

IMPACTO DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* EN EL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA LEPRO DEL PARAGUAY

Paola Arze¹, Oscar Salvioni¹, José Pereira Brunelli², Stefanía Fraenkel¹,
Miriam Rolón¹, Olga Aldama², Celeste Vega¹

¹Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC), Manduvirá 635, CP 1255, Asunción, Paraguay

²Centro de Especialidades Dermatológicas (CED), Programa Nacional de Control de la Lepra (MSPyBS),
San Lorenzo, Paraguay

(Recibido 01/10/2020; Aceptado el: 06/05/2021)

RESUMEN

La Enfermedad de Hansen o lepra es una enfermedad crónica y transmisible causada por *Mycobacterium leprae*, un bacilo acidorresistente de lenta multiplicación. La enfermedad afecta principalmente la piel, los nervios periféricos, los ojos y la mucosa de las vías respiratorias altas. En 2018, Paraguay fue el segundo país de las Américas con mayor número de casos detectados, presentando un alto número de pacientes multibacilares y con discapacidad. Por tanto, el diagnóstico temprano y tratamiento inmediato son claves para el control de la enfermedad y su transmisión.

Objetivo: Evaluar la utilidad de las técnicas moleculares en el diagnóstico de pacientes que acuden al Programa Nacional de Control de la Lepra mediante la implementación de la PCR en tiempo real, amplificando una región específica repetida en tándem (RLEP) de *M. leprae* y comparada con los resultados obtenidos por baciloscopia.

Resultados: Fueron analizadas 164 muestras, donde, la técnica molecular detectó un 63 % de muestras positivas mientras que la técnica microscópica un 34 %. En cuanto a los pacientes que resultaron negativos por baciloscopia, el 45 % de estas muestras resultaron positivas por PCR en tiempo real, que se correspondieron clínicamente con pacientes paucibacilares.

Conclusión: Estos datos demuestran la importancia de la utilización de las técnicas moleculares para el diagnóstico de la lepra principalmente en los pacientes paucibacilares con baja carga bacteriana.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Hansen, *Mycobacterium leprae*, Reacción en Cadena en Tiempo Real de la Polimerasa.

SUMMARY

Hansen disease or commonly known as leprosy is a transmissible chronic disease caused by *Mycobacterium leprae*, an acid-fast resistant bacillus with a slow multiplication rate. This disease affects primarily the skin, peripheral nerves, eyes and the mucous membranes of the upper respiratory tract. In 2018, Paraguay was the second American country with the highest number of cases detected many of them of the multibacillary type and presenting disabilities. Therefore, early diagnosis and treatment are key to control the disease and its transmission.

Objective: Evaluate the utility of molecular techniques used to diagnose patients of the National Leprosy Control Program through the implementation of real-time PCR, amplifying an *M. leprae* specific tandem repeat region (RLEP) and comparing the results obtained from smear microscopy.

Results: 164 samples were analyzed and *Mycobacterium leprae* was detected in 63% of the samples with this molecular technique and only in 34% of the smear stained samples evaluated with the microscopic technique. Regarding the negative samples of smear microscopy, 45 % of these resulted positive with real – time PCR, which corresponds clinically with the paucibacillary type of patients.

Conclusion: These data demonstrate the importance of using molecular techniques for the diagnosis of leprosy, mainly in paucibacillary patients with low bacterial load.

KEYWORDS: Hansen Disease, *Mycobacterium leprae*, Real-Time Polymerase Chain Reaction.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Hansen, comúnmente conocida como lepra, es una de las enfermedades infecciosas humanas más antiguas y de largo periodo de incubación, no obstante, sigue siendo un gran problema de salud pública en muchos países en vías de desarrollo^{1,2}. El agente causal de esta enfermedad es *Mycobacterium leprae*, un bacilo acido-alcohol resistente, gram positivo, intracelular obligado, con un elevado poder de penetración en las células nerviosas.³

