

Evaluación de diferentes muestras para la detección molecular de *Mycobacterium leprae* en Cuba

Evaluation of different samples for *Mycobacterium leprae* molecular detection in Cuba

MSc. Jenny Laura Ruiz-Fuentes;^I MSc. Alexis Diaz-Garcia;^I MSc. Odelaisy Suárez Moreno;^I DrSc. Pedro Torres;^{II} DrSc. Lucrecia Acosta Soto^{II}

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.
Sanatorio San Francisco de Borja (Fontilles). Vall de Laguar, Alicante, España

RESUMEN

Introducción: en la actualidad, la principal estrategia para controlar la infección por *Mycobacterium leprae* es la detección precoz y la multiterapia. El objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad del empleo de diferentes muestras clínicas en el diagnóstico molecular de la infección por *M. leprae*.

Métodos: se evaluaron 22 pacientes con clínica sugestiva de lepra. Se tomaron muestras de linfa de cuatro puntos (ambos lóbulos auriculares y ambos codos) recogidas en una lámina porta objetos (lámina de baciloscopía) y en un hisopo, además muestra de hisopado nasal, muestra de sangre total y de tejido de la lesión. Las muestras se analizaron mediante baciloscopía, histología y PCR según correspondió en cada caso. Por otro lado, para determinar la sensibilidad y especificidad del método, se realizó un estudio de casos y controles en el que se emplearon 40 láminas de baciloscopías negativas de pacientes con lepra paucibacilar y 40 láminas negativas de personas sin lepra.

Resultados: el 54,5 % de los pacientes resultó positivo por baciloscopía. Solo en el 41 % de los pacientes la histología tuvo resultados concluyentes de lepra. En el 100 % de los pacientes se detectó la presencia de ADN de *M. leprae* a partir de la lámina de baciloscopía y el hisopado de linfa. En el 95,45 % de los pacientes se pudo amplificar la secuencia diana a partir de la sangre total y solo en el 31,8 % de los pacientes el hisopado nasal resultó positivo. El estudio de casos y controles mostró que la sensibilidad y especificidad de la PCR respecto al diagnóstico convencional fue de 100 %.

Conclusión: el diagnóstico de *M. leprae* mediante PCR, es de gran utilidad cuando las técnicas convencionales no son concluyentes. La lámina de baciloscopía y el

hisopado de linfa constituyen las muestras clínicas más útiles para la confirmación molecular de la infección por *M. leprae*.

Palabras clave: Diagnóstico molecular; *Mycobacterium leprae*; lepra; baciloscopía; histología; Cuba.

ABSTRACT

Introduction: Currently, the early detection and treatment with multitherapy are the main strategy to control the infection by *Mycobacterium leprae*. The objective of the present study was to evaluate the usefulness of different clinical samples for molecular diagnosis of *M. leprae* infection.

Methods: Twenty two patients with suggestive clinical leprosy were analyzed. Different clinical samples were taken by slit skin smear, histopathology and PCR. To determine the sensitivity and specificity of the PCR method, a case-control study was also performed using 40 slides from negative smears of patients with leprosy paucibacillary and 40 from individuals without leprosy.

Results: From all patient studied fifty-four percent were positive by slit skin smear and 41 % were conclusive of leprosy by histopathology. *M. leprae* DNA was detected in slit skin smears and lymph swabs in 100 % of patients. In 95,45 % of patients were detected *M. leprae* DNA in whole blood and in 31,8 % of them in nasal swab. The sensitivity of PCR respect to conventional diagnostic was 100 %, the specificity was 97.5 %, and the positive predictive value was 97.56 and the negative predictive value was 100 %.

Conclusion: The diagnosis of *M. leprae* by PCR is very useful when conventional techniques are inconclusive. The slit skin smears and lymph swabs are the most useful clinical samples for molecular confirmation of infection with *M. leprae*.

Keywords: Molecular diagnosis; slit skin smeas; *Mycobacterium leprae*; leprosy; Cuba.

INTRODUCCIÓN

La lepra es una enfermedad infecto-contagiosa crónica que afecta al sistema nervioso periférico, piel y otros órganos, causada por el patógeno intracelular obligado *Mycobacterium leprae*. Aunque recientemente se ha observado una disminución de la casuística en el mundo, se registran cada año unos 250.000 nuevos casos por lo que su posible erradicación se encuentra aún distante. En la actualidad, la principal estrategia para el control de esta enfermedad es su detección precoz y la multiterapia (MT).¹ El diagnóstico precoz de la lepra representa una de las bases para evitar la aparición de discapacidades y cortar la cadena de transmisión de la enfermedad.

