGACIÓN

- **Instituto Oswaldo Cruz, Fundación Oswaldo Cruz, Laboratorio de Biología Molecular Aplicada a Micobacterias, Rio de Janeiro-Brasil.**

15 – 29 de Noviembre de 2013

Entrenamiento en el análisis de fragmentos para genotipificación del *Mycobacterium leprae*.

- **Universidad CES Medellín, Instituto Colombiano de Medicina Tropical.**

Entrenamiento en técnicas de identificación de *Mycobacterium leprae*.

BIBLIOGRAFÍA

- ❖ AGUAS, Terencio, *et al.* Historia de la Terapéutica de la Lepra. En: LEPROLOGÍA. Marzo, 2001. vol. 4, no. 2, p.117-124.
- ❖ ALMEIDA, Elza, *et al.* Detection of Mycobacterium leprae DNA by polymerase chain reaction in the blood and nasal secretion of Brazilian household contacts.En: Mem Inst Oswaldo Cruz.Noviembre, 2004. vol. 99, no. 5,p. 509-511.
- ❖ BALASUBRAMANIAN, Deepak, *et al.* A dynamic and intricate regulatory network determines Pseudomonas aeruginosa virulence. En:Nucleic Acids Res. Noviembre, 2013. vol. 41, no.1, p. 1-20.
- ❖ BANERJEE, Surajita, *et al.* Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. En: Int J Dermatol.Diciembre, 2011. vol. 50, no. 12, p. 1522-1527.
- ❖ BRITTON, Warwick, *et al.* Leprosy. En: Lancet. Abril, 2004. vol. 363, no.9416, p. 1209-1219.
- ❖ BUCKINGHAM, Jane, *et al.* The inclusivity of exclusion: isolation and community among leprosy-affected people in the South Pacific.En: Health History. Febrero, 2011. vol. 13, no.2, p. 65-83.
- ❖ BUHRER-SEKULA, Samira, *et al.* The additional benefit of the ML Flow test to classify leprosy patients. En: Acta Trop. Agosto,2009. vol. 111, no.2, p. 172-176.
- ❖ BUHRER-SEKULA, Samira, *et al.* The relation between seroprevalence of antibodies against phenolic glycolipid-I among school children and leprosy endemicity in Brazil. En: Rev Soc Bras Med Trop. Agosto, 2008. vol. 41, no. 2, p. 81-88.
- ❖ CARDONA-CASTRO, Nora, *et al.* Leprosy in Colombia: post elimination stage?. En: Lepr Rev. Septiembre, 2013. vol. 84, no.3, p. 238-247.

- ❖ CARDONA-CASTRO, Nora, *et al.* Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. En: Mem Inst Oswaldo Cruz. Junio,2008. vol. 103, no.4, p. 332-336.
- ❖ CARDONA-CASTRO, Nora, *et al.* *Mycobacterium leprae* in Colombia described by SNP7614 in *gyrA*, two minisatellites and geography.En: Infect Genet Evol. Marzo,2013. vol. 14, no. 1, p. 375-382.
- ❖ CARDONA-CASTRO, Nora, *et al.* Identification and comparison of *Mycobacterium leprae* genotypes in two geographical regions of Colombia.En: Lepr Rev. Septiembre,2009. vol. 80, no.3, p. 316-321.
- ❖ COLE, Stewart, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. En: Nature. Junio,1998. vol. 393, no. 6685, p. 537-544.
- ❖ COLE, Stewart, *et al.* Massive gene decay in the leprosy bacillus.En: Nature. Febrero,2001. vol. 409, no.6823, p. 1007-1011.
- ❖ COLE, Stewart,*et al.* Repetitive sequences in *Mycobacterium leprae* and their impact on genome plasticity. En: Lepr Rev. Diciembre 2001. vol. 72, no.4, p. 449-461.
- ❖ DAS, S, *et al.* Malaria incidence in leprosy patients under dapsone therapy in Karbi-Anglong district, Assam.En: J Commun Dis. Junio,1982. vol. 14, no. 2, p. 134-137.
- ❖ DE WIT, M, *et al.* Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens.En: J Clin Microbiol. Junio,1993. vol. 31, no.3, p. 502-506.
- ❖ DE WIT, M, *et al.* Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. En: J Clin Microbiol. Mayo, 1991. vol. 29, no.5, p. 906-910.
- ❖ DE WIT, M, *et al.* *Mycobacterium leprae* isolates from different sources have identical sequences of the spacer region between the 16S and 23S ribosomal RNA genes.En: Microbiology. Agosto,1994. vol. 140, no. 8, p. 1983-1987.