Esta enfermedad afecta principalmente a la piel, los nervios periféricos, los ojos y las membranas mucosas del tracto respiratorio superior y continúa siendo una causa de sufrimiento no solo por las discapacidades físicas que genera sino también por la estigmatización y discriminación social.^{4,5} La transmisión de este bacilo no se conoce con exactitud, pero se cree que se produce a través de una persona con una alta carga bacilar no tratada, que elimina el bacilo hacia el exterior a través de las vías respiratorias superiores, las secreciones nasales, la saliva, o a través del contacto directo y prolongado.⁶

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2018 se detectaron 208.619 nuevos casos en todo el mundo, con una tasa de 2,74 por cada 100.000 habitantes. La región del Sudeste de Asia representó el 71 % de los nuevos casos a nivel global, principalmente en India e Indonesia. En la región de las Américas, Brasil reportó el 93 % de los nuevos casos seguido de Paraguay que reportó 345 casos, de los cuales el 87,8 % fueron casos multibacilares y 12,5 % de ellos presentaron discapacidad de grado 2.⁷ El Programa Nacional de Control de la Lepra del Paraguay (PNCL) ha reportado entre los años 2001-2015 una media de 448 nuevos casos de lepra, siendo predominante el sexo masculino.⁸

Con fines terapéuticos la OMS recomienda la clasificación de los pacientes en paucibacilares (PB) y multibacilares (MB) de acuerdo al número de lesiones, cantidad de nervios afectados y carga bacilar. El grupo PB se define como pacientes con hasta cinco lesiones, de disposición asimétrica, con un solo nervio periférico afectado y baciloscopía negativa; también se encuentran en este grupo los que presentan una única lesión, pero sin ninguna afección nerviosa. En

el grupo MB los pacientes presentan seis o más lesiones, de disposición más simétrica y con más de un nervio afectado, además de poseer baciloscopia positiva.²

El correcto diagnóstico y clasificación del paciente es fundamental para un adecuado tratamiento basado en la poliquimioterapia (PQT) que consiste en la combinación de dos o más fármacos (Rifampicina, Clofazimina y Dapsona). Esta modalidad de tratamiento es eficaz y previene la farmacoresistencia, que ha logrado reducir la prevalencia a nivel mundial, sin embargo, se siguen reportando numerosos casos cada año.⁹

El diagnóstico de la lepra se basa en un examen clínico dermatoneurológico, la detección microscópica de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en frotis cutáneo (baciloscopia) y la evaluación histopatológica. Sin embargo, *M. leprae* es difícil de detectar en pacientes PB donde la carga bacteriana y la determinación de anticuerpos son difícilmente detectados por los métodos de diagnóstico clásicos,^{10,11} además el análisis clínico puede ser inconcluso y la histopatología inespecífica, especialmente en los estadios tempranos de la enfermedad.

Las limitaciones de recurrir únicamente a los métodos de diagnóstico clásicos para la clasificación de los pacientes pueden llevar a un tratamiento inapropiado o ineficaz aumentando la transmisión de la enfermedad, así como las posibilidades de recurrencia y de discapacidad física.^{12,13,14,15}

En los últimos años se han producido grandes avances respecto al diagnóstico molecular de patógenos de muchas enfermedades infecciosas gracias a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).¹⁶ Esta técnica permite realizar múltiples copias del ácido nucleico diana original lo que posibilita la detección del patógeno, aunque la carga sea baja, por lo que se considera una técnica mucho más sensible que los diagnósticos inmunológicos, microscópicos e histopatológicos. La PCR en tiempo real, a diferencia de la PCR convencional, ha acortado los procesos de análisis gracias a la incorporación de fluoróforos en la reacción que permiten la detección simultánea del ADN del patógeno a través de la fluorescencia.¹⁶

Para la detección del patógeno causante de la lepra, la utilización de la PCR se ha convertido en una herramienta fundamental en los casos de pacientes con sospecha clínica o lesiones cutáneas atípicas, que presentan baciloscopia negativa e histopatología no concluyente, así como también en situaciones donde no hay evidencia de lesiones cutáneas.¹⁷

A partir del año 2016, el Programa Nacional de Control de la Lepra del Paraguay firmó un acuerdo con el Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC) para la detección molecular de *M. leprae* en muestras procedentes de pacientes con sospecha de lepra. En base a este acuerdo, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el impacto de la utilización de la PCR en tiempo real como herramienta diagnóstica complementaria para la detección del patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

TOMA DE MUESTRAS

Se tomaron 164 biopsias cutáneas de pacientes con sospecha de lepra, procedentes de distin-

tas zonas del Paraguay, que acudieron al Centro de Especialidades Dermatológicas (CED) del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social (MSPyBS) entre enero del 2016 a noviembre del 2019.

