

RESULTADO DE PCR REALIZADO COMO PESQUISA EPIDEMIOLÓGICA EN BUSCA DE DIAGNÓSTICO DE LEPRO. CAMAGÜEY, CUBA 2018-2019. CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE Y EPIDEMIOLOGÍA. CAMAGÜEY, CUBA

C. Nieves Atrio Mouriño*, Yenisey Gleidis Mir García**, Kenia María Rodríguez del Valle***, Odalis Abreu Girado****

*Dra. C Médicas Especialista de segundo grado Dermatología. Máster en Enfermedades infecciosas. Profesora Auxiliar Consultante de la Universidad Médica de Camagüey. Jefa de Grupo Dermatología Camagüey.

**Especialista de segundo en Dermatología. Especialista de segundo grado en Medicina General Integral. Máster en Enfermedades Infecciosas. Máster en Educación Médica. Profesor Asistente de la Universidad Médica de Camagüey. Investigador agregado.

*** Especialista de segundo en Dermatología. Especialista de primer grado en Medicina General Integral. Máster en Medicina natural y tradicional. Profesor Asistente de la Universidad Médica de Camagüey.

****Especialista de primer grado en Higiene y Epidemiología. Especialista de primer grado en Medicina General Integral. Máster en Enfermedades infecciosas.

(Recibido el 09/11/2020; Aceptado para su publicación: 22/03/2021)

RESUMEN

Se realizó Reacción en Cadena de la Polimerasa a 37 personas convivientes de pacientes diagnosticados con lepra multibacilar (contacto intradomiciliarios de primer orden) con el objetivo de detectar enfermos de lepra o personas que estén infectadas con el *Mycobacterium leprae* sin estar enfermos. De estos, resultaron positivas seis personas a las que se les realizó examen dermatoneurológico y se encontró que dos tenían lesiones cutáneas consistente en nódulos y mácula con borde micro papuloso respectivamente. Se les realizó baciloscopia y biopsia a ambos y el resultado fue baciloscopia positiva y biopsia compatible con lepra lepromatosa en un caso y baciloscopia negativa y biopsia compatible con lepra tuberculoide en el otro. A los pacientes que presentaron un examen físico negativo se les realizó además ultrasonido abdominal en busca de lesiones viscerales cuyo resultado fue negativo en la totalidad de ellos. A los totalmente asintomáticos se decidió ponerles un tratamiento profiláctico con rifampicina y dapsona por considerar que pudieran estar en estadio pre clínico o en periodo de incubación, y se seguirán con examen dermatoneurológico cada seis meses durante cinco años.

Se concluye que es efectivo realizar PCR a los contactos intradomiciliarios de primer orden de pacientes multibacilares para detectar personas infectadas por *M. leprae* y así lograr un diagnóstico precoz y cortar la cadena de transmisión.

PALABRAS CLAVE: PCR, diagnóstico precoz, lepra.

Correspondencia a: Dra. Nieves Atrio Mouriño. Correo electrónico: atrio.cmw@infomed.sld.cu

SUMMARY

Polymerase chain reaction was carried out in 37 household contacts of patients diagnosed with multibacillary leprosy (first-order household contact) in order to detect potential new leprosy patients or individuals infected but asymptomatic with *Mycobacterium leprae* and not sick. By analysis of the test, six people resulted positive, and underwent a dermatoneurological examination. Two of them had skin lesions consisting of nodules and a macula with a micro-papular border, respectively. Smear microscopy and biopsy were performed on both and the results were a positive smear microscopy and biopsy examination compatible with lepromatous leprosy in one case and negative smear microscopy and biopsy compatible with tuberculoid leprosy in the other. The patients who presented a negative physical examination also underwent an abdominal ultrasound in search of visceral lesions and the tests were negative in all of them. It was decided to give the totally asymptomatic patients a prophylactic treatment with rifampicin and dapsone, considering that they could be in the pre-clinical stage or in the incubation period, and they will be followed up with a dermatoneurological examination every six months for five years.