En la práctica sanitaria, el diagnóstico definitivo recae en las evidencias clínicas y métodos de laboratorio convencionales (baciloscopía e histopatología), no obstante estos no logran confirmar la infección en los pacientes paucibacilares, ni la detección de la infección en etapas subclínicas.²

El Programa Nacional de Control de lepra en Cuba establece que para los pacientes paucibacilares el diagnóstico es esencialmente clínico.³

En general, las técnicas moleculares han demostrado ser herramientas mucho más sensibles y específicas que las convencionales para realizar el diagnóstico de un patógeno como *Mycobacterium leprae*.^{2,4}

El objetivo del presente estudio fue evaluar la utilidad del empleo de diferentes muestras clínicas en el diagnóstico molecular de la infección por *M. leprae*.

MÉTODOS

Tipo de estudio

Desde noviembre de 2012 a diciembre de 2013, se llevó a cabo un estudio transversal que incluyó un total de 22 pacientes que acudieron al Laboratorio Nacional de Referencia de Lepra del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" con diagnóstico clínico presuntivo de lepra para realizar la confirmación microbiológica de la enfermedad.

Los pacientes se agruparon clínicamente según el número de lesiones cutáneas (ninguna; una y más de dos) y según la presencia o no de alteración de la sensibilidad en las mismas o en alguna de las extremidades.

Para determinar la sensibilidad y especificidad del método de PCR se llevó a cabo un estudio de casos y controles en el que se emplearon 40 láminas de baciloscopías negativas de pacientes con lepra paucibacilar y 40 láminas negativas de personas sin lepra.

Muestras clínicas

- i) Linfa para frotis: A todos los pacientes se les tomó muestra de linfa de los lóbulos de las orejas y los codos, para lo cual se anestizó la zona y se realizó un corte con un bisturí hoja No.14, según establece el Programa de Control de lepra en Cuba para el diagnóstico de esta enfermedad.³
- ii) Hisopado de linfa: La linfa restante de las cuatro localizaciones se recuperó en un solo hisopo por paciente que fue previamente humedecido en solución salina y posteriormente se conservó a -20°C hasta la extracción de ADN.
- iii) Biopsia: Para la realización de la histopatología, se tomó una biopsia con sacabocado de 8 mm de diámetro del borde de una lesión activa.
- iv) Exudado nasal: A cada individuo se le realizó raspado del tabique nasal con hisopo el cual se colocó en tubo estéril con solución salina. La muestra se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min y el precipitado se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.
- v) sangre total: A cada paciente se le realizó una extracción de 5 ml de sangre total con EDTA la cual se procesó para obtener ADN.

Pruebas realizadas

Baciloscopía. A cada muestra de linfa se le realizó frotis que posteriormente se tiñó (Ziehl-Neelsen) y se observó según establecen las normas cubanas para el diagnóstico convencional de lepra con vistas a determinar el índice bacteriológico (IB).⁵ Todas las muestras se conservaron a temperatura ambiente hasta su utilización para la extracción de ácidos nucleicos.

Biopsia. Las biopsias incluidas en parafina se cortaron y tiñeron empleando las tinciones de Fite-Faraco y Ziehl-Neelsen, y posteriormente se visualizaron mediante microscopía óptica.⁶

Extracción de ácidos nucleicos.

Pre-tratamiento de las láminas de baciloscopía: Los cuatro frotis realizados a cada paciente se procesaron como una muestra única. Se eliminaron los restos de aceite de inmersión sumergiendo las láminas en xilol durante 15 min. Se rasparon con una punta de pipeta y 400 µl de una solución tampón NET-10 (10mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Tris-HCl) pH 8.0, todo se añadió a un tubo de 1,5 ml. Adicionalmente, se añadieron 40 µl SDS 10 % y 20 µl de proteinasa K (20mg/ml) y se incubaron toda la noche a 70°C en agitación continua. Seguidamente las muestras se sometieron a un paso de congelación a -80°C y descongelación a 37°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 20.000 rpm durante 20min.

Pre-lisado de los hisopados de linfa. Para este procedimiento se emplearon 400 µl de NET-10. Las muestras se incubaron a 60°C durante 18 horas, seguido de un paso de congelación -80°C y descongelación a 37°C. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 20.000 rpm durante 20 min.