- ❖ DOMINGUEZ, M. Carbuncle (anthrax) as biological weapon. En: An R Acad Nac Med. Marzo 2001. vol. 118, no.4, p. 961-980.
- ❖ DONOGHUE, H, *et al.* PCR primers that can detect low levels of Mycobacterium leprae DNA. En: J Med Microbiol. Febrero, 2001. vol. 50, no.2, p. 177-182.
- ❖ EIGLMEIER, K, *et al.* The decaying genome of Mycobacterium leprae. En: Lepr Rev. Diciembre, 2001. vol. 72, no.4, p. 387-398.
- ❖ FIALLO, P, *et al.* Effects of fixation on polymerase chain reaction detection of Mycobacterium leprae. En: J Clin Microbiol. Diciembre, 1992. vol. 30, no. 12, p. 3095-3098.
- ❖ FILICE, G, *et al.* Lack of observed association between armadillo contact and leprosy in humans. En: Am J Trop Med Hyg. Enero, 1977. vol. 26, no.1, p. 137-139.
- ❖ FONTES, A, *et al.* Genotyping of Mycobacterium leprae present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. En: Mem Inst Oswaldo Cruz. Diciembre, 2012. vol. 107, no. 1, p. 143-149.
- ❖ FSIHI, H. *et al.* The Mycobacterium leprae genome: systematic sequence analysis identifies key catabolic enzymes, ATP-dependent transport systems and a novel *polA* locus associated with genomic variability. En: Mol Microbiol. Junio, 1995. vol. 16, no. 5, p. 909-919.
- ❖ FUNDORA, F. *et al.* Nivel de conocimientos de Lepra en la población de un consultorio médico. En: Biblioteca Virtual en Salud CUBA. Abril, 2011. vol. 5, no. 1, p. 1-7.
- ❖ GOMEZ-VALERO, L, *et al.* Reconstructing the ancestor of Mycobacterium leprae: the dynamics of gene loss and genome reduction. En: Genome Res. Julio, 2007. vol. 17, no.8, p. 1178-1185.
- ❖ GOULART, I, *et al.* Detection of Mycobacterium leprae DNA in skin lesions of leprosy patients by PCR may be affected by amplicon size. En: Arch Dermatol Res. Agosto, 2007. vol. 299, no.5, p. 267-271.

- ❖ GRACIANO-MACHUCA, O, *et al.* University students' knowledge and attitudes towards leprosy. En: J Infect Dev Ctries. Septiembre, 2013. vol. 7, no.9, p. 658-664.
- ❖ GREEN, E, *et al.* Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of Mycobacterium paratuberculosis. En: Nucleic Acids Res. Noviembre, 1989. vol. 17, no.22, p. 9063-9073.
- ❖ GRIÑÁN, Ana, *et al.* Modificación de conocimientos sobre lepra en la atención primaria de salud. En: MEDISAN. Febrero, 2001. vol. 15, no. 6, p. 745-753.
- ❖ GROSSKINSKY, C, *et al.* Genetic relationships among Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, and candidate leprosy vaccine strains determined by DNA hybridization: identification of an M. leprae-specific repetitive sequence. En: Infect Immun. Mayo, 1989. vol. 57, no.5, p. 1535-1541.
- ❖ GUERRERO, M, *et al.* Developing and using a PCR test to detect subclinical Mycobacterium leprae infection. En: Rev Panam Salud Publica. Abril, 2002. vol. 11, no. 4, p. 228-234.
- ❖ HASSELBLAD, O, *et al.* Aspectos Psicosociales de la Lepra. En: Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. Enero, 1975. vol. 1, no. 1, p. 422-429.
- ❖ JAMIL, S, *et al.* Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. En: Lancet. Julio, 1993. vol. 342, no.8866, p. 264-268.
- ❖ JOB, C, *et al.* Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. En: Am J Trop Med Hyg. Marzo, 2008. vol. 78, no. 3, p. 518-521.
- ❖ JOHN, H, *et al.* Translating leprosy: the expert and the public in Stanley Stein's anti-stigmatization campaigns, 1931-60. En: J Hist Med Allied Sci. Octubre, 2013. vol. 68, no.4, p. 659-687.
- ❖ KAMBLE, R, *et al.* Extraction and detection of Mycobacterium leprae DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. En: Indian J Med Microbiol. Enero, 2010. vol. 28, no.1, p. 57-59.

- ❖ KAMPIRAPAP, K, *et al.* DNA amplification for detection of leprosy and assessment of efficacy of leprosy chemotherapy. En: Int J Lepr Other Mycobact Dis. Marzo, 1998. vol. 66, no. 1, p. 16-21.
- ❖ KAZEEM, O, *et al.* Leprosy stigma: ironing out the creases. En: Lepr Rev. Junio, 2011. vol. 82, no.2, p. 103-108.
- ❖ KELLERSBERGER, E, *et al.* The social stigma of leprosy. En: Ann N Y Acad Sci Marzo, 1951. vol. 54, no.1, p. 126-133.
- ❖ KHAN, I, *et al.* Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. En: Transbound Emerg Dis. Junio, 2013. vol. 60, no.3, p. 204-221.
- ❖ KHANOLKAR-YOUNG, S, *et al.* Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. En: Clin Exp Immunol. Febrero, 1995. vol. 99, no.2, p. 196-202.
- ❖ KIMURA, M, *et al.* Rapid variable-number tandem-repeat genotyping for Mycobacterium leprae clinical specimens. En: J Clin Microbiol. Junio, 2009. vol. 47, no. 6, p. 1757-1766.
- ❖ KIRCHHEIMER, W, *et al.* Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. En: Int J Lepr Other Mycobact Dis. Noviembre, 1971. vol. 39, no.3, p. 693-702.
- ❖ KRAMME, S, *et al.* Detection and quantification of Mycobacterium leprae in tissue samples by real-time PCR. En: Med Microbiol Immunol. Noviembre, 2004. vol. 193, no. 4, p. 189-193.
- ❖ KRUTZIK, S, *et al.* Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. En: Nat Med. Abril, 2003. vol. 9, no.5, p. 525-532.
- ❖ LAHIRI, R, *et al.* Application of a viability-staining method for Mycobacterium leprae derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. En: J Med Microbiol. Marzo, 2005. vol. 54, no.3, p. 235-242.

