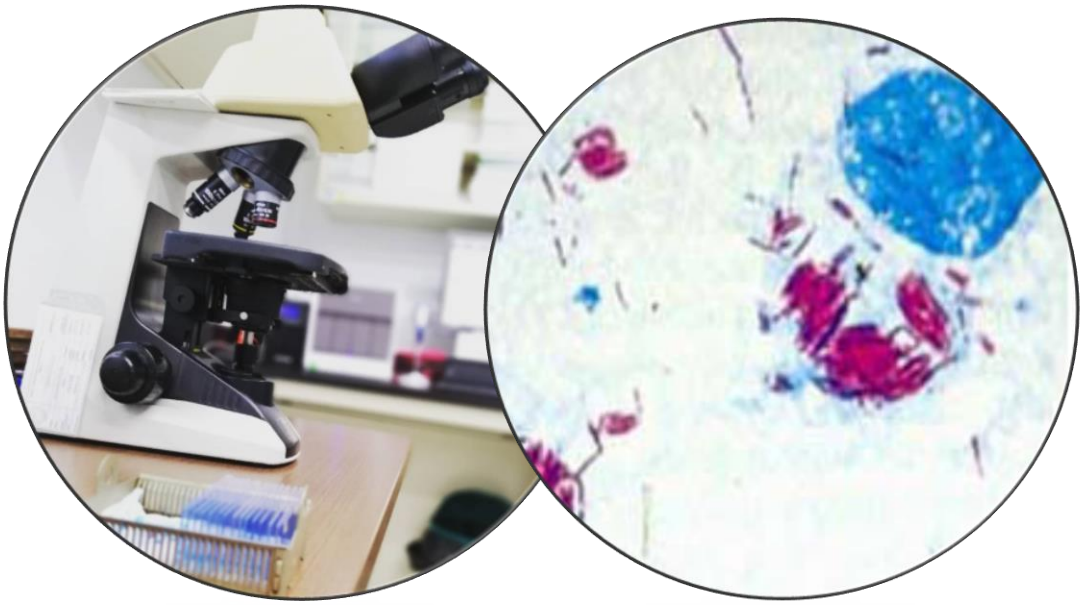
Instituto Conmemorativo Gorgas Estudio de la Salud

Laboratorio Central de Referencia en Salud Pública

Sección de Micobacteriología

Guía Técnica para el Diagnóstico de Lepra en el Laboratorio



	Elaborado por	Revisión	Aprobación
Nombre	Licdo. Juan Domínguez/ Licdo. Prudencio González	Licda. Annie Díaz / Mgter. Samantha Rosas	Dr. Juan M. Pascale
Puesto	Tecnólogo Médico Sección de Micobacteriología	Unidad de Gestión de Calidad / Sección de Micobacteriología	Director del ICGES

Contenido

Tabla de Ilustraciones 3
Introducción 4
Objetivos 5
Definiciones 6
Enfermedad de Hansen (Lepra) 7
Clasificación de Lepra 7
Recepción de muestra en el Laboratorio 10
Registro de laboratorio 11
Tinción del frotis por el método frío de Ziehl-Neelsen 11
Examen microscópico 14
Índice baciloscópico (IB) 16
Índice morfológico (MI) 19
Bacilos enteros 20
Bacilos fragmentados 20
Bacilos granulares 20
Porcentajes de Bacilos S.F.G. 21
Validación de resultados 22
Almacenamiento de placas 23
Tabla de Control de Cambios 24
Referencias 24
Anexos 25

Tabla de Ilustraciones

Ilustración 2. Placas fijadas para teñir..... 14
Ilustración 5. Placa para lectura. Colocar 1 gota aceite inmersión a cada frotis. 15
Ilustración 6. Lectura de frotis iniciando en la parte superior..... 15
Ilustración 7. Lectura de frotis iniciando en la parte inferior..... 15
Ilustración 8. Representación de IB, visto en frotis de acuerdo con la clasificación de Ridley. 17
Ilustración 9. Presencia de BAAR formando "Globia" (flecha) en el examen directo de tinción Ziehl-Neelsen (aumento 40x)..... 19
Ilustración 10. Diagrama representativo de las diferentes formas de M. leprae. 21
Ilustración 11. Aspecto morfológico de Mycobacterium leprae en sus diversas formas. (Ziehl-Neelsen 100x). 22
Ilustración 12. Mycobacterium leprae visto en Globia y aislado. (Ziehl Neelsen 100x). ... 22

Introducción

La enfermedad de Hansen o Lepra es una micobacteriosis clasificada dentro de las enfermedades granulomatosas crónicas, causada por el bacilo intracelular obligatorio *Mycobacterium leprae*, descubierto por Gerhard Hansen en 1873. Afecta la piel y los nervios periféricos, siendo una de las principales causas de neuropatía periférica después de la diabetes mellitus.