Extracción: Todas las muestras clínicas se procesaron mediante el empleo del estuche comercial QIAamp DNA Mini Kit® (Qiagen, Alemania), se siguieron las instrucciones del fabricante para cada tipo de muestra. Las muestras de frotis de linfa e hisopados de linfa se trataron como fluidos corporales.

Amplificación de ácidos nucleicos

La amplificación de los ácidos nucleicos se realizó según las condiciones descritas por Donoghue y colaboradores en 2001, que incluyó los iniciadores específicos Lp1, Lp2, Lp3 y Lp4 (PCR anidada) para *M. leprae*.⁴

Análisis de los resultados

El análisis y la confirmación de los casos se consideraron los resultados de histopatología de cada paciente y del examen dermatoneurológico, criterios claves y obligatorios para el diagnóstico de un paciente en Cuba.

Determinación de la sensibilidad y especificidad de la PCR

Con la metodología antes descrita, se realizó la extracción de ADN a 40 láminas de pacientes paucibacilares diagnosticados en Cuba durante los años 2009 al 2012 (consideradas controles positivos) y a 40 láminas de pacientes con diagnóstico de granuloma anular, psoriasis, pitiriasis alba o rosada y eczemas entre otras (consideradas controles negativos). Todas estas láminas formaban parte de la colección del Laboratorio Nacional de Referencia del IPK.

Análisis estadísticos

Los datos se introdujeron en una hoja de Excel (Microsoft Office 2010). Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad se empleó el programa estadístico EpiDat versión 3.0.

Ética

A cada paciente se le realizó la descripción detallada de los procedimientos a realizar y se le solicitó la firma de un consentimiento informado a todos los individuos que participaron en el estudio.

RESULTADOS

Todos los pacientes se diagnosticaron mediante criterios clínicos y/o bacteriológicos. De ellos, 12 se clasificaron como pacientes con lepra multibacilar (MB; 3 con IB=1; 4 con IB=2; 3 con IB=3; 1 con IB=4 y 1 con IB=5) y 10 pacientes con lepra paucibacilar (PB; IB=0). De los pacientes multibacilares estudiados por histopatología, se observaron bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en 5 de ellos, en 4 se observaron evidencias histológicas compatibles con lepra aunque no se encontraron bacilos (No BAAR), y en 3 de ellos la prueba no resultó concluyente. Todos los pacientes con lepra paucibacilar que presentaron lesiones, 7/10, resultaron no concluyentes mediante la histopatología.

Se detectó ADN de *M. leprae* en las 22 (100 %) muestras procedentes de los frotis de linfa analizados, 22 (100 %) hisopos de linfa, 21 (95,45 %) muestras de sangre y en 7 (31,8 %) de los exudados nasales las que correspondieron a 5 pacientes MB (41,7 %) y 2 pacientes PB (20 %). Ver tabla 1.

Tabla 1. Resultados según el número de lesiones que presentan los pacientes en relación a la alteración de la sensibilidad y resultados de las técnicas diagnósticas realizadas. Programa estadístico EpiDat versión 3.0

Nº lesiones	Frec	A.Sens (PB)	Bacil	Histop (PB)	PCR Hisopo linf. (PB)	PCR Sangre (PB)	PCR Ex.nasal (PB)
Ninguna	3	3 (1)	2	1 (0)	3 (1)	2 (1)	0 (0)
Una	5	3 (3)	2	1 (0)	5 (3)	5 (3)	2 (1)
Más de dos	14	7 (0)	8	3 (0)	14 (6)	14 (6)	5 (1)
Total	22	13 (4)	12	5 (0)	22 (10)	21 (10)	7 (2)

Nº lesiones: Número de lesiones; Frec: Frecuencia; A.Sens (PB): número de pacientes positivos con alteración de la sensibilidad (número de paucibacilares); Bacil: número de pacientes positivos por baciloscopia; Histop: número de pacientes en los que se visualizaron BAAR; PCR Hisopo linf. (PB): número de pacientes PCR positivos en linfa (número de paucibacilares); PCR Sangre (PB): número de pacientes PCR positivos en sangre entera (número de paucibacilares); PCR Ex.nasal (PB): número de pacientes PCR positivos en exudado nasal (número de paucibacilares).

La amplificación de ADN de *M. leprae* demostró la presencia del mismo en todas las láminas negativas de pacientes paucibacilares y en ninguna de las correspondientes a pacientes con otro diagnóstico. El análisis estadístico de estos resultados arrojó una sensibilidad del 100 % y especificidad del 100 % para el método de PCR con respecto al método clínico.