- ❖ LAI, J, *et al.* Epithelioid histiocytic infiltrate caused by Mycobacterium scrofulaceum infection: a potential mimic of various neoplastic entities.En: Am J Dermatopathol. Abril,2013. vol. 35, no. 2, p. 266-269.
- ❖ LAVANIA, M, *et al.* Detection of viable Mycobacterium leprae in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy.En: Infect Genet Evol. Septiembre,2008. vol. 8, no.5, p. 627-631.
- ❖ LAVANIA, M, *et al.* Cohort study of the seasonal effect on nasal carriage and the presence of Mycobacterium leprae in an endemic area in the general population. En: Clin Microbiol Infect. Octubre, 2013. vol. 19, no.10, p. 970-974.
- ❖ LIENHARDT, C, *et al.* Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy. What is the current epidemiological situation?. En: Lepr Rev.Marzo, 1994. vol. 65, no.1, p. 9-33.
- ❖ LOCKWOOD, D. Leprosy elimination-a virtual phenomenon or a reality?. En: BMJ. Junio, 2002. vol. 324, no.7352, p. 1516-1518.
- ❖ LUPSKI, J, *et al.* Chromosomal duplications in bacteria, fruit flies, and humans. En: Am J Hum Genet. Enero, 1996. vol. 58, no.1, p. 21-27.
- ❖ MARAZZI, M, *et al.* Disseminated Mycobacterium scrofulaceum infection in a child with interferon-gamma receptor 1 deficiency.En: Int J Infect Dis. Octubre, 2010. vol. 14, no.2, p.167-170.
- ❖ MATSUOKA, M, *et al.* Mycobacterium leprae DNA in daily using water as a possible source of leprosy infection.En: Indian J Lepr. Enero, 1999. vol. 71, no.1, p. 61-67.
- ❖ MATSUOKA, M, *et al.* Mycobacterium leprae typing by genomic diversity and global distribution of genotypes.En: Int J Lepr Other Mycobact Dis. Junio, 2000. vol. 68, no.2, p. 121-128.
- ❖ MONOT, M, *et al.* On the origin of leprosy.En: Science. Mayo, 2005. vol. 308, no. 5724, p. 1040-1042.
- ❖ MOURA, D, *et al.* CD163 favors Mycobacterium leprae survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. En: Eur J Immunol. Noviembre, 2012. vol. 42, no.11, p. 2925-2936.

- ❖ MOURA, R, *et al.* Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. En: Rev Soc Bras Med Trop. Diciembre, 2008. vol. 41, no. 2, p. 11-18.
- ❖ NOORDEEN, S. Elimination of leprosy as a public health problem.En: Indian J Lepr. Enero, 1994. vol. 66, no.1, p. 1-10.
- ❖ PANNIKAR, V. Enhanced global strategy for further reducing the disease burden due to leprosy: 2011-2015.En: Lepr Rev. Diciembre, 2009.vol. 80, no.4, p. 353-354.
- ❖ PATTYN, S, *et al.* Detection of Mycobacterium leprae by the polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. En: Int J Lepr Other Mycobact Dis. Septiembre,1993. vol. 61, no.3, p. 389-393.
- ❖ PHETSUKSIRI, B, *et al.* A simplified reverse transcriptase PCR for rapid detection of Mycobacterium leprae in skin specimens.En: FEMS Immunol Med Microbiol. Octubre, 2006. vol. 48, no.3, p. 319-328.
- ❖ PLIKAYTIS, B, *et al.* Rapid and sensitive detection of Mycobacterium leprae using a nested-primer gene amplification assay.En: J Clin Microbiol. Septiembre, 1990. vol. 28, no.9, p. 1913-1917.
- ❖ POESTGES, H. Leprosy, the key to another kingdom.En: Lepr Rev. Junio, 2011. vol. 82, no. 2, p. 155-167.
- ❖ QUILES, F, *et al.* La organización del estigma en categorías: actualización de la taxonomía de Goffman.En: Psicothema. Enero, 2000. vol. 12, no. 1, p. 458-465.
- ❖ RAFFERTY, J. Curing the stigma of leprosy.En: Lepr Rev. Junio (2005). vol. 76, no. 2, p. 119-126.
- ❖ RAFI, A, *et al.* Application of polymerase chain reaction for the detection of Mycobacterium leprae DNA in specimens from treated leprosy patients. En: Int J Lepr Other Mycobact Dis. Marzo, 1995. vol. 63, no. 1, p. 42-47.
- ❖ RAMBUKKANA, A. Molecular basis for the peripheral nerve predilection of Mycobacterium leprae.En: Curr Opin Microbiol. Febrero, 2001. vol. 4, no.1, p. 21-27.