Las biopsias fueron tomadas como lo indica el Manual de Diagnóstico Laboratorial de Lepra del MSPyBS.¹⁸ Brevemente, la zona de toma de muestra fue desinfectada con alcohol 70°, con los dedos índice y pulgar de una mano se comprimió firmemente la piel y luego con una hoja de bisturí desechable N° 15 se practicó un corte pequeño de unos 5 mm de largo y con profundidad suficiente (2 mm a 3 mm). Sin aflojar los dedos, se raspó girando el bisturí un ángulo de 90° varias veces, y parte de la sustancia semilíquida recogida se esparció sobre la lámina (frotis de linfa cutánea) para el diagnóstico por baciloscopía.

La otra parte de la muestra tomada fue remitida al Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica (CEDIC) en etanol 70 %, donde fue conservada a -20 °C para su posterior análisis molecular.

BACILOSCOPÍA

Para la detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) en frotis de piel de lesiones, se realizó la tinción de Ziehl-Neelsen en frío. Para ello, las láminas se colorearon con una solución de fucsina por 20 min y se enjuagaron con abundante agua. Seguidamente se decoloraron con solución de alcohol ácido al 1 % por 1 min, y se lavaron. Finalmente, se cubrieron las láminas con una solución acuosa de azul de metileno 0,3 % por 3 min, se lavaron con agua corriente y se secaron al aire. Una vez teñidas, las láminas fueron observadas al microscopio óptico con objetivo de inmersión.¹⁸

BIOLOGÍA MOLECULAR DE *M. LEPRAE*

Extracción de ADN

Se realizó la extracción del ADN genómico de 164 muestras de pacientes con el kit comercial *GeneJET Genomic DNA Purification* (Thermo Scientific®; #K0722), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del material genético obtenido, se evaluó con un espectrofotómetro (DeNovix DS-11FX+).

Amplificación por PCR en tiempo real

Para la detección molecular en tiempo real, se amplificó una región específica repetida en tándem (RLEP) de *M. leprae*, utilizando los siguientes pares de primers forward 5'-GCAGTATCGTGT-TAGTGAA-3', reverse 5' CGCTAGAAGGTTGCCGTATG-3' y la sonda 5'-/56 FAM/TCGATGATCCGGC-CGTCGGCG/3BHQ_1/-3', descritos por Truman, *et al.*¹⁹ Antes de analizar las muestras se realizó la puesta a punto de la PCR en el laboratorio y se corroboró la especificidad de los primers con un alineamiento en el GeneBank.

Las reacciones de amplificación se realizaron utilizando el máster mix Maxima Probe qPCR

Master Mix (2X) (Thermo Scientific®; #K0261) en un volumen final de 25 µl. Las condiciones de amplificación utilizadas en el termociclador Rotor Gene 6000 (Qiagen), fueron las siguientes: 1 ciclo de 95 °C por 10 min.; 40 ciclos de 95 °C por 15 seg., y 60 °C por 60 seg. Para cada reacción de amplificación se tomaron rigurosas medidas de precaución para evitar las contaminaciones cruzadas, además de la utilizaron controles positivos y negativos.

RESULTADOS

Un total de 164 muestras con sospecha de lepra fueron analizadas por baciloscopía en el CED (MSPyBS), de las cuales 109 muestras (66 %) resultaron negativas y 55 positivas (34 %) (Tabla 1). El total de las muestras positivas fueron obtenidas de pacientes clasificados como multibacilares (datos no mostrados).