DISCUSIÓN

Según lo establecido por el Programa Nacional de Control de la lepra en Cuba, el diagnóstico se realiza mediante el análisis de criterios clínicos y bacteriológicos, apoyados en las evidencias histopatológicas.³ En este estudio los pacientes con lepra multibacilar resultaron positivos a más de dos de los criterios convencionales de diagnóstico, por lo que resultaron fácilmente diagnosticados. En este grupo de pacientes, las pruebas moleculares no son imprescindibles aunque logran confirmar los criterios de las pruebas convencionales. Por otra parte, los pacientes con lepra paucibacilar solo fueron diagnosticados por las manifestaciones clínicas, pues tanto la bacteriología como la histopatología no brindaron evidencias suficientes (No BAAR). Esto implica retraso en el diagnóstico pues se necesita de personas expertas para detectar las fases iniciales de las manifestaciones clínicas. Los resultados de este trabajo sugieren que para este grupo de pacientes, el PCR a partir de diferentes muestras clínicas, podría ser un elemento de gran valor para el diagnóstico.

Para detectar la presencia de ADN de *M. leprae* en pacientes con sospechas de padecer lepra, se han empleado disímiles muestras entre ellas tejido fresco, muestras de biopsia, sangre, suero, exudado nasal, orina, cabellos y frotis de linfa.⁷⁻⁹ Debido a esto resulta conveniente identificar la muestra de elección para el diagnóstico, en pacientes sospechosos de padecer lepra. En el presente estudio realizamos un análisis de cuál podría ser la muestra más conveniente para realizar un diagnóstico en pacientes paucibacilares en Cuba.

El análisis de los resultados de los pacientes, a partir del exudado nasal, arrojó baja sensibilidad. Estudios realizados en poblaciones de alta endemia han mostrado que personas aparentemente sanas podrían ser portadores de *M. leprae* en su cavidad nasal, lo que habla a favor de que la transmisión de este microorganismo es por la vía respiratoria,^{10,11} a través de pacientes con infección activa.¹² La probable positividad del PCR de mucosa nasal y su relación con un posible estado portador resulta particularmente llamativo en zonas endémicas.^{13,14} Estas evidencias introducen una disyuntiva al diagnóstico de la enfermedad empleando técnicas moleculares aplicadas solo a este tipo de muestra. Por lo que el hisopo nasal no resulta una muestra adecuada para ser empleada de forma rutinaria en el diagnóstico molecular de la lepra.

Nuestros resultados revelaron que en la muestra de sangre total de todos los pacientes se pudo visualizar la amplificación del ADN diana. El empleo de muestras de sangre para el diagnóstico de la infección por *M. leprae* no ha sido muy utilizado ya que debido a las características de la enfermedad no se observa con mucha frecuencia la bacilemia.¹⁵ Por otra parte, de Almeida y colaboradores en 2004 determinaron la presencia del ADN de esta micobacteria en muestras de sangre de 125 personas contactos de pacientes con lepra. Las personas que resultaron positivas no desarrollaron la enfermedad después de un año de observación. Por lo que concluyen que la presencia de ADN de la micobacteria en la sangre puede significar que las personas se encuentran en estado de infección subclínica.¹³ Sin embargo, otros estudios coinciden en señalar la presencia de *M. leprae* en muestras

de sangre como un elemento válido en el diagnóstico. Sigit Prakoeswa en 2007 detectó la presencia de ADN de *M. leprae* en la sangre de personas con lepra subclínica.¹⁶ Además, en 2013, Yan y colaboradores evaluaron el empleo de la PCR anidada (PCR-Rlep) para detectar ADN de la micobacteria en muestras de sangre de pacientes con lepra multibacilar y lepra paucibacilar. Sus resultados confirman la amplificación de la secuencia diana en el 95,92 % de los MB y el 70 % de los PB. Por lo que concluyeron que se pudiera emplear esta PCR para realizar el diagnóstico temprano de los pacientes además de los resultados de la serología.¹⁷ Los resultados de este estudio a partir de las muestras de sangre coinciden con lo informado por otros investigadores. Sin embargo, la principal desventaja en estas muestras podría estar asociada a la conservación, con vistas a ser procesada para su utilización en el diagnóstico molecular de lepra.