- ❖ RAMBUKKANA, A, *et al.* Contact-dependent demyelination by *Mycobacterium leprae* in the absence of immune cells. En: Science. Mayo, 2002. vol. 296, no.5569, p. 927-931.
- ❖ RAMIREZ-SOLTERO, S. Nivel de conocimientos sobre Lepra en estudiantes universitarios. En: Salud Pública de Mexico. Octubre, 1990. vol. 32, no.5, p. 583-588.
- ❖ RASTOGI, N, *et al.* The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. En: Rev Sci Tech. Abril, 2001. vol. 20, no.1, p. 21-54.
- ❖ REES, R. J. New prospects for the study of leprosy in the laboratory. En: Bull World Health Organ. Julio, 1969. vol. 40, no. 5, p. 785-800.
- ❖ RIDLEY, D, *et al.* Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. En: Int J Lepr Other Mycobact Dis. Julio, 1966. vol. 34, no.3, p. 255-273.
- ❖ ROMERO-SALAZAR, A, *et al.* The stigma in the social representation of leprosy. En: Cad Saude Publica. Octubre, 1995. vol. 11, no.4, p. 535-542.
- ❖ ROOSTA, N, *et al.* A comparison of stigma among patients with leprosy in rural Tanzania and urban United States: a role for public health in dermatology. En: Int J Dermatol. Abril, 2013. vol. 52, no.4, p. 432-440.
- ❖ RYAN, M, *et al.* *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. En: Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Marzo, 2013. vol. 33, no. 3, p. 291-304.
- ❖ SAAD, M, *et al.* Use of the anti-PGL-I antibody ELISA and the Mitsuda reaction in early diagnosis of leprosy. En: Braz J Med Biol Res. Julio, 1991. vol. 24, no.8, p. 801-805.
- ❖ SALAZAR, A. R. La Lepra: Invisibilidad y Estigma. En: Opción. Diciembre, 2001. vol. 17, no. 1, p. 11-42.
- ❖ SALVADOR-ÁLVAREZ M, *et al.* Lepra temida o desconocida. Capacitación a enfermos y familiares. En: MEDISAN. Febrero, 2002. vol. 6, no. 2, p. 50-55.
- ❖ SANTOS, A, *et al.* Use of PCR-mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for the diagnosis of leprosy. En: J Med Microbiol. Octubre, 1993. vol. 39, no. 4, p. 298-304.

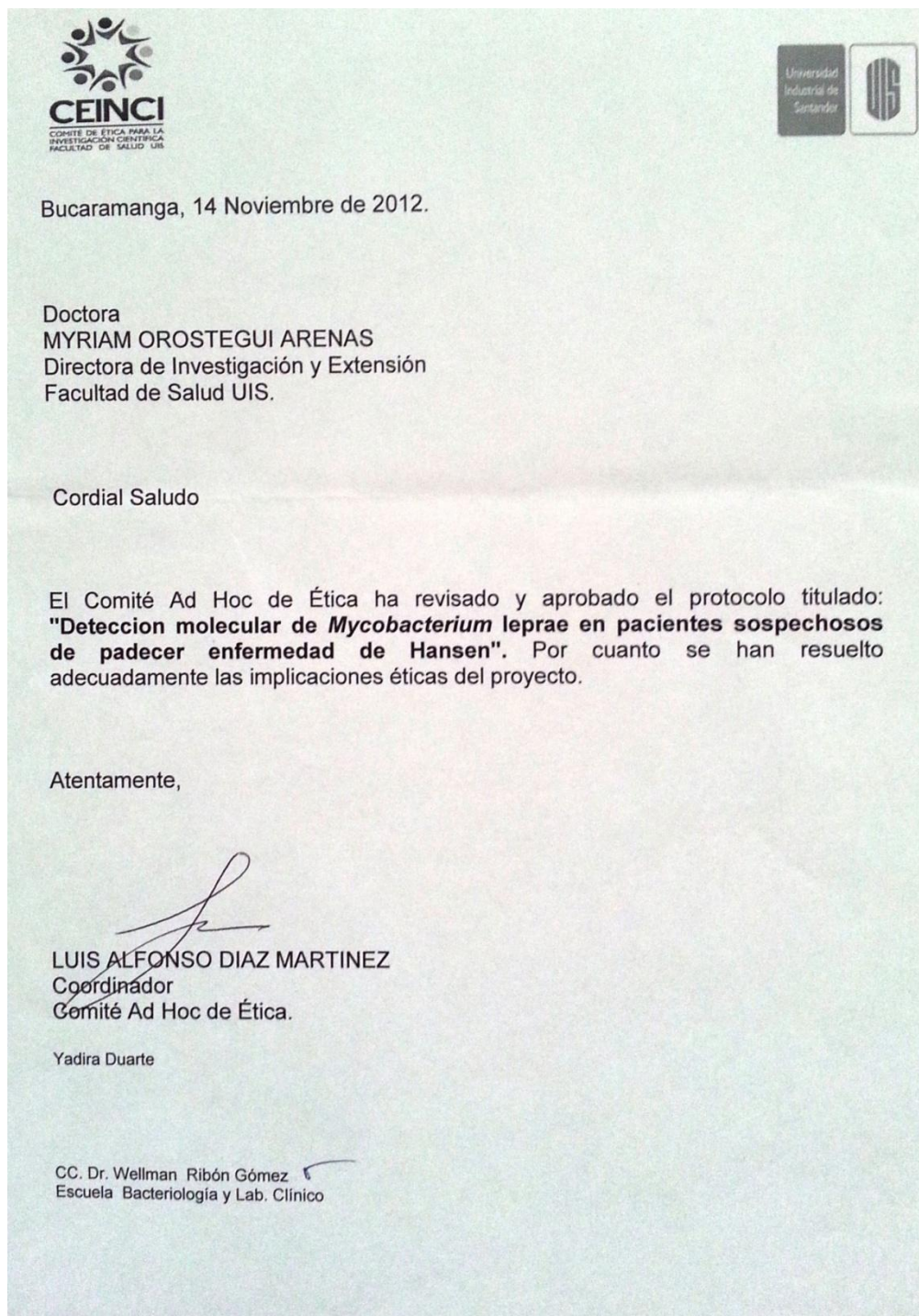
- ❖ SARNO, E, *et al.* Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. En: Clin Exp Immunol. Abril, 1991. vol. 84, no.1, p. 103-108.
- ❖ SCOLLARD, D, *et al.* The continuing challenges of leprosy. En: Clin Microbiol Rev. Abril, 2006. vol.19, no.2, p. 338-381.
- ❖ SHEPARD, C. Multiplication of Mycobacterium leprae in the foot-pad of the mouse. En: Int J Lepr. Julio, 1962. vol. 30, no. 1, p. 291-306.
- ❖ SHEPARD, C. *et al.* A method for counting acid-fast bacteria. En: Int J Lepr Other Mycobact Dis, Enero, 1968. vol. 36, no.1, p. 78-82.
- ❖ SHIMOJI, Y, *et al.* A 21-kDa surface protein of Mycobacterium leprae binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. En: Proc Natl Acad Sci U S A. Agosto, 1999. vol. 96, no. 17, p. 9857-9862.
- ❖ SINGH, G. Psychosocial aspects of Hansen's disease (leprosy). En: Indian Dermatol Online J. Septiembre, 2012. vol. 3, no.3, p. 166-170.
- ❖ SUN, Y, *et al.* Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to examine genetic diversity of Mycobacterium tuberculosis in Singapore. En: J Clin Microbiol. Mayo, 2004. vol. **42**, no. 5, p. 1986-1993.
- ❖ SUN, Y, *et al.* Characterization of ancestral Mycobacterium tuberculosis by multiple genetic markers and proposal of genotyping strategy. En: J Clin Microbiol. Noviembre, 2004. vol. 42, no.11, p. 5058-5064.
- ❖ SUPPLY, P, *et al.* Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of Mycobacterium tuberculosis based on mycobacterial interspersed repetitive units. En: J Clin Microbiol. Octubre, 2001. vol. 39, no. 10, p. 3563-3571.
- ❖ SUZUKI, K, *et al.* High-level expression of pseudogenes in Mycobacterium leprae. En: FEMS Microbiol Lett. Junio, 2006. vol. 259, no.2, p. 208-214.
- ❖ THIERRY, D, *et al.* Characterization of a Mycobacterium tuberculosis insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. En: J Clin Microbiol. Diciembre, 1990. vol. 28, no.12, p. 2668-2673.

