



**Universidad
Norbert Wiener**

Powered by **Arizona State University**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA
MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA**

Tesis

Extracción de ADN a partir de muestras fijadas en láminas para detección
molecular de *Mycobacterium Leprae* Lima, 2023

Para optar el Título Profesional de
Licenciada en Tecnología Médica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

Presentado por:

Autora: Vidia Vitelia, Cotrina Maccha


Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5431-035X>

Asesor: Mg. Huamán Cárdenas, Víctor Raul

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6371-4559>

Lima – Perú


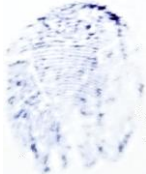
2024

 Universidad Norbert Wiener	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSIÓN: 01 REVISIÓN: 01

Yo, Vidia Vitelia Cotrina Maccha egresado de la Facultad de Ciencias de la Salud y Escuela Académica Profesional de Tecnología Médica de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo de investigación "EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS FIJADAS EN LÁMINAS PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE Mycobacterium leprae LIMA, 2023" Asesorado por el docente: Mg. Huamán Cárdenas Víctor Raúl DNI 70092305 ORCID0000-0002-6371-4559 tiene un índice de similitud de (14) (catorce) % con código 14912:362129295 verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.

.....
 Firma de autor
 Vidia Vitelia Cotrina Maccha
 DNI: 40076869




.....
 Firma
 Mg. Víctor Raúl Huamán Cárdenas
 DNI: 70092305

Lima, 22 de julio de 2024

**EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS FIJADAS EN LÁMINAS PARA
DETECCIÓN MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE*
LIMA, 2023**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
BIOLOGÍA MOLECULAR

ASESOR: Mg. HUAMÁN CÁRDENAS, VICTOR RAUL
ORCID: 0000-0002-6371-4559

Dedicatoria

A mi amado hijo Manuel por ser parte importante de mi vida, mi soporte y compañero en todo momento.

A mis padres Manuel y Vitelia, a mis hermanos. Iván, Jesús, Liz, Nicol, José y Addiz por estar conmigo en todo este proceso y por ser mi ayuda espiritual.

AGRADECIMIENTO

A Dios mi agradecimiento infinito por haberme acompañado y guiado en cada momento de mi vida, por ser mi fortaleza, mi ayuda en momentos de debilidad, a él sea la gloria y honra.

A la Dra. Zully Puyen Guerra, responsable del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias. Por su amistad, confianza y consideración, por brindarme su asesoramiento para desarrollar el presente tema de investigación, la cual fue determinante para cumplir mis metas.

Al Mg. David Santos Lázaro por el asesoramiento y ayuda invaluable que me brindo durante la ejecución del presente tema de investigación, por su apoyo y amistad que me permitieron aprender mucho en esta travesía.

A mi asesor Mg. Víctor Huamán Cárdenas por su apoyo en la elaboración del proyecto, revisión de la tesis y por toda la confianza desde el primer momento.

A todos mis compañeros y amigos del Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias del Instituto Nacional de Salud, en especial a Aiko Vigo y Cynthia Julcapoma.

Al Instituto Nacional de Salud por permitir el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A los profesores de la Escuela Académica de Tecnología Médica y Anatomía Patológica, por la preparación académica brindada para afrontar con éxito los diferentes retos.

ÍNDICE

Índice de tablas	1
Índice de gráficos	
Resumen	
Abstract	
Introducción	
I. EL PROBLEMA.....	1
1.1. Planteamiento del problema	1
1.2. Formulación del problema.....	4
1.2.1 Problema general	4
1.2.2 Problemas específicos	4
1.3. Objetivos de la investigación	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4. Justificación de la investigación	5
1.4.1. Teórica	5
1.4.2. Metodológica	¡Error! Marcador no definido.
1.4.3. Practica.....	6
1.5. Limitaciones de la investigación	6
II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes	7
2.2. Bases teóricas	10
2.2.1. <i>Mycobacterium leprae</i>	10
2.2.2. Ácido desoxirribonucleico	16
2.2.3. Detección molecular	18
2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa	18
2.3. Formulación de hipótesis	21
III. METODOLOGÍA	22
3.1. Método de la investigación	22
3.1.1. Extracción de ADN micobacteriano	22
A) Extracción de ADN a partir de muestras por raspado de incisión cutánea... 22	
B) Control de calidad del ADN	25
3.1.1 Confirmación molecular de obtención de ADN de <i>Mycobacterium leprae</i> 25	
3.2. Enfoque de la investigación	26
3.3. Tipo de investigación	27

3.4.	Diseño de la investigación.....	27
3.5.	Población, muestra y muestreo	27
3.5.1	Población.....	27
3.5.2	Muestra	28
3.5.3	Muestreo	28
3.6.	Variables y operacionalización	30
3.7.	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	31
3.7.1	Técnica.....	31
3.7.2	Descripción de instrumentos.....	31
3.7.3	Validación.....	31
3.7.4	Confiabilidad	31
3.8.	Plan de procesamiento y análisis de datos	32
3.9.	Aspectos éticos.....	32
IV.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	33
4.1.	Resultados	33
4.1.1	Análisis descriptivo de resultados.....	33
4.1.2.	Discusión de resultados.....	48
V.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
5.1.	Conclusiones	52
5.2.	Recomendaciones.....	52
	REFERENCIAS.....	53
	ANEXOS	

i. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Signos cardinales y clasificación de lepra	15
Tabla 2. Secuencia de cebadores y sonda para ensayo de PCR en tiempo real	26
Tabla 3. Esquema de procesamiento.....	33
Tabla 4. Resultados de la prueba 3	34
Tabla 5. Índice bacteriológico de láminas de <i>Mycobacterium leprae</i>	35
Tabla 6. Resultados de la calidad de ADN de <i>Mycobacterium leprae</i>	36
Tabla 7. Calidad de ADN (escala valorativa) respecto al resultado qPCR.....	37
Tabla 8. Resultados de cantidad de ADN de <i>Mycobacterium leprae</i>	39
Tabla 9. Análisis de concordancia categórica entre índice baciloscópico y PCR en tiempo real.....	40
Tabla 10. Comparación del Ct de la qPCR con índice bacteriológico 1+ y 2+	42
Tabla 11. Comparación del Ct de la qPCR con índice bacteriológico 3+ y 4+	43
Tabla 12. Comparación del Ct de la qPCR con índice bacteriológico 5+	44
Tabla 13. Comparación del Ct de la qPCR con índice bacteriológico 6+	45
Tabla 14. Relación de muestras con baciloscopia negativas respecto a resultados de qPCR	47

Figura 1. Resultado de la calidad de ADN (escala valorativa) respecto al Resultado qPCR (cualitativo).....	38
Figura 2. Amplificación de muestras de <i>M leprae</i>	41
Figura 3. Resultados de índice bacteriológico 1+ y 2+ respecto al resultado de qPCR.	42
Figura 4. Resultados de índice bacteriológico 3+ y 4+ respecto al resultado de qPCR.	43
Figura 5. Resultados de índice bacteriológico 5+ respecto al resultado de qPCR.....	45
Figura 6. Resultados de índice bacteriológico 6+ respecto al resultado de qPCR.....	46
Figura 7. Resultados de muestras con baciloscopía negativa respecto al resultado qPCR.	48

iii. RESUMEN

Antecedentes: La lepra es una enfermedad infecciosa de importancia en salud pública causada por *Mycobacterium leprae*. En Perú, el diagnóstico de

laboratorio estándar es la baciloscopia a partir de muestras fijadas en láminas. En los últimos años, en otros países se viene utilizando la prueba de PCR como alternativa para el diagnóstico debido a alta sensibilidad. **Objetivo:** Extraer ADN a partir de muestras fijadas en láminas para la detección molecular de *Mycobacterium leprae*. **Metodología:** Se incluyeron en el estudio 50 muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en lámina portaobjeto (30 muestras con baciloscopia positiva y 20 muestras con baciloscopia negativa). Se extrajo ADN por columna de sílica y se amplificó la secuencia 16S rRNA mediante PCR en tiempo real. **Resultados:** La calidad del ADN extraído fue entre baja y buena calidad, los cuales no afectaron la amplificación mediante PCR en tiempo real. Las concentraciones de ADN presentaron concentraciones desde 0.5 ng/mL hasta 67.2 ng/mL, respectivamente. Los resultados de la PCR en tiempo real presentaron un 100% de concordancia categórica para las 30 muestras positivas, 40% de discordancia para las 20 muestras negativas. **Conclusión:** Se obtuvo buenos resultados a partir de la extracción de ADN de *Mycobacterium leprae* a partir de muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas.

Palabra clave: Extracción, *M. leprae*. qPCR

iv. ABSTRACT

Background: Leprosy is an infectious disease of Public Health importance

caused by *Mycobacterium leprae*. In Peru, the standard laboratory diagnosis of *Mycobacterium leprae. leprae* is smear microscopy from samples fixed on slides. In recent years, the PCR test has been used in other countries as an alternative for diagnosis due to its high diagnostic sensitivity. **Objective:** The goal was to extract DNA from samples fixed on slides for the molecular detection of *M. leprae*. **Methodology.** 50 skin scraping samples fixed on a slide with a smear diagnosis were included (30 positive and 20 negative) DNA was extracted by silica column and the 16S rRNA sequence was amplified by real-time PCR. **Results:** The quality of the extracted DNA was low and good quality, which did not affect the amplification by real-time PCR. The DNA showed concentrations from 0.5 ng/mL to 67.2 ng/mL, respectively. The real-time PCR results presented 100% categorical concordance for the 30 positive samples and 40% discordance for the 20 negative samples. **Conclusion:** Good results were obtained from the extraction of *M. leprae* DNA from skin incision scraping samples fixed on slides.

Keyword: Extraction, *M. leprae*. qPCR

v. INTRODUCCION

Según la Organización Mundial de la Salud, la lepra es un problema continuo

de salud pública (1). La lepra es una enfermedad infecciosa crónica causada por *Mycobacterium leprae*. Afecta principalmente al sistema nervioso periférico, la piel y otros tejidos (2).

Se cree que el modo más probable de transmisión e infección se produce a través de secreciones del tracto respiratorio superior (1). La interacción frecuente y prolongada entre individuos infectados y sujetos susceptibles es un factor clave para la transmisión de *Mycobacterium leprae* (1).

Las dificultades en el diagnóstico precoz contribuyen así a la diseminación continua de bacterias de pacientes no diagnosticados. Las estrategias de intervención para bloquear la transmisión y la atención adecuada de las personas infectadas dependen de la detección temprana y confiable (3)

La lepra sigue siendo un desafío para la salud en todo el mundo: cada año se detectan alrededor de 250 000 nuevos casos. A pesar de la implementación generalizada de una terapia eficaz con múltiples fármacos, la lepra no ha sido eliminada (4).

A nivel mundial, alrededor del 80% de los nuevos casos registrados se encuentran en Brasil, India e Indonesia (5,6). En la región de las Américas, 24 países notificaron casos de lepra. Perú, ha evidenciado buenos resultados en la lucha contra esta enfermedad (7); sin embargo, en la actualidad aún reporta alrededor de 30 casos nuevos cada año principalmente en zonas endémicas de la Amazonia como San Martín, Loreto, Ucayali, Amazonas, Huánuco, Jaén.

El diagnóstico de la lepra es esencialmente clínico, basado en síntomas, examen de piel, nervios periféricos y antecedentes epidemiológicos. Uno de los mayores impedimentos para la investigación de la lepra ha sido la incapacidad del cultivo *in vitro* del bacilo *Mycobacterium leprae*, además del extenso tiempo de

incubación que comprende entre dos hasta treinta años (8)

La lepra es una enfermedad silenciosa con un tiempo de incubación muy largo. Actualmente, la transmisión sólo puede detenerse si los pacientes obtienen un diagnóstico temprano y tratamiento oportuno. Las personas de alto riesgo, que son contactos estrechos de los pacientes, deben ser localizadas y tratadas siempre que se detecte lepra (9)

El presente estudio tiene como objetivo extraer ADN a partir de muestras fijadas en láminas para la detección molecular de *Mycobacterium leprae* mediante PCR en tiempo real (qPCR).

I. EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La lepra, una enfermedad infecciosa causada por *Mycobacterium leprae* continúa siendo responsable de uno de los más terribles casos de estigmatización social en la historia de la humanidad (10,11). Durante las últimas décadas la carga de esta patología ha ido disminuyendo de 805000 en 1995 a 753000 a finales de 1999. Debido a esto, en el año 2000 la lepra fue considerada como un problema de salud pública eliminado (menos de 1 caso por cada 10000 habitantes) (12). A partir de entonces los esfuerzos por erradicar esta enfermedad disminuyeron notablemente al punto de que en los últimos años la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha designado a la lepra como una enfermedad tropical desatendida (13). En el 2019, el número de pacientes nuevos diagnosticados con lepra fue alrededor de 200000 en 100 países (5). Por esto, la OMS ha establecido como meta de alcance mundial erradicar la lepra para el año 2030 (5).

A nivel mundial, alrededor del 80% de los nuevos casos registrados se encuentran en Brasil, India e Indonesia (5,6). En la región de las américas, 24 países notificaron casos de lepra, algunos con más de 100 casos por año como Argentina, Colombia, Cuba, México, Paraguay, República Dominicana, Venezuela y Brasil. De estos, Brasil concentra el 94% de los casos de la región (1), Perú, ha evidenciado buenos resultados en la lucha contra esta enfermedad (7); sin embargo, en la actualidad aún reporta alrededor de 30 casos nuevos cada año principalmente en zonas endémicas de la

Amazonia como San Martín, Loreto, Ucayali, Amazonas, Huánuco. Además, en las últimas décadas también se han registrado casos nuevos en Madre de Dios, Cajamarca (Jaén) y Ayacucho (14). Así mismo, se notifican casos de lepra en zonas no endémicas como Lima (15). La persistencia de esta enfermedad se debe a la existencia de casos ocultos de lepra (casos no notificados ni reportados debido a la falta de búsqueda activa de contactos cercanos), además del desconocimiento del mecanismo de transmisión, tratamiento de la lepra y malos diagnósticos (16). El Ministerio de Salud (MINSA) consideró que algunas zonas del país podrían estar albergando pacientes aún no identificados producto del fenómeno migratorio. Por tal razón recomendó que las regiones endémicas consideren como un problema de salud pública esta enfermedad, demandando una coordinación interinstitucional y multisectorial, a fin de desarrollar planes de intervención a nivel local (17).