En el 2000 se dejó de considerar un problema de salud pública; sin embargo, es endémica en 11 países, y en América se siguen reportando casos, formando parte de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas (EID), definidas como un conjunto de enfermedades de origen infeccioso que en la actualidad persisten exclusivamente en las comunidades más pobres y postergadas del mundo, donde frecuentemente se agrupan y sobreponen. Las manifestaciones clínicas son variadas y dependen de la capacidad inmunológica del individuo en el momento de la infección.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) creó la estrategia mundial contra la Lepra 2016–2020 (Organización Mundial de la Salud, 2017) con el objetivo fortalecer la implicación del gobierno de los países afectados, la coordinación, alianzas y la detención temprana. Además, se han actualizado directrices (Organización Mundial de la Salud, 2018), cuyo objetivo es proporcionar recomendaciones basadas en la evidencia sobre el diagnóstico, tratamiento y prevención de la lepra.

El Ministerio de Salud a través de la Resolución 408 (Ministerio de Salud, 2019), adopta la Guía para el Abordaje Integral de los pacientes con Lepra, llevando el objetivo de brindar al personal de salud un instrumento para el abordaje integral de los pacientes con Lepra, fortalecer la vigilancia epidemiológica (Ministerio de Salud, 2014) y estandarizar los criterios de detección, diagnóstico, tratamiento y alta para los pacientes con Lepra.

Como parte del sistema de salud, esta guía técnica de laboratorio para el diagnóstico de Lepra, complementa los objetivos de la Guía para el Abordaje Integral de los pacientes con Lepra en el país.

Objetivos

- ✓ Proporcionar al personal de laboratorio los lineamientos técnicos necesarios para la recepción, tinción y lectura de la baciloscopia para el diagnóstico bacteriológico de la Enfermedad de Hansen (Lepra).

- ✓ Actualizar los conocimientos del personal de Laboratorio el diagnóstico bacteriológico de la Enfermedad de Hansen (Lepra) y apoyar el diagnóstico bacteriológico a nivel regional y/o local.

Definiciones

BAAR	Bacilos Ácido Alcohol Resistente.
Bacilo de Hansen	Bacilo ácido alcohol resistente, agente etiológico de la enfermedad de Hansen. Una enfermedad infectocontagiosa, crónica, granulomatosa y de evolución lenta, causada por *Mycobacterium leprae.*
Índice Bacteriológico	Es la media de los índices morfológicos de todos los frotis. Indica el grado de contagiosidad del paciente, nos orienta sobre la eficacia del tratamiento o resistencia. Se calcula de la siguiente manera: $\frac{Sumatoria\ en\ cruces\ de\ todos\ los\ frotis\ positivos\ del\ paciente}{N°\ total\ de\ frotis\ del\ paciente}$ Se considera al paciente altamente contagioso por arriba de 2.0.
Índice Morfológico o índice S-F-G	Es el porcentaje de bacilos sólidos, fragmentados y granulados. Relación de bacilos presumiblemente vivos y muertos.
Escala de Ridley	Escala cuantificada normada, que nos da resultados cuantificados en cruces de bacilos o glovis teñidos.
Glovis	Agrupación bacilar en un macrófago en el que los bacilos se han multiplicado hasta reemplazar totalmente su citoplasma. Al observarlo no se visualiza la forma celular, sino un paquete apretado de bacilos. Su presencia es característica de la Lepra Lepromatosa.

Enfermedad de Hansen (Lepra)

La Lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium leprae*, un bacilo conocido como bacilo de Hansen, con forma curva. Es intracelular obligatorio, no cultivable y ácido-alcohol resistente; presenta coloración Ziehl Neelsen (ZN +); y tiene un tiempo de duplicación de entre 12 y 14 días. Afecta principalmente a la piel, los nervios periféricos, la mucosa de las vías respiratorias altas y los ojos.

La lepra es una enfermedad curable. Si se trata en las primeras fases, se puede evitar la discapacidad. *M. leprae* se multiplica muy despacio y el periodo promedio de incubación de la enfermedad es de cinco años. En algunos casos, los síntomas pueden aparecer en 1 año, pero también pueden tardar hasta 20 años. La lepra se transmite con frecuencia a través de las gotitas que se expulsan de la boca o la nariz, por medio de contactos cercanos y frecuentes con personas que no han recibido tratamiento. Es un bacilo capaz de infectar gran cantidad de personas (altamente infeccioso), pero pocas personas enferman (baja patogenicidad). Las manifestaciones clínicas de la lepra son bastantes variables y están relacionadas con la inmunogenicidad del bacilo y con el sistema inmunológico del hospedero. La asociación de estos factores, es responsable del alto potencial incapacitante de la enfermedad. Sin duda, una de las principales razones para que sea de notificación e investigación obligatoria.

Clasificación de Lepra

Cuadro 1. Clasificación de la Enfermedad de Hansen

Clasificación propuesta por Ridley y Jopling (1962-1966)	**Clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) 1982**	**Clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS) 1988**
Toma en cuenta cuatro parámetros: clínico, histológico, respuesta inmune del paciente al bacilo e índice bacteriológico.	Toma en cuenta solamente el índice bacteriológico.	Toma en cuenta solamente el parámetro clínico.
Clasifica la lepra en 5 grupos:	Clasifica la lepra en dos grupos:	Clasifica la lepra en dos grupos:

• Indeterminado (I) • Tuberculoide (T) • Borderline Tuberculoide (BT) • Borderline Borderline (BB) • Borderline Lepromatoso (BL) • Lepromatoso (L)	• Lepra Paucibacilar: Caracterizada por tener un índice bacteriológico inferior a 2+. • Lepra Multibacilar: Caracterizada por tener un índice bacteriológico superior o igual a 2 +.	• Lepra Paucibacilar: Caracterizada por presentar hasta cinco lesiones cutáneas y / o solo un tronco nervioso involucrado. • Lepra Multibacilar: Caracterizada por presentar más de 6 lesiones cutáneas y/o más de un tronco nervioso involucrado.

