

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Departamento Bacteriología-Micología
Laboratorio Nacional de Referencia de Lepra

Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de *Mycobacterium leprae*



Autora: Lic. Jenny Laura Ruiz Fuentes

Tutores: Lic. Odelayis Suárez Moreno, MSc.

Lic. Yaxsier de Armas Rodríguez, DrC.

**Trabajo de Tesis presentado en opción al título de
Master en Bacteriología-Micología**

La Habana, 2013

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Departamento de Bacteriología- Micología
Laboratorio Nacional de Referencia de Lepra

Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de
Mycobacterium leprae

Autora: Lic. Jenny Laura Ruiz Fuentes

**Tutores: Lic. Odelayis Suárez Morenos Rodríguez, MSc.
Lic. Yaxsier de Armas Rodríguez, DrC.**

**Trabajo de Tesis presentado en opción al título de
Master en Bacteriología-Micología**

La Habana, 2013

A mi madre, quien es mi ejemplo y mi inspiración

Agradecimientos

Agradecer a las personas que nos han ayudado es un privilegio, aunque lograr que no nos falte ninguna de esas personas que han formado parte de un logro como este en ocasiones resulta difícil

Mis primeras palabras de agradecimiento son para Dios mi Señor y Salvador por su Amor y su Gracia

Quiero agradecer a mi tutora y jefesa Odelayy por recibirme en el laboratorio y mostrarme que incluso de la Lepra uno puede llegar a enamorarse

A mi tutor Yaxsier, el mayor agradecimiento de mi corazón porque desde que lo conocí ha representado una inspiración y porque en el momento que más ayuda necesitaba él me tendió la mano

A Brian y Erno, los biólogos moleculares del departamento por cada una de sus ideas y por el apoyo a cada paso de esta investigación

A los miembros de mi segundo laboratorio, a Rosabel una especie de consejera y de mamita con quien siempre puedo contar. A Tati quien me ha ayudado de muchas maneras, incluso de formas que ella no se imagina y a Osmel por su sonrisa y su amistad

Quiero agradecer a los que considero más que compañeros, a Anayma quien ha estado cerca en todo momento a pesar de la distancia, a Giovanna mi gran amiga y mi ahijada, a Nildita por los muchos buenos momentos. A las personas de la maestría en especial a Wendy, Alberto y Yuliet que ahora son tres

A otras personas especiales Yoandra, por su amistad, a Yahima más que una madrina de bodas, una confidente, a Yaileana por su amistad de tantos años. A mis amigos de siempre; a Damicel mi hermanita, a Yuselis, Yahimel, Mei-li y a Alberto

A todas las personas del IPK, en especial a las del departamento de Bacteriología-Micología. Un aparte especial para la Dra Maida Munet quien resultó ser una ayuda increíble en un momento muy importante. A la Dra

Raisa Rumbaut quien también es protagonista de este proyecto y Laurita por su apoyo en este proyecto

Y a mi familia, primero los que vienen conmigo desde siempre, mi madre la mujer más extraordinaria que he conocido. A mi hermanita quien es una lucecita de inspiración en mi vida. A mi tía Yoyi por su cariño y a mi papito lindo por ser el hombre increíble que es y por amarme siempre. A los demás de mi familia por estar conmigo siempre y porque los amo

A la familia que Dios me ha regalado; a Miladys y JJ por recibirme y demostrarme que me quieren mucho como yo a ellos. A Alexandra que es muy especial conmigo y por último pero no menos importante a Alexis, mi compañero, mi consejero, mi ayuda, mi amor y el mejor regalo que pude haber recibido.

A todos muchas gracias por formar parte de este sueño hecho realidad.

Gracias

Síntesis

En Cuba el diagnóstico convencional de la lepra se basa en las manifestaciones clínicas y la baciloscopía. Esta última logra diagnosticar solo un 20% de pacientes paucibacilares. Las técnicas moleculares representan una herramienta útil para este grupo de pacientes. Este trabajo presenta los resultados de la introducción de una PCR anidada para la detección de *Mycobacterium leprae* en diferentes muestras clínicas. El límite de detección analítico de la PCR anidada se determinó empleando ADN de *M. leprae* como control positivo. Se compararon 4 métodos de extracción (Fenol/Cloroformo, Chelex-100, y los métodos comerciales Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) y QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit (Qiagen) para obtener ADN a partir de láminas de baciloscopía. Se evaluó la PCR anidada en diferentes muestras clínicas (sangre total, exudado nasal, frotis de linfa, gotas de linfa), provenientes de pacientes multibacilares (3) y paucibacilares (2), diagnosticados en 2012. Como resultado se obtuvo amplificación de los controles positivos hasta 10^{-6} de la concentración inicial. El método comercial de Qiagen resultó el más eficiente para extraer ADN de láminas de baciloscopía. Las muestras clínicas de pacientes multibacilares resultaron todas positivas para la PCR anidada. Las muestras de pacientes paucibacilares resultaron positivas con excepción de una muestra de exudado nasal. Esta investigación permite establecer un protocolo de trabajo para determinar la infección por *M. leprae* empleando una PCR anidada. La aplicación de esta metodología, por primera vez en Cuba, posibilita un salto cualitativo en el diagnóstico de pacientes con lepra paucibacilar los que no presentan hasta hoy, un diagnóstico confirmatorio.

Contenido

1. Introducción.....	1
Objetivo General.....	4
2. Revisión Bibliográfica	5
2.1. <i>Mycobacterium leprae</i> . Ubicación taxonómica y características generales.....	5
2.2. Lepra. Características generales y clasificación.....	7
2.3. Patología.....	9
2.4. Estado actual de la lepra en el mundo y en Cuba	12
2.5. Métodos convencionales de diagnóstico	14
2.5.1. Diagnóstico clínico.....	14
2.5.2. Diagnóstico bacteriológico	15
2.5.3. Diagnóstico histopatológico.....	16
2.6. Métodos alternativos de diagnóstico	17
2.6.1. Diagnóstico serológico	17
2.6.2. Diagnóstico molecular	19
2.7. Tratamiento y resistencia.....	22
3. Materiales y Métodos	25
3.1. Tipo de estudio	25
3.2. Obtención de los ADN patrones para la PCR anidada (PCR-Rlep).....	25
3.3. Reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR-Rlep)	25
3.3.1. Iniciadores para el método de PCR anidada.....	26
3.3.2. Mezcla de reacción y perfil de amplificación de la PCR anidada	26
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa para el gen de la β actina.....	27
3.5. Detección de los productos de amplificación en gel de agarosa.....	27
3.6. Métodos de extracción de ADN a partir de láminas de baciloscopia	28
3.5.1. Método A (Fenol/Cloroformo).....	29
3.5.2. Método B (resina quelante Chelex-100)	29
3.5.3. Método C (Wizard® Genomic DNA Purification Promega).....	29
3.5.4. Método D (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit, Qiagen).	30
3.5.5. Cálculo de la concentración y pureza de ADN	30
3.6. Análisis estadístico.....	30
3.7. Evaluación de la PCR anidada para la detección de <i>M. leprae</i> a partir de diferentes muestras clínicas	31
3.7.1. Universo de estudio	31
3.7.2. Criterios de inclusión y de exclusión.....	31
3.7.3. Toma de muestras	31
3.8. Consideraciones éticas.....	32
4. Resultados	34
4.1 Implementación de la técnica de la PCR anidada para la detección de <i>M.</i> <i>leprae</i> en diferentes muestras clínicas.....	34

4.2 Comparación de cuatro métodos de extracción de ADN a partir de las láminas de baciloscopía de pacientes diagnosticados con lepra	35
4.3 Evaluación de la PCR anidada para la detección de <i>M. leprae</i> a partir de diferentes muestras clínicas	40
5. Discusión	42
6. Conclusiones	56
7. Recomendaciones	57
Referencias Bibliográficas.....	58
Anexos.....	71

1. Introducción

La lepra es una de las enfermedades más antiguas que conoce la humanidad. Años atrás se consideraba incurable y sin lugar a dudas mutilante, ideas éstas que permanecen en las mentes de muchas personas hoy en día (González Prendes, 1963).

Los conocimientos sobre esta enfermedad han aumentado, sin embargo continúa siendo un problema de salud, especialmente en aquellos países de alta endemia donde las condiciones higiénico-sanitarias favorecen el contagio (Gonçalves Barreta *et al.*, 2011). La lepra es una enfermedad crónica, infecto-contagiosa, producida por el *Mycobacterium leprae* (bacilo ácido alcohol resistente, BAAR). Dependiendo de la susceptibilidad genética del paciente se puede presentar de dos formas: paucibacilar (PB) y multibacilar (MB). Las características de la enfermedad en sus diferentes formas, son la resultante de la respuesta inmunológica del organismo humano ante la agresión del *M. leprae* (Pérez *et al.*, 2009). En la forma PB los pacientes presentan una respuesta inmune celular capaz de destruir los bacilos, aunque se considera que no es suficiente para eliminarlos. En este grupo de pacientes las lesiones granulomatosas y la toma de los nervios son algunos de los síntomas clásicos. En la forma MB, la respuesta inmune celular específica está prácticamente ausente, por lo que los bacilos se multiplican en los macrófagos y la infección se disemina por todo el organismo (Vargas Salas, 2006). La lepra afecta principalmente la piel, los nervios periféricos, la mucosa de las vías respiratorias altas y los ojos (Anuja *et al.*, 2012).

Anualmente se diagnostican a nivel mundial más de 200 000 casos. A pesar de los esfuerzos realizados por las autoridades sanitarias, se desconoce con exactitud las características de la transmisión de la enfermedad. Se considera que aún permanecen sin diagnosticar cada año, una cantidad de pacientes equivalente al menos a un 30% de los diagnosticados (OMS, 2012a).

Cuba se encuentra según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) entre los países con alta carga de lepra al diagnosticar entre 250 y 300 casos nuevos cada año (MINSAP, 2012). La tasa de detección de casos nuevos se ha mantenido estable, sin embargo ha aumentado entre los menores de 15 años. Además en 2011 el 79% de los casos diagnosticados fueron de la forma multibacilar (Manguinga, 2012). El diagnóstico de la lepra según el Programa Nacional de Control de Cuba se basa en la clínica, la baciloscopia y la histopatología, aunque estas últimas son insuficientes sobre todo en los pacientes con lepra paucibacilar (MINSAP, 2008).

En la mayoría de los países, sobre todo en aquellos de alta endemia y de bajos recursos, la observación de BAAR por medio de la tinción de Ziehl-Neelsen modificada (ZNm), constituye una de las herramientas básicas para la detección de pacientes multibacilares, los cuales representan la mayor fuente infecciosa dentro de la población (Chimenos-Küstner *et al.*, 2006). La microscopía convencional (baciloscopía), además, es empleada para evaluar la respuesta de estos pacientes frente a la poliquimioterapia (PQT), tratamiento recomendado por la OMS, desde 1982 (OMS, 2000). En los pacientes paucibacilares la baciloscopía es incapaz de confirmar la infección con *M. leprae*, debido a la baja carga bacilar en estos pacientes y a la baja sensibilidad de este método (20%) para este grupo (Alcaide Fernández de Vega *et al.*, 2005). Es por esto que el diagnóstico de los paucibacilares se basa fundamentalmente en la clínica y se consideran los de más difícil detección dentro de la población (Pérez *et al.*, 2009). Por las características de la enfermedad se desconoce además, la proporción de casos con infección subclínica en las poblaciones de alta endemia. Se plantea que estas personas son los que mantienen activa la infección dentro de la sociedad (de Almeida *et al.*, 2004). Los métodos convencionales no son capaces de determinar la presencia de la infección subclínica por lo que estos pacientes escapan a la pesquisa y a la búsqueda activa, y generalmente son detectados años después con daños permanentes debido a la demora en el diagnóstico (Wang *et al.*, 2012).

Los estudios moleculares han sido una herramienta empleada para diagnosticar la infección por varios agentes patógenos, sobre todo en aquellos difíciles de detectar por métodos convencionales (Fernández, 2012). Varias han sido las dianas moleculares empleadas para detectar la infección por *M. leprae*. Entre ellas las que amplifican algunas regiones repetidas del genoma de esta micobacteria, denominadas Rlep, las que muestran alta sensibilidad. Por otra parte, esta región ha sido utilizado ampliamente como alternativa diagnóstica (Martínez *et al.*, 2009) y se estima que esta se presenta en 28 copias en el genoma del microorganismo (Yoo *et al.*, 1993).

En 2001 Donoghue y colaboradores diseñaron dos juegos de cebadores que amplifican la región repetitiva de *M. leprae* mediante una PCR anidada (PCR-Rlep). Esta variante en la técnica aumentó la sensibilidad de la PCR. Estos autores determinaron que esta técnica molecular es capaz de detectar pequeñas cantidades de ADN de la micobacteria aún en muestras donde el material genómico se encuentra muy degradado (Donoghue *et al.*, 2001). Esta PCR ha sido utilizada para confirmar la presencia de la micobacteria en láminas de baciloscopía negativas y en muestras clínicas de pacientes con sospecha de padecer la enfermedad (Aye *et al.*, 2011, Kamble *et al.*, 2010).

En nuestro país, la aplicación de esta variante molecular a láminas de baciloscopía supone ventajas importantes debido a que esta es la muestra clave para el diagnóstico de la lepra, además de que su conservación y manipulación es relativamente fácil, lo que permitirá la realización de estudios retrospectivos. No obstante la posibilidad de emplear otras muestras clínicas tales como exudado nasal y sangre total, para el diagnóstico de casos sospechosos de padecer lepra, sería una alternativa útil y menos traumática que la obtención de linfa en los pacientes.

Es por esta razón que la implementación de técnicas moleculares para el diagnóstico de la lepra en nuestro país resulta importante en el fortalecimiento de las capacidades diagnósticas del Laboratorio Nacional de Referencia de Lepra (LNRL).

La aplicación de esta técnica en nuestro laboratorio permitirá contar con una herramienta rápida, sensible y específica para la detección oportuna de pacientes con sospecha de padecer la forma paucibacilar de la lepra y personas con infección subclínica subyacente.

Teniendo en cuenta la baja sensibilidad de la baciloscopía para diagnosticar a los pacientes paucibacilares y la importancia de introducir una herramienta de diagnóstico molecular en el IPK para la confirmación de los casos con difícil definición nos propusimos la siguiente investigación.

Objetivo General

Introducir un método de diagnóstico molecular para la detección de *Mycobacterium leprae* en diferentes muestras clínicas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Lepra

Objetivos Específicos

- Determinar el límite de detección analítico de la PCR anidada utilizando controles positivos
- Comparar cuatro métodos de extracción de ADN a partir de las láminas de baciloscopía de pacientes diagnosticados con lepra
- Evaluar la PCR anidada para la detección de *M. leprae* en diferentes muestras clínicas de pacientes paucibacilares y multibacilares

2. Revisión Bibliográfica

2.1. *Mycobacterium leprae*. Ubicación taxonómica y características generales

En 1873 el Dr. Gerhard Armauer Hansen en Noruega, descubre el agente causal de la lepra, *Mycobacterium leprae*. Esta constituyó la primera bacteria patógena descubierta en relación con una infección (de Zubiría y Rodríguez, 2003).

M. leprae pertenece al Orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae, que solo contiene al género *Mycobacterium*. Dentro de este género se encuentra el complejo *M. tuberculosis* (MTB); cuyos miembros causan la tuberculosis en humanos y animales e incluye a *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. canetti*, *M. pinnipedii*, *M. microti* y *M. mungi* (Forrellad *et al.*, 2013, Silaigwana *et al.*, 2012). También se encuentran las micobacterias ambientales o atípicas de las cuales se han descrito hasta la fecha más de 140 especies y son consideradas causantes de infecciones oportunistas (Lee *et al.*, 2012).

M. leprae es un bacilo intracelular obligado, inmóvil y no esporulado. Sus dimensiones se encuentran entre 0.3 a 0.5µm de ancho por 1.0 a 8.0µm de largo (Takade *et al.*, 2003). Al microscopio óptico se observa como una estructura rectilínea o curva. También en algunos pacientes puede formar agrupamientos (globis) unidos por una sustancia llamada glea que puede llegar a medir de 100 a 200µm. Esta característica lo distingue de otras micobacterias (Vargas Salas, 2006). Esta micobacteria es un bacilo ácido alcohol resistente (BAAR) y su pared celular está compuesta por peptidoglicanos (N-acetilglucosamina y N- glicosilmurámico) esterificados con unidades de arabinosa. Contiene abundantes lípidos complejos, algunos de los cuales son exclusivos de las micobacterias y producen marcados efectos biológicos en el hospedero. La capa de peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos micólicos son en parte los responsables de que la micobacteria retenga el colorante después de su exposición a alcohol-ácido

(ácido clorhídrico – etanol) y es la base para el método clásico de tinción Ziehl-Neelsen (ZN) (Yzquierdo, 2005). Los ácidos micólicos son largas cadenas de ácidos grasos de 60-90 átomos de carbono, con pocos dobles enlaces, esto le confiere hidrofobicidad a la capa y la convierte en una efectiva barrera contra la penetración de nutrientes hidrofílicos y antibióticos (Grange, 1996). El lípido más abundante y más inmunogénico es un glicolípido fenólico perteneciente a la familia I (GLF-I) (Alcaide Fernández de Vega *et al.*, 2005). El protagonismo de este compuesto está dado por su papel en la interacción de *M. leprae* con los nervios periféricos y de los nervios con las células de Schwann (Spencer y Brennan, 2011).

M. leprae se divide por fisión binaria en un período de 12 a 24 días (Pérez *et al.*, 2009). Este microorganismo no se ha logrado cultivar en medios artificiales aunque se puede mantener viable y metabólicamente estable durante 21 días, en la almohadilla plantar de armadillos muertos y en muestras de suelo con temperatura óptima de 30°C durante 45 días (Turankar *et al.*, 2012). Para su propagación se han empleado exclusivamente modelos animales especialmente armadillos y ratones atímicos de tipo knock-out (T900r, SCID, C57BL/6J) que presentan inmunodeficiencias específicas (Sharma *et al.*, 2013, Adams *et al.*, 2012).

La comparación entre el genoma de *M. leprae* y el de *M. tuberculosis* revela que, el bacilo de Hansen ha sufrido una continua evolución reductiva, que ha dado como resultado la pérdida de al menos 2000 genes funcionales. El tamaño de su genoma es 3 268 203pb mientras que el genoma de MTB es 4 411 532pb (Olmo Pinheiro *et al.*, 2011). *M. leprae*, presenta aproximadamente 1115 pseudogenes, esto implica que solo el 50% del genoma codifica para funciones específicas (Akama *et al.*, 2009). Es por ello que una gran cantidad de rutas metabólicas están ausentes y ello aumenta los requerimientos específicos para su crecimiento y desarrollo, por lo que es un parásito intracelular obligado (Torres Guerrero *et al.*, 2012).

La lepra es una enfermedad exclusivamente humana, el bacilo se transmite de hombre enfermo a hombre sano susceptible, se cree que por vía

respiratoria (Guedes Salgado y Gonçalves Barreto, 2012). *M. leprae* es un microorganismo de baja virulencia por lo que es necesario un contacto íntimo y prolongado entre el paciente como fuente de infección y el nuevo hospedero susceptible (Vaquero *et al.*, 2010). El hecho de que se hallaran armadillos y primates con lepra no descarta la posibilidad de que ellos también puedan ser fuentes de infección en personas que habiten iguales hábitat (Sharma *et al.*, 2013).

Se han realizado estudios para determinar la diversidad genotípica de *M. leprae* utilizando distintos marcadores entre ellos las regiones variables repetidas en tándem (VNTRs, siglas en inglés) que han permitido determinar con mayor precisión las características de la transmisión. Por otra parte empleando la técnica de polimorfismo de simple nucleótido (SNPs, siglas en inglés) se ha determinado la presencia de 4 tipos diferentes denominados SNPs 1-4 (Kuruwa *et al.*, 2012, Matsuoka *et al.*, 2009). A pesar de las diferencias encontradas se ha demostrado que *M. leprae* está altamente conservado, presentando pocas variaciones en su genoma completo. En los últimos años se han informado hallazgos de una nueva especie de micobacteria, *Mycobacterium lepromatosis*, que causa más casos de lepra lepromatosa que *Mycobacterium leprae*. Existen informes de su presencia en Singapur y México aunque sus características no han sido totalmente descritas (Phetsuksiri *et al.*, 2012, Yang Han *et al.*, 2012).

2.2. Lepra. Características generales y clasificación

La lepra es una enfermedad crónica, infecto-contagiosa, producida por el *Mycobacterium leprae*. En épocas antiguas constituyó un azote y es considerada una de las enfermedades más antiguas que conoce la humanidad (de Zubiría y Rodríguez, 2003). Fue declarada por la OMS dentro de las enfermedades olvidadas en 2010 (Arulanantham, 2010, Smith *et al.*, 2012). Se debe tratar no solo como un trastorno médico, sino como una dolencia con dimensiones psicológicas y socioeconómicas, que puede llegar a incapacitar al paciente si no es atendida adecuadamente y a tiempo. Su gravedad va más allá del número de enfermos y es necesario tener en cuenta la duración de la

enfermedad, el impacto de las incapacidades que causa y la repercusión social para los enfermos y su familia (Vargas Salas, 2006).

Esta enfermedad afecta principalmente la piel, los nervios periféricos, la mucosa de las vías respiratorias altas y los ojos. Años atrás se consideraba incurable y mutilante, éstas ideas permanecen en las mentes de muchas personas hoy en día (González Prendes, 1963). Los primeros síntomas suelen ser a nivel neural con anestesia y parestesia en las zonas afectadas de la piel. En las formas más severas de la enfermedad hay infiltración de grandes áreas cutáneas, especialmente en las zonas cartilagosas de la nariz y las orejas (Massone *et al.*, 2013). Las membranas mucosas de la nariz, son invadidas por un gran número de microorganismos. Las lesiones pueden ser hipocrómicas o hiperocrómicas, desde pequeñas y únicas hasta múltiples y grandes incluyendo nódulos (Dimri *et al.*, 2012). El diagnóstico tardío puede provocar la aparición de discapacidades que van desde la falta de sensibilidad hasta la parálisis motora de un miembro. También puede dar lugar a lesiones secundarias no propias de la patología como son las quemaduras, heridas y el mal perforante plantar, que de no ser tratados adecuadamente llegan a la destrucción o reabsorción del hueso (Moonot *et al.*, 2005). La desfiguración típica que sufre el sujeto con lepra, como la pérdida de extremidades debido a la lesión ósea, o la llamada *facies leonina* en la que el rostro se asemeja al de un león con gruesos nódulos cutáneos, son signos avanzados de la enfermedad (Wang *et al.*, 2012).

Las características de la enfermedad en sus diferentes formas, son el resultado de la respuesta del organismo humano ante la agresión del *M. leprae* (Pérez *et al.*, 2009). Las interacciones entre el patógeno y el sistema inmune, constituyen un modelo para investigar los mecanismos básicos de la regulación inmunitaria en el ser humano (Vaquero *et al.*, 2010).

El desarrollo de la lepra depende no solo de la presencia del bacilo de Hansen sino de las características de la respuesta inmune del hospedero susceptible (Torres Guerrero *et al.*, 2012). Los diferentes sistemas de clasificación han pasado desde los criterios que tienen en cuenta solamente las

manifestaciones clínicas hasta una más compleja y completa desarrollada por Ridley y Jopling en 1962. Las bases de este sistema de clasificación son las características clínicas, la histopatología, la inmunología y los resultados del análisis bacteriológico (Ridley y Jopling, 1962). La clasificación se divide en Lepra Tuberculoide (T), Lepra Borderline Tuberculoide (BT), Lepra Borderline Borderline (BB), Lepra Borderline Lepromatosa (BL) y Lepra Lepromatosa (L)(Degang *et al.*, 2012).

Debido a que la lepra es una enfermedad considerada de personas pobres y que por sus implicaciones sociales en muchos países subdesarrollados son los voluntarios religiosos quienes realizan la labor de pesquisa activa y tratamiento, la OMS en 1997 desarrolló una clasificación para usos operacionales (clasificación operacional). La cantidad de lesiones que presenta el enfermo al momento del diagnóstico es la base de esta clasificación, dividiéndolos en tres grandes grupos Paucibacilares (PB) de una lesión, Paucibacilares de 2 a 5 lesiones y Multibacilares (MB) todos aquellos que tengan más de 5 lesiones, esto es fundamental para definir el tiempo de tratamiento (Torres Guerrero *et al.*, 2012).

En Cuba la clasificación que se emplea es la adoptada en el Congreso de Madrid dividiendo la enfermedad en Lepra Indeterminada (LI), Lepra Lepromatosa (LL), Lepra Borderline Lepromatosa (LBL) y Lepra Borderline Borderline (LBB), Lepra Tuberculoide (LT) y Lepra Borderline o Dimorfa (LD). Esta además se vincula con la operacional según la cual los pacientes MB se corresponden con los de LL, LBL y LBB, mientras que los pacientes PB son los de LT y LBT (de Araújo Stefani *et al.*, 2012, MINSAP, 2008).

2.3. Patología

A pesar de que las manifestaciones clínicas que se observan en los enfermos son muy variables no se ha demostrado que existan diferencias sustanciales entre las distintas cepas de *M. leprae* (Kuruwa *et al.*, 2012). Estudios de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) de distintas cepas de *M. leprae* obtenidos de infecciones activas a

animales y al hombre muestran una gran similitud. Asimismo este microorganismo no produce endotoxinas ni exotoxinas u otros factores de virulencia que pudieran ser los responsables de la infección y el desarrollo de la enfermedad (Bochud *et al.*, 2009). Se ha determinado que la presencia del GLF-I y del lipoarabinomano en la membrana pueden ser los responsables de algunos mecanismos de evasión y de modulación de la respuesta inmune. Estos compuestos son capaces de captar metabolitos reactivos del oxígeno y suprimen la inmunidad mediada por células (Scaliante de Moura *et al.*, 2008). La presencia de gran cantidad de bacilos por gramo de tejido en pacientes con Lepra Lepromatosa, sin evidencia de toxicidad, apoya la hipótesis de que la patología de la enfermedad depende de la respuesta del hospedero (Spierings *et al.*, 2000).

El amplio espectro clínico e inmunopatológico de esta enfermedad se correlaciona con los diferentes patrones de respuesta Th1/Th2. La activación de clones específicos de linfocitos T CD4+, de manera preferencial, es importante en su patogenia y constituye un modelo natural de esa dicotomía en la respuesta inmune (Vaquero *et al.*, 2010). En ambas formas polares de la enfermedad se puede definir un patrón de citoquinas de secreción que son las que determinan las diferentes manifestaciones clínicas. Los factores que le confieren a una persona resistencia o susceptibilidad a padecer la enfermedad, no están bien esclarecidos. Entre las hipótesis que se manejan están las que involucran factores genéticos, diferencia en el microambiente de citoquinas celulares, disfunción en las células presentadoras de antígenos y en los macrófagos, además de alteración de los receptores de desechos que se expresan en las células de la inmunidad (Toll like receptors) entre otras (de Léséleuc *et al.*, 2013, Olmo Pinheiro *et al.*, 2011). Además se plantea la posibilidad de que el tipo de lepra que se padezca pueda estar relacionada con la sobreexpresión aumentada del gen Nramp-1 (natural resistance associated macrophage protein 1, siglas en inglés), que se encuentra disminuido en pacientes con lepra lepromatosa debido a la baja expresión de IRF-8. Este es un factor de transcripción específico del macrófago que participa en la expresión regulada de las citoquinas proinflamatorias IL12,

IL18 e IL1 β (Hatta *et al.*, 2010, Vejbaesya *et al.*, 2007). Otro de los factores que puede tener influencia en la susceptibilidad a padecer la enfermedad es el polimorfismo en los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA o MHC, siglas en inglés) (Alter *et al.*, 2011).

En el polo lepromatoso, la respuesta celular es totalmente inadecuada o nula, por lo que los bacilos logran multiplicarse dentro de los macrófagos, esto provoca la diseminación de las lesiones y la afectación de varios órganos (Santos *et al.*, 2002). La inmunidad humoral está exacerbada aunque esta no logra eliminar al patógeno intracelular y provoca una gran cantidad de inmunocomplejos circulantes que se depositan en distintos órganos (Rojas y Segal-Eiras, 1997).

En el polo tuberculoide, la respuesta celular es la adecuada aunque se considera insuficiente para eliminar los bacilos. Esta estimula la activación de los macrófagos y la destrucción de al menos parte de los bacilos. En estos pacientes las lesiones son pocas y se limitan a la piel y los nervios periféricos (Vanderborght *et al.*, 2004, Santos *et al.*, 2000).

Los mayores daños que aparecen en los pacientes están asociados a los mecanismos de hipersensibilidad retardada. Estos se ponen de manifiesto en los pacientes con lepra tuberculoide durante el transcurso de episodios agudos reaccionales (reacciones Tipo 1) y la formación de inmunocomplejos en el caso de los pacientes con lepra lepromatosa o cercanos a ese polo (reacciones Tipo 2) (Spierings *et al.*, 2000).

La diferencia en la respuesta inmune de los pacientes es un fenómeno complejo y multifactorial, que depende de alteraciones en la red de interacciones celulares y moleculares que forman parte de la respuesta inmunitaria. Determinar los mecanismos intrínsecos de la misma permitiría una mejor comprensión de su patogenia y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

2.4. Estado actual de la lepra en el mundo y en Cuba

La enfermedad de Hansen es una de las más complejas de todas las enfermedades bacterianas descritas en el hombre. En 2011 se diagnosticaron a nivel mundial 219 075 casos nuevos con una tasa de detección de 4,06 por cada 100 000 habitantes (OMS, 2012b). Según el reporte anual presentado por la OMS, solo 105 países informan la detección de nuevos casos de lepra y en algunas regiones del mundo como Europa no se informa ningún caso nuevo. Las regiones del Sudeste Asiático, África y América presentan las mayores tasas de detección de casos y de prevalencia. Durante el 2011, el 94% de los casos (206 285) fue diagnosticado en; Angola, Bangladesh, China, República Democrática del Congo, Indonesia, Madagascar, Mozambique, Myanmar, Nepal, Filipinas, Sri Lanka, Sudan, Brasil y La India. La India y Brasil diagnosticaron el 58% y 16% respectivamente del total de casos del año 2011 (OMS, 2012b). Durante el primer semestre del año 2012 el número de casos registrados fue aproximadamente 181 941, siendo nuevamente los países del Sudeste Asiático los que más casos aportaron a esta estadística.

En la región de las Américas, durante el período 2006 a 2011 hubo una disminución progresiva del número de casos nuevos de lepra, de 47 612 en 2006 a 36 832 en 2011 (reducción de 22,6%). En el mismo período la prevalencia disminuyó de 0,71 x 10 000 habitantes en 2006 a 0,37 x 10 000 en 2011 (reducción de 47,8%). En 24 de los 35 países de esta misma región, el 6,5% de los casos nuevos detectados presentaban discapacidad grado 2, lo que confirma que fueron diagnosticados tardíamente (OMS, 2012b). La cantidad de pacientes diagnosticados con lepra multibacilar es una medida de la existencia de focos activos de infección entre la población. En la región de las Américas durante 2011, el porcentaje de pacientes diagnosticados con lepra multibacilar entre los casos nuevos estuvo entre el 33,93% en Ecuador y el 84,12% en Argentina. Todos los países americanos excepto Brasil, han cumplido con la meta de eliminar la lepra como problema de salud a nivel nacional y 18 ya la han eliminado como problema de salud a primer nivel sub-nacional. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha decidido

clasificar a los países según la cantidad de casos diagnosticados anualmente, en países con baja carga de la enfermedad y países con alta carga de la enfermedad. Entre los países con baja carga están los que no reportan casos o reportan menos de 100 casos anuales y entre los de alta carga se encuentran los que reportan más de 100 casos anuales. Cuba se encuentra entre los países con alta carga de la enfermedad pues se diagnostican de 250 a 300 casos nuevos cada año (MINSAP, 2011).

En Cuba después de 1959 se desarrollaron Programas de Control que permitieron disminuir el número de casos y garantizar la detección precoz. A partir de 1988 cuando se comenzó a implementar la PQT, se evidenció una reducción sustancial de los casos de una tasa de prevalencia de $5,6 \times 10\ 000$ habitantes en 1988 a $0,2 \times 10\ 000$ habitantes de 2003 a 2008, observándose un ligero aumento hasta $0,3 \times 10\ 000$ que se ha mantenido en los últimos 4 años. Cuba y Colombia son los dos países de la región que están a punto de alcanzar la meta de eliminación de la lepra como problema de salud a nivel de municipios. En Cuba la tasa de detección de casos nuevos no se ha mantenido estable, varía entre un 1,6 hasta un $3 \times 100\ 000$ habitantes (Manguinga, 2012). Las provincias de Camagüey, Ciego de Ávila, Granma, Guantánamo y el municipio especial Isla de la Juventud, fueron las de mayor incidencia en el país durante 2011 (Tabla 1).

El aumento de la detección de casos nuevos entre los menores de 15 años, también es una característica del comportamiento de los parámetros en los últimos años. La enfermedad de Hansen tiene altos índices de incidencia y continúa afectando la calidad de vida de miles de personas que son diagnosticados tardíamente. Los diagnósticos tardíos en Cuba en 2011 fueron el 23% de los nuevos diagnosticados y la proporción de casos con discapacidad grado 2 fue de 8,6% (MINSAP, 2011).

Tabla 1: Tasa de detección de casos nuevos y prevalencia de lepra por provincias. Cuba, año 2011

Provincias	Incidencia*		Prevalencia**	
	No.	Tasa	No.	Tasa
Pinar del Río	7	1,2	11	0,2
Artemisa	5	1,0	5	0,1
La Habana	20	0,9	27	0,1
Mayabeque	4	1,0	5	0,1
Matanzas	2	0,3	5	0,1
Villa Clara	10	1,3	10	0,1
Cienfuegos	3	0,7	4	0,1
Sancti Spiritus	3	0,6	3	0,1
Ciego de Ávila	22	5,2	19	0,4
Camagüey	33	4,2	35	0,4
Las Tunas	9	1,7	5	0,1
Holguín	17	1,6	21	0,2
Granma	44	5,3	60	0,7
Santiago de Cuba	39	3,7	39	0,4
Guantánamo	30	5,9	34	0,7
Isla de la Juventud	6	7,0	6	0,7
Total	254	2,3	289	0,3

* Tasa por 100 000 habitantes

** Tasa por 10 000 habitantes. Prevalencia puntual al 31 de diciembre

2.5. Métodos convencionales de diagnóstico

El diagnóstico de la lepra ha sido un tema polémico en todas las épocas. Las primeras descripciones de la enfermedad tenían un componente totalmente clínico, el cual se complementó con el diagnóstico bacteriológico mediante la tinción de ZNm (Pérez et al., 2009). Sin embargo debido a las características de la respuesta de los hospederos a la infección, y las diferencias en las manifestaciones clínicas es necesario que los facultativos tengan una experiencia previa para llegar a un diagnóstico certero.

2.5.1. Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico se denomina dermatoneurológico y deben realizarlo los dermatólogos que son los especialistas facultados para ello. Durante este examen se debe explorar primeramente toda las áreas del cuerpo en especial aquellas zonas que se consideran más frías en las cuales tienden a aparecer los primeros síntomas de la enfermedad (ILEP, 2002). La exploración se

centra en la búsqueda de máculas eritematosas, pápulas y placas. Además se debe explorar la sensibilidad en aquellas zonas o manchas sospechosas. Se debe evaluar la existencia de zonas hipoestésicas, anestésicas o con trastornos de la sensibilidad térmica y dolorosa. Al mismo tiempo durante el análisis se deben palpar entre otros los nervios cubital y radial, para detectar engrosamiento (MINSAP, 1999). Los síntomas y signos característicos llevan a una sospecha de la enfermedad que debe ser confirmada por la baciloscopía y el diagnóstico histopatológico (Pérez *et al.*, 2009). En zonas rurales de alta endemia donde no existen los recursos para realizar una baciloscopía o el personal que realiza el diagnóstico no está capacitado para hacerlo, la clínica constituye la principal herramienta. En pacientes que padecen lepra paucibacilar, en los que la baciloscopía es negativa, la clínica es la clave para el diagnóstico (Chimenos-Küstner *et al.*, 2006). Los antecedentes epidemiológicos también son datos a tener en cuenta para llegar a una conclusión.

2.5.2. Diagnóstico bacteriológico

La baciloscopía es una técnica de microscopía en la cual se observan los bacilos a partir de la tinción de un frotis. La tinción empleada es la de ZNm para determinar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. La observación de BAAR en un frotis de linfa es la confirmación de un diagnóstico. En Cuba el Programa de Control establece la toma de cuatro muestras, que provienen de las aurículas y los codos, de las cuales se recolecta la linfa. Adicionalmente cuando el paciente no ha tomado la terapia específica de lepra o alguna otra terapia antibacteriana al menos una semana antes de la toma de muestra, se debe realizar un extendido del mucus obtenido a partir de un exudado nasal. Otra muestra válida al momento del diagnóstico es la linfa de una lesión de piel, teniendo en cuenta el tiempo de evolución de la misma por medio del interrogatorio al paciente (MINSAP, 1999). Los resultados se expresan como un índice que aumenta de manera logarítmica y mide la cantidad de bacilos observados por campo de luz y que se denomina índice bacteriológico (IB). El IB se expresa en valores que van de

0 a 6 y se ha demostrado que disminuye en pacientes con lepra multibacilar después de comenzado el tratamiento. Dependiendo del IB o codificación de la lámina, se definen las estrategias de tratamiento y es el parámetro utilizado para evaluar la evolución y respuesta de los pacientes con lepra multibacilar a la poliquimioterapia (Shen *et al.*, 2012). También se debe informar el índice morfológico (IM) que indica la cantidad de bacilos íntegros que se pueden observar al microscopio óptico, en relación al total de bacilos en la lámina. Esta relación permite evaluar de forma relativa la efectividad del tratamiento (Pérez *et al.*, 2009).

La baciloscopía es una técnica poco sensible, su sensibilidad va desde un 80% en los pacientes con lepra multibacilar hasta un 20% en los pacientes con lepra paucibacilar (Alcaide Fernández de Vega *et al.*, 2005) y su especificidad es de un 100% pues la presencia de BAAR en la linfa es evidencia de una infección por *M. leprae*. Sin embargo su confiabilidad depende en gran medida de la pericia del técnico desde el momento de la toma de muestra y el procesamiento hasta la observación (Premanshu *et al.*, 2008).

2.5.3. Diagnóstico histopatológico

La histopatología es una técnica importante para reunir evidencias de la infección por *M. leprae* (Bijjaragi *et al.*, 2012). La biopsia de piel para identificar BAAR en las zonas cercanas a los nervios, además de la búsqueda de evidencias de daño neural es el principal objetivo de este estudio complementario. El resultado de la histología también permite definir la clasificación de un caso nuevo. Esto resulta muy importante en etapas tempranas de la infección cuando no se observan las manifestaciones clínicas y se puede detectar el daño en los nervios (Williams *et al.*, 2013, Jayalakshmi, 1980). En ocasiones la biopsia no resulta válida debido esencialmente a los errores en el proceso de obtención la de muestra. Se debe seleccionar una lesión representativa y realizar la biopsia en la zona más activa (OMS, 2012a). Las principales tinciones que se emplean son la de ZNm, el Fite modificado y la de Hematoxilina y Eosina (Sharma *et al.*, 2008).

En ocasiones el diagnóstico definitivo de la enfermedad desde el punto de vista histopatológico debe realizarse por probabilidades y se deben analizar de manera global además de lo observado al microscopio, las características clínicas y epidemiológicas del paciente. Se considera un diagnóstico concluyente de lepra cuando se observan BAAR o granuloma en filete nervioso. Una buena evidencia de lepra es la presencia de un manguito perineural de linfocitos o un infiltrado inflamatorio (no granulomas) confinado a sitios protegidos. Se puede decir que las evidencias sugieren lepra cuando se observa destrucción de las glándulas sudoríparas o un infiltrado inflamatorio principalmente en haces neurovasculares (Khan *et al.*, 2012).

Unido a las tinciones convencionales, los estudios inmunohistoquímicos son también una herramienta para determinar la presencia de BAAR en las muestras de tejido y determinar los cambios ocurridos en el tejido aún antes de que aparezcan las manifestaciones clínicas en los pacientes (Anuja *et al.*, 2012).

2.6. Métodos alternativos de diagnóstico

2.6.1. Diagnóstico serológico

Debido a las características de la enfermedad, las investigaciones en los últimos años han estado encaminadas al desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico que permitan tener evidencias de laboratorio de la infección por *M. leprae* y realizar la búsqueda activa de la infección latente en poblaciones de riesgo (Parkash *et al.*, 1997). La respuesta inmune y la detección de los niveles séricos de anticuerpos contra antígenos específicos ha sido una de las herramientas empleadas. Las proteínas homólogas a ESAT-6 y CFP-10, proteínas de *M. tuberculosis* (Parkash, 2011), han sido utilizadas como dianas para el diagnóstico serológico. Además se ha empleado una proteína de 45kDa rica en serina, (Vega-López *et al.*, 1993) y la proteína de shock térmico de *M. leprae* [*M. leprae* Hsp65] que es considerada una de las más inmunoreactivas de la micobacteria con la finalidad de detectar anticuerpos

específicos que aporten evidencias al diagnóstico de la enfermedad (Marengo *et al.*, 2009). Algunos compuestos sintéticos derivados de la estructura de disacáridos y trisacáridos encontrados naturalmente en la pared de *M. leprae* (Oskam *et al.*, 2003) han sido otras dianas utilizadas. Las proteínas específicas de *M. leprae* se han obtenido de forma recombinante con el objetivo de ser utilizadas como antígenos en el diseño de inmunoensayos para el diagnóstico (Pena *et al.*, 2011, Bobosha *et al.*, 2011). De la misma forma han sido obtenidas las proteínas provenientes de otras micobacterias como *M. habana* y *M. tuberculosis* (Seraffin-López *et al.*, 2011, Singh *et al.*, 1994, Chaturvedi *et al.*, 1995). Con estas y otras dianas se ha buscado determinar presencia de anticuerpos en el suero de los pacientes a través de ensayos de ELISA y otras pruebas serológicas rápidas (Geluk *et al.*, 2011). Estas han sido algunas de las dianas más empleadas sin embargo el inmunoensayo empleado mayormente para los estudios en lepra ha sido el glicolípido fenólico I (GLF-I). Con la elucidación de su estructura química en 1981, y la determinación de su capacidad antigénica en 1982, se comenzó un nuevo camino en la búsqueda de candidatos potenciales para el diagnóstico serológico (Scaliante de Moura *et al.*, 2008). El GLF-I ha sido durante varios años el protagonista de las investigaciones en este sentido (Duppre *et al.*, 2012). La detección de anticuerpos IgM altamente específicos con una sensibilidad entre 80 y 90% en pacientes con lepra multibacilar y relativamente baja (30-60%) en pacientes con lepra paucibacilar ha sido considerablemente empleada para realizar pesquisas seroepidemiológicas (Gonçalves Barreta *et al.*, 2011, Bazan-Furini *et al.*, 2011).

La aparición de títulos de anticuerpos específicos contra el GLF-I, está asociada con el nivel de exposición de la población al bacilo. Esto fue evidenciado al detectar que en poblaciones de alta endemia, los niveles de anticuerpos no difieren mucho entre los contactos, los pacientes y la población en general. En esas poblaciones la serología no nos permite diferenciar entre la infección subclínica y la enfermedad (Bobosha *et al.*, 2011). Por otra parte en poblaciones de baja endemicidad existen diferencias en los niveles de anticuerpos entre los contactos y los no contactos (Cardona-

Castro *et al.*, 2009). En Cuba este es el ensayo que se utiliza, empleando un método ultramicroanalítico (UMELISA-Hansen), producido por el centro de Inmunoensayos de Cuba. La detección de anticuerpos en poblaciones de riesgo y en contactos de primer orden ha sido el uso principal dado a este ensayo.

2.6.2. Diagnóstico molecular

La infección subclínica en áreas endémicas se ha considerado un factor determinante pues si bien a nivel mundial la prevalencia de la enfermedad ha disminuido, la incidencia se mantiene estable. La situación actual de la enfermedad en el mundo muestra que a pesar de los esfuerzos de las autoridades no se ha logrado eliminar la transmisión (de Almeida *et al.*, 2004). Se desconoce en gran medida la importancia de la infección subclínica, su relevancia en la transmisión y la proporción real de casos subclínicos en una población dada. El conocimiento de estos datos podría esclarecer la forma en que entendemos el fenómeno de la diseminación, la transmisión y los factores de riesgo asociados a la infección con *M. leprae*. Las personas que están en contacto permanente con los enfermos tienen mayor riesgo tanto de contraer la infección como de padecer la enfermedad por lo que es importante encontrar un método rápido, sensible y específico que permita realizar un diagnóstico precoz entre los contactos intradomiciliarios de los pacientes. (Bernardes Goulart y Goulart, 2008).

Las técnicas moleculares han sido una herramienta emergente para apoyar el diagnóstico y confirmación de la infección por algunos agentes patógenos (Fernández, 2012). En el caso de la infección por *M. leprae* varios estudios se han enfocado en realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad. La aplicación de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en la detección específica de *M. leprae* en muestras clínicas proporciona una alta sensibilidad (detección de 10 a 100 bacilos) y una especificidad del 100% (Dayal *et al.*, 2005). Con fines diagnósticos se han utilizado los genes que codifican para las proteínas antigénicas de 15 kDa (Guerrero *et al.*, 2002), 18 kDa (Scollard *et al.*, 1998) y 36 kDa (Matheson *et al.*, 2009), la proteína de 65

kDa (de Wit *et al.*, 1993), Ag85B (Martinez *et al.*, 2006, Nóbrega Martinez *et al.*, 2011), la secuencia repetitiva RLEP (Martinez *et al.*, 2009) y la secuencia específica del ARNr 16S de *M. leprae* (Rudeeaneksin *et al.*, 2008) y estas dianas han demostrado ser altamente específicas.

La amplificación de regiones del genoma de *M. leprae* ha sido el método empleado fundamentalmente para la detección de la infección subclínica, pues en esta etapa los métodos convencionales suelen ser ineficaces (Guerrero *et al.*, 2002). Además se han realizado estudios de corte transversal para determinar la infección subclínica en personas contactos de pacientes en regiones de alta prevalencia, utilizando técnicas moleculares que demuestran la presencia del ADN de *M. leprae* en diferentes muestras clínicas de pacientes (Cardona-Castro *et al.*, 2008).

Detectar la infección en pacientes con lepra paucibacilar ha sido durante muchos años el principal objetivo del desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico (Santos *et al.*, 2001). El diseño de nuevas dianas moleculares y la mejora de los métodos de detección de los productos de amplificación han permitido emplear los técnicas moleculares para confirmar el diagnóstico en los pacientes con lepra paucibacilar (Sugita, 2001, Pattyn *et al.*, 1992). Wichitwechkarn y colaboradores desarrollaron una PCR que permitió confirmar el diagnóstico en pacientes paucibacilares con IB 0 y serología negativa a partir de muestras de biopsia y láminas de baciloscopia, amplificando un fragmento de 531 pb del genoma de *M. leprae* (Wichitwechkarn *et al.*, 1995).

En el diagnóstico molecular, la toma de muestra es otro factor crítico que garantiza el resultado del ensayo. Para determinar la mejor muestra clínica, se debe tener en cuenta no solo la carga bacteriana, sino que la toma de muestra sea lo menos invasiva posible, lo cual en algunos casos puede influir en la concentración real de la micobacteria que se puede recuperar de la muestra. En el caso de la detección de *M. leprae* se han realizado estudios empleando muestras de biopsia, de tejido fresco, sangre, suero, exudados nasales y frotis de linfa (Torres *et al.*, 2003, Santos *et al.*, 1995, Santos *et al.*,

1997). En dependencia del gen que se desee amplificar las muestras más convenientes han sido la biopsia o la muestra de sangre. Otros estudios revelan que en personas sospechosas y en poblaciones de riesgo la muestra de exudado nasal ha resultado útil, a la vez que mucho menos traumática para los pacientes. Sin embargo la presencia de ADN de la micobacteria en la mucosa nasal de personas que habitan en zonas de alta endemia, puede ser solamente signo de exposición al bacilo (de Almeida *et al.*, 2004).

La región repetida de *M. leprae* (Rlep) que tiene 28 copias en el genoma, descubierta por Yooh y colaboradores, ha sido una de las dianas moleculares empleadas para la detección y confirmación de casos nuevos de lepra. Esta misma secuencia fue utilizada por Wood y Cole para desarrollar una PCR que amplifica un producto de 372pb, con una sensibilidad del 73% en pacientes con IB 0 (Yooh *et al.*, 1993, Woods y Cole, 1989). Se diseñó una PCR anidada basada en esta región, que amplificaba en la primera reacción un producto de 455pb y en la segunda reacción un producto de 320pb. Esta PCR permitió aumentar la sensibilidad del ensayo hasta 85% en pacientes paucibacilares (Jamil *et al.*, 1994).

El empleo de dianas más pequeñas que las ya descritas ha sido una opción válida para lograr la amplificación de ADN a partir de muestras que pudieran estar degradadas o con baja carga bacilar. Estas muestras pueden provenir de pacientes sin tratamiento o de los que han concluido la poliquimioterapia pues se ha demostrado que permanece un ADN residual, varios años después de concluido la terapia, que pudiera estar asociado a las reacciones tardías (Gupta *et al.*, 2005).

Donoghue y colaboradores, diseñaron a partir de estos cebadores ya establecidos un nuevo juego de cebadores, para una PCR anidada que amplifica un producto en el primer paso de 129 pb y en el segundo paso un producto de 99 pb. Los resultados mostraron que esta PCR es 1000 más sensibles que la PCR que amplifica el gen de la proteína de 36kDa muy empleado en el diagnóstico. Por otra parte lograron detectar ADN a partir de

muestras arqueológicas lo que indica la capacidad de esta técnica de detectar bajos niveles de la bacteria (Donoghue *et al.*, 2001).

Emplear dianas moleculares para diagnosticar la infección por *M. leprae* garantiza un diagnóstico rápido, las ventajas de un método sobre otro dependen de las condiciones y de los recursos con los que se cuenta. Por otra parte se prefieren utilizar dianas moleculares que estén en varias copias en el genoma de la micobacteria y que su producto de amplificación sea pequeño. Estas características aumentan la sensibilidad en el diagnóstico debido a que generalmente las muestras clínicas con las que se cuenta presentan baja concentración de bacilos y en ocasiones el material genómico está degradado (Donoghue *et al.*, 2001, Plikaytis *et al.*, 1990).

2.7. Tratamiento y resistencia

El tratamiento de la lepra ha pasado por varias etapas, desde el oscurantismo cuando se consideraba un castigo divino e incurable, hasta la aparición de fármacos incipientes sin resultados considerables (de Zubiría y Rodríguez, 2003). En 1941 se comienza a emplear la dapsona como fármaco contra la infección, con buenos resultados (Maeda *et al.*, 2001).

La década de los 90 marcó pautas en el tratamiento y profilaxis de la lepra. Debido a la alta resistencia observada en pacientes tratados con monoterapia de dapsona, y los procesos de recaída, en 1991 se recomienda por la OMS la poliquimioterapia (PQT) como tratamiento de elección para tratar los casos de lepra. La PQT es una combinación de fármacos que permite prevenir el surgimiento de resistencia a los medicamentos (OMS, 2000). Existen distintas presentaciones con los mismos medicamentos, pero en dosis más bajas para niños (ILEP, 2002). Se puede administrar a pacientes VIH positivos, a aquellos que se encuentra con tratamiento anti-retroviral y a pacientes bajo tratamiento de MTB. Si un paciente de lepra recibe tratamiento para MTB, el esquema PQT debe omitir la rifampicina siempre y cuando el tratamiento que está tomando ya la contenga. El tratamiento es integral: antibacilar,

antirreaccional, de prevención de discapacidades y de rehabilitación (OMS, 2004).

La evaluación de la eficacia del tratamiento ha sido uno de los objetivos de las investigaciones en los últimos años. El empleo de técnicas moleculares para detectar ADN de *M. leprae* a pacientes después de terminada la terapia ha sido una de las herramientas más utilizadas. La proteína de 18kDa de *M. leprae* se empleó para diseñar una reacción en cadena de la polimerasa por reverso transcripción (PCR-RT) y se pudo determinar la eficacia de la PQT en pacientes multibacilares. La sensibilidad de esta técnica fue de 63.3% después de haber terminado el tratamiento, estos resultados no coincidieron con el IB y la serología al GLF-I, lo que indica que esta técnica tiene mayor sensibilidad que las convencionales (Chae *et al.*, 2002). Con esta técnica se determinó que aún después del tratamiento se pueden detectar bacilos, en la linfa de pacientes multibacilares. Además se han utilizado técnicas de PCR para amplificar fragmentos del ARNm 16S específico de *M. leprae*. El análisis de la eficacia de la PQT empleando esta diana molecular ha sido otra aplicación de la PCR (Kurabachew *et al.*, 1998). Se han empleado otras PCR_s para determinar el efecto de la multidrogoterapia en pacientes tratados, analizando las muestras de biopsia post tratamiento y comparándolas con el resultado inicial de la PCR (Singh *et al.*, 1999).

La resistencia a los fármacos es un fenómeno que se observa con baja frecuencia una vez que se comienza a aplicar la PQT (Maeda *et al.*, 2001). A pesar de esto la resistencia a las drogas de primera generación (dapsona y rifampicina) y a las de segunda línea (fluoroquinolonas) se ha descrito (Cambau *et al.*, 1997). Los estudios de resistencia se han desarrollado generalmente en modelos animales, aunque estos requieren de largos períodos de experimentación (Adams *et al.*, 2012). El análisis de marcadores moleculares en el genoma de *M. leprae* que indican la resistencia a los fármacos es importante para determinar las causas de las recaídas y la reinfección (Cambau *et al.*, 2012). La detección de mutaciones en los genes *rpoB*, *gryA* y *folP* son algunas de las dianas moleculares que permiten realizar

estos estudios. En países de alta endemicidad el análisis del comportamiento de estas variaciones garantiza el desarrollo de estrategias para evitar las recaídas. El primer caso de resistencia a la dapsona se detectó en 1964 y se conoce que estaba relacionada con un polimorfismo en el gen *folp1* (da Silva Rocha *et al.*, 2011). La resistencia a la rifampicina está asociada a mutaciones en el gen *rpoB* según estudios realizados en la almohadilla plantar de ratones. Este fármaco actúa bloqueando el paso de elongación dependiente de ADN durante el proceso de transcripción que es llevado a cabo por la enzima micobacteriana ARN polimerasa. La subunidad β de esta enzima es codificada por el gen *rpoB*, por lo que mutaciones en este gen originan niveles de resistencia (Somoskovi *et al.*, 2001). Las fluoroquinolonas actúan sobre las enzimas girasas dependientes de ADN, polimorfismos en el gen *gyrA* y *gyrB* que codifican para esta enzima permiten que los microorganismos sean resistentes a la acción de este fármaco (Degang *et al.*, 2012, Matrat *et al.*, 2008). Determinar mutaciones en los genes que indican resistencia es de gran importancia para combatir los eventos de recaída y recidiva que aparecen cada vez con más frecuencia en las poblaciones de alta endemia (Cambau *et al.*, 1997).

3. Materiales y Métodos

3.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo con la finalidad de introducir un método molecular para la detección de *Mycobacterium leprae* en el Laboratorio Nacional de Referencia de Lepra

3.2. Obtención de los ADN patrones para la PCR anidada (PCR-Rlep)

Se obtuvieron dos controles para la reacción de PCR anidada. El primer patrón positivo fue un ADN puro de *M. leprae* obtenido a partir del crecimiento en la almohadilla plantar de un armadillo de 9 bandas, de un inóculo micobacteriano. Este ADN fue donado gentilmente por el laboratorio de Biología Molecular del Sanatorio San Francisco de Borja, Fontilles, España y procedía del Global Health Institute, Ecole Polytechnique Federal de Lausanne, Department of Immunology, Lausanne, Switzerland.

Además se obtuvo ADN a partir de una lesión nodular de un paciente multibacilar. Para la extracción de ADN se emplearon 40 mg de tejido fresco conservado y se utilizó el estuche comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit (Qiagen, EEUU) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Se determinó la concentración de ambas muestras patrones de ADN y se procedió a conservar una alícuota a 4°C y el resto a -70°C. Para determinar el límite de detección analítico de la PCR se procedió a realizar diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-8} de la concentración inicial. Se compararon los límites de detección para ambos ADN patrones.

3.3. Reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCR-Rlep)

Teniendo en cuenta las condiciones descritas por Donoghue *et al* en 2001 se establecieron las condiciones de la PCR anidada para el actual estudio.

3.3.1. Iniciadores para el método de PCR anidada

Se emplearon dos juegos de iniciadores específicos de *M. leprae*, descritos por Donoghue *et al*, según se describen en la Tabla 2. Estos fueron donados por el Laboratorio de Biología Molecular del Sanatorio San Francisco de Borja, Fontillles, España.

Tabla 2. Secuencia de los iniciadores empleados en la PCR anidada para detectar ADN de *M. leprae* en frotis de linfa y muestras clínicas

Iniciadores	Residuo	Secuencia	Tamaño del producto
Lp1	490-509	TGCATGTCATGGCCTTGAGG	129 pb
Lp2	618-599	CACCGATACCAGCGGCAGAA	129 pb
Lp3	505-522	TGATGGGTCGGCGTGGTC	99 pb
Lp4	603-586	CAGAAATGGTGCAAGGGA	99 pb

3.3.2. Mezcla de reacción y perfil de amplificación de la PCR anidada

Se utilizó como secuencia diana un fragmento de 129 pb en la primera reacción y un fragmento interior de 99 pb en la segunda reacción, del gen que codifica para las regiones repetidas de *M. leprae*. La mezcla de reacción (25µL), contenía 5µL de Green Go-taq Buffer 5X (Promega, EEUU), 2µL (4mM) de MgCl₂, 0,125µL (1,25U) de *taq* polimerasa (Promega, EEUU), 0,5µL (0,2mM) de una mezcla de desoxirribonucleótidos (dNTP mix 10mM), 0,5µL de cada cebador a una concentración de 15pmol/µL (0,3µM) y 11,375µL de H₂O bidestilada estéril. Además se añadieron 5µL de ADN molde para la primera reacción.

Para la segunda reacción se emplearon las mismas condiciones descritas para la primera. En esta ronda se añadieron 2µL del producto la primera reacción de amplificación, como ADN molde (Donoghue *et al.*, 2001).

El perfil de amplificación en ambos casos fue: 94°C por 1min, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 30s y 72°C por 30s, con una extensión final a 72°C por 5min. La reacción de amplificación se llevó a cabo un termociclador (Peltier Gradient Thermal Cycler Model 4196, Nahita. AUXILAB, España).

En cada reacción se emplearon los dos controles positivos. Se utilizó un control negativo para cada ensayo donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN molde. Además se emplearon los controles negativos de extracción

3.4. Reacción en cadena de la polimerasa para el gen de la β actina

Como control interno de la reacción de PCR se empleó como secuencia diana un fragmento de 202 pb del gen que codifica para secuencia de la β actina (GenBank No de acceso NM_007393.3). La mezcla de reacción (50 μ L) contuvo Tris/HCl (pH 8.3) 10mM, KCl 50mM, MgCl₂ 1,5mM, dNTP 400 μ M, iniciadores (forward: CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G, reverse: GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC) 0.5 μ M, 1,25U de *taq* polimerasa (Promega, EEUU) y 5 μ L de ADN molde. El perfil de amplificación fue: 94°C por 3min, seguido de 40 ciclos a 94°C por 1min, 51°C por 2min y 1,5min a 72°C, con una extensión final de 7min a 72°C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Peltier Gradient Thermal Cycler Model 4196, Nahita. AUXILAB, España).

3.5. Detección de los productos de amplificación en gel de agarosa

Los productos de la amplificación de la primera y segunda ronda de la PCR fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% con 0,5 μ g de bromuro de etidio. La corrida electroforética se realizó a 70V con tampón Tris Borato EDTA pH 8 (Tris Base 54g, Ácido bórico 27,5g, 20mL EDTA 0,5M, 800mL H₂O bidestilada estéril) durante 90min. Los resultados de la electroforesis fueron visualizados mediante un transiluminador con luz ultravioleta (LKB 2011, Suecia) y se determinaron sus tallas por comparación con un patrón de peso molecular de 50pb (Promega, EEUU). Los resultados se documentaron empleando el sistema de documentación de imágenes UVIsafe D-55/20M versión 15.08 (UVItec, Inglaterra).

3.6. Métodos de extracción de ADN a partir de láminas de baciloscopía

Para determinar el método de extracción más adecuado para las láminas de baciloscopía se seleccionaron 40 láminas del año 2010 pertenecientes a la colección del Laboratorio Nacional de Referencia de Lepra. Estas láminas cumplían con los parámetros de calidad de tinción y codificación y fueron tomadas al momento del diagnóstico. Las láminas se separaron en dos grupos, las de codificación ≥ 4 que se clasificaron como láminas de alta codificación y las ≤ 1 que se clasificaron como láminas de baja codificación. En todos los casos se verificó la codificación y se prepararon para la extracción. Las láminas fueron seleccionadas aleatoriamente para cada método de extracción empleado en este estudio.

De las 20 láminas trabajadas dentro del grupo de las de baja codificación, 5 (25%) tenían una codificación negativa, las cuales pertenecían a pacientes paucibacilares. Como resultado del proceso de aleatorización de estas 5 láminas, a 3 se les extrajo el ADN por el método de Qiagen, y las otras 2 fueron trabajadas una por el método de Fenol/Cloroformo y 1 por el método de Promega.

Preparación Inicial (Pre-tratamiento)

Se sumergieron las láminas en xilol durante 15min para eliminar los restos de aceite de inmersión y las mismas se dejaron secar hasta eliminar todo el xilol. Se realizaron 4 lavados con 50 μ L de solución NET 10 pH 8, (10mM NaCl, 10mM EDTA, 10mM Tris HCl) y con una pipeta se rasparon los frotis de linfa. Se recogieron estos lavados en un tubo eppendorf de 1,5mL resultando en un volumen final de 200 μ L. Se añadieron 20 μ L de proteinasa K 20mg/mL (Merck, Darmstadt, Alemania) y 40 μ L de SDS 10%. Se calentaron las muestras a 56°C durante 60min y luego a 97°C durante 10min en un bloque térmico (Labnet, Bélgica). Se centrifugaron a 13 000 rpm por 6min. Se tomó el sobrenadante y se comenzó el proceso de extracción.

Se analizaron 4 métodos de extracción nombrados A, B, C, D. Para cada método se emplearon 5 láminas pertenecientes a cada uno de los dos grupos

de estudio, es decir 5 láminas de alta codificación y 5 láminas de baja codificación.

3.5.1. Método A (Fenol/Cloroformo). Descrito por Ani et al, 2009

A partir de un tubo eppendorf con 200µL de muestra en NET 10 se añadieron 250µL de Fenol/Cloroformo/Isoamílico (25:24:1 v:v:v), y el homogenizado se mezcló por inversión 10 veces. Luego la mezcla se centrifugó a 13 000 rpm durante 6min. La fase acuosa (superior) se recuperó sobre un tubo nuevo que contenía 250µL de Cloroformo/Isoamílico (24:1 v:v). Se centrifugó 13 000 rpm por 6min. De la misma manera, se recuperó la fase acuosa (superior) sobre un tubo que contenga 400µL de Etanol Absoluto y 15µL de NaAc 3M pH 6, mezclar por inversión 10 veces. Se guardó 20min a -70°C. Se centrifugó por 6min a 13 000rpm. Se decantó el sobrenadante y se añadieron 500µL de Etanol 70%, mezclar por inversión 10 veces. Se centrifugó por 6min a 13 000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar al aire. El ADN se resuspendió en 100µL de H₂O bidestilada estéril (Ani et al., 2009).

3.5.2. Método B (resina quelante Chelex-100). Descrito por de Armas et al, 2011

Cada muestra resuspendida en un volumen de 200µL se dividió en 2 muestras de 100µL y se añadieron en un tubo eppendorf de 1,5mL que contenía 100µL de una solución al 5% de Chelex-100 (Sigma, EEUU). Se colocaron en un bloque térmico (Labnet, Bélgica) a 100°C por 10min. Se dejaron enfriar y se homogenizaron en vortex. Se centrifugaron a 13 000 rpm durante 5min y se tomó el sobrenadante que se conservó a 4°C (de Armas et al., 2011).

3.5.3. Método C (Wizard® Genomic DNA Purification Promega). Descrito por Queipo-Ortuño et al, 2008

Se empleó el estuche comercial Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, EEUU), las muestras se trataron como provenientes de fluidos corporales. Se partió de 200µL de la muestra en NET 10 y el ADN se extrajo

empleando soluciones que contenían RNAsas, soluciones de precipitación de proteínas y de lisis celular. Luego se realizaron pasos de precipitación de ADN con isopropanol y etanol al 70% siguiendo las especificaciones del fabricante (Queipo-Ortuño *et al.*, 2008).

3.5.4. Método D (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit, Qiagen). Descrito por Davoren *et al.*, 2007

Se empleó el estuche comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit (Qiagen, EEUU), las muestras se trataron como provenientes de fluidos corporales. Se partió de 200 μ L de muestra en NET 10 y el ADN se extrajo empleando soluciones que contenían RNAsas y de precipitación de proteínas. La muestra que contenía el ADN se introdujo en la columna de afinidad y se realizaron lavados sucesivos con soluciones tampón para eliminar los contaminantes. El ADN se eluyó de la columna empleando una solución tampón según las especificaciones del fabricante (Davoren *et al.*, 2007).

3.5.5. Cálculo de la concentración y pureza de ADN

Cada muestra de ADN se corrió en una electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se les determinó la concentración de ADN a 260nm en un espectrofotómetro (Eppendorf, Alemania) y se estimó la pureza por la relación de la absorbancia a D_{260nm}/D_{280nm} . Se consideró que el ADN tiene una pureza adecuada si la relación es $> 1,8$. Las muestras fueron alicuotadas y conservadas a $-20^{\circ}C$ hasta su utilización

3.6. Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó empleando el programa estadístico Graphpad Prisma versión 5.03 para Windows (Graphpad Software, San Diego California, EEUU). Para la comparación de las medias de las densidades ópticas (DO) a 260nm y la relación (DO_{260nm}/DO_{280nm}), se aplicó el Test de Kruskal-Wallis. Se realizaron 10 mediciones de la D.O de cada uno de los 4 métodos utilizados en el estudio.

3.7. Evaluación de la PCR anidada para la detección de *M. leprae* a partir de diferentes muestras clínicas

3.7.1. Universo de estudio

Por otra parte del total de pacientes que asistieron al Laboratorio Nacional de Referencia de Lepra para realizar una baciloscopía (20) durante el segundo semestre de 2012, se estudiaron cinco pacientes.

3.7.2. Criterios de inclusión y de exclusión

Para la selección de los pacientes los criterios de inclusión fueron: presentar manifestaciones clínicas sugerentes de lepra y no haber sido diagnosticado con lepra previamente.

Los criterios de exclusión fueron: haber tomado la poliquimioterapia o estar tomando algún otro tratamiento antibacteriano.

A estos pacientes se les tomaron las muestras clínicas de rutina para el diagnóstico (MINSAP, 2008, MINSAP, 1999) además de sangre total.

3.7.3. Toma de muestras

3.7.3.1. Frotis de linfa (lámina de baciloscopía) y gotas de linfa

Se realizó la toma de muestra convencional para el diagnóstico de lepra por microscopía, (baciloscopía). En una lámina portaobjetos se marcaron 4 círculos para realizar un frotis de linfa de cada una de las 4 muestras procedentes de las aurículas y los codos según lo recomendado por la OMS y el Programa Nacional de Control de Lepra (MINSAP, 1999, OMS, 2000). Se procedió a limpiar la zona y a anemizarla con unas pinzas estériles. Posteriormente se realizó una inserción con un bisturí No 14 y se realizó el frotis de la linfa en la lámina. Luego durante la toma de muestra se procedió a recoger en un tubo eppendorf de 1,5mL, las gotas de linfa. La lámina de baciloscopía se procesó para ser codificada y se conservó a temperatura ambiente hasta su utilización para extraer ADN. El hisopo con la linfa se conservó a -20°C hasta su utilización para la extracción de ADN.

3.7.3.2 Exudado de mucus nasal

Se empleó un hisopo humedecido con solución salina estéril para realizar un exudado nasal con raspado de la zona del tabique, este se introdujo en un tubo eppendorf de 1,5mL estéril. Se centrifugó a 13 000 rpm durante 5min y el precipitado se conservó a -20°C hasta su utilización para la extracción de ADN.

3.7.3.3 Sangre total

Se realizó una extracción de 5mL de sangre total y se vertió en un tubo con EDTA como anticoagulante, se invirtió varias veces durante 30s. Se conservó a 4°C hasta su procesamiento.

Para la extracción de ADN a partir de todas las muestras clínicas de los pacientes se empleó el estuche comercial QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit (Qiagen, EEUU), siguiendo las especificaciones del fabricante en dependencia del tipo de muestra. En todos los casos el ADN se resuspendió en un volumen final de 100µL de tampón de reconstitución y se conservó a 4°C toda la noche.

El diagnóstico de estos pacientes se realizó empleando los métodos convencionales establecidos por el Programa Nacional de Control de la Lepra. Los exámenes complementarios realizados fueron la baciloscopía clásica y de exudado nasal, además de la Biopsia de piel utilizando la tinción específica para *M. leprae*. La conclusión del diagnóstico del caso y la clasificación del mismo se realizaron teniendo en cuenta el criterio clínico y los resultados de los complementarios según Programa de Control (MINSAP, 1999; MINSAP, 2008).

3.8. Consideraciones éticas

Todas las muestras fueron tomadas por el personal capacitado para hacerlo. A las personas involucradas en el estudio se les solicitó firmaran un consentimiento informado.

La información obtenida del estudio solo se utilizó para la investigación, manteniéndose la debida privacidad de los datos del paciente. Se anexa el modelo del consentimiento informado empleado para este trabajo. (Anexo 1)

4. Resultados

4.1 Determinar el límite de detección analítico de la PCR anidada utilizando controles positivos

Teniendo en cuenta las condiciones establecidas en el Laboratorio de Biología Molecular del Sanatorio San Francisco de Borja, Fontilles, se establecieron las condiciones de mezcla de reacción y del perfil de amplificación para la PCR anidada de *M. leprae* (PCR-Rlep) en el LNRL.

Al realizar la detección del ADN de *M. leprae* empleando la muestra de control positivo donado por el laboratorio de Biología Molecular de Fontilles, se observó amplificación hasta una dilución de 10^{-6} de la concentración inicial (Fig. 1). Esto equivalente a una concentración 0,4fg/ μ L de ADN en la muestra. Esta PCR amplifica un fragmento de un gen multicopia del genoma de *M. leprae* (28 copias), lo que le proporciona a esta técnica una alta sensibilidad debido a que es capaz de visualizarse amplificación aún en muestras con baja concentración de ADN. Para esta muestra la pureza relativa según la relación DO_{260nm}/DO_{280nm} fue de 1,8 (Tabla 3)

En estas mismas condiciones se realizó la amplificación del ADN obtenido a partir de una lesión nodular de un paciente multibacilar. La amplificación del producto de la PCR fue visible hasta una dilución 10^{-6} (Fig. 1). La pureza relativa de esta muestra según la relación DO_{260nm}/DO_{280nm} fue de 1,6 (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de concentración y pureza relativa de las muestras utilizadas como control positivo para la PCR anidada de *M. leprae*.

Concentración de ADN y pureza relativa de las muestras utilizadas como control positivo		
	[ADN] ng/ μ L	D.O 260 nm/D.O 280 nm
ADN puro de <i>M. leprae</i>	0,4	1,8
ADN de <i>M. leprae</i> obtenido de lesión nodular	46,3	1,6

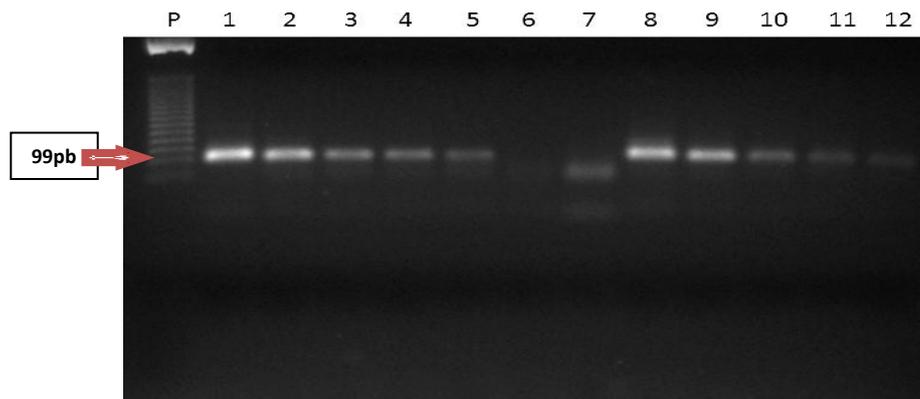


Fig 1. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 99 pb de las secuencias repetidas de *M. leprae* (PCR-Rlep) en la muestra de ADN puro y la muestra de ADN obtenida de la lesión nodular de un paciente multibacilar. Determinación del límite de detección analítica de PCR-Rlep. Línea P: Marcador de peso molecular (50pb, Promega, EEUU), línea 1-6 diluciones de la muestra de control positivo ADN puro de *M. leprae* (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}), línea 7 control negativo, línea 8-12 diluciones de la muestra de control positivo obtenida de la lesión nodular (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}).

4.2 Comparación de cuatro métodos de extracción de ADN a partir de las láminas de baciloscopia de pacientes diagnosticados con lepra

Para determinar el método de extracción más adecuado, en las condiciones de trabajo de nuestro laboratorio, para las láminas de baciloscopia, se midió la concentración de ADN y la relación $D.O_{260nm}/D.O_{280nm}$ para cada uno de los métodos de extracción. Los resultados para el grupo de láminas de alta codificación muestran que con el método de la resina quelante Chelex-100 (método B) se obtuvieron los mayores valores de concentración de ADN ($75,52 \pm 24,4 \text{ ng}/\mu\text{L}$) con diferencias significativas con relación a los métodos de Fenol/Cloroformo (método A) y el método comercial de Promega (método C) ($p < 0,001$). De la misma manera, se encontraron diferencias significativas en los valores de concentración entre los métodos comerciales de Promega y Qiagen (métodos C y D) ($p < 0,05$). En el caso de la relación $D.O_{260nm}/D.O_{280nm}$, con los métodos A, C y D se obtiene material genético con altos niveles de pureza y similares entre sí, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con respecto al método B. Con el empleo del método B, se mostró el grado de pureza más bajo entre los 4 métodos de extracción utilizados en el presente estudio. El análisis en conjunto de los resultados de la investigación

demuestra que el método D proporciona el ADN de mejor calidad para las láminas de alta codificación. (Tabla 4)

Tabla 4. Valores de concentración y pureza de las muestras obtenidas por los 4 métodos de extracción a partir de láminas de alta codificación para la detección *M. leprae*.

Láminas de baciloscopia con codificación alta		
Método de extracción	[ADN] ng/ μ L	D.O _{260 nm} /D.O _{280 nm}
A (FENOL-CLOROFORMO)	2,08 \pm 2,34	1,45 \pm 0,24
B (CHELEX-100)	75,52 \pm 24,4***	1,05 \pm 0,06 [^]
C (PROMEGA)	0,86 \pm 0,46*	1,37 \pm 0,16
D (QIAGEN)	3,32 \pm 0,72	1,41 \pm 0,22

*** Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los métodos de extracción A y C (p<0,001)

* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al método de extracción D (p<0,05)

[^] Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los métodos de extracción A, C y D (p<0,05)

Para las láminas de baja codificación se observó que con el empleo del método B se obtuvo los mayores valores de concentración de ADN (50,08 \pm 35,30ng/ μ L), con diferencias significativas con respecto a los restantes métodos de extracción utilizados en el estudio (p<0,001). Adicionalmente, el método D presentó valores de concentración de ADN significativamente superiores a los obtenidos con los métodos A y C (p<0,05). En el caso de la relación D.O_{260nm}/D.O_{280nm}, se evidenció que con el método D se obtuvo el ADN con los mayores niveles de pureza, mostrando diferencias estadísticamente significativas con los restantes métodos (p<0,05). Estos últimos mostraron niveles similares de pureza entre sí. El análisis del conjunto de las características observadas demuestra que el método D proporciona el ADN de mejor calidad para las láminas de baja codificación. (Tabla 5)

Tabla 5. Valores de concentración y pureza de las muestras obtenidas por los 4 métodos de extracción a partir de láminas de baja codificación para la detección de *M. leprae*

Láminas de baciloscopia con codificación baja		
Método de extracción	[ADN] ng/ μ L	D.O _{260 nm} /D.O _{280 nm}
A (FENOL-CLOROFORMO)	0,8 \pm 0,97	1,04 \pm 0,59
B (CHELEX-100)	50,08 \pm 35,30***	1,05 \pm 0,08
C (PROMEGA)	0,2 \pm 0,02	1,02 \pm 0,58
D (QIAGEN)	1,29 \pm 0,3*	1,33 \pm 0,16 [^]

***Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los métodos de extracción A, C y D (p>0,001)

* Diferencias estadísticamente significativas con respecto al método de extracción A y C (p>0,05)

[^]Diferencias estadísticamente significativas con respecto a los métodos de extracción A, B y C (p>0,05)

Al comparar el resultado de cada método de extracción de ADN con respecto a los dos grupos de láminas (alta y baja codificación) se observó que para el método A existen diferencias significativas en los valores de concentración y pureza. Estas características demuestran que este método pudiera ser empleado para la obtención de ADN provenientes de láminas de alta codificación. Por otra parte, con el método B se obtuvieron los mayores valores de concentraciones de ADN, entre todos los métodos de extracción, tanto en las láminas de alta como de baja codificación y resultaron similares entre sí. Los valores de pureza con este método de extracción fueron similares para los dos grupos de láminas y resultaron ser, en su conjunto, inferiores comparativamente con los restantes métodos. Además, el método C resultó el de menor valor de concentración obtenido tanto para el grupo de láminas de alta como las de baja codificación. Los valores de pureza obtenidos con este método en las láminas de alta codificación resultaron significativamente superiores con respecto a lo obtenido en las láminas de baja codificación y en su conjunto comparativamente inferiores a los métodos A y D. En el caso del método D los valores de concentración de ADN provenientes de las láminas de alta y baja codificación fueron similares entre sí y superiores a los valores de concentración de ADN de los métodos A y C. Por otro lado, los valores de pureza de este método para ambos grupos de láminas fueron similares entre sí y resultaron los de mayor pureza entre los métodos de extracción empleados.

El método B resultó ser el menos laborioso, a la vez que consumió menos tiempo de trabajo del investigador (18min). El método D consume un promedio de tiempo similar al anterior (23 min), pero la manipulación de la muestra es mayor. Los métodos A y C requieren de mucho tiempo de trabajo (50min y 93min respectivamente) y la manipulación es similar entre ellos.

Para evaluar la calidad del ADN extraído se realizó la amplificación del ADN de *M. leprae* empleando la PCR-Rlep. Para el grupo de láminas de alta codificación empleando los 4 métodos de extracción de ADN las muestras mostraron amplificación de la secuencia diana en el 100 %. (Fig. 2).

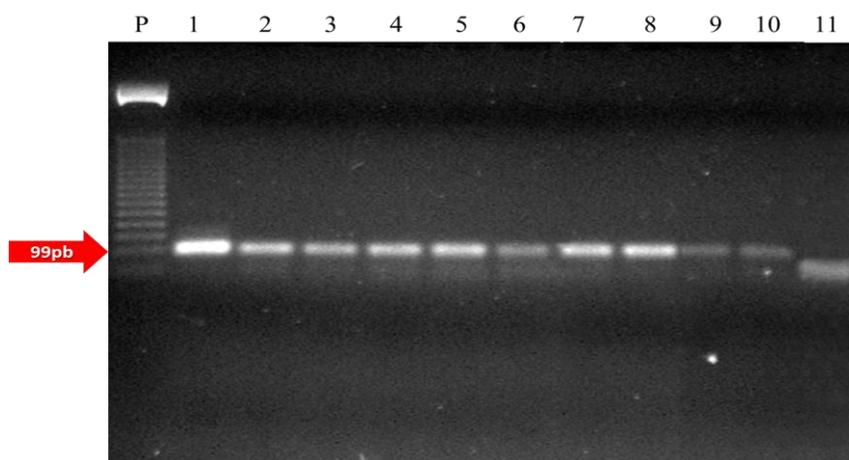


Fig. 2. Productos de la segunda ronda de amplificación de las secuencias repetidas de *M. leprae* (PCR-Rlep) con los 4 métodos de extracción de ADN para el grupo de láminas de alta codificación. Se presentan 2 muestras representativas por cada método. Línea P: Marcador de peso molecular (50 pb, Promega, EEUU); línea 1: muestra control positivo puro de *M. leprae*; línea 2: muestra control positivo obtenido de lesión nodular, línea 3-4: muestras obtenidas con el método Fenol/Cloroformo (método A); líneas 5-6: muestras obtenidas con el método Chelex-100 (método B); líneas 7-8: muestras obtenidas con el método Promega (método C); líneas 9-10: muestras obtenidas con el método Qiagen (método D); línea 11 control negativo.

Los resultados de la amplificación por la PCR-Rlep anidada para las láminas de baja codificación mostraron que para los métodos A y C, 4/5 láminas (80%) tuvieron amplificación de la secuencia diana (Fig. 3). Las muestras negativas por estos dos métodos no mostraron inhibición de la PCR al poder visualizarse la banda de amplificación específica de la β -actina para el genoma humano. Al emplear el método B no se obtuvo amplificación de

ninguna de las muestras empleadas en la investigación, ni aun cuando se realizaron diluciones hasta 1:100 de las muestras (Fig. 4). En estas muestras se confirmó la presencia de inhibidores de la PCR. Las 5 láminas a las que se les extrajo ADN con el método de Qiagen mostraron amplificación de la secuencia diana de 99 pb de *M. leprae* (Fig. 4).

De las láminas con codificación negativa, a las que se les extrajo ADN con los métodos A y C no mostraron amplificación de la secuencia diana (Fig. 3 líneas 7 y 8). A las que se les extrajo ADN por el método de Qiagen, el 100% mostró amplificación.

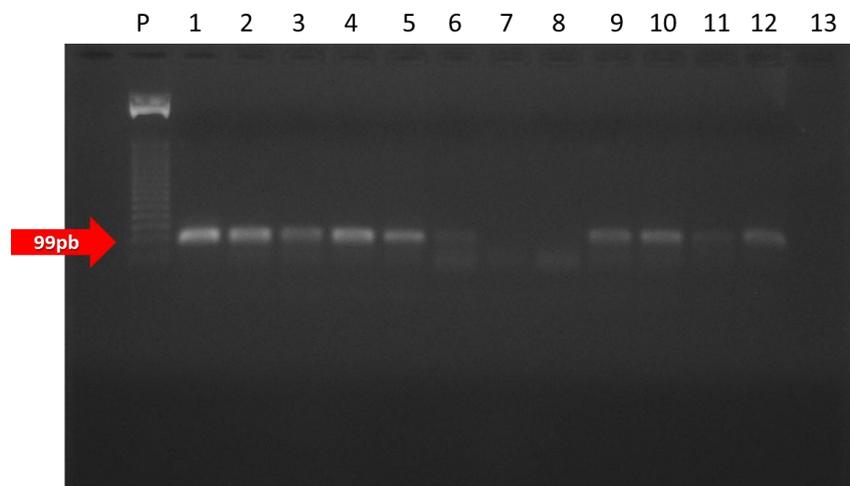


Fig. 3. Productos de la segunda ronda de amplificación de las secuencias repetidas de *M. leprae* (PCR-Rlep) de los métodos de extracción Fenol/Cloroformo y Promega (A y C), amplificación para el grupo de láminas de baja codificación. Línea P: Marcador de peso molecular (50 pb, Promega, EEUU); línea 1: muestra control positivo puro de *M. leprae*; línea 2: muestra control positivo obtenido de lesión nodular, línea 3-7: muestras obtenidas con el método Fenol/Cloroformo (método A); líneas 8-12: muestras obtenidas con el método Promega (método C); línea 13 control negativo.

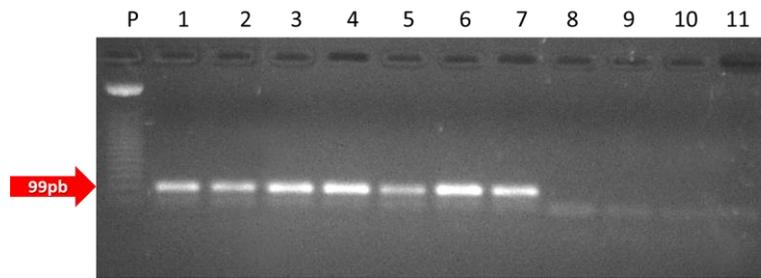


Fig. 4. Productos de la amplificación de las secuencias repetidas de *M. leprae* (PCR-Rlep) de los métodos de extracción Chelex-100 y Qiagen (B y D), amplificación para el grupo de láminas de baja codificación. Línea P: Marcador de peso molecular (50 pb, Promega, EEUU); línea 1: muestra control positivo puro de *M. leprae*; línea 2: muestra control positivo obtenido de lesión nodular, línea 3-7: muestras obtenidas con el método Qiagen (método D); líneas 8-11: muestras obtenidas con el método Chelex-100 (método B).

4.3 Evaluación de la PCR anidada para la detección de *M. leprae* a partir de diferentes muestras clínicas de pacientes multibacilares y paucibacilares

Se estudiaron las muestras clínicas provenientes de 5 pacientes que asistieron al laboratorio de Lepra del IPK. Estos fueron diagnosticados como pacientes con lepra, mediante los métodos diagnósticos convencionales establecidos. Según las manifestaciones clínicas y los resultados de los exámenes complementarios se clasificaron en: tres pacientes con lepra multibacilar y dos pacientes con lepra paucibacilar.

A todos los pacientes, se les extrajeron muestras de sangre total, gotas de linfa, frotis de linfa y exudado nasal. Los resultados de la amplificación de la secuencia diana mostraron que para los pacientes con lepra paucibacilar, las muestras de ADN obtenidas a partir de la sangre total, la linfa y el frotis de linfa fueron positivas. Mientras que la muestra obtenida del exudado nasal de uno de los pacientes no mostró amplificación (Fig. 5 línea 10). En el grupo de pacientes con lepra multibacilar todas las muestras resultaron amplificadas por la PCR anidada de *M. leprae* (Fig. 5).

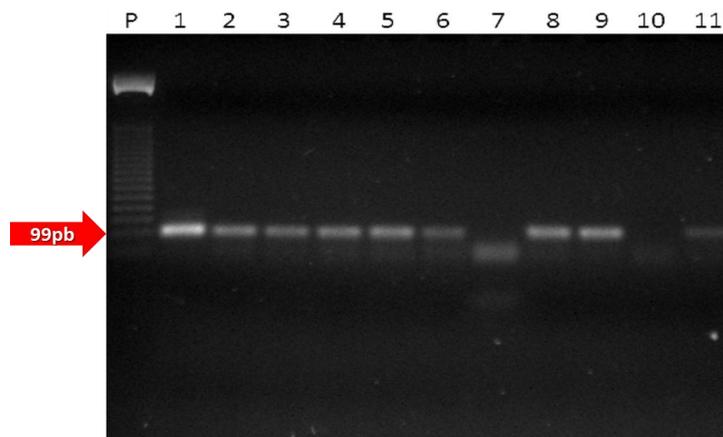


Fig. 5. Productos de la segunda ronda de amplificación de las secuencias repetidas de *M. leprae* (PCR-Rlep) de las diferentes muestras clínicas de los pacientes. Se presenta una muestra significativa de cada grupo de pacientes. Línea P: Marcador de peso molecular (50 pb, Promega, EEUU); línea 1: muestra control positivo puro de *M. leprae*; línea 2: muestra control positivo obtenido de lesión nodular; línea 3-6: amplificación del ADN obtenido a partir de las muestras clínicas de uno de los pacientes con lepra multibacilar; línea 3: sangre total; línea 4: exudado nasal; línea 5: frotis de linfa; línea 6: linfa. Línea 7 control negativo, líneas 8-11: amplificación del ADN obtenido a partir de las muestras clínicas de uno de los pacientes con lepra paucibacilar.

5. Discusión

La lepra es una enfermedad crónica, infecto-contagiosa, su gravedad en relación con otras enfermedades, no se puede evaluar exclusivamente sobre la base del número de enfermos o tasa de prevalencia, hay que tener en cuenta la duración de la enfermedad, las incapacidades que causa y las consecuencias humanas y sociales para los enfermos y su familia (Chimenos-Küstner *et al.*, 2006).

El diagnóstico de la enfermedad es clínico y se apoya en la histología, la epidemiología y la baciloscopía para clasificar un caso y definir el tratamiento. Debido a las características de la enfermedad, el diagnóstico convencional tiene una baja sensibilidad. El empleo de técnicas de Biología Molecular en la confirmación de la infección por *M. leprae* ha sido una herramienta que ha surgido como apoyo al diagnóstico convencional (Martinez *et al.*, 2009).

La aplicación del método de PCR anidada, en el LNRL, permitió la amplificación de un fragmento de la región repetida de *M. leprae*, en una muestra de ADN control positivo donado por el laboratorio de Biología Molecular de Fontilles. Con las condiciones previamente descritas en esa institución, se amplificó el ADN obtenido a partir de una lesión nodular de un paciente multibacilar. En esta muestra que contenía ADN humano y de la micobacteria, la PCR logró amplificar la secuencia diana hasta una dilución 10^{-6} , dilución similar a la que se obtuvo para el control positivo de Fontilles. Esta técnica demostró que es muy sensible y capaz de detectar la presencia de ADN de *M. leprae* incluso en muestras clínicas donde predomina el ADN humano. Estos resultados coinciden con lo obtenido por Donoghue y colaboradores quienes emplearon estos mismos iniciadores para lograr la amplificación específica de este fragmento en biopsias de pacientes después de terminado el tratamiento y en muestras arqueológicas de más de 1000 años. Ellos determinaron que esta PCR es capaz de detectar hasta 0,3 partes del genoma de una micobacteria, lo que indica su alta sensibilidad (Donoghue

et al., 2001). Según lo informado por Bernardes Goulart en 2008, esta PCR anidada ha sido uno de los métodos más sensibles de los empleados para el diagnóstico de la infección por *M. leprae* (Bernardes Goulart y Goulart, 2008). El empleo de una PCR anidada aumenta la sensibilidad de la técnica, pues se realiza la amplificación sobre un fragmento ya amplificado. Sin embargo esta característica puede ser la principal causa de la introducción de contaminaciones (Pérez de Rozas *et al.*, 2008). Con el objetivo de evitar esto se establecieron en el laboratorio las condiciones de separación física entre cada uno de los pasos de la técnica y se emplearon, controles negativos de extracción y de la PCR en ambas rondas de amplificación. La presente investigación permitió contar con una PCR que es capaz de detectar a muy bajas concentraciones ADN de *M. leprae* a partir de un control positivo. El empleo de controles positivos provenientes de muestras clínicas permite utilizar esta PCR para la confirmación de la infección por este microorganismo

La extracción de ADN además de ser el primer paso para la aplicación de las técnicas moleculares (de Armas *et al.*, 2011), es crucial para el buen funcionamiento de las mismas. Los métodos de extracción de ADN suelen ser sencillos aunque en ocasiones presentan problemas con el rendimiento y la calidad del ADN que se obtiene. La presencia de contaminantes e inhibidores de la PCR, las degradaciones parciales de la molécula de ADN y el tiempo de duración de los protocolos son otras dificultades que se pueden presentar (Philips, 2009). Para la extracción de ADN se han empleado múltiples métodos que van desde el calentamiento, la hidrólisis con enzimas, la incubación con detergentes, la precipitación con sales o la unión a matrices de sílica (Ani *et al.*, 2009, Aye *et al.*, 2011, Banerjee *et al.*, 2011, Coelho *et al.*, 2010, Sharbatkhori *et al.*, 2009, Willner *et al.*, 2012). De manera general los métodos se han clasificado como de extracción por no afinidad y por afinidad (Cattaneo *et al.*, 2000). Los de no afinidad son aquellos en los que el ADN permanece en solución mientras que todos los demás componentes celulares incluyendo las proteínas son eliminados. Entre estos se encuentran la extracción con Fenol/Cloroformo, estuches comerciales como los de la firma

Promega (Wizard® Genomic DNA Purification kit) y la resina quelante Chelex-100. Los de afinidad por otra parte requieren que el ADN se una por interacción química a un soporte sólido para después ser eluido para el análisis, algunos estuches comerciales entre ellos el de Qiagen (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit) se basan en este mecanismo (Cattaneo *et al.*, 2000).

La extracción de ADN a partir de láminas de baciloscopía, que ya han sido teñidas y observadas al microscopio puede ser un problema debido a la necesidad de obtener un ADN de buena calidad para ser amplificado en una PCR. Los frotis de linfa ya han sido empleados para realizar el diagnóstico molecular pues es una muestra clínica que supone dos ventajas; la confirmación de la presencia de *M. leprae* en láminas negativas al microscopio óptico y la obtención de ADN para realizar estudios de epidemiología molecular y determinar la cadena de transmisión (Dayal *et al.*, 2007, Jadhav *et al.*, 2005). El protocolo de extracción ideal para las láminas de baciloscopía debe ser rápido, simple, eficiente, barato y capaz de recuperar ADN con suficiente pureza. La decisión de comparar diferentes métodos de extracción respondió a la importancia de establecer en el laboratorio un protocolo sostenible y a la necesidad de valorar varias alternativas para la implementación de la técnica. En el presente estudio comparamos la eficiencia de 4 métodos de extracción de ADN en láminas de baciloscopía con alta codificación y con baja codificación. A todos los frotis de linfa se les realizó un paso común de pre tratamiento con proteinasa K 20 mg/ml y SDS 10%, según lo establecido en el protocolo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular del Sanatorio de Fontilles (comunicación personal). En otros protocolos de extracción a partir de muestras fijadas en láminas portaobjetos, este paso no ha sido informado (Ani *et al.*, 2009, Coelho *et al.*, 2010). Se ha descrito la utilización de esta metodología directamente para extraer ADN a partir de muestras fijadas en láminas portaobjetos con un rendimiento aceptable. En 2010 Kamble y colaboradores, utilizan una solución tampón con proteinasa K 20 mg/ml y SDS 10% para realizar la extracción del ADN. Ellos realizan la amplificación de un fragmento de la subunidad 16S del RNAr, altamente conservado en la micobacteria. En este

estudio del total de muestras estudiadas el 32,6% mostraron amplificación. Con este estudio demostraron que láminas teñidas pueden ser una fuente de ADN con calidad suficiente para realizar estudios moleculares (Kamble *et al.*, 2010), no obstante la sensibilidad resultó muy baja. Fontes y colaboradores en 2012 evaluaron el método de extracción con proteinasa K 20 mg/ml y SDS 10%, para determinar la capacidad de obtener un ADN de calidad para estudios moleculares. En el 28,2% de las muestras se obtuvo material genético con calidad suficiente para ser amplificado y genotipificado (Fontes *et al.*, 2012). La utilización de un paso de pre-tratamiento fue informado por García González y colaboradores quienes compararon un método de extracción a partir de cultivos de tejidos con y sin un paso previo de pre-tratamiento. Ellos determinaron que un paso previo de tratamiento rinde mejores resultados que la extracción directa (García González *et al.*, 2004). Adicionalmente Bonin y colaboradores determinaron que el empleo de un pre-tratamiento ha mostrado resultados favorables al aumentar hasta un 30% la sensibilidad del método de extracción que se emplee después (Bonin *et al.*, 2005).

El método A (Fenol/Cloroformo) se basa en el empleo de solventes orgánicos, que permiten extraer las proteínas presentes en la muestra e inhibir las enzimas que podrían degradar el ADN (Sambrook y Russell, 2001). La mezcla Fenol/Cloroformo ha sido ampliamente empleada para estos fines (Okwumabua *et al.*, 2010). A pesar de su utilidad la mayor desventaja de este método es que presenta varios pasos de manipulación de la muestra, aspecto que puede disminuir el rendimiento y aumentar la contaminación (Sidorova *et al.*, 2012). El método B consistió en la utilización de la resina quelante Chelex-100. Esta es una resina de intercambio catiónico débil, que se une a los iones divalentes especialmente al magnesio y evita que el ADN sea degradado por las enzimas que emplean este ión como cofactor. Sin embargo su principal desventaja es que no constituye un método de purificación por lo que pueden permanecer en la muestra sustancias inhibitoras de la PCR (Ceo *et al.*, 1992, de Armas *et al.*, 2011).

Adicionalmente se utilizaron en este estudio el procedimiento comercial de Promega (método C) que por sus características también representa un método de no afinidad (Promega-Corporation, 1998) y el procedimiento comercial de Qiagen (método D). Este último se basa en la unión del ADN a una matriz debido a la afinidad de este con los grupos activos de la resina a un pH establecido. Una vez que se han eliminado todos los contaminantes de la muestra las moléculas de ADN son eluidas de la matriz utilizando una solución tampón (QIAGEN, 2009). Este método se ha utilizado en múltiples estudios pues garantiza la obtención de un ADN con alta pureza y calidad para ser empleado en una PCR (Phillips *et al.*, 2012).

Cuando realizamos la observación de la eficiencia de cada método con respecto a los dos grupos de láminas vemos que el Fenol/Cloroformo tuvo mejores resultados para las de alta codificación. Aunque en todos los casos donde la lámina fue positiva el método rindió ADN que pudo ser amplificado. No se ha informado la utilización de este método de extracción para las láminas de baciloscopia sin embargo los resultados de esta investigación muestran que este podría ser una alternativa para obtener ADN de calidad a partir de láminas positivas, para ser empleadas en estudios epidemiológicos. El método Fenol/Cloroformo es capaz de extraer un ADN de muy alta calidad que se puede emplear incluso para estudios forenses (Butler, 2005). Su puesta a punto podría garantizar la obtención de grandes cantidades de material genético.

En relación a la resina quelante Chelex-100, esta ha sido muy utilizada para obtener ADN pues además de ser rápido y sencillo, evita la degradación de la muestra (Nagdev *et al.*, 2010). Por otro lado se conoce que la obtención de ADN por este método no garantiza la eliminación del total de los contaminantes (Chang *et al.*, 2009). Nuestros resultados para las láminas de alta codificación concuerdan con lo obtenido por Gomgnimbou M *et al* en 2012 quienes emplearon muestras de esputo fijadas en láminas y teñidas por ZN para realizar un estudio retrospectivo y estimar la prevalencia real en Burkina faso de la infección por *Mycobacterium africanum*. La extracción de

ADN se realizó con Chelex-100 y demostraron que las muestras fijadas en láminas portaobjetos pueden ser empleadas para la confirmación de la infección sobre todo en enfermedades donde otros métodos convencionales fallan. Además concluyeron que el Chelex-100 puede garantizar la obtención de ADN de calidad para el empleo de técnicas moleculares (Gomgnimbou *et al.*, 2012). Las láminas de baja codificación no mostraron amplificación positiva, lo que puede deberse a la presencia de una carga bacilar muy escasa, lo cual puede ser una causa adicional de este resultado con la extracción con la resina quelante. Por otra parte como se ha descrito, este es un método que no es capaz de separar la totalidad de los componentes celulares y otros contaminantes que puedan estar presentes en la muestra (Desloire *et al.*, 2006). Adicionalmente se conoce que por el método de Chelex-100 a pesar de que el rendimiento es muy alto, este no garantiza la purificación del ADN diana, lo que lo convierte en un método inespecífico, de elevada contaminación (Desloire *et al.*, 2006). Es muy probable que por este procedimiento se estén precipitando además del ADN otras moléculas que pueden ser inhibidoras de la PCR. Por lo que pudimos observar a simple vista durante el procedimiento de extracción de ADN con este método, los contaminantes provenientes de la tinción no son eliminados totalmente pues la solución donde está el ADN permanece de color azul. Teniendo en cuenta que en las láminas de alta codificación ocurre lo mismo en lo que respecta a los contaminantes, consideramos que la concentración de ADN de las muestras podría resultar el factor determinante en el resultado de la PCR. Estas características evidencian la utilidad de este método solo para láminas de baciloscopía de alta codificación.

Es válido mencionar que el método Promega demostró ser el menos eficiente para extraer ADN a partir de láminas de baciloscopía, pues aunque la pureza relativa fue similar a la obtenida con otros métodos, el rendimiento fue el más bajo de todos para ambos grupos de láminas. Este resultado podría deberse a que las características de este procedimiento de extracción no son compatibles con la extracción a partir de láminas de baciloscopía.

Al analizar las diferencias en los valores de pureza entre los métodos A, B y C podemos observar que a pesar de que tienen el mismo principio tanto el método de Fenol/Cloroformo como Promega logran mejores resultados en cuanto a la pureza relativa en la purificación de ADN que el método de Chelex-100. Esto coincide con lo obtenido por Chang y colaboradores en 2009 quienes determinan que el método de la resina quelante es muy útil por su rendimiento pero no es capaz de purificar el ADN de la muestra (Chang *et al.*, 2009).

El método de Qiagen permitió recuperar altas concentraciones de ADN con el mayor valor de pureza. Este método es muy eficiente incluso para muestras que tienen un ADN muy degradado (Phillips *et al.*, 2012). Algunas investigaciones que comparan diferentes métodos de extracción incluidos los estuches comerciales, han determinado que estos últimos son más eficientes para la extracción de ADN (Chang *et al.*, 2009). Davoren y colaboradores en 2007 compararon la eficiencia del método de Qiagen con el método Fenol/Cloroformo en muestras de huesos y determinaron que Qiagen permite obtener ADN de más calidad y que la presencia de inhibidores en la muestra es menos significativa (Davoren *et al.*, 2007).

Los dos métodos comerciales, evaluados en este estudio, a pesar de que se reconocen que tienen muy buenos rendimientos, presentaron entre ellos diferencias significativas en este aspecto. Esto puede deberse al principio básico de estos métodos. El método de Promega es de no afinidad y requiere varios pasos de manipulación lo cual puede provocar que si la molécula está en escasas concentraciones o está muy degradada, se pierda durante los sucesivos lavados. Esto no sucede en el método de Qiagen pues el ADN queda confinado a la matriz. Poma y colaboradores en 2012 compararon tres estuches comerciales de extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* a partir de sangre murina artificialmente infectada y demostraron que el método de Qiagen tiene una alta eficiencia en comparación con los estuches comerciales de Invitrogen (Viral RNA/DNA Mini Kit y PureLink™) y Macherey-Nagel (NucleoSpin® RNA Virus) (Poma *et al.*, 2012).

Las láminas de los pacientes paucibacilares resultan negativas mediante la tinción de ZNm. Esto no indica necesariamente que el paciente no está infectado. Esta es una de las limitantes de la detección de *M. leprae* por los métodos convencionales. Debido a la baja sensibilidad de la técnica microscópica para detectar BAAR el hecho de que un frotis de linfa tenga codificación negativa solo indica que la concentración de bacilos está por debajo de 10 000 bacilos/ml (Shepard y McRae, 1968). Es por esta razón que el diagnóstico de los pacientes paucibacilares se basa en las evidencias clínicas e histológicas, además de la epidemiología que en áreas endémicas tiene mucho peso (de Almeida *et al.*, 2004).

De las 20 láminas de baja codificación, 5 pertenecían a pacientes con lepra paucibacilar. De estas 5 láminas negativas al microscopio óptico, a las que se les extrajo ADN solo se pudo visualizar la banda de amplificación correspondiente a la talla de 99pb en 3 de ellas (60%). La lámina negativa a la que se le extrajo ADN con el método de Fenol/ Cloroformo no tuvo amplificación de la secuencia diana. Se obtuvo este mismo resultado para la lámina negativa a la que se le extrajo ADN con el método de Promega. El análisis de las muestras negativas en los métodos de extracción evidenció que ninguna presentó inhibición de la reacción cuando se empleó la PCR de la β -actina como control interno de amplificación. Para confirmar que el hecho de que estas láminas no tuvieran amplificación dependió de las características del método y no de que son realmente negativas se seleccionaron de la colección del LNRL las que pertenecían a estos pacientes y que fueron tomadas después de concluido el tratamiento. A estas se les extrajo ADN empleando el método de Qiagen y resultaron positivas para la secuencia diana. Esto confirma que las láminas iniciales eran positivas pero los métodos de Fenol/Cloroformo y Promega no son capaces de extraer ADN con calidad suficiente para ser amplificado. Esto puede deberse en el caso del método de Fenol/Cloroformo a que según lo informado por algunos autores cuando no hay suficiente cantidad de ADN en la muestra la extracción con Fenol/Cloroformo puede rendir concentraciones de ADN por debajo del límite de detección de la PCR (Okwumabua *et al.*, 2010). La obtención de

amplificación a partir de láminas negativas muestra que el método de Qiagen es eficiente para extraer ADN de láminas de baciloscopía con codificación cero. Nuestro resultado coincide con lo obtenido por Kamble *et al* en 2010 quienes emplearon una PCR que amplifica un fragmento de la subunidad 16S del RNAr de *M. leprae*, para detectar la presencia de este microorganismo en frotis de linfa negativas al microscopio. Estos autores concluyen que el empleo de frotis de linfa puede ser útil para la obtención de ADN y que las técnicas moleculares permiten disminuir la cantidad de casos que no son detectados por el diagnóstico convencional. De igual forma demostraron que el período de almacenamiento de las láminas no varía la capacidad de obtener ADN, por lo que estos métodos pueden ser empleados para realizar estudios retrospectivos y determinar características de la infección. (Kamble *et al.*, 2010).

Este resultado abre la posibilidad de utilizar esta PCR para determinar la presencia de ADN de *M. leprae* en láminas supuestamente negativas. Los resultados de esta investigación demuestran la utilidad de los métodos de Fenol/Cloroformo y Qiagen para extraer ADN de las láminas de baciloscopías para el diagnóstico de *M. leprae*.

El análisis del tiempo requerido para completar los diferentes protocolos de extracción y el grado de manipulación muestran que el método B (Chelex-100) y el D (Qiagen) son los que requieren menos tiempo y menos manipulación por el investigador. De manera general, para extracción de ADN de láminas de baciloscopía, el método más eficiente fue el de Qiagen, teniendo en cuenta, concentración de ADN recuperado, pureza del ADN, amplificación de las muestras, además del tiempo requerido y el nivel de manipulación. En cuanto a los costos de implementación de esta técnica se debe tener en cuenta la relación costo beneficio pues aunque las columnas de Qiagen son muy costosas, su empleo en láminas de baciloscopía supuestamente negativas es ventajoso para confirmar el diagnóstico en estos pacientes. En las condiciones de nuestro laboratorio consideramos que para extraer ADN de láminas negativas se puede utilizar al método de Qiagen, el

cual creemos es una alternativa sostenible. El método Fenol/Cloroformo a pesar de que requiere más tiempo y mayor manipulación de la muestra, tiene como ventaja para nuestras condiciones que es barato y fácil de poner a punto, aunque los solventes que se emplean son muy tóxicos. Para láminas de alta codificación también se podría emplear el método de Fenol/Cloroformo como una alternativa.

A pesar que los frotis de linfa son la muestra clásica empleada en el diagnóstico convencional y que el empleo de estas supone entre otras ventajas la posibilidad de estudiar de manera retrospectiva láminas conservadas a temperatura ambiente en los laboratorios de referencia (Fontes *et al.*, 2012). Es importante destacar en cada investigación cuál es la mejor muestra clínica para ser empleada. 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 (Beyene *et al.*, 2003 , Cardona-Castro *et al.*, 2008, Santos *et al.*, 1997, Sugita, 2001, Yooh *et al.*, 1993, Santos *et al.*, 2001, Santos *et al.*, 1999, Torres *et al.*, 2003). En el presente estudio realizamos un análisis preliminar de cuál podría ser la muestra más conveniente para realizar un diagnóstico en pacientes multibacilares y paucibacilares.

Nuestros resultados muestran que en la 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 se plantea que la bacilemia es un fenómeno que no se observa con mucha frecuencia (Rao *et al.*, 2007). En 2004 de Almeida y colaboradores determinaron el ADN de esta micobacteria en la muestra de sangre de 125 personas contactos de pacientes con lepra. De las 4 personas que presentaron amplificación de la secuencia diana, ninguna desarrolló la enfermedad después de un año de observación. Ellos concluyen que la presencia de ADN de la micobacteria en la sangre puede significar que las personas son portadoras o se encuentran en estado

de infección subclínica. Por lo que sugieren utilizar los resultados de la PCR en combinación con la clínica y la serología para concluir un caso sobre todo entre los contactos de pacientes (de Almeida *et al.*, 2004). Sin embargo otros estudios coinciden en señalar la posibilidad de detectar la presencia de ADN de *M. leprae* en muestras de sangre. Sigit Prakoeswa en 2007 detectó la presencia de ADN de *M. leprae* en la sangre de personas con lepra subclínica. En este estudio del total de pacientes estudiados el 20,69% tuvo amplificación empleando la PCR que amplifica la misma secuencia diana utilizada en nuestro estudio. Por lo que ellos concluyen que en la sangre de pacientes con infección subclínica puede haber presencia de ADN de *M. leprae* (Sigit Prakoeswa, 2007). Además en 2013 Yan y colaboradores evalúan el empleo de esta PCR anidada para detectar ADN de la micobacteria en muestras de sangre de pacientes con lepra multibacilar y lepra paucibacilar, además en contactos de pacientes, pacientes con tuberculosis y personas sanas. Ellos obtuvieron que 95,92% (47/49) y 70% (21/30) de amplificación en la sangre de pacientes con lepra multibacilar y paucibacilar respectivamente. Además de un 6,25% (6/96) de amplificación en contactos de pacientes y no se mostró amplificación ni en los enfermos con MTB (18) ni en las personas sanas (35). 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 (Yan *et al.*, 2013). En nuestro caso a pesar de que estudiamos pacientes con un desarrollo clínico de la enfermedad no podemos generalizar la utilidad de esta muestra. La validez del empleo de muestras de sangre debe ser demostrada más extensivamente con el análisis de un mayor número de pacientes.

En nuestro estudio la muestra de ADN a partir de la fosa nasal fue positiva para los pacientes multibacilares. Para los pacientes con lepra paucibacilar una de las dos muestras fue negativa. Esto podría estar dado porque este paciente con lepra paucibacilar tiene baja carga de la enfermedad y no se encuentra transmitiendo y por ello no se puede detectar la presencia de los bacilos en la cavidad nasal. Varios estudios revelan que en personas sospechosas de padecer lepra y en poblaciones de riesgo la muestra de

exudado nasal ha resultado muy útil a la vez que mucho menos traumática para los pacientes (de Almeida *et al.*, 2004). Sin embargo a pesar de que se ha empleado ampliamente, ha quedado establecido que estudios moleculares a partir de muestras de exudado nasal no son definitivos de un diagnóstico (Beyene *et al.*, 2003). Debido a que la transmisión de la enfermedad es por vía respiratoria, la presencia de ADN de *M. leprae* en las fosas nasales solo indica que la persona puede ser portadora (Araújo *et al.*, 2012). Otros 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 sea por la vía respiratoria e introduce una disyuntiva al diagnóstico de la enfermedad empleando técnicas moleculares aplicadas solo a este tipo de muestra (Group, 2000).

En las muestras de frotis de linfa de ambos pacientes se pudo obtener amplificación de la secuencia diana. Los resultados muestran que los frotis de linfa, pueden ser una muestra clínica que permita realizar un diagnóstico molecular, toda vez que se tienen estandarizadas las condiciones para realizar la extracción del ADN. Esto es válido incluso para pacientes con lepra paucibacilar donde la concentración de bacilos en la lámina es muy baja (Kamble *et al.*, 2010). La obtención de amplificación de la secuencia diana incluso en los pacientes paucibacilares, sugiere los frotis de linfa como una muestra prometedora para el diagnóstico de estos pacientes.

Por último analizamos la muestra de linfa, a pesar de que no existen muchos informes de su empleo para extraer ADN sabemos que la presencia de ADN de *M. leprae* en linfa implica la infección (López Navarro *et al.*, 2007). Lograr detectar ADN de *M. leprae* a partir de linfa es una sólida evidencia para determinar la infección por esta micobacteria. Consideramos que esta puede ser la muestra de elección para el diagnóstico pues además de que su toma se realiza durante la misma toma de muestra del frotis de linfa, que es la muestra clásica para el diagnóstico convencional, su procesamiento para la extracción de ADN es más sencillo pues no es necesario raspar la lámina. Por

otra parte con vista a extender esta herramienta a la confirmación de casos dudosos en el país, el frotis de linfa tiene ventajas pues no tiene requerimientos especiales para su conservación y traslado. En este estudio la linfa de todos los pacientes mostró amplificación, lo cual es consecuente con las evidencias clínicas y permitió confirmar el diagnóstico para los pacientes con lepra paucibacilar.

Las técnicas moleculares son herramientas mucho más sensibles que las técnicas convencionales para realizar el diagnóstico de un patógeno como *Mycobacterium leprae* (Torres *et al.*, 2003). Debido a lo costoso de la implementación de estas técnicas es importante determinar para qué tipo de pacientes es más conveniente utilizarlas. En 2011 Banerjee y colaboradores compararon la sensibilidad de una PCR y de la observación de frotis de linfa para el diagnóstico de lepra paucibacilar y multibacilar. Ellos establecen que es mucho más útil emplear las técnicas moleculares en pacientes con lepra paucibacilar pues en estos el diagnóstico convencional es muy poco sensible. Para el caso de los pacientes con lepra multibacilar ellos determinaron que hay una alta correlación entre la carga bacilar, las manifestaciones clínicas y los resultados de la baciloscopía y la serología (Banerjee *et al.*, 2011). Recientemente Nóbrega Martínez y colaboradores emplearon esta PCR para detectar la infección por *M. leprae* en pacientes que aún no habían desarrollado la enfermedad y otros con un diagnóstico erróneo, presentando una sensibilidad de un 87,1% (Nóbrega Martínez *et al.*, 2011). Esta PCR ha sido utilizada también para detectar ADN de esta micobacteria a partir de láminas de biopsias. Aye *et al* en 2011 extrajeron ADN de 192 muestras de biopsia de pacientes con índice bacteriológico entre 1 y 5. Del total de muestras estudiadas el 70% fueron positivas para esta PCR (Aye *et al.*, 2011).

Otras muestras también podrían ser empleadas para la confirmación del diagnóstico entre ellas los tejidos frescos y bloques de parafinas. Job *et al* realizaron un estudio en 39 personas sospechosas de padecer lepra, extrajeron ADN a partir de muestras de tejido y se les realizó además un

análisis histopatológico y clínico. De 26 pacientes diagnosticados histopatológicamente solo 11 fueron confirmados por PCR (Job *et al.*, 1997).

Este estudio abre la posibilidad a emplear otras muestras que pudieran ser útiles para el diagnóstico de *M. leprae*.

Con esta investigación hemos establecido un protocolo de trabajo para determinar la infección por *M. leprae* mediante la aplicación de una técnica de PCR anidada. Se determinó el mejor método de extracción de ADN a partir de láminas de baciloscopia debido a la importancia de estas para el diagnóstico en el Programa Nacional de Control de Lepra. Por otro lado se estableció de manera preliminar las mejores muestras para el diagnóstico de la enfermedad. La aplicación de esta metodología permite dar un salto cualitativo en el diagnóstico de los pacientes con lepra en Cuba si tenemos en cuenta que los pacientes paucibacilares no presentan hasta hoy un diagnóstico confirmatorio. Adicionalmente, podría permitir complementar el diagnóstico definitivo para la gran cantidad de casos sospechosos de padecer lepra. Por otro lado, posibilita la realización de estudios retrospectivos que pueden enriquecer el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad y establecer futuras pautas en el diagnóstico y el seguimiento de pacientes y contactos en aras de reducir los focos de infección y las manifestaciones subclínicas de la enfermedad.

6. Conclusiones

- La PCR anidada demostró tener una gran sensibilidad lo que permite la utilización de esta técnica para el diagnóstico a partir de diferentes muestras clínicas
- El método de Qiagen es el más adecuado para extraer ADN a partir de láminas de baciloscopía de alta y baja codificación lo que garantiza la obtención de ADN de calidad para estudios moleculares
- El método de Fenol/Cloroformo constituye una alternativa barata y útil para la obtención de ADN a partir de láminas de baciloscopía positivas
- Los resultados obtenidos por la técnica de PCR anidada a partir de láminas de baciloscopía negativas posibilita su utilización para la confirmación de la enfermedad en pacientes con lepra paucibacilar. Esto permite realizar un diagnóstico certero en este grupo de pacientes
- La detección de *M. leprae* en muestras de sangre total, exudado nasal, frotis de linfa y gotas de linfa, de pacientes paucibacilares y multibacilares, brinda alternativas importantes para el diagnóstico de este microorganismo

7. Recomendaciones

Realizar un estudio de casos y controles para determinar la sensibilidad y especificidad del método en nuestras condiciones

Aumentar la cantidad de pacientes paucibacilares estudiados

8. Referencias Bibliográficas

- Adams, L., Pena, M., Sharma, R., Hagge, D., Schurr, E. & Truman, R. 2012. Insights from animal models on the immunogenetics of leprosy - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(Suppl. I), 197-208.
- Akama, T., Suzuki, K., Tanigawa, K., Kawashima, A., Wu, H., Nakata, N., Osana, Y., Sakakibara, Y. & Ishii, N. 2009. Whole-Genome Tiling Array Analysis of *Mycobacterium leprae* RNA Reveals High Expression of Pseudogenes and Noncoding Regions. *J Bacteriol* 191, 3321-3327.
- Alcaide Fernández de Vega, F., Esteban Moreno, J., Gonzalez Martín, J. & Palacios Gutierrez, J. 2005. Micobacterias. In: Cercenado, E. & Cantón, R. (eds.) *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España: SEIMC.
- Alter, A., Huong, N., Singh, M., Orlova, M., Thuc, N., Katoch, K., Gao, X., Thai, V., Ba, N., Carrington, M., Abel, L., Mehra, N., Alcai, A. & Schurr, E. 2011. Human Leukocyte Antigen Class I Region Single-Nucleotide Polymorphisms are Associated with Leprosy Susceptibility in Vietnam and India. *The Journal of Infectious Diseases*, 203, 1274–1281.
- Ani, A., Okpe, S., Akambi, M., Ejelionu, E., Yakubu, B., Owolodun, O., Ekeh, P., Oche, A., Tyem, D. & Idoko, J. 2009. Comparison of a DNA based PCR method with conventional methods for the detection of *M. tuberculosis* in Jos, Nigeria. *Infect Dev Ctries* 3, 470-475.
- Anuja, N., Sherlin, H., Anandan, S., Mani, N. & Malathi, N. 2012. Subclinical changes of oral mucosa in Hansen's disease – a histopathological and immunohistochemical study. *Biology and Medicine*, 3, 31-42.
- Araújo, S., Lobato, J., de Melo Reis, E., Bernardes Souza, D., Gonçalves, M., Vieira Costa, A., Goulart, L. & Bernardes Goulart, I. 2012. 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*, 107 (Suppl.I).
- Arulanantham, S. 2010. Leprosy and the Millennium Development Goals. *Lepr Rev* 81, 287-289.
- Aye, K., Matsuoka, M., Kai, M., Kyaw, K., Win, A., Shwe, M., Thein, M., Htoo, M. & Htoon, M. 2011. FTA Card Utility for PCR Detection of *Mycobacterium leprae*. *Jpn J Infect Dis*, 64, 246-248.
- Banerjee, S., Biswas, N., Kanti Das, N., Sil, A., Ghosh, P., Hasanoor Raja, A., Dasgupta, S., Kanti Datta, P. & Bhattacharya, B. 2011. Diagnosing leprosy: revisiting the role of the slit-skin smear with critical analysis of the applicability of polymerase chain reaction in diagnosis. *Int J Dermatol*, 50, 1522-1527.
- Bazan-Furini, R., Motta, A., Simão, J., Chaves Tarquínio, D., Marques Jr, W., Barbosa, M. & Tiraboschi Foss, N. 2011. Early detection of leprosy by examination of

- household contacts, determination of serum anti-PGL-1 antibodies and consanguinity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106, 536-540.
- Bernardes Goulart, I. & Goulart, L. 2008. Leprosy: diagnostic and control challenges for a worldwide disease. *Arch Dermatol Res*.
- Beyene, D., Aseffa, A., Harboe, M., Kidane, D., Macdonald, M., Klatser, P., Bjune, G. & Smith, W. 2003 Nasal carriage of *Mycobacterium leprae* DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. *Epidemiol Infect*, 131, 841-848.
- Bijjaragi, S., Kulkarni, V., Suresh, K., Chatura, K. & Kumar, P. 2012. Correlation of clinical and histopathological classification of Leprosy in post elimination era. *Indian J Lepr*, 84, 271-275.
- Bobosha, K., Van der Ploeg-Van Schip, J., Zewdie, M., Sapkota, B., Hagge, D., Franken, K., Inbiale, W., Aseffa, A., Ottenhoff, T. & Geluk, A. 2011. Immunogenicity of *Mycobacterium leprae* unique antigens in leprosy endemic populations in Asia and Africa. *Lepr Rev*, 82, 445-458.
- Bochud, P., Sinsimer, D., Aderem, A., Siddiqui, M., Saunderson, P., Britton, S., Abraham, I., Argaw, A., Janer, M., Hawn, T. & Kaplan, G. 2009. Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28, 1055-1065.
- Bonin, S., Petrera, F., Rosai, J. & Stanta, G. 2005. DNA and RNA obtained from Bouin's fixed tissues. *J Clin Pathol*, 58, 313-316.
- Butler, J. 2005. *Forensic DNA Typing*, New York, Elsevier.
- Cambau, E., Chauffour-Nevejans, A., Tejmar-Kolar, L., Matsuoka, M. & Jarlier, V. 2012. Detection of Antibiotic Resistance in Leprosy Using GenoType LepraeDR, a Novel Ready-To-Use Molecular Test. *PLoS Negl Trop Dis*, 6.
- Cambau, E., Perani, E., Guillemin, I., Jamet, P. & Ji, B. 1997. Multidrug resistance to dapsone, rifampin and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. *Lancet* 349, 103-104.
- Cardona-Castro, N., Beltrán-Alzate, J. & Manrique-Hernández, R. 2008. Survey to identify *Mycobacterium leprae*-infected household contacts of patients from prevalent regions of leprosy in Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 103, 332-336.
- Cardona-Castro, N., Beltrán-Alzate, J. & Romero-Montoya, M. 2009. Clinical, bacteriological and immunological follow-up of household contacts of leprosy patients from a post-elimination area - Antioquia, Colombia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 104, 935-936.
- Cattaneo, C., Gelsthorpe, K. & Sokol, R. 2000. DNA Extraction Methods in Forensic Analysis. In: Meyers, R. (ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry: Applications, Theory, and Instrumentation*. John Wiley and Sons, Ltd.

- Ceo, R., Kazerouni, M. & Rengan, K. 1992. Sorption of Silver Ions by Chelex 100 Chelating Resin. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 172, 43-48.
- Coelho, A., Pinto, M., Miranda, A., Coelho, A., Pires, M. & Matos, M. 2010. Comparative evaluation of PCR in Ziehl-Neelsen stained smears and PCR in tissues for diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 948-950.
- Chae, G., Kim, M., Kang, T., Lee, S., Shin, H., Kim, J., Ko, Y., Kim, S. & Kim, N. 2002. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDa gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy. *J Med Microbiol*, 51, 417-422.
- Chang, J., Zhang, S. & Li, L. 2009. Comparing and evaluating six methods of extracting human genomic DNA from whole blood. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 25, 109-111.
- Chaturvedi, V., Singh, N. & Sinha, S. 1995. Immunoreactive antigens of a candidate leprosy vaccine: *Mycobacterium habana*. *Lepr Rev*, 66, 31-8.
- Chimenos-Küstner, E., Pascual-Cruz, M., Piñol-Dansis, C., Viñals-Iglesias, H., Rodríguez de Rivera-Campillo, M. & López-López, J. 2006. Lepromatous leprosy: A review and case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11.
- da Silva Rocha, A., das Graças Cunha, M., Martins Diniz, L., Salgado, C., Aires, M., Nery, J., Novisck Gallo, E., Miranda, A., Magnanini, M., Matsuoka, M., Sarno, E., Suffys, P. & de Oliveira, M. 2011. Drug and Multidrug Resistance among *Mycobacterium leprae* Isolates from Brazilian Relapsed Leprosy Patients. *J Clin Microbiol*, 50, 1912-1917.
- Davoren, J., Vanek, D., Konjhodzić, R., Crews, J., Huffine, E. & Parsons, T. 2007. Highly Effective DNA Extraction Method for Nuclear Short Tandem Repeat Testing of Skeletal Remains from Mass Graves. *Croat Med J*, 48, 478-485.
- Dayal, R., Agarwal, M., Natrajan, M., Katoch, V., Katoch, K., Singh, K. & al, e. 2007. PCR and in-situ hybridization for diagnosis of leprosy. *Indian J Pediatr*, 74, 645-648.
- Dayal, R., Singh, S., Mathur, P., Katoch, V., Katoch, K. & Natrajan, M. 2005. Diagnostic value of *In Situ* Polymerase Chain Reaction in Leprosy. *Indian Journal of Pediatric*, 72, 1043-1046.
- de Almeida, E., Nóbrega Martinez, A., Câmara Maniero, V., Sales, A., Duppre, N., Sarno, E., Santos, A. & Moraes, M. 2004. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood and Nasal Secretion of Brazilian Household Contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99, 509-512.
- de Araújo Stefani, M., Badotti Grassi, A., Sampaio, L., Maroclo de Sousa, A., Barcelos Costa, M., Scheelbeek, P., Neupane, K., Hagge, D., Macdonald, M., Cho, S., Oskam, L. & Bühner-Sékula, S. 2012. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-I serology in Brazil and Nepal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107(Suppl. I), 124-131.

- de Armas, Y., Capó, V., López, L., Mederos, L. & Díaz, R. 2011. Comparación de tres métodos de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina. *Biotecnología Aplicada*, 28, 40-43.
- de Léséleuc, L., Orlova, M., Cobat, A., Girard, M., Huong, N., Ba, N., Thuc, N., Truman, R., Spencer, J., Adams, L., Hong Thai, V., Alcais, A. & Schurr, E. 2013. PARK2 Mediates Interleukin 6 and Monocyte Chemoattractant Protein 1 Production by Human Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis*, 7.
- de Wit, M., Douglas, J., McFadden, J. & Klatser, P. 1993. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swab specimens. *J Clin Microbiol*, 31, 502-506.
- de Zubiría, R. & Rodriguez, G. 2003. Historia de la lepra ayer, hoy y mañana. *Rev MEDICINA*, 25, 33-46.
- Degang, Y., Akama, T., Hara, T., Tanigawa, K., Ishido, Y., Gidoh, M., Makino, M., Ishii, N. & Suzuki, K. 2012. Clofazimine Modulates the Expression of Lipid Metabolism Proteins in *Mycobacterium leprae*-Infected Macrophages. *PLoS Negl Trop Dis* 6.
- Desloire, S., Valiente Moro, C., Chauve, C. & Zenner, L. 2006 Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: *Dermanyssidae*). *Vet Res*, 37, 725-732.
- Dimri, D., Sethi, B. & Kumar, Y. 2012. De Novo Histoid Leprosy in an Elderly: A Case Report and Review of the Literature. *Case Reports in Pathology*, 2012.
- Donoghue, H., Holton, J. & Spigelman, M. 2001. PCR primers that can detect low levels of *Mycobacterium leprae* DNA. *J Med Microbiol*, 50, 177-182.
- Duppre, N., Camacho, L., Sales, A., Illarramendi, X., Nery, J., Sampaio, E., Sarno, E. & Buhrer-Sekula, S. 2012. Impact of PGL-I Seropositivity on the Protective Effect of BCG Vaccination among Leprosy Contacts: A Cohort Study. *PLoS Negl Trop Dis*, 6.
- Fernández, C. 2012. *Amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de infecciones por micoplasma y ureaplasma de interes clínico en Cuba*. DrC en opción al grado de DrC., IPK.
- Fontes, A., Gomes, H., de Araujo, M., de Albuquerque, E., Baptista, I., Moura, M., Rezende, D., Pessolani, M., Lara, F., Pontes, M., Gonçalves Hde, S., Lucena-Silva, N., Sarno, E., Vissa, V., Brennan, P. & Suffys, P. 2012. Genotyping of *Mycobacterium leprae* present on Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides and in skin biopsy samples from leprosy patients in different geographic regions of Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 107, 143-149.
- Forrellad, M., Klepp, L., Gioffré, A., Sabio y García, J., Morbidoni, H., de la Paz Santangelo, M., Cataldi, A. & Bigi, F. 2013. Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence*, 4, 3-66.

- García González, L., Rodrigo Tapia, J., Sánchez Lazo, P., Ramos, S. & Suárez Nieto, C. 2004. DNA extraction using Chelex resin for oncogenic amplification analysis in head and neck tumours. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 55, 139-144.
- Geluk, A., Duthie, M. & Spencer, J. 2011. Postgenomic *Mycobacterium leprae* antigens for cellular and serological diagnosis of *M. leprae* exposure, infection and leprosy disease. *Lepr Rev*, 82, 402-421.
- Gomgnimbou, M., Refrégier, G., Diagbouga, S., Adama, S., Kaboré, A., Ouiminga, A. & Sola, C. 2012. Spoligotyping of *Mycobacterium africanum*, Burkina Faso. *Emerging Infectious Diseases* [Online], 18.
- Gonçalves Barreta, J., de Souza Guimaraes, L., Neves Leao, M., Gomes Ferreira, D., Alves de Araujo Lima, R. & Guedes Salgado, C. 2011. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *Lepr Rev*, 82, 358-370.
- González Prendes, J. 1963. Historia de la Lepra en Cuba. *Publicaciones del Museo de la Academia de Ciencias*.
- Grange, J. 1996. The biology of the genus *Mycobacterium*. *J Appl Bacteriol Suppl*, 81, 1-9.
- Group, M. S. 2000. Approaches to studying the transmission of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev*, Suppl:S26-9.
- Guedes Salgado, C. & Gonçalves Barreto, J. 2012. Leprosy Transmission: Still a Challenge. *Acta Derm Venerol*, 92, 335.
- Guerrero, M., Arias, M., Garcés, M. & León, C. 2002. Desarrollo y aplicación de una prueba de RCP para detectar la infección subclínica por *Mycobacterium leprae*. *Rev Panam Salud Publica*, 11.
- Gupta, U., Katoch, K., Singh, H., Natrajan, M. & Katoch, V. 2005. Persist studies in leprosy patients after multi-drug treatment. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 73, 100-104.
- Hatta, M., Ratnawati, Tanaka, M., Ito, J., Shirakawa, T. & Kawabata, M. 2010. NRAMP1/SLC11A1 gene polymorphisms and host susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae* in South Sulawesi, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 41 386-394.
- ILEP 2002. *Como diagnosticar y tratar la lepra. Guía de aprendizaje*, London, Great Britain, Internacional Federation of Anti-Leprosy Associations
- Jadhav, R., Kamble, R., Shinde, V., Edward, S. & Edward, V. 2005. Use of reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in the slit-skin smears of leprosy patients. *Indian J Lepr*, 77, 116-27.

- Jamil, S., Wilson, S., Hacket, M., Hussein, R. & Stoker, N. 1994. A colorimetric PCR method for the detection of *M. leprae* in skin biopsies from leprosy patients *Int J Lepr*, 62, 512-520.
- Jayalakshmi, M. 1980. Histopathology of skin lesions in leprosy. *Malaysian J Pathol*, 3, 39-45.
- Job, C., Jayakumar, J., Williams, D. & Gillis, T. 1997. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 65, 461-464.
- Kamble, R., Shinde, V., Madhale, S., Kamble, A., Ravikumar, B. & Jadhav, R. 2010. 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*, 28, 57-59.
- Khan, I., Rahim Khan, A. & Sheraz Khan, M. 2012. Clinicopathological study of 50 cases of leprosy in Northern Pakistan. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, 22, 200-206.
- Kurabachew, M., Wondimu, A. & Ryon, J. 1998. Reverse transcription-PCR detection of *Mycobacterium leprae* in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 36, 1352-1356.
- Kuruwa, S., Vissa, V. & Mistrya, N. 2012. Distribution of *Mycobacterium leprae* Strains among Cases in a Rural and Urban Population of Maharashtra, India. *J Clin Microbiol*, 50, 1406-1411.
- Lee, S., Lee, E., Kim, S., Chang, J., Jeong, S. & Kang, Y. 2012. Changing epidemiology of nontuberculous mycobacterial lung disease in South Korea. *Scand J Infec Dis*, 1-6.
- López Navarro, N., Bosch García, R., Ruiz del Portal Pérez-Bryan, G., Castillo Muñoz, R., Tejera Vaquerizo, A. & Herrera Ceballos, E. 2007. Lepra en el tercer milenio. A propósito de cuatro casos en Málaga, dos autóctonos y dos importados. *Med Cutan Iber Lat Am*, 35, 219-224.
- Maeda, S., Matsuoka, M., Nakata, N., Kai, M., Maeda, Y. & al, e. 2001. Multidrug resistant *Mycobacterium leprae* from patients with leprosy. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 3635-3639.
- Manguinga, S. 2012. *Comportamiento de la Lepra en Cuba: Estratificación epidemiológica y pronóstico 1980-2015*. Lic en opción al grado de MSc., Ciencias Médicas.
- Marengo, E., Gonçalves Commodaro, A., Peron, J., de Moraes, L., Portaro, F., Belfort, R. J., Rizzo, L. & Sant'Anna, O. 2009. Administration of *Mycobacterium leprae* rHsp65 Aggravates Experimental Autoimmune Uveitis in Mice. *PLoS ONE*, 4.
- Martinez, A., Britto, C., Nery, J., Sampaio, E., Jardim, M., Sarno, E. & Moraes, M. 2006. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *J Clin Microbiol*, 44, 3154-3159.

- Martinez, A., Lahiri, R., Pittman, T., Scollard, D., Truman, R., Moraes, M. & Williams, D. 2009. Molecular Determination of *Mycobacterium leprae* Viability by Use of Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 2124-2130.
- Massone, C., Clapasson, A. & Nunzi, E. 2013. Images in Clinical Tropical Medicine. Borderline Lepromatous Leprosy in an Italian Man. *Am J Trop Med Hyg*, 88, 211.
- Matheson, C., Vernon, K., Lahti, A., Fratpietro, R., Spigelman, M., Gibson, S., Greenblatt, C. & Donoghue, H. 2009. Molecular Exploration of the First-Century Tomb of the Shroud in Akeldama, Jerusalem. *PLoS One*, 4.
- Matrat, S., Cambau, E., Jarlier, V. & Aubry, A. 2008. Are all the DNA gyrase mutations found in *Mycobacterium leprae* clinical strains involved in resistance to fluoroquinolones? *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 745-747.
- Matsuoka, M., Vargas Gonzalez, A., Estrada, I., O-Martinez, C. & Fafutis-Morris, M. 2009. Various genotypes of *Mycobacterium leprae* from Mexico reveal distinct geographic distribution
Lepr Rev. 80, 322-326.
- MINSAP 1999. Programa de control de Lepra. 2 ed. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.
- MINSAP 2008. Lepra. Normas técnicas para el control y tratamiento. Editorial Ciencias Médicas.
- MINSAP 2011. Anuario Estadístico de Salud. Cuba.
- MINSAP 2012. Registros Dirección Nacional de Estadísticas. In: (DNE) (ed.). Cuba.
- Moonot, P., Ashwood, N. & Lockwood, D. 2005. Orthopaedic complications of leprosy. *J Bone Joint Surg Br*, 87-B 1328-1332.
- Nagdev, K., Kashyap, R., Deshpande, P., Purohit, H., Taori, G. & Dagainawala, H. 2010. Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis in Chelex-100 extracted DNA samples. *Int J Tuberc Lung Dis*, 14, 1032-1038.
- Nóbrega Martinez, A., Ribeiro-Alves, M., Sarno, E. & Ozório Moraes, M. 2011. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. *PLoS Negl Trop Dis*, 5, e1354.
- Okwumabua, O., Shull, E., O'Connor, M., Moua, T., Danz, T. & Strelow, K. 2010. Comparison of three methods for extraction of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis DNA for polymerase chain reaction from broth-based culture systems. *J Vet Diagn Invest*, 22, 67-69.
- Olmo Pinheiro, R., de Souza Salles, J., Sarno, E. & Pereira Sampaio, E. 2011. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol*, 6, 217-230.

- OMS 2000. Guide to Eliminate Leprosy as a Public Health Problem. *Multidrug therapy cures leprosy, stops transmission and prevents disabilities*. 1st ed. Suiza: Leprosy Elimination Group World Health Organization.
- OMS 2004. Formulario modelo de OMS. Antiinfecciosos. Antibacterianos. Antileprosos.
- OMS 2012a. Memorandum on leprosy 2012 on behalf of the Panel of Leprosy Opinion.
- OMS 2012b. : Weekly Epidemiological Record, No. 34 24 august 2012 ed.
- Oskam, L., Slim, E. & Buhner-Sekula, S. 2003. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. *Lepr Rev*, 74, 196-205.
- Parkash, O. 2011. Serological detection of leprosy employing *Mycobacterium leprae* derived serine rich 45kDa, ESAT-6, CFP-10 and PGL-I: a compilation of data from studies in Indian populations. *Lepr Rev*, 82, 383-388.
- Parkash, O., Beuria, M., Girdhar, B., Katoch, K. & Sengupta, U. 1997. Efforts in diagnosing early leprosy using serological techniques. *J Biosci*, 22, 111-116.
- Pattyn, S., Ursi, D., Leven, M., Raes, V. & Jamet, P. 1992. Polymerase chain reaction amplifying DNA coding for species-specific rRNA of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 60, 234-243.
- Pena, M., Geluk, A., Van der Ploeg-Van Schip, J., Franken, K., Sharma, R. & Truman, R. 2011. Cytokines responses to *Mycobacterium leprae* unique proteins differentiate between *Mycobacterium leprae* infected and naive armadillos. *Lepr Rev*, 82, 422-431.
- Pérez de Rozas, A., González, J., Aloy, N. & Badiola, I. 2008. Standardization of Nested-PCR for the detection of *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Myxomatosis virus* and *Rabbit Haemorrhagic disease virus*. In: Congress, t. W. R. (ed.) *Pathology and Hygiene*. Verona, Italy.
- Pérez, M., Gómez, J. & Torres, P. 2009. La lepra. *la opinión del experto* [Online], 9. Available: www.masdermatologia.com.
- Phetsuksiri, B., Srisungngam, S., Rudeeaneksin, J., Bunchoo, S., Lukebua, A., Wongtrungkapun, R., Paitoon, S., Sakamuri, R., Brennan, P. & Vissa, V. 2012. SNP Genotypes of *Mycobacterium leprae* isolates in Thailand and their combination with rpoT and TTC Genotyping for analysis of leprosy distribution and transmission. *Jpn. J. Infect. Dis*, 65, 52-56.
- Philips, S. 2009. *A comparative study of DNA extraction methodologies: variation in DNA yield and effects on downstream PCR analysis*. Lic Tesis en opción al grado de MSc, Boston University.
- Phillips, K., McCallum, N. & Welch, L. 2012. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). *Forensic Sci Int Genet*, 6, 282-285.

- Plikaytis, B., Gelber, R. & Shinnick, T. 1990. Rapid and Sensitive Detection of *Mycobacterium leprae* Using a Nested-Primer Gene Amplification Assay. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 28, 1913-1917.
- Poma, H., Davies, C., Gutierrez Cacciabue, D., Mora, M., Basombrio, M. & Rajal, V. 2012. Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR. Efecto de las sustancias inhibidora. *Revista Argentina de Microbiología*, 44, 144-149.
- Premanshu, B., Sardana, K., Koranne, R., Choudhary, M. & Manjul, P. 2008. Diagnosis multibacillary leprosy: A comparative evaluation of diagnostic accuracy of slit-skin smear, bacterial index of granuloma and WHO operational classification. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 74, 322-326.
- Promega-Corporation 1998. Wizard^(R) Genomic DNA Purification Kit. Technical Manual. USA.
- QIAGEN. 2009. *QIAGEN Purification Technologies: QIAGEN Anion-Exchange, Silica-Gel-Membrane, and Magnetic-Particle Technologies* [Online]. Available: http://www1.qiagen.com/resources/info/qiagen_purification_technologies_1.aspx
- Queipo-Ortuño, M., Tena, I., Colmenero, J. & Morata, P. 2008. Comparison of seven commercial DNA extraction kits for the recovery of Brucella DNA from spiked human serum samples using real-time PCR. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 27, 109-114.
- Rao, R., Mohan, V. & Shenoi, S. 2007. Bacteremia in leprosy. *Journal of Pakistan Association of Dermatologists*, 17, 14-15.
- Ridley, D. & Jopling, W. 1962. A classification for research purpose. *Lepr Rev*, 33, 119-128.
- Rojas, R. & Segal-Eiras, A. 1997. Characterization of circulating immune complexes in leprosy patients and their correlation with specific antibodies against *Mycobacterium leprae*. *Clin Exp Dermatol*, 22, 223-9.
- Rudeeaneksin, J., Srisungngam, S., Sawanpanyalert, P., Sittiwakin, T. & Likanonsakul, S. 2008. LightCycler real-time PCR for rapid detection and quantitation of *Mycobacterium leprae* in skin specimens. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 54, 263-270.
- Sambrook & Russell 2001. *Molecular Cloning, Third Edition*, Cold Spring Harbour, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Santos, A., Almeida, A., Suffys, P., Moraes, M., Filho, V., Mattos, H., Nery, J., Cabello, P., Sampaio, E. & Sarno, E. 2000. Tumor necrosis factor promoter polymorphism (TNF2) seems to protect against development of severe forms of leprosy in a pilot study in Brazilian patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 68, 325-327.

- Santos, A., Balassiano, V., Oliveira, M., da Silva Pereira, M., Barros, P., Degrave, W. & Suffys, P. 2001. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the blood of individuals, Eight Years after completion of Anti-leprosy therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 96, 1129-1133.
- Santos, A., Degrave, W. & Suffys, P. 1999. Use of polymerase chain reaction (PCR) in leprosy research. *Indian J Lepr*, 71, 101-110.
- Santos, A., Goes Filho, J., Nery, J., Duppre, N., Gallo, M., Suffys, P. & Degrave, W. 1995. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 11, 113-20.
- Santos, A., Nery, J., Duppre, N., Gallo, M., Filho, J., Suffys, P. & Degrave, W. 1997. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol*, 46, 170-172.
- Santos, A., Suffys, P., Vanderborcht, P., Moraes, M., Vieira, L., Cabello, P., Bakker, A., Matos, H., Huizinga, T., Ottenhoff, T., Sampaio, E. & Sarno, E. 2002. Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *J Infect Dis*, 186, 1687-1691.
- Scaliante de Moura, R., Calado, K., Oliveira, M. & Bühner-Sékula, S. 2008. Leprosy serology using PGL-I: a systematic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 41.
- Scollard, D., Gillis, T. & Williams, D. 1998. Polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Mycobacterium leprae* in patients in the United States. *Am J Clin Pathol*, 109, 642-646.
- Serafín-López, J., Talavera-Paulin, M., Amador-Molina, J., Alvarado-Riverón, M., Vilchis-Landeros, M., Méndez-Ortega, M., Fafutis-Morris, M., Paredes-Cervantes, V., López-Santiago, R., León, C., Guerrero, M., Ribas-Aparicio, R., Mendoza-Hernández, G., Carreño-Martínez, C., Estrada-Parra, S. & Estrada-García, I. 2011. Enoyl-Coenzyme A Hydratase and antigen 85B of *Mycobacterium habana* are specifically recognized by antibodies in Sera from Leprosy Patients. *CLIN VACCINE IMMUNOL*, 18.
- Sharbatkhori, M., Kia, E., Fasihi Harandi, M., Jalalizand, N., Zahabiun, F. & Mirhendi, H. 2009. Comparison of Five Simple Methods for DNA Extraction from *Echinococcus granulosus* Protoscoleces for PCR Amplification of Ribosomal DNA. *Iranian J Parasitol*, 4, 54-60.
- Sharma, A., Sharma, R., Goswami, K. & Bardwaj, S. 2008. Clinico-Histopathological correlation in leprosy. *JK Science*, 10, 120-123.
- Sharma, R., Lahiri, R., Scollard, D., Pena, M., Williams, D., Adams, L., Figarola, J. & Truman, R. 2013. The armadillo: a model for the neuropathy of leprosy and potentially other neurodegenerative diseases. *Disease Models & Mechanisms* 6, 19-24.
- Shen, J., Bathyala, N., Kroeger, A., Arana, B., Pannikar, V., Mou, H., Bao, X., Yang, R., Manickam, P., Li, W., Zhou, M. & Want, J. 2012. Bacteriological results and

- leprosy reactions among MB leprosy patients treated with Uniform Multidrug Therapy in China. *Lepr Rev*, 83, 164-171.
- Shepard, C. & McRae, D. 1968. A method for counting acid-fast bacteria. *Int J Lepr*, 36, 78-82.
- Sidorova, J., Biderman, B., Nikulina, E. & Sudarikov, A. 2012. A simple and efficient method for DNA extraction from skin and paraffin-embedded tissues applicable to T-cell clonality assays. *Exp Dermatol*, 21, 57-60.
- Sigit Prakoeswa, C. 2007. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in Blood of the Subclinical Leprosy. *Media Folia Medica Indonesiana*, 43.
- Silaigwana, B., Green, G. & Ndip, R. 2012. Molecular Detection and Drug Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* Complex from Cattle at a Dairy Farm in the Nkonkobe Region of South Africa: A Pilot Study. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9, 2045-2056.
- Singh, H., Katoch, K., Natrajan, M., Sharma, R., Gupta, U., Sharma, V., Singh, D., Chauhan, D., Srivastava, K. & Katoch, V. 1999. Effect of treatment on PCR positivity in multibacillary leprosy patients treated with conventional and newer drugs ofloxacin and minocycline. *Acta Leprol*, 11, 179-182.
- Singh, N., Bhatnagar, S., Choudhary, A., Gupta, H. & Kaul, S. 1994. Evaluation of diversified antigens for detection of *Mycobacterium leprae* antibodies from leprosy patients and contacts. *Indian J Exp Biol*, 32, 478-81.
- Smith, W., Salandini Odong, D. & Nnebuogor Ogosi, A. 2012. The importance of neglected tropical diseases in sustaining leprosy programmes. *Lepr Rev*, 83, 121-123.
- Somoskovi, A., Parsons, L. & Salfinger, M. 2001. The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respir Res*, 2, 164-168.
- Spencer, J. & Brennan, P. 2011. The role of *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid I (PGL-I) in Serodiagnosis and in the pathogenesis of Leprosy. *Lepr Rev*, 82, 344-357.
- Spierings, E., Boer, T., Zulianello, L. & Ottenhoff, T. 2000. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: The role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. *Immunol Cell Biol*, 78, 349-355.
- Sugita, Y. 2001. PCR in leprosy. *Nihon Hansenbyo Gakkai Zasshi. Jap J Leprosy*, 70, 3-13.
- Takade, A., Umeda, A., Matsuoka, M., Yoshida, S., Nakamura, M. & Amako, K. 2003. Comparative studies of the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique. *Microbiol Immunol*, 47, 265-270.

- Torres Guerrero, E., Vargas Martínez, F., Atoche Diéguez, C., Arrazola, J. & Arenas Guzmán, R. 2012. Lepra. Clasificación y cuadro clínico. *Dermatol Rev Mex* 56, 47-54.
- Torres, P., Camarena, J., Gomez, J., Nogueira, J., Gimeno, V., Navarro, J. & Olmos, A. 2003. 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*, 74, 18-30.
- Turankar, R., Lavania, M., Singh, M., Siva Sai, K. & Jadhav, R. 2012. Dynamics of *Mycobacterium leprae* transmission in environmental context: deciphering the role of environment as a potential reservoir. *Infect Genet Evol*, 12, 121-126.
- Vanderborght, P., Matos, H., Salles, A., Vasconcellos, S., Silva-Filho, V., Huizinga, T., Ottenhoff, T., Sampaio, E., Sarno, E., Santos, A. & Moraes, M. 2004. Single nucleotide polymorphism (SNPs) at -238 and -308 positions in the TNF alpha promoter: clinical and bacteriological evaluation in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 72, 143-148.
- Vaquero, N., Mussari, C. & Girard Bosh, M. 2010. Modelo natural de dicotomía TH1-TH2. La enfermedad de Hansen. *Rev argent dermatol*, 91.
- Vargas Salas, F. 2006. *Determinación de frecuencias de alelos HLA región DQ y DR en pacientes con lepra lepromatosa, en el estado de Colima*. DrC, Universidad de Colima.
- Vega-López, F., Brooks, L. & Dockrell, H. 1993. Sequence and immunological characterization of a serine-rich antigen from *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun*, 61, 2145-2153.
- Vejbaesya, S., Mahaisavariya, P., Luangtrakool, P. & Sermduangprateep, C. 2007 TNF alpha and NRAMP1 polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thai*, 90, 1188-1192.
- Wang, C., Chang, Y., Tsai, C. & Chuang, Y. 2012. Tic Douloureux as a Presenting Feature of Facial Leprosy: Diagnostic Enigma in Taiwan. *Acta Neurol Taiwan*, 21, 125-128.
- Wichitwechkarn, J., Karnjan, S., Shuntawuttisetee, S., Sornprasit, C., Kampirapap, K. & Peerapakorn, S. 1995. Detection of *Mycobacterium leprae* infection by PCR. *J Clin Microbiol*, 33, 45-49.
- Williams, D., Hagino, T., Sharma, R. & Scollard, D. 2013. Primary Multidrug resistant leprosy, United States. *Emerging Infectious Diseases*. www.cdc.gov/eid, 19.
- Willner, D., Daly, J., Whiley, D., Grimwood, K. & Wainwright, C. 2012. Comparison of DNA Extraction Methods for Microbial Community Profiling with an Application to Pediatric Bronchoalveolar Lavage Samples. *PLoS ONE* 7, e34605.
- Woods, S. & Cole, S. 1989. A rapid method for the detection of potentially viable *M. leprae* in human biopsies: a novel application of PCR. *FEMS Microbiol Lett*, 53, 305-309.

- Yan, W., Yan, X., Lian-Chao, Y., Jian, L., Zhang, Y. & Huan-Ying, L. 2013. Whole blood nester-PCR amplification of *M. leprae*-specific DNA for early diagnosis of leprosy. *Anm J Trop Med Hyg*, 11.
- Yang Han, X., Sizer, K. & Tan, H. 2012. Identification of the leprosy agent *Mycobacterium lepromatosis* in Singapore. *J Drug Dermatology*, II, 168-172.
- Yooh, D., Cho, S., Lee, M., Abalos, R., Cellona, R., Fajardo, T. J., Guido, L., Dela Cruz, E., Walsh, G. & Kim, J. 1993. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol*, 31, 895-899.
- Yzquierdo, S. 2005. *Aplicación de métodos rápidos para la detección de resistencia a rifampicina en Mycobacterium tuberculosis*. Lic En opción al grado de MSc., Universidad de Ciencias Médicas.

Anexo 1

Consentimiento informado

Yo, _____, acepto bajo mi voluntad participar en el estudio que sobre lepra llevada a cabo la Lic. Odelaissy Suárez y su grupo de trabajo del IPK, con el propósito de confirmar el diagnóstico de la lepra en pacientes sospechosos con baja carga de la enfermedad mediante métodos moleculares y brindarles atención profiláctica para evitar que desarrollen la enfermedad, además de favorecer el bienestar social que puedan crear los resultados de esta investigación. Y sin ningún tipo de presiones y pudiendo decidir en cualquier momento del desenvolvimiento de la misma y de forma totalmente libre, retirarme de este estudio. También exijo se me explique en cada momento como será mi participación antes de que ella se realice y que la información obtenida de mi como paciente tendrá carácter confidencial. Para este estudio se tomaran muestras de sangre por el personal de salud capacitado, para minimizar las molestias que esto pueda ocasionar.

Fecha:_____.

Firma:_____.

Nombre y firma del investigador: _____