El diagnóstico de la lepra es esencialmente clínico, basado en síntomas, examen de piel, nervios periféricos y antecedentes epidemiológicos. Uno de los mayores impedimentos para la investigación de la lepra ha sido la incapacidad del cultivo *in vitro* del bacilo *Mycobacterium leprae*, además del extenso tiempo de incubación de dos hasta treinta años (8). El actual diagnóstico de laboratorio de la lepra es realizado a nivel mundial únicamente a través del uso de la técnica de baciloscopía convencional. Esta técnica tiene una alta especificidad (hasta 100%) pero una sensibilidad entre 10-50% para muestras por raspado de incisión cutánea (18). Adicionalmente, es realizada a partir de la mucosa nasal, lóbulo de la oreja y/o lesiones en la piel. A lo largo del tiempo, pruebas alternativas de diagnóstico han sido desarrolladas; sin embargo,

pruebas como el ensayo de inmunoabsorbancia ligado a enzimas (ELISA), cromatografía de flujo lateral y western blot, muestran una baja sensibilidad para la lepra paucibacilar (PB), en comparación con la lepra multibacilar (MB) (19–21).

La OMS ha recomendado el desarrollo de pruebas moleculares que mejoren el diagnóstico de la lepra permitiendo la detección y ruptura de la cadena de transmisión temprana (13). Actualmente se han desarrollado avances en el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) para detección de secuencias de ácido desoxirribonucleico (ADN) específicos de *Mycobacterium leprae*. Sin embargo, este método aún no presenta una estandarización a nivel mundial. Los resultados previos han demostrado que este método posee una gran sensibilidad y especificidad tanto para casos de lepra PB así como MB por lo que se propone como una buena alternativa diagnóstica (21–23). Ante esto, surge la necesidad de investigar sobre métodos alternativos de diagnóstico de la lepra que permitan aumentar el límite de detección del patógeno con mayor sensibilidad y se consiga la identificación adicional de pacientes con formas difíciles de detección (formas neurales, PB y tuberculoide de lesión única) en la que apenas se encuentran pocos bacilos (1).

Actualmente, en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) del Instituto Nacional de Salud se realiza el diagnóstico a través de la baciloscopia. Las muestras de los pacientes con diagnóstico clínico son obtenidas a través de la Red de Laboratorios del país y remitidas al LRNM para la confirmación.

El presente estudio tiene como objetivo extraer ADN de *Mycobacterium leprae* a partir de muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas para su posterior uso en un método molecular que permita el diagnóstico en laboratorio de la lepra con mayor sensibilidad y adecuada especificidad.

1.2. Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Se puede extraer ADN a partir de muestras fijadas en láminas para la detección de *Mycobacterium leprae*?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cuál es el nivel de calidad de ADN de *Mycobacterium leprae* extraído a partir de muestras fijadas en láminas?
- ¿Cuál es la cantidad de ADN de *Mycobacterium leprae* que se puede extraer en muestra fijadas en láminas?
- ¿Es posible realizar la detección por qPCR de ADN de *Mycobacterium leprae* extraído de muestras fijadas en láminas?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

- Extraer ADN a partir de muestras fijadas en láminas para la detección de *Mycobacterium leprae*

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el nivel de calidad de ADN extraídas a partir de muestras fijadas en láminas.
- Medir la cantidad de ADN extraídas a partir de muestras fijadas en láminas.
- Realizar la detección mediante qPCR de ADN de *Mycobacterium leprae* extraído de muestras fijadas en lámina.

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1 Teórica

El presente trabajo de investigación evaluó el método de extracción de ADN a partir de muestras fijadas en láminas para *Mycobacterium leprae*, esto permitirá diagnosticar la lepra en etapas tempranas de la enfermedad, contribuyendo a un diagnóstico eficiente que agilice el tratamiento adecuado, disminuyendo la discapacidad que produce, así como la estigmatización para quienes lo padecen. Por otro lado, los resultados obtenidos proporcionarán información para mejorar el conocimiento de la lepra en el Perú.

1.4.2 Metodológica

De la revisión de los antecedentes y del marco teórico se evidenció que a pesar de los pocos estudios abarcando este problema, sí es posible la obtención de ADN bacteriano a partir de muestras por raspado de incisión

cutánea fijadas en láminas. Para ello, en el presente estudio se describió el proceso de extracción de ADN y se realizó los procesos de acuerdo a las metodologías previamente descritas.

1.4.3 Práctica

Este estudio permitió aportar el diagnóstico preciso y con buena sensibilidad y especificidad en pacientes con formas clínicas de difícil detección ya que mediante la baciloscopia es difícil encontrar bacilos en etapas tempranas de la enfermedad y en contactos cercanos, generando diagnósticos de falsos negativos y como consecuencia de ello. Perú continúa presentando casos de lepra a través de los años en diversas regiones. En nuestro país, la detección de casos es un gran desafío para el control y manejo de esta enfermedad, por lo que la metodología propuesta constituye una herramienta que permite mejorar el diagnóstico laboratorial.

1.5 Limitaciones de la investigación

- Poca cantidad de muestras para realizar el estudio.
- No se encontró mucha información referente a extracción de ADN a partir de muestras fijadas en láminas.
- Se trabajó con láminas coloreadas desconociendo si esta característica podrían interferir en el proceso de extracción y amplificación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Manta FSN y col (2022) describieron la extracción de ADN y puesta en ejecución de una prueba de qPCR para el diagnóstico de lepra. Para este ensayo evaluaron 97 muestras de pacientes con confirmación clínica e histopatológica de lepra, mostrando una alta sensibilidad (91%) y especificidad (100%) diagnósticas. Los resultados demostraron que la qPCR multiplex detecta de manera efectiva y específica el ADN de *Mycobacterium leprae* en muestras de raspado de piel (9).

Mohanty PS y col (2020) evaluaron la eficacia de una PCR que avaluó la región repetitiva de *Mycobacterium leprae* (RLEP-PCR) donde la mayoría de los pacientes eran negativos para bacilos alcohol-ácido resistentes. Se tomaron 80 muestras de frotis de piel cortada para microscopía y prueba molecular. Se extrajo el ADN y se realizó RLEP-PCR para todas las muestras. Estas 80 muestras con lepra comprendieron 38 casos de lepra PB y 42 casos de lepra MB. 18 (22,5%) muestras dieron positivo para microscopia, mientras que 53 (66,25%) dieron positivo por RLEP-PCR (24).

Singh V y col. (2020) recolectaron muestras de frotis de piel (9 casos MB, 16 casos PB, 22 contactos domésticos y 38 muestras de suelo ambiental). La cantidad de *Mycobacterium leprae* viable fue estimada mediante extracción de material genético y Transcripción inversa - PCR en tiempo real (qRT-PCR) utilizando el gen 16S rRNA. Se observó la presencia de bacilos viables de *Mycobacterium leprae* en 11 (44%) casos de lepra, 4 (18%) contactos domésticos y en 10 (53%) muestras de suelo (25).

Gama y col. (2018) utilizaron la qPCR para detectar el ADN de *Mycobacterium leprae* en muestras de frotis cutáneo del lóbulo de la oreja y muestras de sangre de casos de lepra y contactos familiares asintomáticos. Participaron 164 sujetos 43 casos índice, 113 contactos domiciliarios y 8 individuos que informaron no tener contacto con pacientes ni antecedentes de lepra en la familia (controles negativos). De los contactos domiciliarios asintomáticos, el 23,89% mostró ADN bacilar por qPCR en muestras de frotis cutáneo del lóbulo de la oreja y sangre. Asimismo, el 48,84% de los pacientes diagnosticados de lepra dieron positivo a la qPCR mientras que la carga bacilar fue positiva solo en el 30,23% de los pacientes, identificaron la infección en el 23,89% de los contactos clínicamente asintomáticos. Estos datos corroboran el alto potencial de esta herramienta para el diagnóstico precoz de la lepra (26).

Siwakoti y col (2016) realizaron comparación de dos métodos, microscopia de frotis cutáneo en hendidura (SSS) y, previa extracción de ADN, PCR para amplificar la secuencia de 129pb del elemento repetitivo de *Mycobacterium leprae*. La sensibilidad de SSS y PCR fue del 18% y 72%, respectivamente. La mejora del 54% en la detección de casos mediante PCR mostró claramente su ventaja sobre la SSS. Además, la PCR pudo confirmar el diagnóstico de lepra en el 66% de los casos negativos para Bacilo ácido alcohol resistente (BAAR), lo que indica su superioridad sobre la SSS. Además, en los pacientes PB la sensibilidad de la PCR fue del 44%, mientras que en los pacientes MB fue del 78% (27).

Ruiz y col (2015) realizaron extracciones de ADN de cuatro grupos de láminas

con raspado cutáneos con sospecha de lepra: un grupo con índice bacteriológico (IB) mayor a 4+, un grupo con IB igual a 1+, un grupo con diagnóstico negativo (IB = 0), y un grupo de control negativo (IB = 0). La calidad del ADN se evidenció mediante la amplificación de un elemento repetitivo de lepra RLEP mediante una PCR anidada. Como resultado, detectaron ADN de buena calidad y amplificación positiva en el grupo de IB > 4+ con los cuatro métodos, mientras que del grupo con IB=1+ solo los métodos QIAGEN y fenol-cloroformo obtuvieron amplificación de *Mycobacterium leprae*. En el grupo de diagnosticados como negativos, solo el método QIAGEN pudo obtener ADN con calidad suficiente para la amplificación positiva de la región RLEP. No se observó amplificación en el grupo de control negativo mediante ningún método (28).

Reja y col (2013) evaluaron la capacidad de la tinción de Fite-Faraco (tinción FF) y la PCR múltiplex sobre la tinción con hematoxilina y eosina (H y E) y la tinción de Ziehl-Neelsen (ZN). Las muestras utilizadas fueron biopsias y se tiñeron mediante tres métodos: tinción H y E para examen histopatológico, tinción ZN y tinción FF para la detección de BAAR. Así mismo, se sometió a extracción de ADN y se realizó PCR a partir de la muestra de ADN obtenida. Los resultados diagnósticos de estas técnicas fueron: sensibilidad del 70,6% para tinción con H y E, sensibilidad del 59,9% para tinción con ZN, sensibilidad de 74,6% para tinción FF y sensibilidad de 87,8% para PCR (29).

Fontes y col (2012) analizaron 115 láminas teñidas con ZN y 51 muestras de biopsias de piel de pacientes con lepra. Evaluaron dos procedimientos para extraer ADN de *Mycobacterium leprae* de láminas teñidas con ZN: el primero incluye Chelex

y la otra combina proteinasa y dodecilsulfato de sodio. Analizaron 16 repeticiones tándem de número variable (VNTR) y tres polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). De las 76 muestras procesadas mediante el primer procedimiento, el 30,2% fueron positivas por genotipificación VNTR; mientras que de las 39 muestras procesadas mediante el segundo procedimiento, el 28,2% arrojaron genotipos definidos por VNTR (30).

Banerjee y col (2011) evaluaron y compararon la eficacia diagnóstica de la PCR versus SSS. Se extrajo muestra de 164 pacientes, la PCR fue positiva en el 82,3%. La sensibilidad de la PCR fue significativamente mayor que la de SSS (31).

Kamble RR (2010) evaluaron la extracción de ADN de *Mycobacterium leprae* de 46 portaobjetos negativos de frotis de piel teñidos, se utilizaron cebadores específicos de *Mycobacterium leprae* para la amplificación de ADN basada en PCR (16S rRNA). Detectaron ADN de *Mycobacterium leprae* en 15 (32,6%) muestras. El método demostró ser útil en el diagnóstico de casos de lepra con frotis de piel con resultados negativos (32).

2.2 Bases teóricas

2.2.1 *Mycobacterium leprae*

A) Biología de *Mycobacterium leprae*

La enfermedad de la lepra se conoce desde hace más de 3000 años. El término Lepra es un tributo al médico noruego Gerhard Armauer Hansen, quien identificó al bacilo *Mycobacterium leprae* como la causa de la enfermedad en 1873

(33). Por tal motivo en el año de 1967 se introdujo el término Hanseniasis para reducir el estigma asociado con la enfermedad, dicho término fue propuesto por el profesor Abraão Rotberg (34).

Mycobacterium leprae es un organismo parásito obligado intracelular y pertenece al género *Mycobacterium* dentro de la familia *Mycobacteriaceae* en el orden Actinomycetales. Es un bacilo de crecimiento lento, resistente al ácido, grampositivo, con forma de bastón recto o ligeramente curvado, de aproximadamente 1 a 8µm de largo y un diámetro de 0,3 a 0,6µm con extremos redondeados y de tamaño paralelo (35).

La micobacteria tiene un tiempo de duplicación de 12-14 días en comparación con *Mycobacterium tuberculosis* que es de 18 a 20 horas. El bacilo tiene predisposición por sitios fríos del cuerpo, como la piel, la mucosa nasal y los nervios periféricos, principalmente los superficiales, teniendo como preferencia una temperatura entre 27 y 30°C. La estructura molecular del bacilo, principalmente la cápsula y la pared celular, le confieren ciertas propiedades que explican su efectividad en un nicho ecológico muy limitado (36).

B) Inmunología

Esta enfermedad granulomatosa presenta predisposición por la piel y los nervios periféricos. La presentación clínica de la enfermedad depende del estado inmunológico del paciente al adquirirla y de la evolución de la misma (37). La presentación clínica e histopatológica dependen de la capacidad inmunológica del

paciente en el momento de adquirir la infección o durante el desarrollo de la evolución natural de la misma. El macrófago es la célula predilecta por el bacilo, en ella se agrega para formar conjuntos bacilares intracelulares denominados globias. Hasta la actualidad no se logró cultivar en medios artificiales (38) . El bacilo se replica de manera natural en armadillos de 9 bandas del sudeste de Estados Unidos, ardillas rojas (*Sciurus vulgaris*) en las Islas Británicas y primates no humanos, incluidos los chimpancés (*Pan troglodytes*) en África y Asia (38).

La cápsula está formada por una gran cantidad de lípidos, siendo los dos más importantes el dimicocerosato de tiocerol y el glucolípido fenólico-1, este último blanco de una intensa respuesta humoral mediada por IgM. Otro componente importante de la pared celular es el lipoarabinomano, que es el antígeno para el macrófago (39). Gran parte de los genes funcionales encontrados en otras micobacterias han sido inactivados o convertidos en pseudogenes, inhabilitando funciones como la reproducción extracelular. De esta manera diversas funciones metabólicas y de reproducción hacen que sea una bacteria intracelular obligada con un tiempo de replicación prolongado (39).