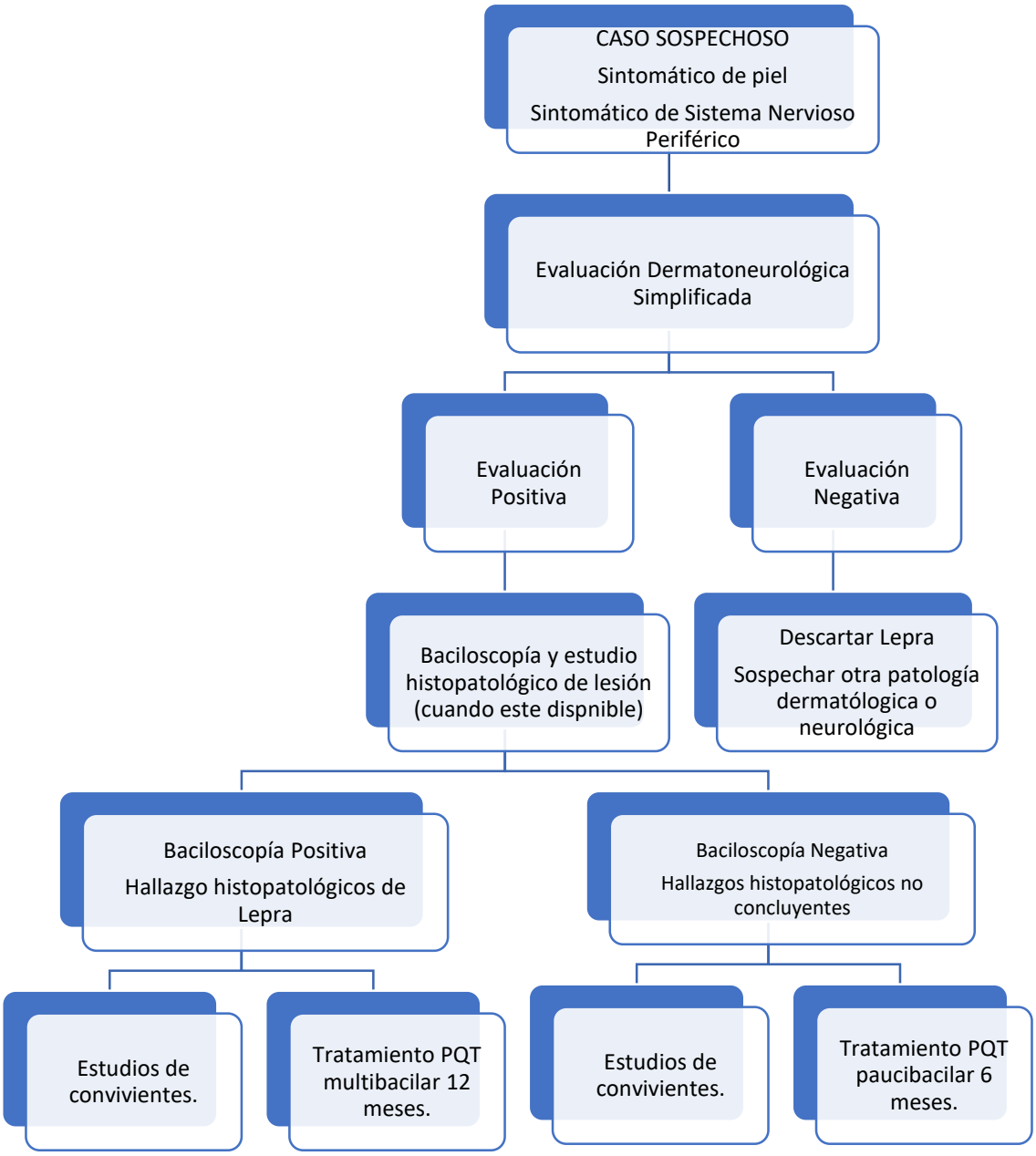
La clasificación de la lepra propuesta por Ridley y Jopling entre 1962-1966, sigue siendo la más ampliamente utilizada actualmente por su mayor especificidad de acuerdo con los parámetros incluidos en su evaluación. (Guerra Figueroa, 2020).

Cuadro 2. Clasificación de caso de lepra establecida por el Programa Nacional para la Prevención y Control de la Lepra en Panamá.

Paucibacilar (PB)	Un caso de lepra con 1 a 5 lesiones cutáneas, sin presencia demostrada de bacilos en un frotis cutáneo.
Multibacilar (MB)	Un caso de lepra con más de cinco lesiones cutáneas; o con afectación nerviosa (neuritis pura, o cualquier número de lesiones cutáneas y neuritis); o con la presencia demostrada de bacilos en un frotis por raspado de incisión cutáneo, independientemente del número de lesiones cutáneas.

Fuente: Definiciones de caso de lepra según guía de monitoreo y evaluación: Organización Mundial de la Salud; 2018.