In conclusion, we consider that it is effective to perform PCR on first-order household contacts of multibacillary patients to detect people infected by *Mycobacterium leprae* and thus achieve an early diagnosis and interrupt the chain of transmission.

KEYWORDS: PCR, early diagnosis, leprosy.

INTRODUCCIÓN

La lepra es una infección granulomatosa, de distribución mundial, causada por *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) y por el *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*). Se puede clasificar, según el número de lesiones cutáneas, en dos grupos: a) grupo paucibacilar (con menos de seis lesiones, sin presencia de BAAR en biopsias), que incluye las formas clínicas indeterminada, tuberculoide tuberculoide (TT) y borderline tuberculoide (BT), y b) grupo multibacilar (con seis o más lesiones, y presencia de BAAR en la biopsia), en el que se agrupan las formas borderline borderline (BB), borderline lepromatosa (BL), la lepra lepromatosa (LL) y la lepra histioides, siendo esta última una forma muy poco frecuente que puede presentarse como reactivación por tratamiento incompleto o más raramente como forma inicial de esta enfermedad.

Dado que el *M. leprae* no es cultivable in vitro, el actual desarrollo de técnicas moleculares, entre ellas la secuenciación de los genes 16S rARN o hsp65, son de especial utilidad para el diagnóstico de confirmación de esta enfermedad en presentaciones atípicas.¹

El descenso mundial de la prevalencia de la lepra no ha coincidido con un descenso de su incidencia, lo cual indica que no se ha podido prevenir la transmisión de la enfermedad. A pesar de la escasez de pacientes con LL, la mayoría de los habitantes de áreas endémicas presentan signos de exposición al *M. leprae*, hecho que podría explicarse por la presencia de infecciones subclínicas bacilíferas en las comunidades.²

En la lepra, el diagnóstico temprano es fundamental para evitar la aparición y evolución de secuelas en los pacientes. Para incrementar la sensibilidad y la especificidad en la detección de *M. leprae* muchos autores han desarrollado métodos basados en la técnica de Reacción de la polimerasa en cadena, por sus siglas en inglés (PCR).

La lepra en el humano, posee un período de prevalencia bastante largo de entre dos a diez años. El diagnóstico molecular mediante PCR es de gran utilidad en los casos en que la sensi-

bilidad de la baciloscopia es muy baja, ya que para la detección mediante esta técnica se requieren del orden de 10⁴ bacilos por gramo de tejido, especialmente en los pacientes con lepra indeterminada (LI) o que se encuentren en el polo tuberculoide, donde la presencia de BAAR es rara o ausente. Dada la imposibilidad de cultivar *in vitro*, y que el tiempo de generación de *M. leprae* es de 20 días, el diagnóstico por inoculación en animales de experimentación retrasa en gran medida el diagnóstico. En almohadilla de ratón no se visualizan bacilos hasta los seis a ocho meses de la primoinfección y en armadillo hasta alrededor del año. Por otro lado, si existiese la necesidad de hacer un diagnóstico diferencial específico con otras micobacterias, la baciloscopia no resuelve este problema dado que todas las micobacterias son indistinguibles fenotípicamente. A lo que se ha de sumar que las técnicas serológicas disponibles y comercializables son inconcluyentes.

Por lo tanto, el PCR va a solventar muchos problemas diagnósticos que no era posible solucionar con las técnicas clásicas disponibles, ya que es una técnica muy sensible (diagnóstico clínico) y específica (diagnóstico diferencial). También puede ser de utilidad ante la necesidad de discernir entre recidivas o leproreacciones, y análisis de la respuesta individual (posibilidad de cuantificar carga bacteriana o detección de bacterias viables) o resistencias al tratamiento, pudiendo prevenir así la aparición de resistencias a la multidrogoterapia.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DEL *M. LEPRAE*

Esta técnica se ha convertido en una herramienta indispensable en el ámbito de la biología molecular e ingeniería genética. El objetivo de esta técnica es la amplificación *in vitro* de un segmento específico de ácidos desoxiribonucleicos (ADN).³