Paralelamente fueron enviadas al CEDIC una copia de las 164 muestras en estudio para ser analizadas molecularmente (Figura 1).

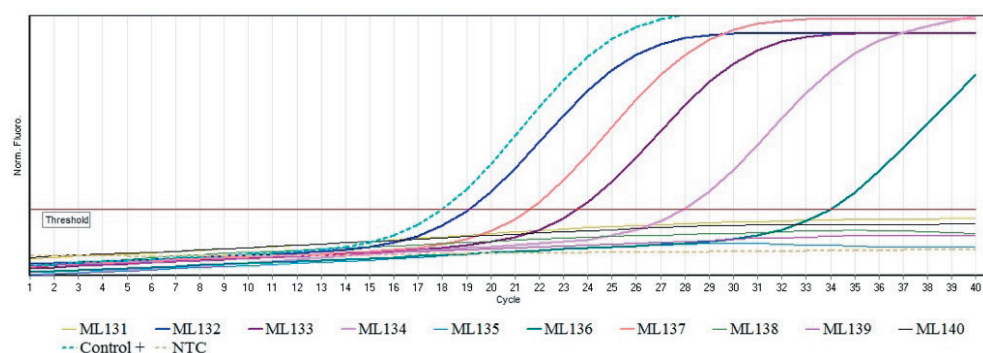


Figura 1. Curva de amplificación de PCR en tiempo real del fragmento RLEP de *M. leprae*.

Los resultados demostraron una concordancia del 100 % entre las 55 muestras con baciloscopías positivas y la PCR en tiempo real (Tabla 1).

De las 109 muestras con baciloscopía negativa, 49 de ellas resultaron positivas por PCR en tiempo real (45 %) y las restantes 60 muestras fueron negativas (55 %) (Tabla 1). Estas 49 muestras molecularmente positivas se corresponden clínicamente a pacientes paucibacilares que no pudieron ser diagnosticados por microscopía.

Comparando los resultados obtenidos por ambas técnicas, se observó que, del total de las muestras analizadas, el 63 % fueron positivas por PCR en tiempo real, mientras que por baciloscopía resultaron positivas solo el 34 % (Tabla 1).

En la Figura 2 se observa la distribución de los casos molecularmente positivos en los diferentes departamentos del país, donde se encontró un predominio en los departamentos de Central (53 casos) seguidas de Asunción (9), Paraguari (9), Cordillera (6) y casos aislados en diferentes zonas del país (27). De los 17 departamentos no se han reportado casos en Alto Paraguay, Caaguazú y Ñeembucú.

Tabla 1. Número de casos analizados y comparación de técnicas de diagnóstico en pacientes con sospecha de lepra en el Paraguay.

Técnica			
Muestras	Baciloscopia	PCR en tiempo real	
		Detectado	No detectado
Negativas	109	49 (45 %)	60 (55 %)
Positivas	55	55 (100 %)	----
Total	164	104	60
% Positivos detectados	34 %	63 %	

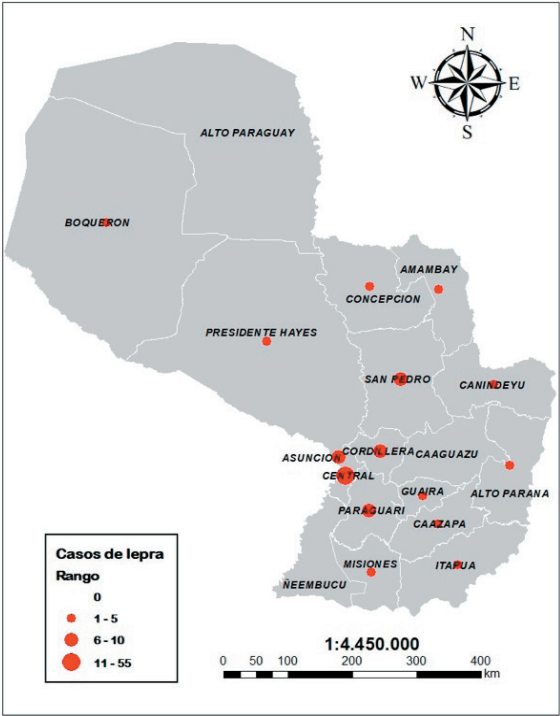


Figura 2. Distribución de casos molecularmente positivos de lepra en Paraguay entre 2016 y 2019. En cuanto a la distribución de los casos molecularmente positivos en la población estudiada, el 67 % de ellos correspondió al sexo masculino y el 33 % al sexo femenino (Figura 3).