Flujograma para el manejo de caso sospechoso de Lepra. (Ministerio de Salud Panamá, 2019)



Fuente: Guía para el abordaje integral de los pacientes con Lepra. Ministerio de Salud. Panamá.

Recepción de muestra en el Laboratorio

En esta etapa, es importante señalar que en todos los sectores de laboratorio donde circulan las muestras, los profesionales deben estar debidamente protegidos con el uso de equipo de protección personal, tal y como recomiendan las normas de bioseguridad.

En la recepción de muestras, el Tecnólogo Médico (TM) debe comprobar:

- El formulario de solicitud diagnóstica debe estar completo con la información del paciente, número de portaobjetos y sitio anatómico de toma de muestra del paciente.
- Identificados los portaobjetos con el sitio anatómico de toma de muestra del paciente.
- Integridad de los portaobjetos enviados al laboratorio.

Depende del TM decidir si recibir o rechazar la muestra según cada caso.

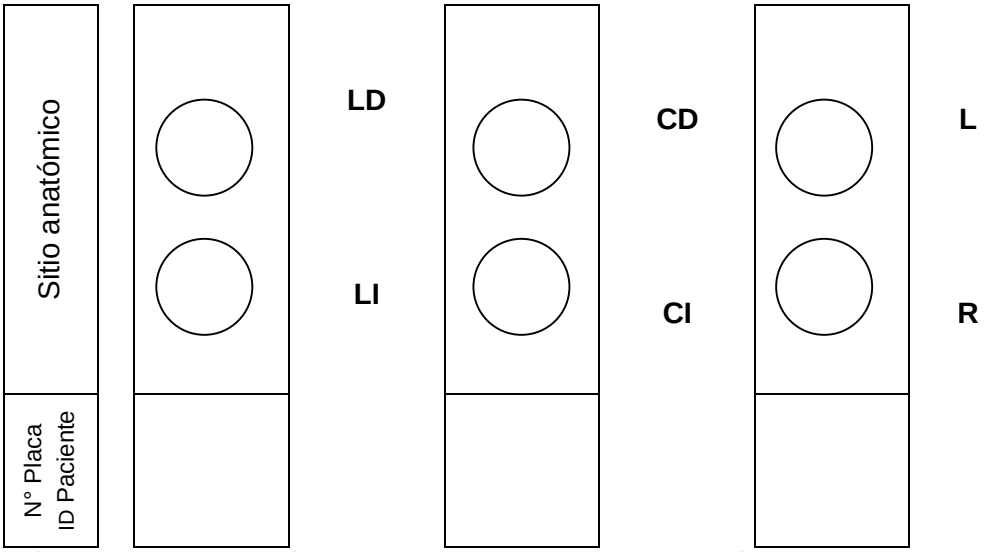


Ilustración 1. Diagrama según formulario de solicitud de diagnóstico de Lepra. ICGES.

Observación: Los sitios anatómicos para el raspado intradérmico son: Lóbulo Oreja Derecha (LD), Lóbulo Oreja Izquierda (LI), Codo Derecho (CD), Codo Izquierdo (CI) y Lesión (L). En caso de no tener lesión se puede tomar de la parte superior de la Rodilla (R) (Izquierda o derecha).

En el caso de rechazo de la muestra, el profesional deberá dejar constancia del motivo del rechazo en el formulario de recibo de muestra, informar a la unidad solicitante de lo sucedido y solicitar una nueva recogida.

Registro de laboratorio

El laboratorio deberá contar con un registro diario de baciloscopia de Hansen, el cual debe registrar los siguientes datos:

- Número de laboratorio: Sea este el número generado por el sistema de laboratorio o un número consecutivo único.
- Nombre y apellido del paciente.
- Número de identificación del paciente: Cédula o pasaporte o código generado por la institución.
- Edad/Género: Colocar la edad del paciente dependiendo si es masculino (M) o femenino (F).
- Diagnóstico: Si el paciente es un su primer diagnóstico (inicial) o es paciente control.
- Solicitado por: Se refiere a la institución de salud que lo refiere y/o el médico que lo refiere.
- Presencia de sangre: Sugiere si se requiere aplicar solución para lisar los glóbulos rojos y tener mejor campo de visualización en el microscopio.
- Baciloscopia: Corresponde a la presencia o no de BAAR en cada uno de los frotis de los sitios anatómicos recolectados.
- Presencia de células: Corresponde a la observación microscópica de la presencia de macrófagos, leucocitos o células epiteliales.
- Índices: Cálculo del índice bacteriológico (IB) y la cantidad de bacilos sólidos, fragmentados o granulados (S-F-G).
- Observación: Si en caso de que alguno de los frotis no presente las condiciones adecuadas para el examen, lea el resto y coloque observación de la ausencia del resultado.
- Fecha de reporte de los resultados.
- TM responsable del diagnóstico.

Tinción del frotis por el método frío de Ziehl-Neelsen

Se recomienda el método de tinción en frío para preservar las condiciones morfotintoriales del bacilo. Además, evita que los vapores tóxicos del fenol,

presentes en la fucsina y que se eliminan durante el calentamiento, sean inhalados por el profesional, provocando un riesgo para la salud. (Brasil. Ministerio de Salud, Secretaria de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica., 2010).