Todas las muestras de linfa, tanto en hisopo como frotis, permitieron la amplificación de la secuencia diana. Los frotis de linfa resultaron útiles para ambos grupos de pacientes tanto MB, como PB. Los resultados muestran que los frotis de linfa, pueden ser una muestra clínica que permita realizar el diagnóstico molecular. Esto es válido incluso para pacientes con lepra paucibacilar donde la concentración de bacilos en la lámina es muy baja². Esta muestra requiere de una estandarización del método de extracción de ADN, pero su principal ventaja reside en que se realiza sobre la base del método empleado convencionalmente para el diagnóstico de la enfermedad. Estas láminas se almacenan y transportan fácilmente en condiciones que no afectan el resultado final del PCR.² Los resultados observados al emplear los frotis de linfa sugieren que esta podría ser la muestra idónea para realizar el diagnóstico molecular, principalmente en pacientes con IB=0.

En el estudio de casos y control el empleo de la lámina de baciloscopía mostró una sensibilidad y especificidad del 100 % con respecto al método clínico.⁴ Este estudio constituye un acercamiento a la inclusión de un método molecular en el abordaje del diagnóstico de la lepra en Cuba. El mismo permitiría establecer nuevas pautas en el diagnóstico y seguimiento de pacientes, detectar a las personas en etapa subclínicas de la enfermedad, evitar la aparición de discapacidades, reducir los focos de infección e interrumpir la cadena de transmisión lo que constituye un avance cualitativo para el programa de control y erradicación de esta enfermedad.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS: Weekly Epidemiological Record, Global Leprosy situation. 2012;34.
2. Kamble R, Shinde V, Madhale S, Kamble A, Ravikumar B, Jadhav R. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears. Indian Journal of Medical Microbiology. 2010;28(1):57-9.

3. MINSAP. Programa de control de Lepra. 2 ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas;1999;1-2.
4. Donoghue H, Holton J, Spigelman M. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. J Med Microbiol. 2001;50(2):177-82.
5. MINSAP. Lepra. Normas técnicas para el control y tratamiento. Editorial Ciencias Médicas 2008.
6. Ridley D. Histological classification and the immunological spectrum of leprosy. Bull World Health Organ. 1974;51(5):451-65.
7. Beyene D, Aseffa A, Harboe M, Kidane D, Macdonald M, Klatser P, et al. Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. Epidemiol Infect. 2003 131(2):841-8.
8. Cardona-Castro N, Beltrán-Alzate J, Manrique-Hernández R. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2008;103(4):332-6.
9. Torres P, Camarena J, Gomez J, Nogueira J, Gimeno V, Navarro J, et al. Comparison of PCR mediated amplification of DNA and the classical methods for detection of *Mycobacterium leprae* in different types of clinical samples in leprosy patients and contacts. Lepr Rev. 2003;74(1):18-30.
10. Patrocínio L, Goulart I, Goulart L, Patrocínio J, Ferreira F, Fleury R. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol. 2005;44:311-6.
11. Martinez T, Figueira M, Costa A, Gonçalves M, Goulart L, Goulart I. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1653-8.
12. de Wit M, Douglas J, McFadden J, Klatser P. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. J Clin Microbiol. 1993;31(3):502-6.
13. de Almeida E, Nóbrega Martinez A, Câmara Maniero V, Sales A, Duppre N, Sarno E, et al. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood and Nasal Secretion of Brazilian Household Contacts. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2004;99(5):509-12.
14. Araújo S, Lobato J, de Melo Reis E, Bernardes Souza D, Gonçalves M, Vieira Costa A, et al. Unveiling healthy carriers and subclinical infections among household contacts of leprosy patients who play potential roles in the disease chain of transmission Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 2012;107

15. Rao R, Mohan V, Sheno S. Bacteremia in leprosy. Journal of Pakistan Association of Dermatologists. 2007;17:14-5.
16. Sigit Prakoeswa C. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Blood of the Subclinical Leprosy. Media Folia Medica Indonesiana. 2007;43(2):64-7.
17. Wen Y, Xing Y, Yuan L, Liu J, Zhang Y, Li H. Whole-blood nested-PCR amplification of *M. leprae*-specific DNA for early diagnosis of leprosy. Am J Trop Med Hyg. 2013;88(5):918-22.

Recibido: 4 de enero de 2015.

Aprobado: 23 de febrero de 2015.

Lucrecia Acosta. Laboratorio de Análisis Clínicos, Sanatorio San Francisco de Borja (Fontilles), Crtra Orba-Vall de Laguar Km 4, 03791, Vall de Laguar, Alicante, España. Tel: +34965583350; Fax: +34965583376. Correo electrónico: lacosta@fontilles.org