En un estudio realizado en la isla de Providencia en Colombia se plantea que las personas con infección subclínica de lepra que alojen el bacilo en su nariz pueden esparcirlo en la comunidad. La infección subclínica se puede demostrar mediante métodos moleculares que detectan el ADN del bacilo de Hansen en el moco nasal y por la presencia de anticuerpos IgM contra el glucolípidio fenólico de la pared celular del bacilo (GLP-1) circulantes en la sangre del individuo infectado. Se considera que en 80 a 90 % de los casos, la lepra comienza como una mancha hipocrómica e hipoestésica, etapa en que se la denomina 'lepra indeterminada' y puede diagnosticarse clínicamente. En dicho estudio en el 2009, se confirmaron dos casos de lepra multibacilar histioide en la isla de Providencia, donde los programas de salud no tenían registros de la enfermedad. El primero fue en una adolescente de 14 años y, posteriormente, se encontró la misma forma clínica de la enfermedad en su padre.⁴

Se plantea que si bien no es necesario el diagnóstico por PCR para los pacientes de lepra con alta carga bacilar y un gran número de lesiones, sí resulta muy útil para el diagnóstico en situaciones tales como la presentación clínica con escaso número de bacilos de *M. leprae* (paucibacilar) y para pacientes difíciles de diagnosticar. La detección de ADN del *M. leprae* en diversas muestras provenientes de los contactos familiares con los enfermos de lepra es muy prometedora. Aunque obtener un resultado positivo para la PCR no es suficiente para establecer una relación causal como resultado de la enfermedad, una cuantificación proporcionada por la qPCR es un indicativo muy claro de un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad y

podría alertar a los médicos a seguir más de cerca estos contactos o incluso para ordenar una quimioprofilaxis.⁵

La PCR, es una técnica de amplificación de material genético muy poderosa basada en los mecanismos de replicación del ADN. Su sensibilidad es tan alta que permite la detección de una sola molécula de ADN en una muestra dada y su especificidad -que depende de las secuencias elegidas para los oligonucleótidos iniciadores de la reacción- puede distinguir, si se desea, hasta cepas dentro de la misma especie. Para la lepra, se han descrito varios iniciadores que permiten la detección e identificación rápida y específica de *M. leprae* en hisopos nasales o en muestras de tejido.⁶⁻⁸

El Manual de Diagnóstico Laboratorial del Programa Nacional de Control de la Lepra, ha contado con la cooperación técnica de la OPS/Ministerio de Salud Pública y bienestar social de Paraguay en el 2017 plantea que la técnica de PCR se ha utilizado con éxito para detectar pequeñas cantidades de bacilos en los tejidos; además es útil para demostrar la infección subclínica en los contactos; seguimiento del tratamiento; determinar la curación de los pacientes o su resistencia a los medicamentos de la terapia multidroga; distinguir la reacción de la recurrencia; y ayudar a entender los mecanismos de transmisión de *M. leprae*. Se basa en la amplificación de secuencias específicas del genoma de *M. leprae* y en la identificación del fragmento de ADN amplificado o de ácido ribonucleico (ARN).⁷

En el año 2015 en Cuba se realizó una evaluación de diferentes muestras para la detección molecular de *M. leprae* y se demostró que en el 100 % de los pacientes se detectó la presencia de ADN de *M. leprae* a partir de la lámina de baciloscopia y el hisopado de linfa. Concluyéndose que el diagnóstico de *M. leprae* mediante PCR, es de gran utilidad cuando las técnicas convencionales no son concluyentes. La lámina de baciloscopia y el hisopado de linfa constituyen las muestras clínicas más útiles para la confirmación molecular de la infección por *M. leprae*.⁸

El objetivo de este estudio consistió en realizar prueba de PCR para detectar *M. leprae* en muestras de moco nasal de contactos intradomiciliarios de pacientes con lepra multibacilar, paralelo al examen dermatoneurológico.

MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó PCR (hisopadonasal) a 37 personas entre casos con antecedentes epidemiológicos (Contactos de primer orden) y casos sospechosos de lepra con el objetivo de diagnosticar casos de lepra con cuadro clínico de difícil diagnóstico y personas totalmente asintomáticas que pudieran estar en periodo de incubación o periodo pre clínico. En el presente estudio se utilizaron muestras de moco nasal teniendo en cuenta que las vías respiratorias altas, y especialmente la mucosa de las fosas nasales, son una de las principales vías de transmisión. Se realizó baciloscopia de linfa teniendo en cuenta el índice bacteriológico, para estudiar el índice bacteriológico se realizó la coloración de Ziehl Neelsen, se estudiaron 100 campos de luz con aumento de 800 x.

La clasificación fue según las siguientes tablas:

Ningún bacilo en toda la lámina cod 0

De 1 a 10 bacilos en 100 campos cod 1

De 1 a 10 bacilos en 10 campos cod 2

De 1 a 10 bacilos por campos cod 3

De 1 a 100 bacilos por campos cod 4

De 100 a 1000 bacilos por campos cod 5

Más de 1000 bacilos por campos cod 6

Las muestras de baciloscopia de linfa y biopsia de lesión de piel se enviaron al Instituto Pedro Kouri (IPK) en la ciudad de la Habana, Cuba, para control de calidad.

RESULTADOS

De las 37 pruebas realizadas resultaron positivas seis, a las que se le realizó examen dermatoneurológico cuyo resultado fue en un caso lesiones nodulares diseminadas con baciloscopia positiva y biopsia de piel lepra lepromatosa, un segundo caso lesión cutánea única consistente en mácula de bordes micropapuloides, baciloscopia negativa y biopsia lepra tuberculoide.

Tres de los casos fueron menores de 15 años con examen dermatoneurológico negativo, ultrasonido abdominal en busca de lesiones viscerales normal. (Tabla 1).

Tabla 1. Pruebas realizadas a los seis convivientes positivos por PCR

Contacto	PCR	Examen dermatoneurológico	Baciloscopia	Biopsia
Caso No1	Positivo	Nódulos cutáneos y anestesia	Positiva	LL
Caso No 2	Positivo	Mácula con borde micropapuloide	Negativa	LT
Caso No 3	Positivo	No lesiones cutáneas	Negativa	No se realiza.
Caso No 4	Positivo	No lesiones cutáneas	Negativa	No se realiza.
Caso No 5	Positivo	No lesiones cutáneas	Negativa	No se realiza
Caso No 6	Positivo	No lesiones cutáneas	Negativa	No se realiza

Se presentan las microhistorias de los casos positivos de PCR.

CASO Nº 1

Paciente de 52 años de edad que presenta PCR por hisopado nasal positivo al realizar el examen dermatoneurológico presenta lesiones cutáneas consistente en nódulos cutáneos y anestesia. Se atiende en la consulta provincial especializada y se notifica como LL y se impone tratamiento MB (rifampicina, dapsona y clofazimina) por un año.



Caso 1. Nódulos cutáneos

CASO Nº 2

Paciente de 34 años de edad con PCR positivo que al examen dermatoneurológico presenta lesión única consisten en una mácula de unos 7 cm con bordes micropapulosos y disminución de la sensibilidad táctil, térmica y dolorosa.



Caso 2. Mácula con bordes micropapulosos

CASO Nº 3

20/03/2018: Paciente masculino de 5 años de edad con antecedente de ser contacto de primer orden de su padre diagnosticado el 06/03/2018 con LL, (que refiere el padre que dormía con el niño) el cual se encuentra en tratamiento.

Consulta Provincial Especializada

Se examina como contacto y el examen dermatoneurológico es negativo, pero al referir el padre que dormía con el niño decidimos indicar PCR del hisopado nasal.

08/05/2018: Paciente sin lesiones en piel, con PCR positivo, se vuelve a examinar y continúa sin lesiones de piel. Se indica baciloscopia de linfa de auricular, codos y rodillas.

22/05/2018: Resultado Baciloscopia Cod 0. Se decide indicar ultrasonido abdominal en busca de Hepatoesplenomegalia, para descartar una lepra visceral.