En la actualidad se habla de susceptibilidad genética asociada al cromosoma 10p13 localizado cerca del gen que codifica los receptores de manosa tipo 1, que funcionan como receptores fagocíticos de los macrófagos (40).

C) Contagio

La transmisión no es conocida, pero se sabe que *Mycobacterium leprae* es una micobacteria con un poder de contagio muy pobre. Entre los principales factores de riesgo están el hacinamiento y el contacto prolongado con la persona enferma sin tratamiento (41). Se ha estudiado la posibilidad de la vía respiratoria como canal importante de transmisión. Los pacientes con Lepra Lepromatosa (LL) son quienes presentan una gran carga bacteriana en los tejidos, describiéndose hasta 7000 millones de bacilos por gramo de tejido. Se sabe que los casos no lepromatosos tienen una carga bacteriana mucho más pequeña, del orden de un millón de organismos en total. El bacilo se ha encontrado en gran número en la mucosa nasal (100 millones de microorganismos viables por día) (42). Si bien se creía que la piel podría ser una superficie de transmisión, esto nunca se ha podido comprobar. Se ha descrito una viabilidad del bacilo que oscila entre 36 horas hasta 9 días fuera del cuerpo humano, siendo así posible la transmisión por fómites (43).

D) Clasificación

La clasificación clínica más utilizada es la de Ridley-Jopling, se basa en el estado clínico e inmunológico del paciente. La enfermedad se divide en 2 polos (LL y Lepra tuberculoide [LT]) y un estadio intermedio (lepra dimorfa [borderline]). Los casos dimorfos se clasifican a su vez según se acerquen al polo Lepromatoso o Tuberculoide anteceditos por la palabra borderline: Borderline lepromatoso (BL), Borderline tuberculoide (BT) y Borderline borderline (BB). Estos casos se encuentran en un estadio inestable que evoluciona eventualmente a una polaridad y puede ser interrumpido con tratamiento farmacológico. En este estadio, a pesar de la dificultad

del diagnóstico clínico, es donde la lepra puede ser curada fácilmente (44).

E) Aspectos clínicos

▪ Lepra tuberculoide

El espectro tuberculoide (LT y BT) se presenta como escasas máculas hipopigmentadas, hipoestésicas, bien delimitadas con bordes eritematosos elevados y zonas centrales atróficas. En el rostro es difícil encontrar disminución de la sensibilidad debido a una abundante inervación sensitiva. Generalmente se asocia con anhidrosis y pérdida de anejos. Debido a que la LT representa un estado inmunológico competente, no es típico observar lesiones grandes o en gran número (44).

▪ Lepra lepromatosa

El espectro categórico lepromatoso (LL y BL) se caracteriza por pápulas y nódulos que confluyen, pudiendo originar una marcada infiltración difusa de la piel que da lugar a la denominada facies leonina y a la madarosis. Las lesiones suelen ser simétricas y bilaterales, en esta polaridad suele haber más afectación nerviosa e incapacidad que en la tuberculoide (44).

▪ Lepra dimorfos

Los casos dimorfos tienen una presentación clínica aguda o subaguda y provienen de casos indeterminados, presenta situación clínica inestable y transitoria en la cual se le debe iniciar el tratamiento oportuno; casi todos los casos dimorfos evolucionan hacia LL. Clínicamente se presentan como placas

eritematoescamosas circulares o anulares con bordes externos difusos e internos bien delimitados, la evolución de la lesión deja atrofia y pérdida de los anejos de la piel. (44).

F) Diagnóstico de la lepra

▪ Diagnóstico clínico

El diagnóstico actual se basa en 3 signos cardinales señalados por la OMS en 1997: i) lesiones en la piel de tipo parches hipopigmentados o eritematosos con pérdida de sensibilidad, ii) engrosamiento de los nervios periféricos y iii) presencia de bacilos ácido alcohol resistentes en la baciloscopia o en la biopsia de piel (Tabla 1) (11).

Tabla 1.

Signos cardinales y clasificación de lepra

Signos cardinales	Clasificación para tratamiento
– Parches hipopigmentados o levemente eritematosos con pérdida definitiva de sensibilidad.	– Paucibacilar (1 a 5 parches en piel)
– Nervios periféricos engrosados.	– Multibacilar (6 o más parches en piel)
– Bacilo ácido alcohol resistente en baciloscopia o biopsia de piel	

Fuente: Britton et al. (11).

- **Baciloscopia**

La baciloscopia tiene una especificidad del 100% y una sensibilidad del 50%. La baciloscopia se obtiene de la mucosa nasal, lóbulo de la oreja y/o lesiones en piel. Se utiliza la tinción ZN para visualizar la micobacteria y el resultado se interpreta utilizando la escala logarítmica de Ridley o índice bacteriológico (45).

- **Biopsia de piel**

La biopsia de piel se obtiene de una lesión cutánea y se tiñe con la técnica de Fite-Faraco, en el polo LT no se observan bacilos, pero se buscan granulomas característicamente con afectación neural (37).

- **Intradermorreacción con Lepromina**

La prueba de la Lepromina proviene de partículas de *Mycobacterium leprae* extraído de lepromas. Se efectúa mediante inyección intradérmica 0,1ml de reactivo de Lepromina y se aplica en la superficie flexora del antebrazo, la respuesta se interpreta de dos maneras: una reacción temprana llamada reacción de Fernández que se interpreta a las 24 o 48 horas y una reacción tardía conocida como reacción de Mitsuda que se realiza a los 21 días. Es positiva cuando se produce un nódulo mayor a 5mm (37).

2.2.2 Ácido desoxirribonucleico

A) Estructura molecular del ADN

El ADN está formado por tres moléculas: una pentosa (ribosa o desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada. Hay cinco clases de bases nitrogenadas diferentes: adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T)/ uracilo (U), las cuales son ensambladas de una en una por la célula y luego se encajan juntos en el proceso de la replicación/transcripción (46).

El descubrimiento del ADN se debe a Johan Friedrich Miescher quien, en 1869, mientras estudiaba la composición química de los glóbulos blancos, observó que dentro de las células había una sustancia rica en fosfatos, sin azufre y resistente a las proteasas, algo que no correspondía a la estructura típica de los lípidos o proteínas: por lo tanto, la aisló y la llamó “nucleína”, que posteriormente se cambiaría a “ácido nucleico” (46). Existen dos clases de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (ADN), el azúcar que contiene es la desoxirribosa, y el ácido ribonucleico (ARN) que contiene ribosa; ambos se encuentran en todas las células procariotas, eucariotas y virus. (46)

Todos los organismos poseen estas biomoléculas que controlan y dirigen la síntesis de sus proteínas, proporcionando la información que determina su especificidad y características biológicas, ya que estas contienen las instrucciones necesarias para realizar procesos vitales y se responsabilizan de las funciones básicas en el organismo (46) (47).

B) Extracción de ADN

La extracción de ADN es un método por el cual se obtiene el ADN a partir de las células y puede provenir de un cepillado bucal, vaginal, cervical, de fluidos

como la saliva, la sangre o casi cualquier parte de un organismo. La extracción consiste en separar el ADN de otros componentes celulares (como la membrana o las proteínas) con el fin de poder estudiarlo o manipularlo (32).

2.2.3 Detección molecular

“Detección molecular” es un término amplio que incluye técnicas de biología molecular en beneficio de la salud humana, detectando y/o cuantificando secuencias genéticas específicas de ácido ADN, ARN o proteínas. Inicialmente, el concepto de “Biología Molecular” se aplicó a los trabajos realizados sobre el ADN (48).

La detección específica de material genético en una muestra biológica ha mostrado un significativo impacto en todas las áreas de la salud, sobre todo en las áreas de las enfermedades infecciosas y el cáncer, el desarrollo de nuevas tecnologías, más rápidas y precisas (48).

2.2.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction). Es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN partiendo una única copia; con la cual el Dr. Kary Mullis comparte el premio Nobel de Química en 1993 por inventar esta tecnología (49). Este método permite multiplicar (amplificar) pequeñas cantidades de ADN en cientos de miles y millones de veces. El gramo a

amplificar puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud (50).

A. PCR cuantitativa en tiempo real

La PCR en tiempo real (qPCR) es una variante de la PCR convencional (PCR de punto final) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación de ADN molde, al menos un par de cebadores específicos, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs), un tampón de reacción adecuado y una ADN polimerasa termoestable; a dicha mezcla se le adiciona una sustancia marcada con un fluoróforo que permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos en un termociclador provisto de sensores de fluorescencia, tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, dicha medición se realiza tras cada ciclo de amplificación (51).

La ventaja de la qPCR proporciona una detección y cuantificación en menos tiempo, rápida y de alto rendimiento de las secuencias de ADN diana (7-8 Log10) y la multiplexación de amplificación de varios genes en una sola reacción, la qPCR es más segura que permite evitar contaminaciones cruzadas, ya que no requiere ninguna manipulación adicional con las muestras después de la amplificación (52).

Pasos de la qPCR

a) Desnaturalización

La primera reacción consiste en la desnaturalización del ADN,

separándose las dos cadenas por ruptura de los enlaces de hidrógeno, las condiciones típicas de desnaturalización son 95°C por 30 segundos, o 97°C por 15 segundos; sin embargo, temperaturas más altas pueden ser apropiadas especialmente para la hebra molde de ADN rica en G + C (52).

b) Hibridación

Segunda reacción que consiste en hibridación de los *primers*, para ello se baja la temperatura y las condiciones facilitará la unión de los *primers* a las cadenas de ADN, la temperatura y el tiempo requerido para la hibridación de los *primers* depende de la composición, tamaño y concentración de los *primers* amplificadores, el rango de actividad de las enzimas varía en dos órdenes de magnitud entre 20 y 85°C; las temperaturas de hibridación en el rango de 55 a 72°C generan resultados adecuados (49).

c) Extensión

La tercera reacción se realiza a 72° C, temperatura a la cual, la polimerasa lleva a cabo su acción, insertando los diferentes nucleótidos complementarios en el orden que le va indicando la cadena que actúa como molde, el tiempo de extensión depende de la longitud y concentración de la secuencia blanco y de la temperatura. La extensión del primer se realiza tradicionalmente a 72°C las estimaciones para la tasa de incorporación de nucleótidos a 2°C varía de 35 a 100 nucleótidos por segundo dependiendo del buffer, pH, concentración de sales y la naturaleza de la hebra molde de ADN

(49).

B. Ciclo umbral (Ct)

El umbral (Threshold) es el valor calculado durante la fase exponencial de la PCR en tiempo real, el cual se refiere al nivel de detección donde la reacción alcanza una intensidad de fluorescencia por encima de la línea base (“baseline”) pero lo suficientemente bajo como para estar dentro de la región de crecimiento exponencial de una curva de amplificación. Se utiliza para la determinación del número del ciclo de la PCR o valor Ct en ensayos en tiempo real (53).

- **Valor Ct:** es el número de ciclo de la PCR en el cual la señal fluorescente de la secuencia blanco cruza el umbral. Este valor se utiliza en la cuantificación absoluta o relativa de la expresión del gen (53).

C. Muestra fijada

Son preparaciones fijas con muestras preparadas ya listas, este tipo de preparación permite observar a los microorganismos y resulta muy útil cuando se quiere almacenar por varios años, además, estas preparaciones son muy fáciles de realizar, pues sólo se coloca sobre la lámina portaobjeto.

2.3 Formulación de hipótesis

Hipótesis general

Es posible la extracción de ADN de *Mycobacterium leprae* a partir de muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas.

III. METODOLOGÍA

3.1 Método de la investigación

El método de investigación es hipotético – deductivo. Según Rodríguez *et al.* (2017) dicho método se basa en presunción o hipótesis derivadas de leyes o datos empíricos que, si son consistentes con la realidad, se comprueba la veracidad. Este método es de uso muy común en medicina, donde se identifica como diagnóstico clínico (54).

3.1.1 Extracción de ADN micobacteriano

Se realizó la extracción de ADN a partir de muestras por raspados de incisión cutánea fijadas en láminas conteniendo bacilos de *Mycobacterium leprae*. La extracción de ADN se realizó en dos pasos: a) extracción de ADN propiamente dicha y b) control de calidad del ADN.

A) Extracción de ADN a partir de muestras por raspado de incisión cutánea.

Para llevar a cabo la extracción del material genético contenido en las muestras por raspado de incisión cutánea (ADN humano y ADN de *Mycobacterium leprae*) que se encuentran fijadas en láminas portaobjetos se utilizó el kit comercial E.Z.N. A®, Tissue DNA kit (Omega Bio-tek), siguiendo el protocolo del kit para extracción de ADN tisular, con algunas modificaciones que se evidencia en sección de resultados.

El kit presentó los siguientes componentes:

- Minicolumna HiBind® DNA
- Tubos de colecta de 2 mL
- Buffer BL
- Buffer TL
- Buffer HBC
- Buffer de lavado de DNA
- Buffer de elusión
- Solución de Proteinasa K

El proceso de extracción se dividió en cuatro etapas: lisis, unión a columna, lavado y elusión.

Lisis

- Todo el material biológico impregnado en la lámina (coloreada o sin colorear) se hidrató utilizando el buffer TL e inmediatamente se traspasó a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml por raspado directo utilizando hojas de bisturí.
- Se adicionó 180µl de Buffer TL y 25µl de solución de Proteinasa K. Se agitó en vórtex para mezclar bien. Se incubó a 55°C con agitación por 1 hora.
- Se agregó 4 µl de RNasa A (100 mg/ml). Se mezcló por pipeteo y dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 minutos.
- Se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos y luego se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5ml.
- Se añadió 200µl de Buffer BL y agito en vórtex para mezclar bien. Se incubó a 70°C durante 10 minutos.

Unión a columna

- Se insertó una Mini columna HiBind DNA en un tubo de colecta de 2ml.
- Se transfirió toda la muestra procesada al interior de la mini columna HiBind DNA, incluidos los precipitados que se hayan podido formar, y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. Se desechó el filtrado y reutilizó el tubo de colecta.
- Se añadió 500µl de Buffer HBC (diluido con Isopropanol-100%) a la mini columna, y centrifugo a 12000 rpm por 30 segundos. Se desechó el filtrado y el tubo de colecta.