- ❖ THOLE, J, *et al.* A major immunogenic 36,000-molecular-weight antigen from *Mycobacterium leprae* contains an immunoreactive region of proline-rich repeats. En: *Infect Immun.* Enero, 1990. vol. 58, no.1, p. 80-87.
- ❖ TRUMAN, R, *et al.* Viable *M. leprae* as a research reagent. En: *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* Junio, 2001. vol. 69, no.1, p. 1-12.
- ❖ VALERA, I. Conocimientos de los médicos de la familia sobre Lepra. En: *Revista Cubana de Medicina General Integral.* Diciembre,2006. vol. 22, no. 1, p. 1-10.
- ❖ VAN BEERS, S, *et al.* Patient contact is the major determinant in incident leprosy: implications for future control.En: *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* Junio, 1999. vol. 67, no. 2, p. 119-128.
- ❖ VAN DER VLIET, G, *et al.* A simple colorimetric assay for detection of amplified *Mycobacterium leprae* DNA.En: *Mol Cell Probes.* Febrero, 1993.vol. 7, no.1, p. 61-66.
- ❖ VAN DER VLIET, G, *et al.* Simple colorimetric microtiter plate hybridization assay for detection of amplified *Mycobacterium leprae* DNA. En: *J Clin Microbiol* Marzo, 1993. vol. 31, no.3, p. 665-670.
- ❖ VAN DER ZANDEN, A, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex in paraffin wax embedded tissues and in stained microscopic preparations.En: *Mol Pathol.* Agosto,1998. vol. 51, no. 4, p. 209-214.
- ❖ VAN SOOLINGEN, D, *et al.* Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. En: *J Clin Microbiol.* Noviembre,1991. vol. 29, no.11, p. 2578-2586.
- ❖ VAN VOORHIS, W, *et al.* The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and the predominant T-cell phenotypes. En: *N Engl J Med.* Diciembre,1982. vol. 307, no.26, p. 1593-1597.