Se debe asegurar que cada placa tenga la correcta identificación de cada sitio anatómico antes de realizar la tinción. Realizar la coloración de las placas de acuerdo con los siguientes pasos:

Antes de realizar el proceso de la tinción verifique los frotis. Si tienen mucha sangre, se deben lisar los eritrocitos sumergiendo la placa en solución de Rouge, el exceso de sangre en la muestra interfiere con la lectura del frotis. Ver Anexo preparación de solución Rouge.

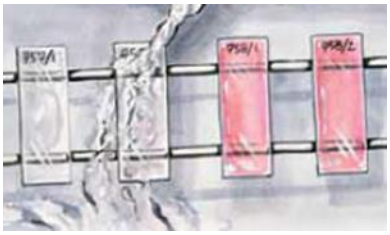
1. Coloque los portaobjetos en un soporte adecuado, separados entre si.

2. Cubra todo el frotis con la solución de fucsina de Ziehl-Neelsen durante 20 minutos.

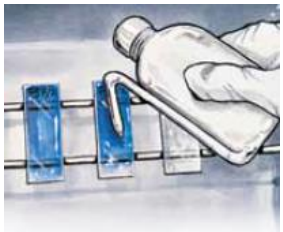
3. Retire el portaobjeto del soporte y lávelo con agua corriente a baja presión.

4. Decolorar los frotis con una solución de alcohol-ácido al 1%, hasta que se tornen rosados, aproximadamente 15-20 segundos.

5. Lave el portaobjetos nuevamente con agua corriente a baja presión.



6. Cubra todo el frotis con una solución de azul de metileno al 0,3% durante 1 minuto.



7. Lávelo con agua corriente a baja presión y déjelo secar a temperatura ambiente.

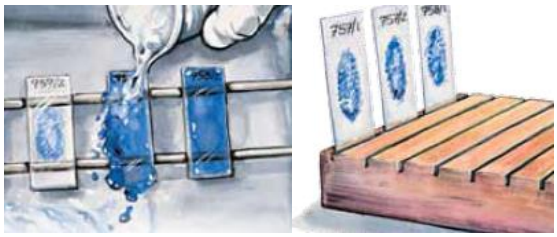


Ilustración 1. Placas fijadas para teñir.

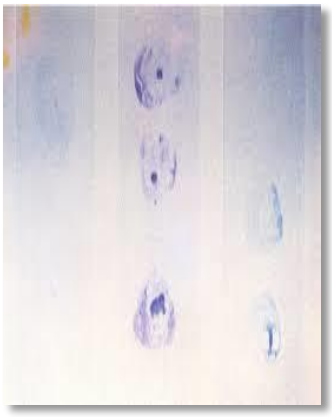


Ilustración 3. Muestras teñidas.

Examen microscópico

El correcto uso y manejo del microscopio es un factor esencial. Algunos elementos como: lámparas, aceite de inmersión, mantenimiento y limpieza del equipo, cuando son inadecuados, pueden comprometer el resultado de la prueba. Para el buen desempeño del análisis, es necesario que exista un mantenimiento periódico del equipo y que los productos utilizados sean recomendados por el fabricante.

Para leer los frotis, siga las recomendaciones a continuación:

a. Utilice un microscopio con objetivo de inmersión (aumento de 100x) y un ocular de 10x.

b. Examine inicialmente con objetivos de bajo aumento (10x) para seleccionar campos que contengan muchos macrófagos y evitar aquellos con glóbulos rojos.
c. Colocar una gota de aceite de inmersión y luego cambiar al objetivo de inmersión (100x), ajustando el enfoque con la ayuda del micrómetro.
d. Comenzar a examinar el frotis en la parte superior como se muestra en la figura 1 o inferior como se muestra en la figura 2, de manera sistemática, en zigzag en 100 campos representativos, de acuerdo con el siguiente esquema. (Brasil. Ministerio de Salud, Secretaria de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica., 2010).

Ilustración 2. Placa para lectura. Colocar 1 gota aceite inmersión a cada frotis.

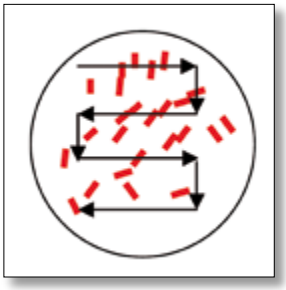


Ilustración 3. Lectura de frotis iniciando en la parte superior.

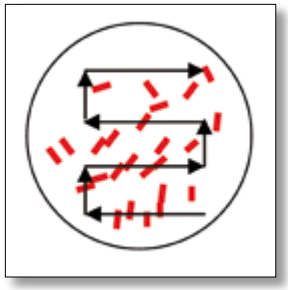


Ilustración 4. Lectura de frotis iniciando en la parte inferior.

Índice baciloscópico (IB)

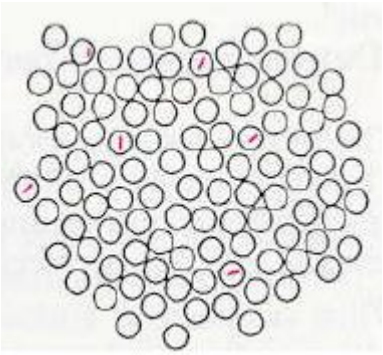
El Índice Baciloscópico (IB), propuesto por Ridley en 1962, se basa en una escala logarítmica que va de 0 a 6. Es el método de evaluación cuantitativa más correcto y utilizado en la lectura de la baciloscopia en la lepra.