Lavado

- Se introdujo la mini columna HiBind DNA en un nuevo tubo de colecta de 2ml y añadió 700µl de Buffer de lavado de ADN (diluido con Etanol-100%). Se centrifugó a 12000 rpm por 30 segundos. Se desechó el filtrado y reutilizó el tubo de colecta.
- Se repitió el paso de lavado con el Buffer de lavado de ADN.
- Se centrifugo la mini columna HiBind DNA vacía a 14000 rpm durante 2 minutos para secar la columna.

Elusión de ADN

- Se transfirió la mini columna HiBind DNA a un tubo de microcentrífuga de 1.5mL libre de nucleasas.
- Se añadió 30 de Buffer de elución calentado a 70°C e incubo la columna completa a 70°C por 1 minuto. Luego, Centrifugo a 14 000 rpm por 1 minuto.

- Se repitió el paso de elución usando el volumen previo.
- Se almacenó el ADN eluido a -20°C.

B) Control de calidad del ADN

La calidad del ADN obtenido se evaluó a través de la cantidad y la pureza del material genético. La cantidad de ADN se evaluó mediante cuantificación fluorométrica de ADN de doble cadena usando el kit “Qubit High Sensitivity” (Thermo Fisher Scientific), y la calidad del ADN se determinó mediante relación de absorbancia 260/280nm.

Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C para posteriormente realizar la confirmación de la extracción mediante qPCR.

3.1.2 Confirmación molecular de obtención de ADN de *Mycobacterium leprae*

La confirmación de obtención de ADN conteniendo material genético de *Mycobacterium leprae* fue realizado mediante qPCR para lo cual se describe el proceso realizado:

A) Selección de *primers* y sonda de ADN

Se utilizaron primers y una sonda que tienen como blanco el gen 16S rRNA previamente reportados por Martínez y col. (55). Las secuencias nucleotídicas de los primers y sondas seleccionadas fueron derivadas a casas comerciales para su respectiva síntesis. La sonda fue diseñada con la metodología TaqMan usando el fluoróforo FAM como molécula reportera (Tabla 2.).

Tabla 2.

Secuencia de cebadores y sonda para ensayo de PCR en tiempo real

Tipo	Nombre	Secuencia
Primer forward	ML16S_ARNrTaq-F	5'-GCATGTCTTGTGGTGGAAAGC-3'
Primer reverse	ML16S_ARNrTaq-R	5'-CACCCCACCAACAAGCTGAT-3'
Sonda	ML16S_ARNrTaq	5'-CATCCTGCACCGCA-3'

B) Protocolo de qPCR

La qPCR se realizó utilizando el sistema de amplificación TaqMan. La mezcla maestra y las condiciones de ciclaje se realizaron según lo establecido por Martínez y col. (55) con ligeras modificaciones. Se añadió 5 µl de muestra de ADN a un volumen de Mezcla maestra de 20 µl conteniendo TaqMan 2x (incluye la Polimerasa), 500 nM de cada primer y 100 nM de la sonda 16S rRNA.

La mezcla de reacción se sometió a las siguientes condiciones de ciclaje: un ciclo de 95 °C durante 3 minutos y 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, luego 56°C durante 1 minuto (55)

Las corridas de qPCR fueron realizadas utilizando el equipo Rotor-Gene-Q disponible en las instalaciones de Biomedicina del Instituto Nacional de Salud.

3.2 Enfoque de la investigación

El enfoque de investigación es Cuantitativo, según Hernández *et al.* (2018) ; este tipo de enfoque describe de manera secuencial para

comprobar ciertas suposiciones, se basa en la medición y análisis utilizando métodos estadísticos (56).

3.3 Tipo de investigación

El tipo de investigación es de tipo Básica, como lo describe Arias *et al.* en este tipo de investigación no se resuelve ningún problema inmediato, más bien, sirven de base teórica para otros tipos de investigación (57).

3.4 Diseño de la investigación

El estudio presenta un alcance descriptivo y de corte transversal. El nivel descriptivo, según Hernández-Sampieri *et al.* Tiene como función especificar las propiedades, características, perfiles, además describe y fundamentan varios aspectos del fenómeno. (56). El corte transversal, según Monterola *et al.* recoge los datos en un solo momento y solo una vez. (58).

3.5 Población, muestra y muestreo

3.5.1 Población

Se utilizaron todas las muestras (50 muestras) con baciloscopias positivas y negativas a *Mycobacterium leprae* provenientes por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas que fueron diagnosticados por baciloscopia en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias (LRNM) del Instituto Nacional de Salud (INS). El periodo comprendió los años 2019 – 2023, y se encontraban almacenadas

en la colección de muestras del LRNM.

3.5.2 Muestra

Se utilizó un total de 50 muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas con diagnósticos de baciloscopía positiva (30) y negativas (20) para *Mycobacterium leprae*, que se almacenadas en la colección de muestras del LRNM del INS. Se incluyó 1 muestra de *Staphylococcus sp.* fijada en lámina como control negativo, 1 lámina con baciloscopía positiva con IB 6+ y con diagnóstico clínico de tipo lepra lepromatosa como control positivo, 1 control de extracción (agua) y 1 control de sistema (en etapa de preparación de mezcla maestra).

Todos los procesos de extracción de ADN se llevaron a cabo en instalaciones con niveles de Bioseguridad 2 y 3 del LRNM del INS.

3.5.3 Muestreo

Las muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas se seleccionaron realizando un muestreo censal que cumplieren los criterios de inclusión.

Criterios de inclusión

- Muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas almacenadas en la colección del LRNM del INS (periodo 2019 al 2023).
- Muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas con

baciloscopía positiva y/o negativa para *Mycobacterium leprae*.

- Muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas de zonas, como lóbulo de oreja, codo, rodilla y lesión.
- Muestras por raspado de incisión cutánea fijada en láminas que se encuentran en adecuado estado de almacenamiento y bien rotulada.

Criterios de exclusión

- Muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas con restos de sangre.
- Muestras que se encuentran fijadas en láminas rotas.

3.6 Variables y operacionalización

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicador	Escala de Medición	Escala valorativa
Extracción	Técnica molecular para extracción de ADN.	Obtención de ADN a partir de muestras por raspado de incisión cutánea	Cantidad de ADN	Concentración en microgramos/mililitro ($\mu\text{g/ml}$)	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> – Cantidad adecuada ($[\text{ADN}] \geq 1\text{ng/mL}$) – Cantidad inadecuada ($[\text{ADN}] < 1\text{ng/mL}$)
			Pureza de ADN	Relación 260/280 nanómetros (nm)	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> – Baja pureza (índice < 1.7) – Buena pureza (índice entre 1.7-1.9) – Baja pureza (índice > 1.9)
Detección de <i>M leprae</i>	Material genético de <i>Mycobacterium leprae</i> .	Obtención de ADN de <i>Mycobacterium leprae</i>	Amplificación mediante qPCR	Valor Ct	Ordinal	<ul style="list-style-type: none"> – ADN de <i>Mycobacterium leprae</i> detectado ($\text{Ct} \leq 40$) – ADN de <i>Mycobacterium leprae</i> no detectado ($\text{Ct} \geq 40$)

3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1 Técnica

La técnica empleada es el método experimental debido a que se extrajo ADN a partir de láminas fijadas siguiendo el protocolo previamente descrito. Se utilizó un registro de recolección de datos, que permitió almacenar los resultados obtenidos de cada uno de los experimentos y en donde se incluyó cada una de las muestras con las codificaciones utilizadas específicas para el estudio. Los datos obtenidos primero fueron registrados en “Hojas de trabajo físicas” y luego fueron digitalizados.

3.7.2 Descripción de instrumentos

Se utilizó como instrumento la hoja de trabajo para el reporte físico de los resultados obtenidos, la cual fue elaborada por la tesista.

3.7.3 Validación

El instrumento de recolección de datos fueron validados a través de Juicio de expertos (Anexo 3).

3.7.4 Confiabilidad

Al ser el instrumento hojas de trabajo de recolección de datos, de los procesos de extracción de ADN no amerita un test de confiabilidad.

3.8 Plan de procesamiento y análisis de datos

La extracción de ADN fue evaluada según parámetros de calidad y cantidad del material genético que se obtuvo a partir de las muestras evaluadas. Para esto, se analizaron las muestras por raspado de incisión cutánea positivas para *Mycobacterium leprae*. Las concentraciones de ADN ([ADN]) fueron categorizadas en adecuada ([ADN] \geq 1ng/mL) o inadecuada ([ADN] < 1ng/mL), según lo obtenido de las lecturas por fluorescencia, utilizando el equipo fluorómetro Qubit Thermo scientific y se establecieron las frecuencias relativas para cada categoría. La calidad de ADN fue determinada por espectrofotometría, usando la relación de absorbancia a 260nm y 280nm. Para dicho proceso se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 8000 de Thermo scientific que incluye un software que proporciona espectros de absorbancia y concentraciones. Se categorizo como: ADN de buena calidad entre 1.7 – 1.9 (Relación 260/280) o de baja calidad < 1.7 o > 1.9).

3.9 Aspectos éticos

El presente estudio de investigación se presentó al Comité de ética de la Universidad Privada Norbert Wiener, luego de su revisión y aprobación, mediante una constancia de aprobación fue presentado al Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Salud y fue aprobada mediante Resolución Directoral.

La investigación no involucró la participación de seres humanos. El presente estudio no recolectó muestras por raspado de incisión cutánea de uso exclusivo para la investigación, sino que utilizó láminas que ya fueron diagnosticadas por baciloscopia. En ninguna etapa del estudio se tuvo contacto con algún paciente.

El resultado oportuno y exacto de diagnóstico por raspado de incisión cutánea de los pacientes no fueron perjudicados, debido a que se trabajaron con muestras ya procesadas en años anteriores. Las muestras, además de contar con una codificación propia del laboratorio, recibieron una segunda codificación específica para el presente estudio. No se requirió consentimiento informado.

Los resultados serán publicados y compartidos en una revista científica indexada.

IV. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1 Resultados

4.1.1 Análisis descriptivo de resultados

a) Extracción de ADN de *Mycobacterium leprae*

De acuerdo al protocolo de extracción se realizó previamente la evaluación de parámetros como: presencia de lisozima y volumen final de elución. Para la lisozima se evaluó la inclusión o no de este componente. Para el volumen final de elución se evaluó 60 y 100 uL respectivamente (Tabla 3)

Tabla 3.

Esquema de procesamiento

N° prueba	Buffer Lisozima	Volumen final de elución (uL)	Número de láminas
1	Sí	60	6
2	Sí	100	6
3	No	60	6
4	No	100	6

A cada prueba se adicione 1 control de extracción (Agua)

b) Láminas fijadas con índice bacteriológico

Para cada prueba se incluyeron 6 láminas confirmadas por:

- Índice bacilosκόpico (4+) → 2 láminas
- Índice bacilosκόpico (5+) → 2 láminas
- Índice bacilosκόpico (6+) → 2 láminas.

Durante la evaluación de extracción se obtuvo mejores resultados con la prueba número 3 (tabla 4), de forma que se ajustó los parámetros para la extracción de las muestras: no se utilizó Lisozima y el volumen final de elusión 60uL.

Tabla 4.

Resultados de la prueba 3

Código	Código	Índice bacteriológico	Conc. Tubo Qubit (ng/mL)	260/280	Valor Ct
1	PBA-LEP-1	4+	46.8	1.95	28.64
2	PBA-LEP-2	4+	81.9	2.26	28.05
3	PBA-LEP-3	5+	38.5	1.87	28.91
4	PBA-LEP-4	5+	231	2.05	25.93
5	PBA-LEP-5	6+	13.5	1.74	25.6
6	PBA-LEP-6	6+	23.3	2.11	30.01
7	PBA-LEP-7	CN	Fuera de rango	2.15	

Las 30 muestras con bacilosκόpía positiva fueron procesadas de acuerdo a la metodología descrita. La distribución del índice bacteriológico fue de 1+ hasta 6+, como se describe en la (tabla 5).

Tabla 5.

Índice bacteriológico de láminas de *Mycobacterium leprae*

Número de láminas	Índice bacteriológico (cruces)
2	1+
3	2+
3	3+
2	4+
10	5+
10	6+

Las 20 muestras negativas corresponden a láminas por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas con baciloscopía negativa.

Nivel de calidad de ADN

Se determinó el nivel de calidad del ADN de las 50 muestras extraídas, mediante un espectrofotómetro donde se midió el índice 260/280 (Nanodrop8000 de Thermo Fisher).

En la medición de las 50 muestras, se obtuvo un índice 260/280 con un intervalo de valores, mínimo de 1.02 y máximo de 2.87, los cuales no presentaron ninguna relación respecto al índice bacteriológico para cada muestra evaluada (Tabla 6).

Tabla 6.Resultados de la calidad de ADN de *Mycobacterium leprae*

Código interno	Índice bacteriológico	Relación 260/280	Código interno	Índice bacteriológico	Relación 260/280
INS-LEP-1	1+	1.43	INS-LEP-26	6+	1.49
INS-LEP-2	1+	2.75	INS-LEP-27	6+	1.93
INS-LEP-3	2+	1.81	INS-LEP-28	6+	1.89
INS-LEP-4	2+	1.52	INS-LEP-29	6+	1.30
INS-LEP-5	2+	2.03	INS-LEP-30	6+	2.12
INS-LEP-6	3+	2.87	INS-LEP-31	Negativo	1.85
INS-LEP-7	3+	1.85	INS-LEP-32	Negativo	2.06
INS-LEP-8	3+	2.05	INS-LEP-33	Negativo	1.27
INS-LEP-9	4+	2.24	INS-LEP-34	Negativo	2.52
INS-LEP-10	4+	1.48	INS-LEP-35	Negativo	2.01
INS-LEP-11	5+	2.17	INS-LEP-36	Negativo	1.02
INS-LEP-12	5+	1.88	INS-LEP-37	Negativo	2.15
INS-LEP-13	5+	1.37	INS-LEP-38	Negativo	1.47
INS-LEP-14	5+	1.96	INS-LEP-39	Negativo	1.28
INS-LEP-15	5+	1.96	INS-LEP-40	Negativo	1.65
INS-LEP-16	5+	1.53	INS-LEP-41	Negativo	1.48
INS-LEP-17	5+	2.00	INS-LEP-42	Negativo	2.58
INS-LEP-18	5+	1.46	INS-LEP-43	Negativo	2.19
INS-LEP-19	5+	1.83	INS-LEP-44	Negativo	1.75
INS-LEP-20	5+	1.76	INS-LEP-45	Negativo	2.42
INS-LEP-21	6+	1.62	INS-LEP-46	Negativo	1.21
INS-LEP-22	6+	2.20	INS-LEP-47	Negativo	2.25
INS-LEP-23	6+	1.23	INS-LEP-48	Negativo	1.98
INS-LEP-24	6+	1.75	INS-LEP-49	Negativo	1.83
INS-LEP-25	6+	1.39	INS-LEP-50	Negativo	1.66

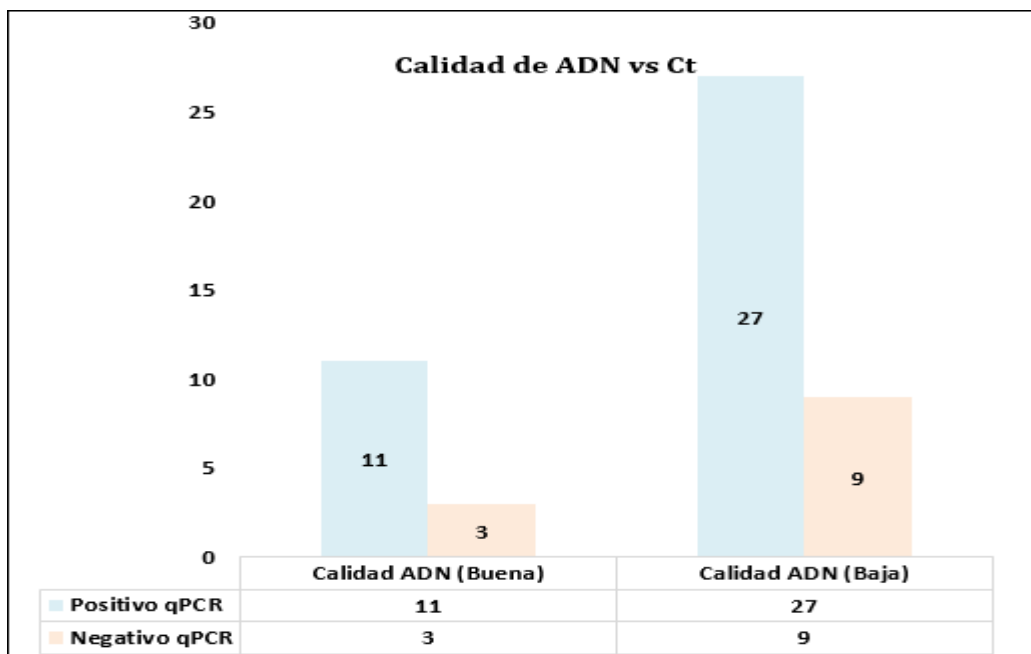
Tabla 7.

Calidad de ADN (escala valorativa) respecto al resultado qPCR

Código interno	Calidad ADN (escala valorativa)	Resultado qPCR	Código interno	Calidad ADN (escala valorativa)	Resultado qPCR
INS-LEP-1	Baja	Positivo	INS-LEP-26	Baja	Positivo
INS-LEP-2	Baja	Positivo	INS-LEP-27	Buena	Positivo
INS-LEP-3	Buena	Positivo	INS-LEP-28	Buena	Positivo
INS-LEP-4	Baja	Positivo	INS-LEP-29	Baja	Positivo
INS-LEP-5	Baja	Positivo	INS-LEP-30	Baja	Positivo
INS-LEP-6	Baja	Positivo	INS-LEP-31	Buena	Negativo
INS-LEP-7	Buena	Positivo	INS-LEP-32	Baja	Negativo
INS-LEP-8	Baja	Positivo	INS-LEP-33	Baja	Positivo
INS-LEP-9	Baja	Positivo	INS-LEP-34	Baja	Negativo
INS-LEP-10	Baja	Positivo	INS-LEP-35	Baja	Positivo
INS-LEP-11	Baja	Positivo	INS-LEP-36	Baja	Positivo
INS-LEP-12	Buena	Positivo	INS-LEP-37	Baja	Negativo
INS-LEP-13	Baja	Positivo	INS-LEP-38	Baja	Positivo
INS-LEP-14	Buena	Positivo	INS-LEP-39	Baja	Negativo
INS-LEP-15	Buena	Positivo	INS-LEP-40	Baja	Negativo
INS-LEP-16	Baja	Positivo	INS-LEP-41	Baja	Negativo
INS-LEP-17	Baja	Positivo	INS-LEP-42	Baja	Negativo
INS-LEP-18	Baja	Positivo	INS-LEP-43	Baja	Negativo
INS-LEP-19	Buena	Positivo	INS-LEP-44	Buena	Negativo
INS-LEP-20	Buena	Positivo	INS-LEP-45	Baja	Negativo
INS-LEP-21	Baja	Positivo	INS-LEP-46	Baja	Positivo
INS-LEP-22	Baja	Positivo	INS-LEP-47	Baja	Positivo
INS-LEP-23	Baja	Positivo	INS-LEP-48	Buena	Negativo
INS-LEP-24	Buena	Positivo	INS-LEP-49	Buena	Positivo
INS-LEP-25	Baja	Positivo	INS-LEP-50	Baja	Positivo

Figura 1.

Resultado de la calidad de ADN (escala valorativa) respecto al Resultado qPCR (cualitativo).



Interpretación:

De 14 (28%) muestras evaluadas con calidad de ADN buena, 11 muestras salieron positivas. De 36 (72%) muestras con calidad de ADN baja, 27 salieron positivas. De la misma forma, de 14 muestras evaluadas con calidad de ADN buena, 3 salieron negativas. De 36 muestras con calidad de ADN baja, 9 muestras salieron negativas. Los rendimientos de la qPCR son óptimos tanto para muestras de baja y buena calidad.

Medición de la cantidad de ADN

Se realizó la medición de la cantidad de ADN de las 50 muestras extraídas a partir de muestras fijadas en láminas, se evaluó mediante cuantificación fluorométrica de ADN de doble cadena usando el kit “Qubit High Sensitivity” (ThermoFisher Scientific). Se midió la cantidad utilizando dos estándares. Los resultados obtenidos se muestran en la

tabla 8.

Tabla 8.

Resultados de cantidad de ADN de *Mycobacterium leprae* en muestras fijadas en laminas.

Código interno	Índice bacteriológico	Conc. Tubo Qubit (ng/mL)	Código interno	Índice bacteriológico	Conc. Tubo Qubit (ng/mL)
INS-LEP-1	1+	1.06	INS-LEP-26	6+	3.09
INS-LEP-2	1+	0.86	INS-LEP-27	6+	10.80
INS-LEP-3	2+	7.35	INS-LEP-28	6+	12.10
INS-LEP-4	2+	1.87	INS-LEP-29	6+	4.97
INS-LEP-5	2+	2.55	INS-LEP-30	6+	6.44
INS-LEP-6	3+	0.74	INS-LEP-31	Negativo	0.97
INS-LEP-7	3+	1.05	INS-LEP-32	Negativo	0.50
INS-LEP-8	3+	2.11	INS-LEP-33	Negativo	1.82
INS-LEP-9	4+	46.80	INS-LEP-34	Negativo	2.43
INS-LEP-10	4+	19.30	INS-LEP-35	Negativo	7.20
INS-LEP-11	5+	1.24	INS-LEP-36	Negativo	1.87
INS-LEP-12	5+	6.28	INS-LEP-37	Negativo	1.87
INS-LEP-13	5+	21.30	INS-LEP-38	Negativo	0.84
INS-LEP-14	5+	1.06	INS-LEP-39	Negativo	0.61
INS-LEP-15	5+	1.32	INS-LEP-40	Negativo	2.15
INS-LEP-16	5+	0.90	INS-LEP-41	Negativo	1.27
INS-LEP-17	5+	3.47	INS-LEP-42	Negativo	1.63
INS-LEP-18	5+	1.15	INS-LEP-43	Negativo	0.54
INS-LEP-19	5+	13.70	INS-LEP-44	Negativo	37.00
INS-LEP-20	5+	12.40	INS-LEP-45	Negativo	38.10
INS-LEP-21	6+	15.00	INS-LEP-46	Negativo	4.02
INS-LEP-22	6+	24,00	INS-LEP-47	Negativo	4.32
INS-LEP-23	6+	2.52	INS-LEP-48	Negativo	67.20
INS-LEP-24	6+	3.13	INS-LEP-49	Negativo	5.30
INS-LEP-25	6+	1.56	INS-LEP-50	Negativo	1.10

Nota. Los resultados obtenidos de la cantidad de ADN fueron expresados en ng/mL desde un valor mínimo de 0.5 ng/mL hasta 67.2 ng/mL.

De las 50 muestras analizadas mediante índice bacilosκόpico y qPCR, se estableció la concordancia categórica con los siguientes resultados (Tabla 9)

Tabla 9. Análisis de concordancia categórica entre índice bacilosκόpico y PCR en tiempo real a partir de muestras fijada en lámina.

Código interno	Índice bacteriológico	Ciclo umbral (Ct)	Concordancia categórica		Código interno	Índice bacteriológico	Ciclo umbral (Ct)	Concordancia categórica
INS-LEP-1	1+	26.28	CONCORDANTE		INS-LEP-28	6+	29.56	CONCORDANTE
INS-LEP-2	1+	37.27	CONCORDANTE		INS-LEP-29	6+	29.6	CONCORDANTE
INS-LEP-3	2+	38.9	CONCORDANTE		INS-LEP-30	6+	26.78	CONCORDANTE
INS-LEP-4	2+	34.72	CONCORDANTE		INS-LEP-31	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-5	2+	33.86	CONCORDANTE		INS-LEP-32	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-6	3+	31.72	CONCORDANTE		INS-LEP-33	Negativo	36.22	DISCORDANTE
INS-LEP-7	3+	36.43	CONCORDANTE		INS-LEP-34	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-8	3+	29.67	CONCORDANTE		INS-LEP-35	Negativo	30.21	DISCORDANTE
INS-LEP-9	4+	28.91	CONCORDANTE		INS-LEP-36	Negativo	27.90	DISCORDANTE
INS-LEP-10	4+	30.01	CONCORDANTE		INS-LEP-37	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-11	5+	28.08	CONCORDANTE		INS-LEP-38	Negativo	39.00	DISCORDANTE
INS-LEP-12	5+	25.55	CONCORDANTE		INS-LEP-39	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-13	5+	29.30	CONCORDANTE		INS-LEP-40	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-14	5+	33.49	CONCORDANTE		INS-LEP-41	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-15	5+	27.09	CONCORDANTE		INS-LEP-42	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-16	5+	37.61	CONCORDANTE		INS-LEP-43	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-17	5+	23.73	CONCORDANTE		INS-LEP-44	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-18	5+	24.63	CONCORDANTE		INS-LEP-45	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-19	5+	25.79	CONCORDANTE		INS-LEP-46	Negativo	36.74	DISCORDANTE
INS-LEP-20	5+	23.71	CONCORDANTE		INS-LEP-47	Negativo	38.43	DISCORDANTE
INS-LEP-21	6+	23.28	CONCORDANTE		INS-LEP-48	Negativo		CONCORDANTE
INS-LEP-22	6+	20.84	CONCORDANTE		INS-LEP-49	Negativo	39.02	DISCORDANTE
INS-LEP-23	6+	28.30	CONCORDANTE		INS-LEP-50	Negativo	38.96	DISCORDANTE
INS-LEP-24	6+	29.31	CONCORDANTE		INS-LEP-51	CN		CONCORDANTE
INS-LEP-25	6+	29.38	CONCORDANTE		INS-LEP-52	CE		CONCORDANTE
INS-LEP-26	6+	28.61	CONCORDANTE		INS-LEP-53	CS		CONCORDANTE
INS-LEP-27	6+	25.09	CONCORDANTE		INS-LEP-54	CP (6+)	25.60	CONCORDANTE

Leyenda: CN: control negativo. CE: control de extracción. CS: control de sistema. CP: control positivo

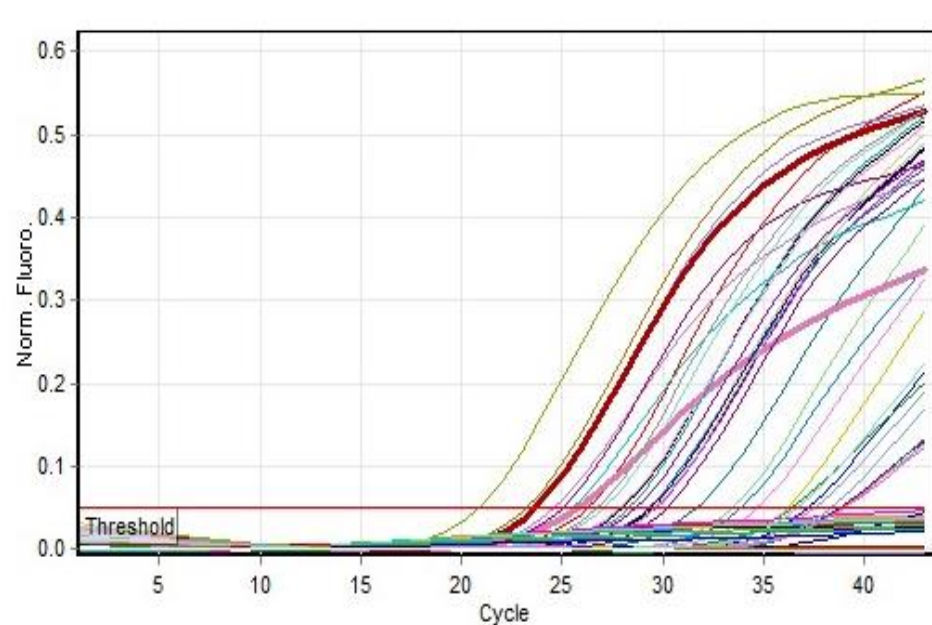
Nota. En la tabla 9 se observa que, de las 50 muestras amplificadas, 30 fueron según qPCR, obteniéndose un 100 % de concordancia con los resultados obtenidos mediante el índice bacteriológico. Respecto a las muestras negativas por baciloscopia, de las 20 muestras amplificadas, 8 muestras resultaron positivas por qPCR obteniendo una discordancia de 40% entre ambas metodologías para estas muestras.

Además, referente al control negativo se incluyó una muestra de *Staphylococcus sp* fijada en lámina, la cual dio negativo por qPCR, demostrando la efectividad de dicha técnica, donde se utilizó primers y sonda específicos para *Mycobacterium leprae*. Respecto a los controles de extracción y de sistema que se incluyó en dicho proceso se evidencio resultados sin presencia de contaminación, demostrando un buen proceso de extracción y amplificación

Figura 2.

Amplificación de muestras de *M leprae*.

Quantitation data for Cycling A.Green



Interpretación:

En la figura 2 se observa las curvas de amplificación de las 50 muestras procesadas, la línea umbral (t) permite discriminar las muestras positivas y negativas. Todas las muestras positivas presentaron un valor, como se muestra en la tabla 10. De esta manera se confirma la positividad de las muestras por qPCR a *Mycobacterium leprae*

Tabla 10.

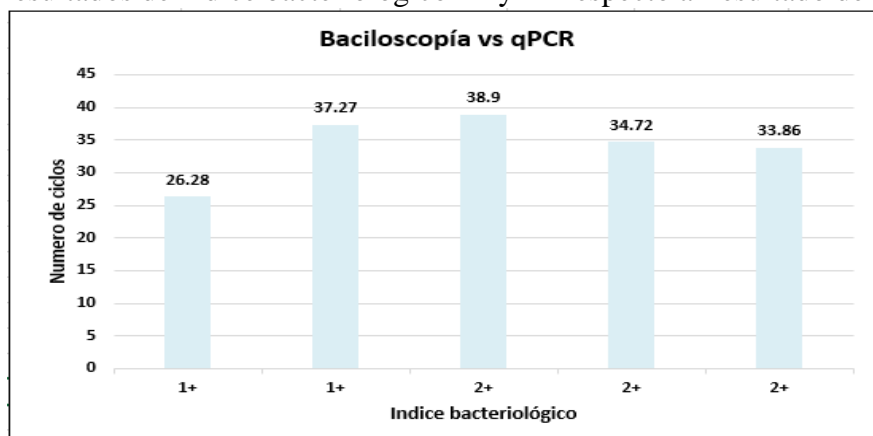
Comparación del Ct de la qPCR con índice bacteriológico 1+ y 2+

Índice bacteriológico	Ciclo umbral (Ct)
1+	26.28
1+	37.27
2+	38.9
2+	34.72
2+	33.86
Promedio	34.2

Nota. En la tabla se observa el promedio de las Ct de la qPCR obtenido para las muestras con índice bacteriológico 1+ y 2+, el cual es de 34.2

Figura 3.

Resultados de índice bacteriológico 1+ y 2+ respecto al resultado de qPCR.



Interpretación:

En cuanto al grafico del índice bacteriológico 1+ y 2+ se evidencia a menor cantidad de IB mayor cantidad de Ct

Tabla 11.

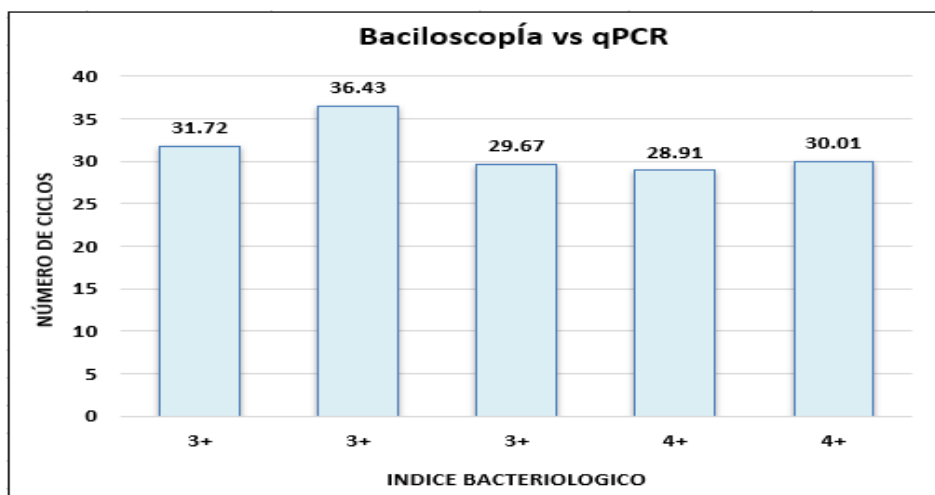
Comparación del Ct de la qPCR con índice bacteriológico 3+ y 4+

Índice bacteriológico	Ciclo umbral (Ct)
3+	31.72
3+	36.43
3+	29.67
4+	28.91
4+	30.01
Promedio	31.35

Nota. En la tabla se observa el promedio de las Ct de la qPCR obtenido para las muestras con índice bacteriológico 3+ y 4+, el cual es de 31.35.

Figura 4.

Resultados de índice bacteriológico 3+ y 4+ respecto al resultado de qPCR.



Interpretación:

Se observa la relación inversa de número de ciclos e índice bacteriológico, a menor índice bacteriológico mayor número de ciclos.

Tabla 12.

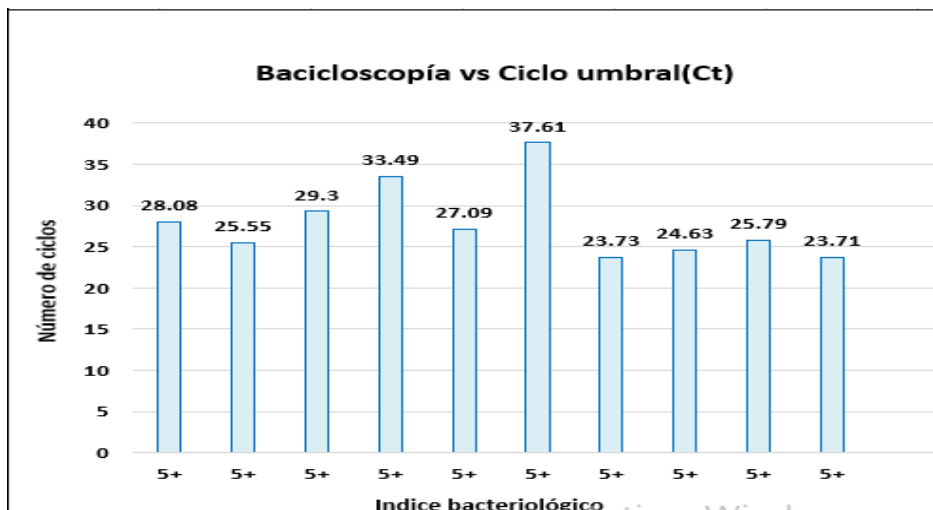
Comparación del Ct de la qPCR con índice bacteriológico 5+

Índice bacteriológico	Ciclo umbral (Ct)
5+	28.08
5+	25.55
5+	29.3
5+	33.49
5+	27.09
5+	37.61
5+	23.73
5+	24.63
5+	25.79
5+	23.71
Promedio	27.9

Nota. En la tabla se observa el promedio de las Ct de la qPCR obtenido para las muestras con índice bacteriológico 5+, el cual es de 27.9.

Figura 5.

Resultados de índice bacteriológico 5+ respecto al resultado de qPCR.

**Interpretación:**

Se observa la relación inversa entre el número de ciclos e índice bacteriológico, a mayor índice bacteriológico menor número de ciclos.

Tabla 13.

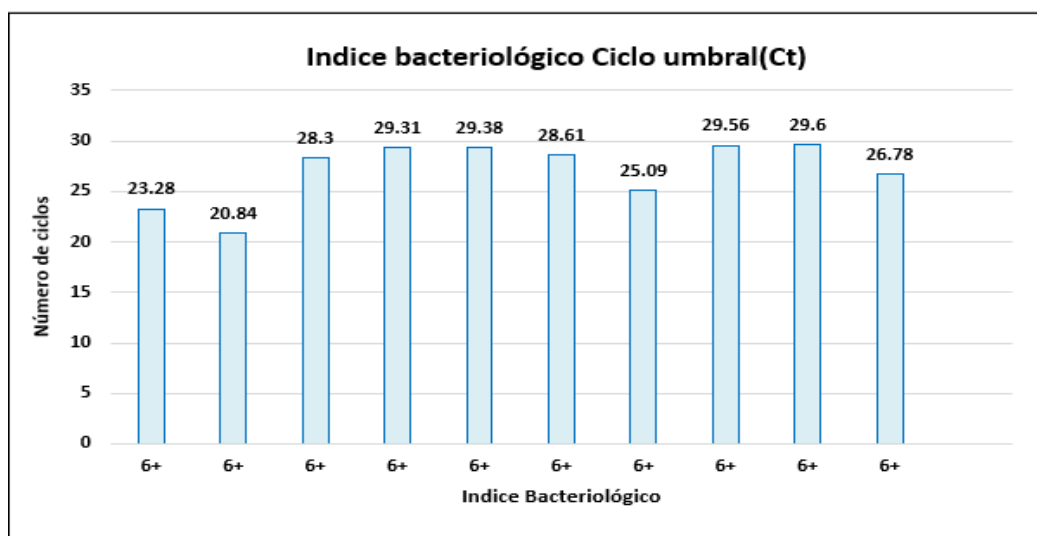
Comparación del Ct de la qPCR con índice bacteriológico 6+

Índice bacteriológico	Ciclo umbral (Ct)
6+	23.28
6+	20.84
6+	28.3
6+	29.31
6+	29.38
6+	28.61
6+	25.09
6+	29.56
6+	29.6
6+	26.78
Promedio	27.1

Nota. En la tabla se observa el promedio de las Ct de la qPCR obtenido para las muestras con índice bacteriológico 6+, el cual es de 27.1

Figura 6.

Resultados de índice bacteriológico 6+ respecto al resultado de qPCR.



Interpretación:

Se observa la relación inversa entre el número de ciclos e índice bacteriológico, a mayor índice bacteriológico menor número de ciclos.

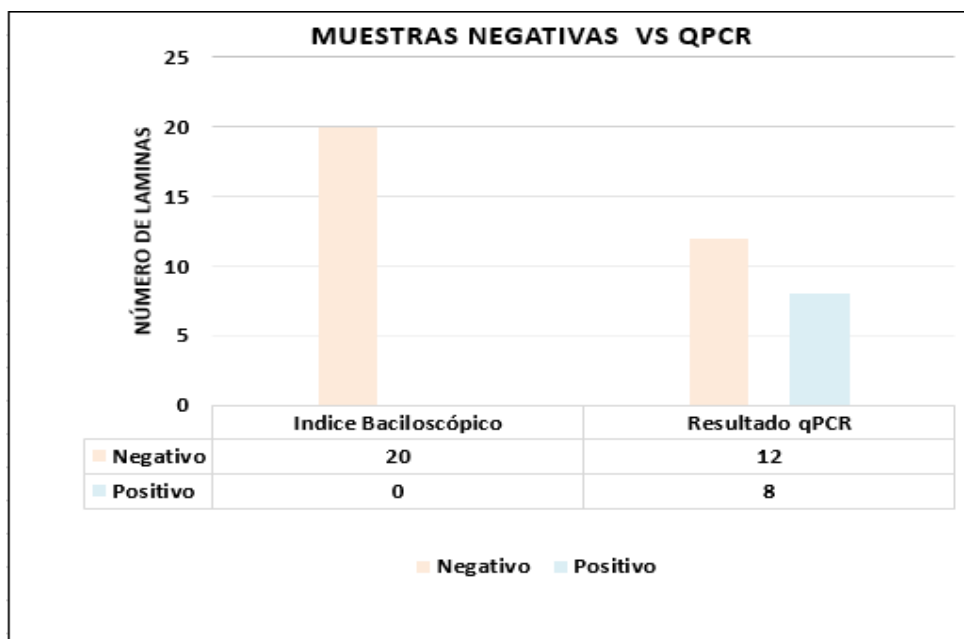
Tabla 14.

Relación de muestras con baciloscopia negativas respecto a resultados de qPCR

Código interno	Índice bacteriológico	Resultado qPCR
INS-LEP-31	Negativo	Negativo
INS-LEP-32	Negativo	Negativo
INS-LEP-33	Negativo	Positivo
INS-LEP-34	Negativo	Negativo
INS-LEP-35	Negativo	Positivo
INS-LEP-36	Negativo	Positivo
INS-LEP-37	Negativo	Negativo
INS-LEP-38	Negativo	Positivo
INS-LEP-39	Negativo	Negativo
INS-LEP-40	Negativo	Negativo
INS-LEP-41	Negativo	Negativo
INS-LEP-42	Negativo	Negativo
INS-LEP-43	Negativo	Negativo
INS-LEP-44	Negativo	Negativo
INS-LEP-45	Negativo	Negativo
INS-LEP-46	Negativo	Positivo
INS-LEP-47	Negativo	Positivo
INS-LEP-48	Negativo	Negativo
INS-LEP-49	Negativo	Positivo
INS-LEP-50	Negativo	Positivo

Figura 7.

Resultados de muestras con baciloscopía negativa respecto al resultado qPCR.



Interpretación:

De 20 muestras procesadas con resultado de baciloscopía negativa, se observa que 8 muestras dieron positivo mediante qPCR, lo que demuestra un mejor rendimiento de detección de *Mycobacterium leprae* por el método molecular.

4.1.2. Discusión de resultados

La lepra en el Perú, ha evidenciado buenos resultados en la lucha contra esta enfermedad (7); sin embargo, en la actualidad aún se reporta alrededor de 30 casos nuevos cada año, principalmente en zonas endémicas de la Amazonia (14). Así mismo, se notifican casos de lepra en zonas no endémicas como Lima y La libertad, lo cual podría explicarse por el proceso de la inmigración de personas de las zonas endémicas hacia la región costera, así como la presencia de extranjeros debido al proceso

migratorio de países vecinos, el cual se incrementó en estos últimos años. (59)

El diagnóstico tardío favorece la transmisión continua y aumenta el riesgo individual de discapacidades funcionales, en ese sentido, las herramientas de laboratorio se consideran beneficiosas para facilitar la detección temprana de la enfermedad (60). Ante esto, consideramos que el presente estudio es la primera prueba de biología molecular que se desarrolla en el país a partir de la extracción del ADN de *Mycobacterium leprae* a partir de muestras fijadas en láminas proveniente de pacientes con diagnóstico clínico para esta enfermedad.

Actualmente, en Perú el único diagnóstico de laboratorio es la baciloscopía, el cual presenta una limitación por su baja sensibilidad para pacientes de forma clínica de tipo tuberculoide, los paucibacilares y los contactos de pacientes positivos, ya que en su totalidad de estas son baciloscopía negativa. Para este tipo de pacientes es importante implementar PCR en tiempo real.

Las muestras procesadas correspondieron a pacientes con diagnóstico baciloscópico positivo (n=30) y negativo (n=20), y en los resultados presentados evidenciamos una alta concordancia (100%) para las muestras positivas y una positividad de (40%) para las muestras negativas. Estos resultados son similares con los reportados en el 2016 por Siwakoti y col. donde realizaron comparación de dos métodos, microscopia de frotis cutáneo en hendidura (SSS) y PCR para amplificar la secuencia de 129pb del elemento repetitivo de *Mycobacterium leprae*. La sensibilidad de SSS y PCR fue del 18% y 72%, respectivamente. La mejora del 54% en la detección de casos mediante PCR mostró claramente su ventaja sobre la SSS. Además, la PCR pudo confirmar el diagnóstico de lepra en el 66% de los casos negativos para Bacilo

ácido alcohol resistente (BAAR), lo que indica su superioridad sobre la SSS. Además, en los pacientes PB la sensibilidad de la PCR fue del 44%, mientras que en los pacientes MB fue del 78% (27). De la misma manera, Kamble RR (2010) evaluaron la extracción de ADN de *Mycobacterium leprae* de 46 muestras con resultados negativos para baciloscopia donde detectaron ADN de *Mycobacterium leprae* en 15 (32,6%) muestras. El ADN se aisló con éxito a partir de portaobjetos teñidos. Este estudio muestra que la extracción de ADN para la PCR se puede realizar a partir de portaobjetos de SSS teñidos con Ziehl-Neelsen. El método demostró ser útil en el diagnóstico de casos de lepra con frotis de piel con resultados negativos (32). Estos estudios refuerzan la importancia de la técnica molecular para detección del material genético, es especial para las muestras con diagnóstico clínico compatible con *Mycobacterium leprae* y diagnóstico negativo mediante baciloscopia.

Los resultados de las muestras procesadas mediante qPCR demostraron una alta concordancia en láminas con baciloscopia positivas confirmadas, demostrando alta sensibilidad, tal como demuestra Manta FSN y col. (2022) que describieron una prueba de qPCR para el diagnóstico de lepra. Para este ensayo evaluaron 97 muestras de pacientes con confirmación clínica e histopatológica de lepra, mostrando una alta sensibilidad (91%) y especificidad (100%) diagnósticas. Los resultados demostraron que la qPCR multiplex detecta de manera efectiva y específica el ADN de *Mycobacterium leprae* en muestras de raspado de piel (9).

Respecto a la calidad del ADN, un índice A260/280 menor a 1.7 revela la posible existencia de contaminación con proteínas, fenol u otros contaminantes (61). Mientras que valores altos del índice A260/280 revelan contaminación con moléculas

de RNA (62). Finalmente, valores entre 1.7 y 1.9 revelan la presencia de ADN con buen grado de pureza (63). En los resultados del presente estudio se evidenciaron que algunas muestras presentaron valores fuera de los límites esperados (1.7-1.9) para la relación 260/280; a pesar de ello, la mayoría de estas muestras fueron positivas por qPCR. Los valores hallados fuera del límite esperado podrían explicarse por los componentes de la coloración de Ziehl-Neelsen al que fueron sometidas previamente, sin embargo, los resultados no se vieron alterados, debido a la precisión en la detección del material genético.

Finalmente, referente a la cantidad de ADN que se obtuvo durante la cuantificación, 3 muestras con resultados por debajo de la concentración 1ng/mL, fueron positivas, amplificando en los últimos ciclos de detección (después del Ct 35), lo que demuestra que, pese a concentraciones bajas de ADN, estas fueron detectadas, demostrando que la qPCR es una técnica altamente sensible y permite amplificar con cantidades mínimas de ADN. Los resultados hallados son comparables con el estudio realizado por Singh V y col. en el 2020 donde recolectaron muestras de frotis de piel (9 casos MB, 16 casos PB, 22 contactos domésticos y 38 muestras de suelo ambiental). La cantidad de *Mycobacterium leprae* viable fue estimada mediante qRT-PCR utilizando el gen 16S rRNA. Se observó la presencia de bacilos viables de *Mycobacterium leprae* en 11 (44%) casos de lepra, 4 (18%) contactos domésticos y en 10 (53%) muestras de suelo (25).

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se logró extraer ADN de *Mycobacterium leprae* en 38/50 muestras por raspado de incisión cutánea fijada en láminas mediante extracción en columna de sílica gel.
- La extracción de ADN a partir de láminas fijadas permite obtener material genético de buena y baja calidad, los cuales no afectaron negativamente la amplificación mediante PCR en tiempo real.
- Las concentraciones de ADN extraídas a partir de muestras fijadas en láminas presentaron mediciones de amplio rango, desde una concentración mínima de 0.5 ng/mL hasta una concentración máxima de 67.2 ng/mL, respectivamente.
- Se obtuvo resultados de concordancia categórica entre la baciloscopia y PCR en tiempo real en 30/30 muestras positivas a baciloscopia y 8/20 muestras negativas a baciloscopia.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda complementar el uso de la técnica de qPCR para pacientes con diagnóstico clínicos de *Mycobacterium leprae* y baciloscopia negativa.
- Se recomienda ampliar la evaluación de extracción y amplificación a partir de láminas sin colorear para evaluar la calidad del ADN extraída
- Evaluar diferentes kits de extracción para ver el rendimiento diagnóstico.

REFERENCIAS

1. Directrices para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la lepra - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado 28 de agosto de 2022]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/guidelines-diagnosis-treatment-and-prevention-leprosy>
2. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clinics in Dermatology*. 1 de enero de 2015;33(1):26-37.
3. Steinmann P, Reed SG, Mirza F, Hollingsworth TD, Richardus JH. Innovative tools and approaches to end the transmission of *Mycobacterium leprae*. *The Lancet Infectious Diseases*. 1 de septiembre de 2017;17(9): e298-305.
4. Rodrigues LC, Lockwood DN. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *The Lancet Infectious Diseases*. 1 de junio de 2011;11(6):464-70.
5. Organización, Mundial de la Salud, Oficina Regional para el Sudeste Asiático. Hacia cero lepras. Estrategia mundial contra la lepra (enfermedad de Hansen) 2021–2030 [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/es/publications/i/item/9789290228509>
6. World Health Organization. Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives [Internet]. 2019. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/who-wer9536>
7. Neyra R J. Reflexiones acerca de la enfermedad de Hansen (Lepra). *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. marzo de 2005;22(1):81-2.
8. Suzuki K, Udono T, Fujisawa M, Tanigawa K, Idani G, Ishii N. Infection during infancy and long incubation period of leprosy suggested in a case of a chimpanzee used for medical research. *J Clin Microbiol*. septiembre de 2010;48(9):3432-4.
9. Manta FS de N, Jacomasso T, Rampazzo R de CP, Moreira SJM, Zahra NM, Cole ST, et al. Development and validation of a multiplex real-time qPCR assay using GMP-grade reagents for leprosy diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. febrero de 2022;16(2):e0009850.
10. Kumar B, Naafs B, Dogra S. Leprosy. *Lepr Rev*. marzo de 2007;78(1):5-6.
11. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*. 10 de abril de 2004;363(9416):1209-19.
12. Organización Mundial de la, Salud, Oficina Regional para Asia Sudoriental. Pautas para el diagnóstico, tratamiento y prevención de la lepra. 2017.
13. World Health Organization. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030 [Internet]. 2020. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>

14. Ministerio de Salud. Norma técnica de salud para la prevención, atención integral y control de la lepra en el Perú [Internet]. 2019. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/4810.pdf>
15. Mendez-Guerra C, Montenegro-Idrogo JJ, Resurrección-Delgado C, Quevedo-Ramírez A, Cornejo-Venegas G, Berrio-Martínez S, et al. Lepra: sospecha diagnóstica en área no endémica. Serie de casos y revisión de la literatura. *Acta Médica Peruana*. julio de 2020;37(3):346-51.
16. Osorio-Mejía C, Falconí-Rosadio E, Acosta J. Sistemas de interpretación, itinerarios y repertorios terapéuticos de pacientes con lepra en un país con baja prevalencia. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 8 de junio de 2020;37:25-31.
17. Ministerio de Salud. Perú mantiene el descenso de casos de lepra [Internet]. Disponible en: <https://www.gob.pe/institucion/minsa/noticias/39971-peru-mantiene-el-descenso-de-casos-de-lepra>
18. Mahajan VK. Slit-skin smear in leprosy: lest we forget it! *Indian J Lepr*. 2013;85(4):177-83.
19. Wang H, Liu W, Jin Y, Yu M, Jiang H, Tamura T, et al. Detection of antibodies to both *M. leprae* PGL-I and MMP-II to recognize leprosy patients at an early stage of disease progression. *Diagn Microbiol Infect Dis*. noviembre de 2015;83(3):274-7.
20. Duthie MS, Orcullo FM, Abbelana J, Maghanoy A, Balagon MF. Comparative evaluation of antibody detection tests to facilitate the diagnosis of multibacillary leprosy. *Appl Microbiol Biotechnol*. abril de 2016;100(7):3267-75.
21. Torres RT, Fachi MM, Böger B, Marson BM, Ferreira VL, Pontarolo R, et al. Sensitivity and specificity of multibacillary and paucibacillary leprosy laboratory tests: A systematic review and meta-analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. junio de 2021;100(2):115337.
22. Silva AR, Queiroz MFA, Ishikawa EAY, Silvestre M do PSA, Xavier MB. Evaluation of agreement between tests for the diagnosis of leprosy. *J Bras Patol Med Lab*. abril de 2017;53:100-7.
23. Ruiz-Fuentes JL, Diaz-Garcia A, Suárez Moreno O, Torres P, Acosta Soto L. Evaluación de diferentes muestras para la detección molecular de *Mycobacterium leprae* en Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. agosto de 2015;67(2):0-0.
24. Mohanty PS, Naaz F, Bansal AK, Kumar D, Sharma S, Arora M, et al. Molecular detection of *Mycobacterium leprae* using RLEP-PCR in post elimination era of leprosy. *Mol Biol Res Commun*. abril de 2020;9(1):17-22.
25. Singh V, Turankar RP, Goel A. Real-time PCR-based quantitation of viable *Mycobacterium leprae* strain from clinical samples and environmental sources and its genotype in multi-case leprosy families of India. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.

noviembre de 2020;39(11):2045-55.

26. Gama RS, Gomides TAR, Gama CFM, Moreira SJM, de Neves Manta FS, de Oliveira LBP, et al. High frequency of *M. leprae* DNA detection in asymptomatic household contacts. *BMC Infect Dis.* 2 de abril de 2018; 18(1):153.
27. Siwakoti S, Rai K, Bhattarai NR, Agarwal S, Khanal B. Evaluation of Polymerase Chain Reaction (PCR) with Slit Skin Smear Examination (SSS) to Confirm Clinical Diagnosis of Leprosy in Eastern Nepal. *PLoS Negl Trop Dis.* diciembre de 2016;10(12):e0005220.
28. Ruiz-Fuentes JL, Díaz A, Entenza AE, Frión Y, Suárez O, Torres P, et al. Comparison of four DNA extraction methods for the detection of *Mycobacterium leprae* from Ziehl-Neelsen-stained microscopic slides. *Int J Mycobacteriol.* Diciembre de 2015;4(4):284-9.
29. Reja AHH, Biswas N, Biswas S, Dasgupta S, Chowdhury IH, Banerjee S, et al. Fite-Faraco staining in combination with multiplex polymerase chain reaction: a new approach to leprosy diagnosis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2013;79(5):693-700.
30. Fontes ANB, Gomes HM, Araujo MI de, Albuquerque ECA de, Baptista IMFD, Moura MM da F, et al. 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.* diciembre de 2012;107 Suppl 1:143-9.
31. Banerjee S, Biswas N, Kanti Das N, Sil A, Ghosh P, Hasanoor Raja AH, et al. 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.* Diciembre de 2011;50(12):1522-7.
32. Kamble RR, Shinde VS. Extraction and detection of *Mycobacterium leprae* DNA from ZNCF-stained skin smear slides for better identification of negative skin smears.
33. Lastória JC, Abreu MAMM de. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *An Bras Dermatol.* abril de 2014;89(2):205-18.
34. Opromolla PA, Laurenti R. Hansen's disease control in the State of São Paulo: a historical analysis. *Rev Saúde Pública.* febrero de 2011; 45:195-203.
35. Clapasson A, Canata S. Microbiology of *Mycobacterium leprae*. En: Nunzi E, Massone C, Portaels F, editores. *Leprosy and Buruli Ulcer: A Practical Guide [Internet]*. Cham: Springer International Publishing; 2022. p. 13-7. Disponible en: https://doi.org/10.1007/978-3-030-89704-8_2
36. Gulia A, Fried I, Massone C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. *F1000 Med Rep.* 27 de abril de 2010; 2:30.
37. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy.

- An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas Dermosifiliogr.* septiembre de 2013;104(7):554-63.
38. Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Fujiwara Y, et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence.* 13(1):1985-2011.
 39. Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti VA, Rambukkana A. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 de agosto de 1999;96(17):9857-62.
 40. Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm Genome.* febrero de 2011;22(1-2):19-31.
 41. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Faber WR, van Beers SM, Klatser PR, et al. Population survey to determine risk factors for *Mycobacterium leprae* transmission and infection. *Int J Epidemiol.* diciembre de 2004;33(6):1329-36.
 42. Davey TF, Rees RJ. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr Rev.* junio de 1974;45(2):121-34.
 43. Ghorpade A. Ornamental tattoos and skin lesions. Tattoo inoculation borderline tuberculoid leprosy. *Int J Dermatol.* enero de 2009;48(1):11-3.
 44. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* septiembre de 1966;34(3):255-73.
 45. Hatta M, van Beers SM, Madjid B, Djumadi A, de Wit MY, Klatser PR. Distribution and persistence of *Mycobacterium leprae* nasal carriage among a population in which leprosy is endemic in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* agosto de 1995;89(4):381-5.
 46. Alberts, B, Johnson, A. *Molecular Biology of the Cell* (4a ed.). Nueva York, Londres: Garland Science Alberto Checa Rojas [Internet]. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/extraccion-de-adn-2/>
 47. Checa Rojas, A. Extracción de ADN. Conogasi, Conocimiento para la vida.
 48. J. Farfán BQM. *BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO.* Revista Médica Clínica Las Condes. 2015;26(6):788-93.
 49. Kramer MF, Coen DM. Enzymatic Amplification of DNA by PCR: Standard Procedures and Optimization. *Current Protocols in Molecular Biology.* 2001;56(1):15.1.1-15.1.14.
 50. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* junio de 2006;27(2-3):95-125.

51. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* octubre de 1996;6(10):986-94.
52. Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med.* junio de 2002;8(6):257-60.
53. INSN - San Borja. GUÍA DE PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE SARS-COV-2 (ENFERMEDAD POR CORONAVIRUS [COVID-19]) MEDIANTE TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN [Internet]. GP-051/INSN-SB/USDT/SUSD-PC. V 0.2; 2023. Disponible en: file:///C:/Users/manue/Downloads/GP-051-SARS%20COV%202.pdf
54. Rodríguez, A, Pérez, A. O. Métodos científicos de indagación y de construcción del conocimiento *Revista EAN.* EAN.
55. Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO, et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol.* julio de 2009;47(7):2124-30.
56. Hernández R, Mendoza CP. Metodología de la investigación. Las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta. McGraw-Hill Interamericana editores SA de CV; 2018.;
57. Arias JL, Covinos M. Diseño y metodología de la investigación. Primera edición digital. Perú: Enfoques consulting EIRL. Perú; 2021.
58. Manterola, C, Quiróz, G, Salazar, P, García, N. Metodología de los tipos y diseños de estudio más frecuentemente utilizados en investigación clínica. *Revista Médica Clínica Las Condes.* :30(1), 36-49.
59. Murto C, Ariza L, Alencar CH, Chichava OA, Oliveira AR, Kaplan C, et al. Migration among individuals with leprosy: a population-based study in Central Brazil. *Cad Saúde Pública.* marzo de 2014;30(3):487-501.
60. Beissner M, Woestemeier A, Saar M, Badziklou K, Maman I, Amedifou C, et al. Development of a combined RLEP/16S rRNA (RT) qPCR assay for the detection of viable *M. leprae* from nasal swab samples. *BMC Infect Dis.* 28 de agosto de 2019;19(1):753.
61. Gupta N. DNA Extraction and Polymerase Chain Reaction. *J Cytol.* 2019;36(2):116-7.
62. Russo A, Mayjonade B, Frei D, Potente G, Kellenberger RT, Frachon L, et al. Low-Input High-Molecular-Weight DNA Extraction for Long-Read Sequencing From Plants of Diverse Families. *Front Plant Sci.* 19 de mayo de 2022;13:883897.
63. Shaik AP, Alsaeed AH, Faiyaz-ul-Haque M, Alsaeed MA, Alyousef AA, Bammidi VK, et al. Vitamin D Receptor FokI, ApaI, and TaqI Polymorphisms in Lead Exposed Subjects From Saudi Arabia. *Front Genet.* 26 de abril de 2019;10:388.

ANEXOS

Anexo 1: Matriz de consistencia

EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS FIJADAS EN LÁMINAS PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE* LIMA, 2023

Formulación del problema	Objetivos de la investigación	Hipótesis	Variables	Diseño metodológico
Problema general	Objetivo General	Hipótesis general	1. Extracción Dimensiones <ul style="list-style-type: none"> • Cantidad de ADN • Calidad del ADN 2. Detección Dimensiones <ul style="list-style-type: none"> • ADN de <i>Mycobacterium leprae</i> 	Tipo de investigación Básica Método y diseño de la investigación Descriptivo y de corte transversal. Población .La población estará constituida por todas muestras (50 muestras) con baciloscopias positivas y negativas a <i>Mycobacterium leprae</i> por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas portaobjetos, y se encuentran almacenadas en la colección de muestras del LRNM del INS corresponde periodo 2019 – 2023
¿Se puede extraer ADN a partir de muestras fijadas en láminas para la detección de <i>Mycobacterium leprae</i> ?	Extraer ADN a partir de muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas para la detección de <i>Mycobacterium leprae</i>	Es posible la extracción de ADN de <i>Mycobacterium leprae</i> a partir de muestras por raspado de incisión cutánea fijadas en láminas.		

<p>Problemas secundarios:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ¿Cuál es el nivel de calidad de ADN extraídas a partir de muestras fijadas en láminas? - ¿Cuál es la cantidad de ADN que se podría extraer en muestra fijadas en láminas? - ¿Es posible realizar la detección mediante qPCR de ADN de <i>Mycobacterium leprae</i> extraído de muestras fijadas en lamina? 	<p>Objetivos específicos:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determinar el nivel de calidad de ADN extraídas a partir de muestras fijadas en láminas. - Medir la cantidad de ADN extraídas a partir de muestras fijadas en láminas. - Realizar la detección mediante qPCR de ADN de <i>Mycobacterium leprae</i> extraído de muestras fijadas en lamina 			<p>Muestra:</p> <p>Se utilizó un total de 50 muestras que representa toda la población demuestras por raspados de incisión cutáneos fijadas en láminas portaobjetos con diagnósticos de baciloscopias positivas y negativas para <i>Mycobacterium leprae</i></p>
--	--	--	--	---

Anexo 2: Instrumento de recolección de datos

Anexo 3: Validez del instrumento mediante Juicio de expertos

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO: JUICIO DE EXPERTOS

Teniendo como base los criterios que a continuación se presenta, solicito su opinión sobre el instrumento de la investigación titulada, “**EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS FIJADAS EN LAMINAS PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM LEPRAE EN LIMA, 2023**”, para lo cual se requiere que pueda calificar, marcando con un aspa (X) en la casilla correspondiente a su opinión respecto a cada criterio formulado.

Ítem N°	Criterio	SI	NO	Observación
1	La información permite dar respuesta al problema	X		
2	El instrumento propuesto responde a los objetivos del estudio	X		
3	El instrumento contiene a las variables de estudio	X		
4	La estructura del instrumento es adecuada	X		
5	El instrumento responde a la operacionalización de la variable	X		
6	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento	X		
7	Los ítems son claros en lenguaje entendible	X		
8	El número de ítems es adecuado para su aplicación	X		

Observaciones (precisar si hay suficiencia):

EL instrumento que se presenta permite recolectar la información necesaria para el desarrollo de la investigación.

Opinión de aplicabilidad:

Aplicable [X] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador: Dr. Enrique Walter Mamani Zapana

DNI: 02414092

Especialidad del validador: Maestría en Microbiología.

Fecha: 18 de agosto del 2023

Dr. Enrique W. Mamani Zapana
DAMyP.- FCB-UNMSM
Código RENACYT : P0002206 Nivel: V

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO: JUICIO DE EXPERTOS

Teniendo como base los criterios que a continuación se presenta, solicito su opinión sobre el instrumento de la investigación titulada, “**EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS FIJADAS EN LAMINAS PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM LEPRAE EN LIMA, 2023**”, para lo cual se requiere que pueda calificar, marcando con un aspa (X) en la casilla correspondiente a su opinión respecto a cada criterio formulado.

Ítem N°	Criterio	SI	NO	Observación
1	La información permite dar respuesta al problema	X		Ninguna
2	El instrumento propuesto responde a los objetivos del estudio	X		Ninguna
3	El instrumento contiene a las variables de estudio	X		Ninguna
4	La estructura del instrumento es adecuada	X		Ninguna
5	El instrumento responde a la operacionalización de la variable	X		Ninguna
6	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento	X		Ninguna
7	Los ítems son claros en lenguaje entendible	X		Ninguna
8	El número de ítems es adecuado para su aplicación	X		Ninguna

Observaciones (precisar si hay suficiencia): El instrumento elaborado presenta suficiencia para realizar la investigación.

Opinión de aplicabilidad: El instrumento mide apropiadamente las variables en estudio

Aplicable [X] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador: Mg. Elias David Santos Lázaro

DNI: 44645298

Especialidad del validador: Genética y Biología Molecular

Fecha: 26/09/2023



firma del Juez experto

VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO: JUICIO DE EXPERTOS

Teniendo como base los criterios que a continuación se presenta, solicito su opinión sobre el instrumento de la investigación titulada, **“EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE MUESTRAS FIJADAS EN LAMINAS PARA DETECCIÓN MOLECULAR DE MYCOBACTERIUM LEPRAE EN LIMA, 2023”**, para lo cual se requiere que pueda calificar, marcando con un aspa (X) en la casilla correspondiente a su opinión respecto a cada criterio formulado.

Ítem N°	Criterio	SI	NO	Observación
1	La información permite dar respuesta al problema	X		
2	El instrumento propuesto responde a los objetivos del estudio	X		
3	El instrumento contiene a las variables de estudio	X		
4	La estructura del instrumento es adecuada	X		
5	El instrumento responde a la operacionalización de la variable	X		
6	La secuencia presentada facilita el desarrollo del instrumento	X		
7	Los ítems son claros en lenguaje entendible	X		
8	El número de ítems es adecuado para su aplicación	X		

Observaciones (precisar si hay suficiencia):

Opinión de aplicabilidad:

Aplicable [X] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador Dra. Zully M. Puyén Guerra

DNI: 40852288

Especialidad del validador: Biólogo- Microbiólogo

Fecha: 31/01/2023

firma del Juez experto

Anexo 4: Constancia de aprobación de comité de ética



COMITÉ INSTITUCIONAL DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN

CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Lima, 08 de noviembre de 2023

Investigador(a)
Vidia Vitelia Cotrina Maccha
Exp. N°: 1043-2023

De mi consideración:

Es grato expresarle mi cordial saludo y a la vez informarle que el Comité Institucional de Ética para la investigación de la Universidad Privada Norbert Wiener (CIEI-UPNW) evaluó y **APROBÓ** los siguientes documentos:

- Protocolo titulado: "Extracción de ADN a partir de muestras fijadas en láminas para detección molecular de *Mycobacterium leprae* Lima, 2023" Versión 02 con fecha 21/10/2023.
- Formulario de Consentimiento Informado Versión 01 con fecha 06/10/2023.

El cual tiene como investigador principal al Sr(a) Vidia Vitelia Cotrina Maccha y a los investigadores colaboradores (no aplica)

La **APROBACIÓN** comprende el cumplimiento de las buenas prácticas éticas, el balance riesgo/beneficio, la calificación del equipo de investigación y la confidencialidad de los datos, entre otros.

El investigador deberá considerar los siguientes puntos detallados a continuación:

1. La vigencia de la aprobación es de **dos años** (24 meses) a partir de la emisión de este documento.
2. El **Informe de Avances** se presentará cada 6 meses, y el informe final una vez concluido el estudio.
3. **Toda enmienda o adenda** se deberá presentar al CIEI-UPNW y no podrá implementarse sin la debida aprobación.
4. Si aplica, la **Renovación** de aprobación del proyecto de investigación deberá iniciarse treinta (30) días antes de la fecha de vencimiento, con su respectivo informe de avance.

Es cuanto informo a usted para su conocimiento y fines pertinentes.

Atentamente,


Yenny Marisol Bellido Fuente
Presidenta del CIEI- UPNW



Anexo 5: Resolución de aprobación de la institución para la recolección de los datos

SECTOR SALUD

INSTITUTO NACIONAL DE SALUD



N° 148 -2024-DIIS/INS

RESOLUCIÓN DIRECTORAL

OPE/INS que aprueba la Sección Segunda del Reglamento de Organización y Funciones del Instituto Nacional de Salud y la Resolución Jefatural N° 031-2021-J-OPE/INS que aprueba la Directiva N° 057-INS/OGITT-V.01 "Directiva para la Gestión de Proyectos de Investigación Institucionales y Colaborativos en el Instituto Nacional de Salud";

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Autorizar la ejecución del proyecto de tesis titulado: "**Extracción de ADN a partir de muestras fijadas en láminas para detección molecular de *Mycobacterium leprae***" el mismo que se ejecutará en el Laboratorio de Referencia Nacional de Micobacterias de la Subdirección de Investigación y Laboratorios de Enfermedades Transmisibles del Centro Nacional de Salud Pública y de acuerdo al detalle del anexo adjunto, que forma parte integrante de la presente Resolución Directoral.

Artículo 2°.- La tesista, como investigadora principal debe cumplir con las disposiciones establecidas en la Directiva N° 057-INS/OGITT- V.01 "Directiva para la Gestión de Proyectos de Investigación Institucionales y Colaborativos en el Instituto Nacional de Salud" y con lo dispuesto por el Comité Institucional de Ética en Investigación.

Artículo 3°.- El Centro Nacional de Salud Pública, es responsable de las acciones de seguimiento y evaluación durante el desarrollo del protocolo de tesis, aprobado por la presente Resolución.

Artículo 4°.- Notificar la presente resolución al Centro Nacional de Salud Pública, al Comité Institucional de Ética en Investigación, a la tesista para conocimiento y acciones que corresponda efectuar en el marco de sus funciones y/o competencias.

Regístrese y comuníquese,



OT-043-23

Dra. LEDA YAMILEÉ HURTADO ROCA
Directora
Departamento de Investigación e Innovación en Salud
Instituto Nacional de Salud

Anexo 6. Procedimiento de extracción de ADN, cuantificación y amplificación por qPCR

Extracción de ADN



Cuantificación por espectrofotometría



Cuantificación por Qubit



Cargado de ADN



Amplificación por qPCR



Anexo 7. Informe del asesor de Turnitin

NOMBRE DEL TRABAJO

**Tesis Hansen. Vidia Cotrina Maccha 20.
06.24 v2.docx**

AUTOR

Vidia Cotrina

RECUENTO DE PALABRAS

13728 Words

RECUENTO DE CARACTERES

75288 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

78 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

2.5MB

FECHA DE ENTREGA

Jun 20, 2024 8:57 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

Jun 20, 2024 8:58 AM GMT-5

● 14% de similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 13% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 6% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Material citado
- Bloques de texto excluidos manualmente
- Material citado
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

● 14% de similitud general

Principales fuentes encontradas en las siguientes bases de datos:

- 13% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 9% Base de datos de trabajos entregados
- 6% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

FUENTES PRINCIPALES

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	actasdermo.org Internet	3%
2	repositorio.uwiener.edu.pe Internet	1%
3	coursehero.com Internet	1%
4	transparencia.gob.sv Internet	<1%
5	repositorio.cinvestav.mx Internet	<1%
6	CONACYT on 2017-11-11 Submitted works	<1%
7	Universidad Nacional Mayor de San Marcos on 2020-11-27 Submitted works	<1%
8	bdigital.unal.edu.co Internet	<1%