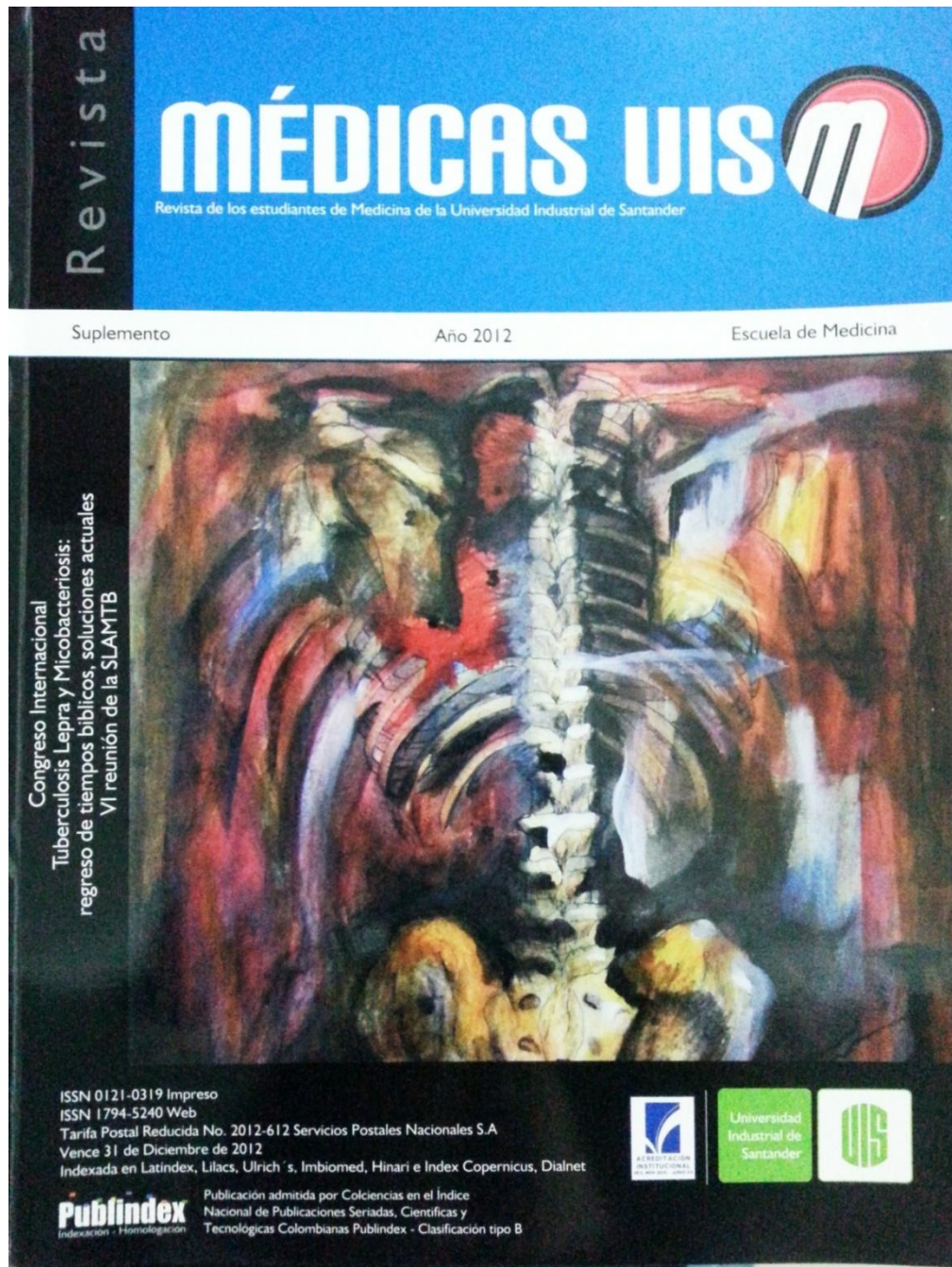
- ❖ VIDAL PESSOLANI, M, *et al.* Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role?. En: Microbes Infect. Junio, 2003. vol. 5, no.7, p. 677-684.
- ❖ WHO. Chemotherapy of leprosy for control programmes. World Health Organ.En:Tech Rep Ser. Enero,1982. vol. 675, no. 1, p. 1-33.
- ❖ WHO. Surveillance of drug resistance in leprosy: 2010.En: Wkly Epidemiol Rec.Agosto, 2011. vol. 86, no.23, p. 317-328.
- ❖ WHO. Global leprosy: update on the 2012 situation.En: Wkly Epidemiol Rec Agosto, 2013. vol. 88, no. 35, p. 365-379.
- ❖ WOODS, S, *et al.* A rapid method for the detection of potentially viable Mycobacterium leprae in human biopsies: a novel application of PCR. En: FEMS Microbiol Lett. Diciembre, 1989. vol. 53, no. 3, p. 305-309.
- ❖ YOON, K,*et al.* Evaluation of polymerase chain reaction amplification of Mycobacterium leprae-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients.En: J Clin Microbiol. Abril, 1993. vol. 31, no.4, p. 895-899.

ANEXOS

Anexo A. Aprobación comité de ética



Anexo B. Portada de revista que publicó memorias ponencia internacional



Anexo C. Memorias ponencia internacional

UIS 020

Social leprosy in Santander

Estupiñán-Velásquez H.^{1,2}; Villa D.²; Ribón W.¹

¹Industrial University of Santander, ²UIS: Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular "GIEM"
³Biomedical Sciences Master Student
⁴Health Secretary of Santander
 email: hees_v@hotmail.com; wellmanribon@yahoo.es

Introduction: Hansen disease (Hd) is a chronic infection caused by *Mycobacterium leprae*, it is strange by the ordinary people and that is why some persons develop stigmatizing attitudes. **Objective:** To determinate during the 2011 – 2012 the knowledge about Hd current on the society of Santander. **Methodology:** This study was completed in 2011-2012 in communities from Santander Colombia, the populations were selected by sampling simple random and using an instrument for data recollection, compose by: a first part designated for the collection of socio demographic data; second block for determinate the actually situation in the knowledge over Hd. We categorized four groups:

28

SEPTEMBER OPENING ABSTRACTS

Group A: People having heard about Hd.
 Group B: People Knowing about Hd and its contagious mechanism
 Group C: People Knowing about Hd, it's contagious mechanism and first symptoms
 Group D: People Knowing about Hd, it's contagious mechanism and first symptoms, treatment and cure of Hd.