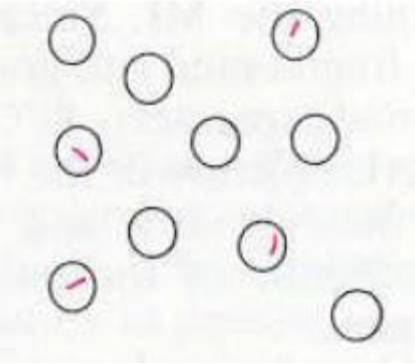
Cuadro 2. Escala logarítmica de Ridley

0+	Ausencia de bacilos en 100 campos examinados.
1+	Presencia de 1 a 10 bacilos, en 100 campos examinados.
2+	Presencia de 1 a 10 bacilos, en cada 10 campos examinados.
3+	Presencia de 1 a 10 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
4+	Presencia de 10 a 100 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
5+	Presencia de 100 a 1000 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.
6+	Presencia de más de 1.000 bacilos, en promedio, en cada campo examinado.

Nota: Para índices de 0 a 3+, deben examinarse 100 campos microscópicos; de 4+ a 6+, la lectura se puede realizar en 25 campos. (Brasil. Ministerio de Salud, Secretaria de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica., 2010).

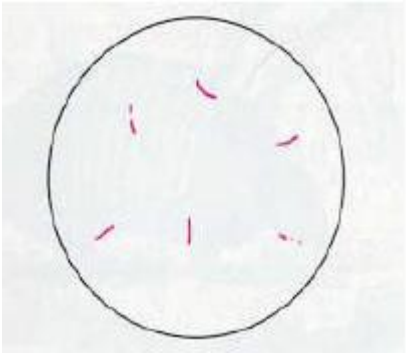
IB=1

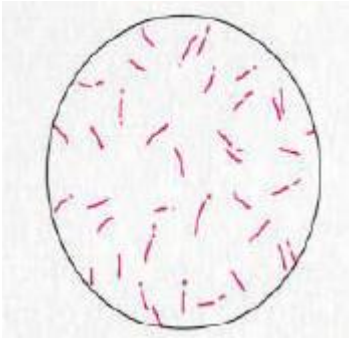




IB=2

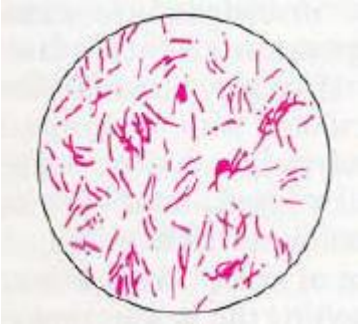
IB=3

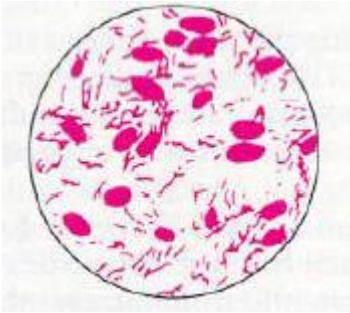




IB=4

IB=5





IB=6

Ilustración 5. Representación de IB, visto en frotis de acuerdo con la clasificación de Ridley.

Fuente: (Suárez Moreno, 2007)

Cuadro 3. Resultado de la baciloscopia según la clasificación propuesta por Ridley y Jopling (1962-1966).

Método diagnóstico	**Lepra Lepromatosa**	**Lepra Tuberculoide**	**Lepra Indeterminada**	**Grupo Dimorfo**
Baciloscopia	Positiva con abundantes bacilos	La microscopía de frotis intradérmico es negativa.	La microscopia de frotis de piel intradérmica siempre es negativa, cuando es positiva indica progresión de la enfermedad.	El frotis intradérmico puede ser positivo o negativo.

Todos los bacilos aislados que se observen en cada campo microscópico, deben registrarse en la hoja de recuento de IB (Formulario de registro diario). Los bacilos aglomerados y los contenidos en globos no se pueden contar, sin embargo, se debe estimar su número, según el diagrama siguiente:

Pequeña Globia	Presenta una media de ± 30 bacilos en su cuerpo.
Mediana Globia promedio	Tiene un promedio de ± 60 bacilos en su cuerpo.
Grande Globia	Presenta un promedio de ± 100 bacilos en su cuerpo.