En cuanto a la distribución etaria, se observó que el mayor porcentaje de los casos positivos están distribuidos en los rangos comprendidos entre 27-69 y 60-85 años tanto para el sexo masculino como el femenino (Figura 3).

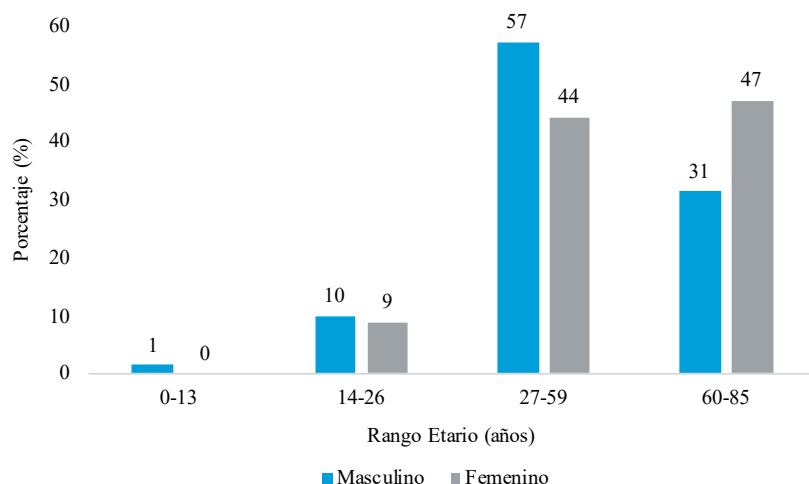


Figura 3. Distribución de casos de lepra molecularmente positivos según edad y sexo.

DISCUSIÓN

Debido a que *M. leprae* es una bacteria que no puede ser cultivada *in vitro*, la implementación de herramientas moleculares es especialmente útil para la detección del bacilo en estadios tempranos de la enfermedad, en manifestaciones atípicas de la misma, o en reactivaciones por tratamientos farmacológicos incompletos.

La utilización de las herramientas moleculares como un método complementario para la correcta clasificación de los pacientes PB y MB, es de suma importancia para llevar a cabo el tratamiento adecuado de poliquimioterapia, ya que tanto la dosis de los fármacos, como la duración del tratamiento difieren en ambos casos. Además, estos métodos favorecen la detección temprana de la enfermedad evitando así la aparición de discapacidades y cortando la cadena de transmisión.

Las técnicas de PCR son especialmente útiles en los casos en los que el paciente presenta una baja carga bacteriana. La principal ventaja de la PCR en tiempo real es que los resultados pueden obtenerse más rápidamente que con la PCR convencional, ya que los fluorocromos aumentan la fluorescencia proporcionalmente a la cantidad de ADN que se va copiando y es visualizada simultáneamente en una pantalla.

En comparación con la amplificación de otras regiones del genoma de *M. leprae*, la utilización de primers que amplifican fragmentos de la secuencia repetitiva (RLEP) presentan mayor sensibilidad frente a otras secuencias dianas, ya que existen múltiples copias en el ADN genómico y son altamente específicas debido a que no se encuentran en el genoma de ninguna otra especie de bacteria.^{19,20}

La implementación de la PCR en tiempo real como herramienta diagnóstica complementaria es fundamental para la detección de pacientes paucibacilares, y además podrá ser sumamente útil en otro tipo de estudios, como para la detección de recidivas post tratamiento o para la detección de portadores sanos.

La detección precoz del bacilo es un factor primordial para interrumpir la cadena de transmisión y prevenir la aparición de neuropatías y discapacidades de por vida evitando así el gran impacto que padecen y que afectan su bienestar físico, psicológico y social debido a la estigmatización asociada a esta enfermedad.