The third part was composed by direct questions to determinate the origin of their Knowledge's. In addition, we determinate attitudes when contact with a sick person, either during the coexistence in the home, living in the workplace, direct contact or by sharing public spaces and others. The analysis was carried out using the "Excel 2007" licensed on the UIS. **Results and discussion:** 120 person resident in Bucaramanga, Floridablanca, Girón y Piedecuesta answer this study, 65% was women and 70% have superior study, and was determinate four different grade of knowledge A, B, C and D group, considering the D group as the people with most knowledge about Hd, 45% of the people was the group A, 23% the B, 9% C and 22% group D. The most constant age for the A-D group was the people between the 20 – 50 years old, although the most dominant age was less o equal to 25 years old. In terms of the gender, the female group was the most abundant in the different classification. See Graphic 1. The origin of theirs knowledge was for the 60% of the people the media as a source followed by the acquisition of the information by another. Finally, the 55% of the people are afraid of the contagion if are in contact with sick people and express negative attitude towards cohabitation, direct contact, coexistence in the workplace, public spaces and others.

Group	Municipality	% of female	% of male
A (45%)	Bucaramanga	70	30
	Floridablanca	65	35
	Girón	20	80
	Piedecuesta	15	85
B (23%)	Bucaramanga	65	35
	Floridablanca	84	16
	Girón	97	3
	Piedecuesta	25	75
C (9.5%)	Bucaramanga	65	35
	Floridablanca	100	0
	Girón	100	0
D (22%)	Bucaramanga	31	69
	Floridablanca	30	70
	Piedecuesta	30	70

Knowledge about Hansen disease ?

Graphic 1. Gender and classification by group of knowledge

Conclusions: Hd is an ancient infection and stigmatizing, and this study is a preliminary effort to determine the knowledge presented by the resident population in northeastern Colombia, it is estimated that the ignorance of the disease is even greater and it is them extremely worrying little is known due to data published by the media, therefore a priority the establishment of an education program to Santander population about the disease, so as to reduce any stigma or attitude that is the starting point for rejection of a patient with Hansen. **Acknowledgment:** The "GIEM" adscript to the "UIS" for allow the development of this work; to the "Secretaría de Salud de Santander" for allow the data bases of patients with Hd. **Funding resources:** The funding resources for the development of the present work were made possible by the "GIEM" adscript to the "UIS".

Key words: Hansen disease "Hd", knowledge, Society and Santander.

29

Anexo D. Certificado ponencia internacional



Anexo E. Portada de revista que publicó memorias poster internacional



Anexo F. Memorias poster internacional

lymph nodes showed intrasinusoidal histiocytosis, pericapsular chronic inflammatory changes without any neoplastic cell infiltration. Her second inguinal lymph node biopsy was reported as diffuse nodular histiocytosis. On the 3rd month, new cervical LAP and exudative ascites were detected. Ascites assessment was inconclusive. Excisional biopsy of new left cervical LAP showed histiocytic infiltration with widespread intra-cytoplasmic acid-fast bacilli. She was then initiated to HRZE regimen. Under this treatment she presented with pulmonary symptoms and reticulonodular infiltration on chest CT. Her ESR and CRP concentrations were persistently high. Because of disease progression under treatment specimen was directed for PCR identification. *M. tuberculosis* was identified by using 16S rDNA sequencing from FFPE-cervical and -inguinal lymph nodes. After having received the unambiguous identification, the treatment was reverted to CLR, CIP, rifabutin, EMB, AMK. At the 10th month of her treatment she presented with chylous ascites. Thoracic duct injury was suspected but further intervention was postponed because of ascites complications. At the end of the 2nd year of her diagnosis, she died of sepsis due to a secondary bacterial peritonitis attack while she was still under antimycobacterial treatment for more than 20 months.

To our knowledge here we present the 8th case from which *M. tuberculosis* is microbiologically identified as the causative agent and mark *M. tuberculosis* as a pathogen for severe disseminated lymphadenitis in immune-competent patients

P216

THE DISABILITY IN LEPROSY DUE TO SOCIAL STIGMA

Hernando Yesid Estupiñán Velásquez¹, Debora Villa Villa², Wellman Ribon³

¹Grupo de Inmunología Y Epidemiología Molecular, Bucaramanga, Colombia; Master Student Biomedical Science, Universidad Industrial de Santander, Colombia

²Secretaría de Salud de Santander, Bucaramanga, Colombia

³Grupo de Inmunología Y Epidemiología Molecular, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Background: During 2010 leprosy has been the cause of more than 13000 new cases with grade-2 disabilities of the 228,474 reported. As a result, World Health Organization (WHO) implemented a program in order to reduce about 35% the occurrence of disability. In Colombia, disabilities cases are 27 of the 295 new cases, considering Santander department as a locality with a high disease burden, due to 21% of cases with disability. High levels of cases are probably influenced by their location in urban or

rural places or by the appearance of the stigma in the society, such as, the fear to promote isolation of the disease and cause the emergence of stereotypes that segregate the ill, inducing attitudes that difficult it identification and promotes the disability. **Objective:** to determinate social stigma as promoter of disability.