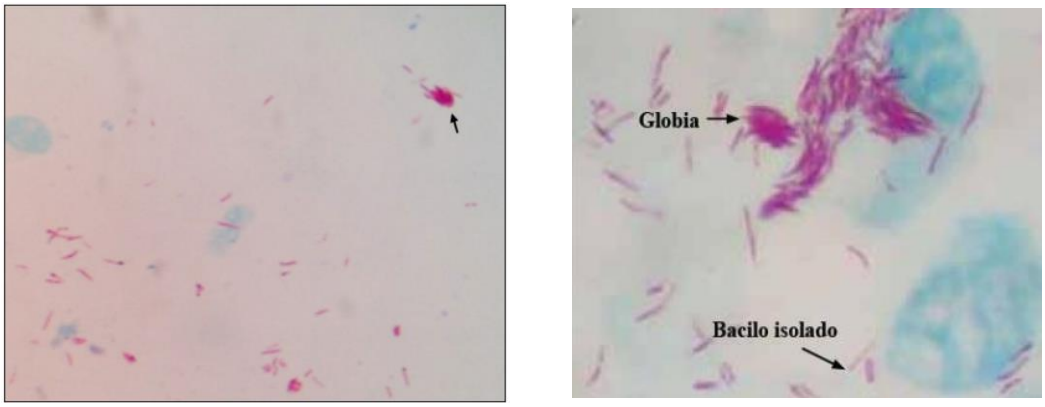


Ilustración 6. Presencia de BAAR formando "Globia" (flecha) en el examen directo de tinción Ziehl-Neelsen (aumento 40x). Fuente: *(Brasil. Ministerio de Salud, Secretaria de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica., 2010)*.

El IB del paciente se calcula mediante la media aritmética de los IB de cada sitio analizado, según el siguiente ejemplo:

LD= 4+	$IB = \frac{19}{5} = 3.8$
LI= 3+	
CD=4+	
CI= 2+	
Lesión= 6+	

Si no se encuentra ningún bacilo en 100 campos en los frotis, valide el resultado como 0 y no se calcula los índices (IB = 0). (Brasil. Ministerio de Salud, Secretaria de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica., 2010).

Índice morfológico (MI)

Este es el índice utilizado para describir la aparición de la morfología de *M. leprae* en los frotis. Cuando se someten a tinción, los bacilos se tiñen, la mayoría de ellos, de forma irregular. Se pueden observar de forma aislada o formando racimos o globos que son estructuras formadas a partir de una sustancia incolora (glía) que se dispone entre los bacilos, uniéndolos de forma organizada. (Brasil. Ministerio de Salud, Secretaria de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica., 2010).

El IM del paciente es la media de los IM de todas las extensiones del paciente, indicándonos:

- Indica el grado de contagiosidad del paciente.
- Nos permite orientar sobre la eficacia del tratamiento.
- Da una rápida información sobre la aparición de resistencia o fallo al tratamiento. (Román, 1989).

Considerando que la lectura del MI requiere habilidad y mucha práctica, además de ser un análisis subjetivo, se recomienda que, cuando sea necesario, se realice solo en centros de referencia con más experiencia. La descripción morfológica de los bacilos es de especial importancia en los casos de sospecha de recaída y resistencia a las drogas. Desde el punto de vista morfológico, *M. leprae* puede presentarse en forma de bacilo intacto, fragmentado o granular, considerándose el intacto la forma viable. (Brasil. Ministerio de Salud, Secretaria de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica., 2010)

Bacilos enteros

Se las considera viables o vivas porque están totalmente coloreadas de rojo y sin defectos en las paredes celulares. A menudo se observan en frotis de pacientes que aún no han recibido tratamiento (diagnóstico) o en casos de recurrencia de la enfermedad.

Bacilos fragmentados

Son bacilos que presentan pequeñas fallas en su pared celular debido a la interrupción de la síntesis de los componentes que la componen. Se consideran inviables o muertos y a menudo se observan en frotis de pacientes después del final del tratamiento.

Bacilos granulares

Son bacilos que tienen grandes defectos en su pared celular, mostrando solo pequeños puntos (gránulos) teñidos de rojo. Se consideran inviables o muertos y también se ven con frecuencia en frotis de pacientes después del final del tratamiento.

Es importante señalar que, si el laboratorio local tiene dificultades para completar la lectura de los sitios, debe remitir las placas a la sección de Micobacteriología de LCRSP/ICGES, para que finalice el análisis.

Porcentajes de Bacilos S.F.G.

Se da un valor de 2,1 o 0 a cada clase de bacilos SFG, según el número de cada uno que se vean y se compara con la escala que traduce en un índice SFG.

- 2= Si aparecen numerosos de esa clase, 20% o más.
- 1= Si aparecen pocos de esa clase 1 –20%.
- 0= Si aparecen menos de 1%.

Nota: Un valor de del Índice SFG de 2 o menos indica que no hay bacilos sólidos en la preparación (vivos).

Tabla 3: Porcentaje de bacilos S-F-G.

Valores SFG de Escala	**Índice SFG**
2-0-0	10
2-1-0	9
2-2-0	8
2-1-1 (1-2-1)	7
2-2-1	6
1-2-1	5
1-2-2	4
1-1-2 (1-2-1)	3
0-2-2	2
0-1-2	1
0-0-2	0

Ilustración 7. Diagrama representativo de las diferentes formas de M. leprae. Fuente: D. Leiker y A.C. McDougall. Guía técnica para la baciloscopia de la lepra. 1987.