Los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que la PCR en tiempo real es una técnica específica y sensible donde se obtuvo un 100% de concordancia entre los resultados positivos microscópicos y moleculares, y además la detección de un elevado porcentaje de detección de muestras positivas que no pudieron ser visualizadas por baciloscopía. Estos resultados demuestran que la PCR en tiempo real es una herramienta muy útil para el Programa Nacional de Control de la Lepra del Paraguay, brindando un diagnóstico precoz especialmente en pacientes PB con baciloscopía negativa o histopatología no concluyente. Este estudio no sustituye al diagnóstico convencional, sino que lo complementa.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS

1. Han XY, Seo YH, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(6):856–64.
2. Flageul B. Lepra. Enfermedad de Hansen. *EMC Dermatología*. 2011;45(1):1–17.
3. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Lepra: puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. *Actas Dermosifiliográficas*. 2013;104(7):554–63.
4. Hatta M, van Beers SM, Madjid B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1995;89(4):381–5.
5. Lupi O, Madkan V, Tying SK. Tropical dermatology: Bacterial tropical diseases. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54(4):559–78.
6. da Silva Cruz RC, Penna MLF, Talhari S, Bühner-Sékula S, Oliveira Penna G. Leprosy: current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. *An Bras Dermatol*. 2017;92(6):761–73.
7. WHO. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy- free world. *Wkly Epidemiol Rec*. 2019;94:389–412.
8. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Manual de Normas y Procedimientos. Programa Nacional de Control de Lepra. 2015;77.
9. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial para la lepra 2016 – 2020 Manual operativo. 2020.

10. Silva EA, Iyer A, Ura S, Lauris JR, Naafs B, Das PK, et al. Utility of measuring serum levels of anti-PGL-I antibody, neopterin and C-reactive protein in monitoring leprosy patients during multi-drug treatment and reactions. *Trop Med Int Heal*. 2007;12(12):1450–8.
11. Oskam L, Slim E, Bühner-Sékula S. Serology: Recent developments, strengths, limitations and prospects: A state of the art overview. *Lepr Rev*. 2003;74(3):196–205.
12. Gallo MEN, Ramos Júnior LAN, Albuquerque ECA de, Nery JA da C, Sales AM. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. *An Bras Dermatol*. 2003;78(4):415–424.
13. Gomes CCD, Pontes MA de A, Gonçalves H de S, Penna GO. Perfil clínico-epidemiológico dos pacientes diagnosticados com hanseníase em um centro de referência na região nordeste do Brasil. *An Bras Dermatol*. 2005;80(suppl 3):S283–8.
14. Costa Teixeira A, Lemos Cruvinel D, Rodrigues de Roma F, Ferreira Luppino L, Henrique Pereira Resende L, de Sousa T, et al. Avaliação da concordância entre exames clínicos e laboratoriais no diagnóstico da hanseníase. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41(Suplemento II):48–55.
15. Pavani RAB, Tonolli ER, D'Avila SCGP. Histopathological classification and clinical correlation of 50 leprosy cases from a Teaching Hospital, São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil. *Medicina (B Aires)*. 2008;41(2):188–95.
16. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol*. 2017;8(FEB):1–9.
17. Naaz F, Mohanty PS, Bansal AK, Kumar D, Gupta UD. Challenges beyond elimination in leprosy. *Int J Mycobacteriology*. 2017;6(3):222–5.
18. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Manual de diagnóstico laboratorial de lepra. Programa Nacional de Control de la Lepra, Paraguay. 2017.
19. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of *Mycobacterium leprae* using real-time PCR. *PLoS Negl Trop Dis*. [en línea] 2008;2(11):e328. [Citado el 12 de mayo de 2020]. Disponible en: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000328>>
20. Kang TJ, Kim SK, Lee SB, Chae GT, Kim JP. Comparison of two different PCR amplification products (the 18-kDa protein gene vs. RLEP repetitive sequence) in the diagnosis of *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28(4):420–4.