29/05/2018: Se recibe resultado de USG abdominal: Hígado ligeramente reactivo de límites máximos normales para su edad. Vesículas sin alteraciones. Páncreas, bazo, riñones y vejiga normal.

19/06/2018: Solicitamos Historia Clínica para confeccionar resumen y análisis del caso para la Comisión Técnica Nacional.

Se realiza:

- Baciloscopia: Cod 0 (09/05/2018)
- PCR positiva (08/05/2018)
- Examen dermatoneurológico: Negativo

Conclusiones: Teniendo en cuenta que el niño mantiene un examen dermatoneurológico negativo, con baciloscopia negativa, pero PCR positiva, se consideró como un caso infectado con el *M. leprae* pero no enfermo, por lo que solicitó autorización para poner un tratamiento profiláctico por seis meses como un PB sin notificar y seguirlo como contacto por cinco años.

Se comenzó tratamiento Paucibacilar por seis meses y sólo se pudo realizar por 30 días por anemia severa. Se repitió PCR y volvió a ser positivo. Se mantiene en seguimiento con examen dermatoneurológico cada seis meses.

CASO Nº 4

Niña de 14 años, contacto de dos casos diagnosticados en el Hospital Juan Manuel Márquez en la Habana que son MB y que no están controlados en tratamiento.

- Examen dermatoneurológico: No lesiones cutáneas.
- Se realiza ultrasonido abdominal. No se observa visceromegalia.

Se impone tratamiento con rifampicina y dapsona por seis meses.

Se sigue en consulta cada tres meses, hasta el momento se encuentra asintomática.

CASO Nº 5

Niña de 15 años, contacto de dos casos diagnosticados en el Hospital Juan Manuel Márquez en la Habana que son MB y que no están controlados en tratamiento.

- Examen dermatoneurológico: No lesiones cutáneas.
- Se realiza ultrasonido abdominal. No se observa visceromegalia.

Se impone tratamiento con rifampicina y dapsona por seis meses.

Se sigue en consulta cada tres meses, hasta el momento se encuentra asintomática.

Nota: Los casos nº 4 y nº 5 son contactos de la misma fuente de infección.

CASO Nº 6

Paciente de 72 años que al examen dermatoneurológico se constatan lesiones en cara infiltradas eritematoescamosas y dedos de las dos manos con retracción que refiere es por el trabajo que realizaba, no tiene engrosamiento neural, ni anestesia, con biopsia de piel pénfigo seborreico y tiene dos PCR positivas. Se impuso tratamiento para el pénfigo seborreico con corticoesteroides y azatioprina. Las lesiones desaparecieron, sólo queda la retracción de los dos últimos dedos de cada mano.

Se mantiene en seguimiento cada tres meses en consulta.



Caso 6. Retracciones de los dedos

CONCLUSIONES

- Resultaron positivos PCR en seis casos de los 37 estudiados.
- De los seis casos positivos de PCR cuatro resultaron asintomáticos.
- El PCR fue útil para el diagnóstico temprano de dos pacientes.

REFERENCIAS

1. García Moreno E, Marín Arriaza M, Navarro Martínez MD, Martínez Lirola MJ. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [en línea] 2012;30(5):276-277. [Citado el 10 octubre de 2020]. Disponible en: <<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-confirmacion-molecular-un-caso-lepra-S0213005X12000559>>
2. Guerrero Guerrero MI. Desarrollo y aplicación de una prueba de RCP para detectar la infección subclínica por *Mycobacterium leprae*. Rev Panam Salud Pública. [en línea] 2002;11(4):228-234. [Citado el 12 de octubre de 2020]. Disponible en: <<https://scielosp.org/pdf/rpsp/2002.v11n4/228-234/es>>
3. Acosta Soto L. Diagnóstico molecular de *Mycobacterium leprae*. Fontilles, Rev. Leprol. [en línea]. 2013;29(1):66-88. [Citado el 12 de octubre de 2020]. Disponible en: <<https://www.leprosy-information.org/resource/revista-de-leprologia>>
4. Fuentes J, Jiménez J, Urueta G, Fadul S, Meléndez E, Guerrero MI, Rodríguez G. Lepra en