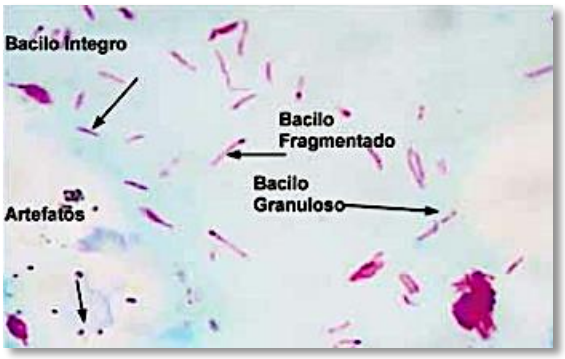


Ilustración 8. Aspecto morfológico de Mycobacterium leprae en sus diversas formas. (Ziehl-Neelsen 100x). Fuente: Centro de Referencia Dona Libânia. CE.

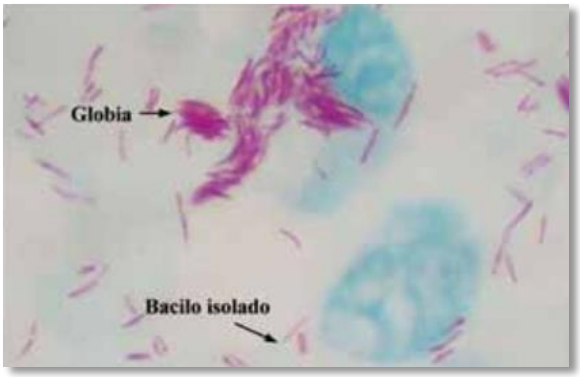


Ilustración 9. Mycobacterium leprae visto en Globia y aislado. (Ziehl Neelsen 100x). Fuente: Centro de Referencia Dona Libânia. CE.

Validación de resultados

Los resultados serán emitidos según la escala logarítmica de Ridley (0 a 6+) por cada frotis de sitio anatómico analizado:

Sitio Anatómico	IB
Lóbulo derecho (LD)	3+
Lóbulo Izquierdo (LI)	1+
Codo derecho (CD)	0
Codo Izquierdo (CI)	0
Lesión (L)	2+

Se estimarán los índices por paciente:

Índice Baciloscópico	**1.2**
Índice Morfológico (SFG)	2

La Metodología: Tinción de Ziehl Neelsen en frío. Escala de reporte Logarítmica de Ridley.

Nota: Un valor de del Índice Morfológico (SFG) de 2 o menos indica que no hay bacilos sólidos en la preparación (vivos).

Es fundamental que los resultados obtenidos sean reportados tanto a la unidad solicitante, como a epidemiología, para el registro de caso de notificación obligatoria.

Almacenamiento de placas

Después de la lectura, el portaobjetos debe colocarse en posición vertical, durante unos minutos, para eliminar el exceso de aceite de inmersión. No se recomienda utilizar papel absorbente o gasa para eliminar el aceite.

Después de este procedimiento, todos los portaobjetos deben almacenarse en la caja para portaobjetos por pacientes, o identificados por pacientes. Enviar al LCRSP para realizar control de calidad Indirecto de las placas.

Tabla de Control de Cambios

Tabla de cambios del documento	
Versión y fecha	**Cambios realizados**
00/ 06/07/2021	1. Original.

Referencias

Brasil. Ministerio de Salud, Secretaria de Vigilancia en Salud. Departamento de Vigilancia Epidemiológica. (2010). *Guia de Prodecimientos Técnicos: Baciloscopia em Hanseníase.* Brasilia-DF, Brasil.

Guerra Figueroa, S. E. (Julio a Diciembre de 2020). Actualización en Lepra: Epidemiología, Fisiopatólogia, Clacificación, Diagnóstico y Tratamiento. *Crea Ciencia Vol 13, N°1*, 32-43.

Ministerio de Salud Panamá. (2019). *Guía para el abordaje integral de los pacientes con Lepra.* Panamá.

Román, M. C. (1989). *Microbiologia Clínica de las Enfermedades por Micobacterias (Tuberculosis, Lepra y Micobacteriosis).* Cordoba, España.

Anexos

Anexo 1. Preparación de solución de Rouge

Ácido acético	5ml	2.5ml
Formol 37% o 40 %	10ml	5.0 ml
Agua destilada	485 ml	242.5 ml
Volumen final	500 ml	250 ml
Filtrar la solución y guardar en frasco de color ámbar, no más de 30°C.		

Anexo 2. Preparación de Tintes (de ser necesario)

Alcohol Ácido 1 %	
Alcohol etílico 99 ml	99 ml
Ácido clorhídrico	1 ml
Colocar en una probeta de 20 ml el alcohol etílico, adicionar el ácido clorhídrico concentrado (1 ml) al alcohol, gota a gota, completando con alcohol etílico el volumen final de 100 ml. Guardar en frasco apropiado a temperatura ambiente.	
Colorante de Azul de Metileno 0.3 %	
Azul de Metileno	3 g
Agua destilada	1000 ml
Disolver azul de metileno en agua destilada, completar un volumen final de 1000 ml, dejar en reposo 24 horas, filtrar antes de usar.	
Carbol Fucsina	
Fucsina Básica	10 g
Alcohol Etílico	100 ml
Fenol (ácido fenólico)	50 ml
Agua destilada	1000 ml
Disolver la fucsina básica en alcohol etílico, enseguida colocar fenol, homogenizar. Pasar para una probeta y adicionar agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml. Dejar reposar por 24 horas, filtrar y transferir a un frasco ámbar, almacenar protegido de la luz, agitar y filtrar antes de usar.	