Methods: a data collection tool was applied to 120 people selected by simple random sampling, for establish the socio-demographic characteristics, the knowledge state about leprosy, and the establishment of stigmatizing attitudes. The analysis was carried out by percents using the calculation tool "Excel" with license present in the "UIS". **Result and discussion:** The people was analyzed and classified on A, B, C and D groups according to their concepts about the leprosy, establishing as evaluative judgments, the recognition of the disease, the route of infection, the first symptoms and the state of healing. We detected that about 22% of the population know to depth the disease and 67% says they're not afraid of contagion, but between 60 and 85% of them have 17 different attitudes that evidence ill rejection. In consequence, we identified the existence of gaps on the conception of the disease. 69% of the people most knowledgeable about leprosy expressed attitudes of isolation of the sick and more that 65% related leprosy with leper and misshapen stereotypes, indicating the presence of stigma and rejection of the disease. Therefore it was set for the first time the state of knowledge about leprosy in Santander and it was determined the components of the stigma that affect sick and modifies the attitudes of the groups they frequents, isolating and avoiding its identification, causing the emergence of disability. **Conclusions:** the stigma in Santander people produces attitudes that require a future academic intervention to promote the objectives of the strategy of the WHO for the identification of the sickness and for the reduction of it disability. **Acknowledgments:** *Mycobacterium*, Laboratorio de Investigación y Extensión, Grupo de Inmunología y Epidemiología Molecular, Maestría Ciencias Básicas Biomédicas, Universidad Industrial de Santander, Colombia.

P218

PULMONARY MYCOBACTERIOSIS CAUSED BY MYCOBACTERIUM PEREGRINUM IN AN OLD WOMAN

Ionela Sorina Muntean¹, Adriana Drăgan¹, Daniela Homorodean², Sven Hoffner³

¹Pneumophtisiology Hospital Brasov, România

²Leon Daniello Pneumophtisiology Clinical Hospital Cluj-Napoca, România

³Supranational Reference Laboratory Stockholm, Swedish Institute for Communicable Disease Control, Stockholm, Sweden

A 75 years old woman, never-smoker, with pulmonary simptomatology, was referred to our hospital

Anexo G. Certificados asistencias a eventos o pasantías adicionales

INTERNATIONAL CONGRESS
**TUBERCULOSIS, LEPROSY AND MYCOBACTERIOSIS:
BACK TO BIBLICAL TIMES, TODAY SOLUTIONS**
VI MEETING OF THE SLAMTB 2012

 SLAMTB
Sociedad
Latinoamericana de
Tuberculosis y otras
Mycobacteriosis

Bucaramanga 25 of September 2012

To whom it may concern:

This certifies that Hernando Yesid Estupiñán Velásquez attended the preconference course: "Infectious Substance Shipping Transportation - (16 hours)" in the **INTERNATIONAL CONGRESS TUBERCULOSIS, LEPROSY AND MYCOBACTERIOSIS: BACK TO BIBLICAL TIME, TODAY SOLUTIONS. VI MEETING OF THE SLAMTB 2012.**

Sincerely


Cristina Bressler
Center for Diseases Control
and Prevention - USA


David Bressler
Center for Diseases Control and
Prevention - USA


Wellman Ribón
Universidad Industrial de Santander
Congress president
VI MEETING OF THE SLAMTB 2012

Anexo H. Certificados asistencias a eventos o pasantías adicionales

INTERNATIONAL CONGRESS
TUBERCULOSIS, LEPROSY AND MYCOBACTERIOSIS:
BACK TO BIBLICAL TIMES, TODAY SOLUTIONS
VI MEETING OF THE SLAMTB 2012

Bucaramanga 25 of September 2012

To whom it may concern:


This certifies that Hernando Yesid Estupiñán Velásquez attended the preconference course: "Conceptos generales y condiciones de manejo de las cabinas de bioseguridad - (4 hours)" in the **INTERNATIONAL CONGRESS TUBERCULOSIS, LEPROSY AND MYCOBACTERIOSIS: BACK TO BIBLICAL TIME, TODAY SOLUTIONS. VI MEETING OF THE SLAMTB 2012.**

Sincerely


Wellman Ribón
Universidad Industrial de Santander
Congress president
VI MEETING OF THE SLAMTB 2012


Edgar Sevilla
Asociación Mexicana de Bioseguridad
AMEXBIO

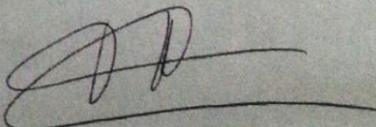
Anexo I. Certificados assistencias a eventos o pasantías adicionales



**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo
Cruz**

Rio de Janeiro, 29 de novembro de 2013

Declaro para os devidos fins, que o pesquisador Hernando Yesid Estupián Velasquez realizou um treinamento em Análise de Fragmentos para genotipagem de *Mycobacterium leprae*, no período de 15/11/2013 a 29/11/2013, no Laboratório de Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.



Dr. Philip Noel Suffys
Chefe do Laboratório de
Biologia Molecular Aplicada a Micobactérias
Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz