

Revista del Centro Dermatológico Pascua

Volumen
Volume **10**

Número
Number **3** Septiembre-Diciembre
September-December **2001**

Artículo:

Reacción en cadena de la polimerasa en lepra

Derechos reservados, Copyright © 2001

Otras secciones de
este sitio:

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



Edigraphic.com

Reacción en cadena de la polimerasa en lepra

Dra. Obdulia Rodríguez Rodríguez,* Dra. Diana Elizabeth Medina Castillo**

RESUMEN

El diagnóstico molecular de lepra es un gran avance que no debe sustituir a la histopatología y mucho menos a la clínica. Hacemos una revisión del uso de la reacción en cadena de la polimerasa en lepra.

Palabras clave: Lepra, reacción en cadena de la polimerasa, *Mycobacterium leprae*.

ABSTRACT

Leprosy molecular diagnosis is a great scientific advance but it does not substitute clinical and histopathological findings. We review polymerase chain reaction in leprosy.

Key words: *Leprosy, polymerase chain reaction, Mycobacterium leprae.*

INTRODUCCIÓN

La lepra como todos sabemos es una enfermedad infeccio-contagiosa, crónica, causada por el *Mycobacterium leprae*, que afecta de manera primordial la piel y nervios periféricos, sin embargo, el tipo progresivo (lepromatoso) es de hecho un padecimiento sistémico en la mayoría de los casos.¹

La clasificación que se considera oficial internacionalmente es la de Madrid (1953) y es la que fundamentalmente sobre bases clínicas, bacteriológicas e inmunológicas divide la lepra en dos tipos "polares" con características esenciales clínicas y biológicas bien definidas, estables y totalmente antagónicas: lepromatoso y tuberculoide y considera además dos grupos de casos con caracteres comunes, bien definidos pero inestables y de evolución incierta: indeterminados y dimorfos.²

El diagnóstico de la lepra se basa en los criterios clínicos, bacteriológicos, inmunológicos e histopatológicos, y algunos autores abogan porque también se haga un diagnóstico molecular en aquellos casos subclínicos y para lo cual han utilizado la técnica de PCR o reacción en cadena de la polimerasa.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica basada en el conocimiento de la secuencia del ácido nucleico, que para una aplicación diagnóstica se analiza de manera repetida en diferentes individuos. Se preparan cebadores de oligonucleótidos (primers) que son complementarios de las cadenas opuestas del ADN (ácido desoxirribonucleico) y que están separados por centenares de bases, en otras palabras las dos hebras de ADN pueden disociarse y reasociarse *in vitro* por calentamiento y por enfriamiento. Los cebadores de oligonucleótidos se incuban con ADN diana para su amplificación y con una ADN polimerasa que sintetiza una cadena complementaria en dirección 5 a 3. La reacción es sometida a una serie de temperaturas específicas para su desnaturalización, enlace y polimerización, para el paso de síntesis detecta la secuencia de nucleótidos correspondientes a agentes infecciosos como es el caso de las micobacterias.

Inicialmente se empleaba una polimerasa proveniente de *Escherichia coli*, pero esta enzima se inactivaba por la elevada temperatura necesaria para que se produjera la desnaturalización del ADN, por lo que se debía añadir polimerasa fresca manualmente al final de cada ciclo. La técnica se simplificó cuando se introdujo el empleo de la polimerasa Taq, aislada de *Thermus aquaticus*, una bacteria termófila que vive en aguas termales a una temperatura comprendida entre los 70 y

* Directora del Centro Dermatológico "Dr. Ladislao de la Pascua".

** Residente de 4º año Dermatología CDP.

80°C. Esta enzima es termoestable y permite que la reacción de polimerasa y el reanillado del ADN sea más sensible y específico.

El investigador selecciona el segmento específico de ADN que desea amplificar, encargando la síntesis de cebadores, es decir, oligonucleótidos de secuencias complementarias al ADN que flanquea la región seleccionada del mismo. Una vez amplificado se puede someter a electroforesis, secuenciar o clonar con o sin hibridación. Recientemente se ha descrito la posibilidad de amplificar secuencias de ARNm, que permite cuantificar la transcripción de ARNm por parte de una célula y constituye una modificación del método habitual de la PCR.

La PCR es una técnica capaz de generar *in vitro* grandes cantidades de un determinado fragmento de ADN a partir de cantidades mínimas del mismo. La gran sensibilidad, versatilidad y sencillez de este método han revolucionado tanto las estrategias de estudio de la genética y de los procesos evolutivos como determinados aspectos diagnósticos y forenses.

La primera aplicación de la PCR tuvo como finalidad aumentar la sensibilidad en el diagnóstico prenatal de la anemia falciforme. Con la PCR el diagnóstico se efectuaba en 24 horas, mientras que con el Southern blotting y la hibridación convencional, se tardaba una semana.

Así se ha utilizado para diagnóstico prenatal de betatalasemias, fibrosis quística, distrofia muscular de Duchenne. En el campo de la dermatología se ha usado para diagnóstico de enfermedades virales, como VIH, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, herpes simple o papilomavirus, o para establecer coexistencia fisiopatológica de algunos virus en procesos neoplásicos tales como papilomavirus y el cáncer cervicouterino, el herpes virus tipo 8 y el sarcoma de Kaposi. La técnica de la PCR también ha permitido investigar la asociación de determinados HLA en enfermedades autoinmunes e investigar los mecanismos de oncogénesis, entre ellos la activación del oncogen K-ras en el melanoma.³

La mayoría de los estudios se han hecho en tuberculosis pero como era de esperarse también se han realizado estudios en lepra⁴⁻⁷ y más aún, se han determinado algunas citocinas involucradas en la patogenia de la misma.⁸

La técnica se ha usado para demostrar la presencia de fragmentos de *Mycobacterium leprae* en diversos tejidos. En dos estudios, uno realizado en Bélgica y otro en Holanda, usaron secreciones nasales de enfermos con lepra lepromatosa y amplificaron en forma selectiva al fragmento 531 bp del gen que codifica para prolina de *M. leprae* y se utilizaron otros fragmentos de micobacterias como el dUTP uracilglicosilasa ADN, para prevenir fal-

sos positivos. Los autores de estos estudios sostienen que con esta técnica pueden ser detectados casos subclínicos.^{9,10}

Se han hecho estudios comparativos de histopatología con microscopía de luz y reacción en cadena de la polimerasa, para diagnóstico de lepra en pacientes con lepra lepromatosa y tuberculoide, con resultados iguales y sin diferencia estadísticamente significativa¹¹ Misra y colaboradores utilizaron biopsias de piel y frotis de linfa usando la PCR para detectar el bacilo de la lepra, en pacientes con lepra lepromatosa; basados en la secuencia del gen LSR/15K. Y se encontró que la PCR fue específica y sensible con un nivel de detección entre 10 y 100 bacilos. Sin embargo, la biopsia de piel fue superior debido a que es mayor la densidad de bacilos que en la linfa cutánea. Dentro de los resultados se encontraron a ocho casos subclínicos, los cuales fueron positivos para PCR y negativos para las técnicas convencionales de detección del bacilo de la lepra.¹²

Se han publicado algunos artículos interesantes con detección de *M. leprae* en biopsias de bulbo piloso y de nervios periféricos, para diferenciar la neuropatía de la lepra con otras no hansenianas. Los artículos más recientes hablan que PCR en lepra puede también ser positiva en sangre y ganglios linfáticos, pero no tan sensible como la detectada en piel.¹³⁻¹⁵

Como la detección de bacilos por PCR requiere tejido fresco embebido en solución salina, se ha encontrado que las biopsias que se incluyen en parafina revelan un bajo porcentaje de positividad, lo cual implica manejar dos biopsias o dividir el fragmento en dos, uno para estudio histopatológico y otro, para PCR.¹⁶

Un aspecto importante es que los bacilos no sean detectados por microscopía de luz posterior a varios cortes, lo que implica mayor tiempo y costo, esto no llega a suceder al menos no con frecuencia en centros donde se atienden pacientes de lepra y se tiene experiencia para la observación con microscopía de luz.

Algunos autores consideran la PCR útil para el monitoreo terapéutico después de los regímenes de tratamiento convencional. Y para el diagnóstico de pacientes paucibacilares con la ventaja de que el método puede ser realizado con rapidez, aproximadamente en 10 horas se obtiene el resultado.^{17,18,20}

En Londres se estudiaron pacientes con lepra lepromatosa ya tratados, los resultados señalaron que la PCR tuvo una sensibilidad hasta del 99% y sugieren que los pacientes con recaída o reacción leprosa pueden resultar positivos a la PCR porque los bacilos sobrevivientes los reinfectan.²¹

Hemos comentado ya acerca de la modificación de la técnica de PCR, hay estudios que han usado el ARN ribosomal 16s (ARN NASBA) y reportan que se obtiene un 90% de sensibilidad para casos lepromatosos y 16.7% para tuberculoideos. Positividad que disminuyó a los 3 meses de tratamiento antileproso.¹⁹

COMENTARIO

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica revolucionaria que ayuda para la detección de diversas enfermedades.²² Sin embargo, aún no hay estudios convincentes en lepra que puedan realmente afirmar que supera a la histopatología y mucho menos a la clínica.

Fundamentos bien establecidos por la Escuela Mexicana de Leprología mencionan que un paciente de lepra no debe ser dado de alta, hay que mantenerlo en vigilancia epidemiológica por el riesgo de recaídas y esto ya fue corroborado por los investigadores británicos que encontraron recaídas y suponen que es por la presencia de bacilos viables en tejidos, cosa que ya se infería desde hace muchos años.

Otra suposición siempre ha sido que la probabilidad de encontrar bacilos en biopsias de piel para la lepra tuberculoide es escasa o nula, mismo evento que ya fue señalado por investigadores que usaron PCR modificado (ARN NASBA).

Deben hacerse más estudios para validar la prueba en lepra y tratar de hacerlos comparativos con un estándar de oro como lo es la histopatología.

AGRADECIMIENTO

Dra. Myrna Rodríguez Acar por su apoyo para la realización de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Latapí F. Lepra. Breve información para el médico general. *Dermatología Clínica*. México, D.F. 1963.
2. Rodríguez RO, Lepra. PAC® *Dermatología* 2000; 4: 53-75.
3. Baiget M, Puig LI. Reacción en cadena de la polimerasa: aplicaciones diagnósticas en dermatología. *Piel* 1991; 6: 132-135.
4. William P. Application of polymerase chain reaction amplification technology for the detection of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr* 1992; 58: 192.
5. Plikayates B, Shinnick T. Rapid sensitive and specific detection of micobacteria using gene amplification technique. *Int J Lepr* 1990; 58: 197.
6. [http:// bioinformatics. weizman.ac.il/mb/bioguide/pcr/PCRwhat.htm](http://bioinformatics.weizman.ac.il/mb/bioguide/pcr/PCRwhat.htm).
7. Job CK, Drain V, Williams DL et al. Comparison of polymerase chain reaction technique with other methods for detection of *Mycobacterium leprae* in tissues of wild nine-banded armadillos. *Lepr Rev* 62 (4): 362-73 1991.
8. Launois P. Cytokines and leprosy. *Acta Lepr* 1992; 8(1) 5-10.
9. Pattyn SR, Ursi D, Leven M et al. Detection of *Mycobacterium leprae* by polymerase chain reaction in nasal swabs of leprosy patients and their contacts. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993; 61(3): 389-93.
10. De Wit M, Douglas J, McFadden J et al. Polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in nasal swabs specimens. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (3): 502-6.
11. Yoon KH, Chon SN, Lee MK et al. Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *J Clin Microbiol* 1993; 31 (4): 895-9.
12. Misra N, Ramesh V, Misra R et al. Clinical Utility of LSR/A15 Gene for *Mycobacterium leprae* Detection in leprosy Tissues using The polymerase Chain Reaction. *Int J Lepr* 1995; 63(1): 35-40.
13. Santos AR, De Miranda AB, Sarno E, Suffys P, Degrave W. Use of PCR- mediated amplification of *Mycobacterium leprae* DNA in different types of clinical samples for diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol* 1993; 39(4): 298-304.
14. Santos A, GoesFilho J, Nery J et al. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1995; 11(2): 113-20.
15. Chemouilli P, Woods S, Said G, Cole S. Detection of *Mycobacterium leprae* in nerve lesions by the polymerase chain reaction. *Int J Lepr Other Mycobact* 1996; 64(1): 1-5.
16. Sung K, Kim S, Choi J, Koh K, Na D. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in formalin fixed, paraffin embedded samples from multibacillary and paucibacillary leprosy patients by polymerase chain reaction. *Int J Dermatol* 1993; 32(10): 710-3.
17. Jamil S, Keer J, Lucas S et al. Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. *Lancet* 1993; 342 (8866): 264-8.
18. Rafi A, Donoghue H, Standford J. Application of polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* DNA in specimens from treated leprosy patients. *Int J Lepr* 1995; 63(4): 42-7.
19. Van der Vliet G, Cho S, Kampirapap K, van Leeuwen J et al. Use of NASBA RNA. Amplification for detection of *Mycobacterium leprae* in skin biopsies from untreated a treated leprosy patients. *Int J Lepr* 1996; 64(4): 396-401.
20. Voranuch W, Tapchaisri P. *Joint study on the detection of Mycobacterium leprae by polymerase chain reaction (PCR)*. Science and technology agency of Japan (STAJ) Fellowship Report, 1996.
21. Santos A, Nery J, Duppre N. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of leprosy. *J Med Microbiol* 1997; 46 (2): 170-2.
22. Job C, Jayakumar J, Williams D. Role of polymerase chain reaction in the diagnosis of early leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1997; 65(4): 461-4.