



**UNIVERSIDAD CES**

Un compromiso con la excelencia

**Primer reporte de *Mycobacterium lepromatosis* como causa de lepra en  
pacientes colombianos.**

**María Victoria Escobar Builes**

**Universidad CES**

**Facultad de Medicina**

**División de Salud Pública**

**Medellín**

**2021**



**UNIVERSIDAD CES**

Un compromiso con la excelencia

**Informe final trabajo de investigación**

**Primer reporte de *Mycobacterium lepromatosis* como causa de lepra en  
pacientes colombianos.**

**María Victoria Escobar Builes**

Estudiante cohorte 7

**Nora María Cardona Castro**

Asesora

Trabajo de investigación para optar por el título de

Magíster en Medicina Tropical

Universidad CES

Facultad de Medicina

División de Salud Pública

Medellín, noviembre de 2021

## Tabla de contenido

<b>RESUMEN</b> .....	6
<b>1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	8
1.1 Planteamiento del problema .....	8
1.2 Justificación .....	9
1.3 Pregunta de investigación.....	10
<b>2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL</b> .....	11
2.1 Conceptos generales .....	11
2.2 Definición .....	11
2.3 Presentación clínica .....	11
2.4 Agente etiológico .....	12
2.5 Transmisión .....	13
2.6 Epidemiología .....	14
2.7 Clasificación de la enfermedad .....	14
2.8 Clasificación de la discapacidad .....	15
2.9 Reacciones lepromatosas.....	15
2.10 Diagnóstico de la enfermedad .....	16
2.11 Tratamiento.....	17
2.12 <i>M. lepromatosis</i> como agente etiológico de lepra.....	18
2.13 Factores socioeconómicos.....	19
2.14 Presentaciones clínicas asociadas a <i>M. lepromatosis</i> .....	20
2.15 Formas graves de la enfermedad .....	20
2.16 Métodos moleculares de detección de <i>M. lepromatosis</i> y <i>M. leprae</i>	21
2.17 Marco normativo .....	22
<b>3. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	25
4.1 Objetivo General .....	25

4.2	Objetivos específicos .....	25
<b>5.</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>26</b>
5.1	Enfoque metodológico de la investigación .....	26
5.2	Tipo de estudio .....	26
5.3	Población .....	26
5.3.1	Población de estudio .....	26
5.3.2	Muestra.....	26
5.3.3	Muestreo.....	26
5.3.4	Criterios de inclusión .....	27
5.3.5	Criterios de exclusión .....	27
5.4	Variables.....	27
5.4.1	Tabla de variables .....	28
5.4.2	Diagrama de variables.....	29
5.5	Recolección de información .....	29
5.5.1	Fuentes de información .....	29
5.5.2	Técnicas de recolección de información.....	29
5.5.3	Instrumentos de recolección de información .....	29
5.5.4	Procedimientos de recolección de información .....	30
5.6	Control de errores y sesgos .....	35
5.6.1	Sesgo de información .....	35
5.6.2	Sesgo de memoria.....	36
5.6.3	Sesgo de respuestas ausentes.....	36
5.6.4	Sesgo de análisis de la información .....	36
5.7	Técnicas de procesamiento y análisis de datos.....	36
5.7.1	Técnicas de procesamiento .....	36
5.7.2	Análisis de los datos .....	37
<b>6.</b>	<b>ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>37</b>

<b>7. RESULTADOS</b> .....	38
7.1 Características poblacionales, geográficas y clínicas .....	38
7.2 Detección de <i>Mycobacterium lepromatosis</i> en las muestras biológicas de los pacientes con lepra.....	38
7.3 Descripción de los pacientes con lepra coinfectados con <i>Mycobacterium lepromatosis</i> .....	40
<b>8. DISCUSIÓN</b> .....	42
<b>9. LIMITACIONES</b> .....	45
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	46
<b>REFERENCIAS</b> .....	47
<b>ANEXOS</b> .....	55
Anexo 1. Curva de amplificación de qPCR .....	55
Anexo 2. Curva estándar de qPCR .....	56
Anexo 3. Curva multicomponente de qPCR.....	57
Anexo 4. Curva de datos crudos de qPCR.....	58

## RESUMEN

### Introducción

La enfermedad de Hansen o lepra es una enfermedad crónica granulomatosa considerada por la Organización Mundial de la Salud como una enfermedad infecciosa desatendida. El agente etiológico tradicionalmente conocido de la enfermedad es *Mycobacterium lepra*, sin embargo, desde el año 2008 se ha identificado un nuevo agente etiológico, *Mycobacterium lepromatosis*. Este estudio intenta determinar la presencia de *M. lepromatosis* en muestras biológicas de pacientes Colombianos.

### Métodos

Mediante el uso de qPCR se analizaron muestras biológicas de pacientes colombianos con lepra multibacilar con el fin de detectar elementos repetitivos específicos para *M. leprae* (RLEP) y *M. lepromatosis* (RLPR). Las muestras fueron tomadas por el grupo de investigación en lepra del Instituto Colombiano de Medicina Tropical y la Universidad CES entre 2006 y 2016, y fueron analizadas en el National Hansen's Disease Program Laboratory Research Branch de la Universidad del Estado de Louisiana (Baton Rouge, EE. UU.)

### Resultados

Se analizaron 67 biopsias de piel y 25 muestras de líquido intersticial para un total de 92 muestras biológicas. De estas, 5 fueron positivas para *M. lepromatosis* en coinfección con *M. leprae*, 83 fueron positivas exclusivamente para *M. leprae* y 4 fueron negativas para ambas bacterias. Los pacientes en coinfección con *M. lepromatosis* tenían una mediana de edad de 48,1 años con un rango etario entre 20 y 62 años y se encontraban distribuidos en Santander, Atlántico y Cochó. Clínicamente todos tenían lepra MB según la clasificación de la OMS. Según Ridley-Jopling 4 fueron LL y uno fue BL.

### Conclusiones

Este estudio es el primero en demostrar la presencia de *M. lepromatosis* en pacientes con lepra multibacilar en zonas endémicas de enfermedad en

Colombia. Se hace fundamental continuar la vigilancia epidemiológica y profundizar el conocimiento del comportamiento de esta micobacteria en el país.

Palabras clave

Leprosia, Enfermedad de Hansen, *Mycobacterium lepromatosis*, *Mycobacterium leprae*, Multibacilar.

# 1. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

## 1.1 Planteamiento del problema

La enfermedad de Hansen o lepra es una enfermedad crónica granulomatosa causada por la bacteria *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Esta micobacteria se identificó como agente causal de la enfermedad en 1873 y se caracteriza por teñirse positivamente con carbol fucsina (Ziehl-Neelsen) ácido-alcohol resistente y al Gram. Sin embargo, debido a la presencia de abundantes gránulos citoplasmáticos que poseen una resistencia mayor a la tinción por los colorantes, estas tinciones no se logran fácilmente.(1–3)

*M. leprae* es un microorganismo intracelular obligado, con tropismo por macrófagos y células de Schwann. La infección por esta micobacteria afecta las células del sistema reticuloendotelial y del sistema nervioso periférico, y con frecuencia, puede causar daños irreversibles incluyendo discapacidad física si no se diagnostica y trata de manera oportuna.(3–5) Más aún, el mecanismo de transmisión de la enfermedad no ha sido aún del todo demostrado. Las hipótesis más aceptadas son el contagio a través de fluidos corporales de la nariz y boca de personas con la enfermedad, y se conoce también que los armadillos de nueve bandas son reservorios importantes de esta enfermedad.(6,7)

Esta enfermedad infecciosa desatendida (EID), como es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), afecta principalmente a poblaciones viviendo en condiciones de hacinamiento, desnutrición o que tienen algún tipo de susceptibilidad inmunológica.(8–10) Cifras oficiales de la OMS, reportan que a nivel mundial la prevalencia de lepra corresponde a 22,9 casos por millón de habitantes. Para el año 2019 se registraron alrededor de 203.000 nuevos casos de lepra, de estos, más de un 5% con discapacidad grado 2, y siendo casi un 8% niños menores de 14 años.(11) En Colombia para este mismo año se registraron 343 casos nuevos, cerca de un 24% con discapacidad grado 1 y un poco más del 9% con discapacidad grado 2. Así mismo, el 71% de los nuevos casos se reportaron como formas multibacilares.(12)

En la actualidad, los avances en las técnicas de biología molecular han permitido la secuenciación completa del genoma de *M. leprae*, de igual manera que han logrado identificar otro microorganismo genéticamente similar, *Mycobacterium*

*lepromatosis (M. lepromatosis).*(13) En un principio la semejanza entre los genomas de *M. leprae* y *M. lepromatosis* llevó a pensar que este último era una cepa de *M. leprae*. Sin embargo, se descubrieron importantes diferencias genéticas entre ambos organismos fundamentando el reconociendo de *M. lepromatosis* como una nueva especie.(14,15)

Este nuevo agente etiológico fue detectado por primera vez en Estados Unidos en 2008 en dos pacientes de ascendencia mexicana que padecían Lepra lepromatosa difusa (LLD).(15) Seguido a este reporte, su presencia se ha demostrado también en Singapur, Canadá, India, y Malasia.(16–19) Conjuntamente, *M. lepromatosis* ha sido asociado a formas severas de la enfermedad y a episodios reaccionales de lepra como es el fenómeno de Lucio o eritema necrosante (20,21). En Latinoamérica, otros países como Costa Rica también han reportado la incidencia de *M. lepromatosis*.(22) Igualmente, en Paraguay se reportó recientemente un caso de infección mixta, en un paciente con reacción lepromatosa tipo 2.(23)

En Colombia, al momento de la realización de este estudio, aún no se ha logrado identificar exitosamente la presencia de *M. lepromatosis*.(24,25) No obstante, la alta incidencia de enfermedad multibacilar reportada en el país por el Instituto Nacional de Salud (INS), podría indicar que esta especie es un importante agente causal de enfermedad.(12) Se hace necesario reconocer la presencia de *M. lepromatosis* en nuestro medio por las posibles repercusiones clínicas, demográficas e investigativas que podrían tener su identificación.

## **1.2 Justificación**

La lepra es una enfermedad conocida por la humanidad desde hace milenios. Ha sido documentada por diferentes culturas, y a pesar de ser tan antigua, sigue siendo estigmatizante y presentando importantes cuadros de infección grave principalmente en poblaciones vulnerables(26). En las últimas décadas, avances en la biología molecular y el advenimiento de nuevas tecnologías han permitido redescubrir la lepra y sus agentes causales. Aun así, al día de hoy persisten muchos retos diagnósticos y clínicos por determinar (27).

Investigaciones recientes ya han ayudado a aclarar la localización geográfica de *M. lepromatosis* en América y en Asia(18). A pesar de que en Colombia no se ha

logrado registrar la presencia de esta micobacteria como agente causal de enfermedad, la alta incidencia de formas multibacilares sugieren la presencia de este microorganismo en la población(12,24,25).

Por lo tanto, realizar la identificación de *M. lepromatosis* en Colombia podrá conducir a una mejor comprensión de algunos aspectos de la enfermedad desde el punto de vista clínico e investigativo. Por ejemplo, servirá para tener un mejor entendimiento de su epidemiología y así plantear estrategias de salud pública encaminadas a disminuir su incidencia. Asimismo, motivará el diseño de nuevas técnicas diagnósticas en diferenciación etiológica, permitiendo una caracterización más detallada de la población afectada. Por último, con este trabajo se genera nuevo conocimiento e información sobre la presencia de la micobacteria en el país, contribuyendo así a determinar su localización en el continente americano.

El Instituto Colombiano de Medicina Tropical (ICMT) cuenta con un biobanco de muestras de pacientes con lepra. De estos especímenes, el grupo de investigación en Medicina Tropical del instituto en conjunto con la Universidad CES (Medellín, Colombia), identificaron las muestras de pacientes relacionadas con formas multibacilares y las enviaron a procesar al National Hansen's Disease Program (NHDP) Laboratory Research Branch de la Universidad del Estado de Louisiana (Baton Rouge, EE. UU.).

### **1.3 Pregunta de investigación**

¿Es *M. lepromatosis* agente etiológico de lepra en pacientes colombianos?

## **2. MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL**

### **2.1 Conceptos generales**

Los primeros registros de casos de lepra datan del año 600 a.C en la India y del año 200 d.C en China y Japón. Sin embargo, las primeras evidencias científicas de lepra provienen de un esqueleto egipcio y de dos momias coptas del siglo II a.C y del siglo V d.C. No obstante, solo fue hasta 1873 cuando el primer microorganismo responsable de la lepra fue reconocido por el noruego Gerhard Hansen.(28)

Algunas teorías indican que la lepra fue llevada desde la India a la cuenca Mediterránea por las tropas de Alejandro magno entre 327 y 326 a.C. Esta enfermedad posteriormente se extendió por los Imperios griego y romano para finalmente llegar a Latinoamérica en la época colonial.(29,30) En la actualidad, por medio de técnicas genómicas, se ha demostrado que todos los casos existentes de lepra son atribuibles al mismo clon, y que la enfermedad parece haberse originado en África oriental o en Oriente próximo.(28)

### **2.2 Definición**

La lepra es una enfermedad crónica granulomatosa ocasionada por micobacterias no cultivables, y tiene un periodo de incubación aproximado entre 3 y 5 años.(15,31) Esta infección afecta principalmente el sistema nervioso periférico donde presenta tropismo por células de Schwann, logrando permanecer por largo tiempo sin estimular el sistema inmune (sitio de protección inmunológica).(11) Igualmente pueden invadir las células del sistema reticuloendotelial donde tienen mayor afinidad por macrófagos.(3)

### **2.3 Presentación clínica**

Las manifestaciones de la lepra dependen de la respuesta inmune del hospedero. Estas pueden darse en cualquier órgano o sistema, sin embargo, es más frecuente encontrarlas en piel, sistema nervioso periférico o mucosas.(32,33)

Posterior a la entrada del bacilo, la respuesta inmune innata mediante una reacción local inflamatoria podría eliminar el bacilo evitando la enfermedad. Pero si esto no ocurre, entonces la respuesta inmune adaptativa es activada, y el

bacilo puede multiplicarse dentro de los macrófagos e ingresar a través de ellos al torrente linfático y sanguíneo, posteriormente ingresando a los órganos a través del sistema fagocito mononuclear.(33)

Los pacientes susceptibles a la enfermedad pero que tienen una respuesta inmune adecuada presentan manifestaciones clínicas leves y de mejor pronóstico como es el caso de la lepra tipo tuberculoide. Este tipo de lepra se caracteriza por ser paucibacilar (PB) y tener menor transmisibilidad debido a una mayor capacidad del sistema inmune para depurar el microorganismo.(34)

Por otro lado, están los hospederos que tienen una respuesta inmune de menor efectividad que desarrollan la forma invasora grave y de mal pronóstico, llamada Lepra lepromatosa. Este otro tipo de lepra se caracteriza por ser multibacilar (MB), por lo tanto, al tener mayor carga bacteriana son fuente importante de transmisión. Entre estos dos polos se encuentran los pacientes con respuesta inmune intermedia o inestable quienes desarrollan enfermedad de tipo indeterminado, dimorfo o borderline.(34)

Es así como los pacientes con lepra pueden experimentar gran variedad de presentaciones clínicas. Desde máculas hipocrómicas hipoestésicas de resolución espontánea en cualquier parte del cuerpo, hasta cuadros más severos con pápulas y nódulos confluentes con marcada infiltración de la piel, que al presentarse en la cara dan lugar a las denominadas facies leoninas.(35,36) En las extremidades estas lesiones son generalmente bilaterales, teniendo una mayor afectación nerviosa e incapacidad, y siendo características del polo lepromatoso.(3)

## **2.4 Agente etiológico**

El genoma de *M. leprae* consta de 1.600 genes, con reducción evolutiva. Este está constituido por 3.268.203 pares de bases (pb) y muestra pseudogenes no funcionales. El origen molecular de esta micobacteria es motivo de controversia, pero se han logrado identificar cuatro tipos. El tipo 1 es relacionado con migraciones asiáticas, el tipo 2 como procedente de África, el tipo 3 asociado con la colonización española, y finalmente, el tipo 4 con el tráfico de esclavos.(37)

El bacilo tiene preferencia por sitios del cuerpo con temperaturas bajas, entre 27 y 30°C, como la piel, la mucosa nasal y los nervios periféricos, principalmente los superficiales.(3) Su estructura, específicamente la pared y la cápsula le

confieren ciertas propiedades que explican su selectividad a nichos ecológicos muy limitados(38). Este microorganismo ha sido aislado de los cojinetes pedios del armadillo de nueve bandas, en la ardilla de cola roja de las islas británicas, en chimpancés y mangabey hollín en África, y en los macacos cynomolgus en Asia (39,40).

Por muchos años se pensó que *M. leprae* era el único agente etiológico de la lepra. Sin embargo, en 2008 se pudo establecer a *M. lepromatosis* como un agente etiológico diferenciado a pesar de que comparte características similares con *M. leprae*.(27) Esta diferenciación como nuevo agente etiológico de enfermedad se logró mediante la secuenciación completa del genoma de *M. lepromatosis*, que reveló que este tenía una diferencia genómica del 9% con respecto a *M. leprae*.(14,41,42)

Otro estudio molecular permitió dilucidar la presencia del gen HemN en *M. lepromatosis*, secuencia faltante en *M. leprae*, ahondado así las diferencias entre estos.(34) Se considera entonces que este locus genómico es específico de *M. lepromatosis*, proporcionando una nueva perspectiva en el contexto de la historia evolutiva de ambas. La falta de HemN en *M. leprae* puede explicar algunas de las variaciones en la virulencia entre ambas micobacterias.(43)

## **2.5 Transmisión**

Los seres humanos son el principal reservorio natural del *M. leprae*, aunque pueden existir reservorios en otros animales. Si bien el mecanismo de transmisión de la enfermedad no ha sido aún del todo demostrado, se considera la transmisión a través de fluidos corporales de nariz y boca como la hipótesis más aceptada. Los armadillos de nueve bandas también representan una fuente importante de infección para los seres humanos.(6,7,44–46).

La fuente de infección principal en los humanos son las personas que cursan con lepra MB sin diagnosticar o de reciente diagnóstico. Dichas personas al ser portadores de una alta cantidad de bacterias en su piel y mucosas, pueden arrojar grandes cantidades de bacilos por sus fosas nasales, un promedio de  $10^7$  micobacterias viables por día.(47) Vale la pena aclarar que la lepra no es hereditaria ni congénita, y que tampoco existe la trasmisión transplacentaria.(48)

## **2.6 Epidemiología**

A nivel mundial más de 200.000 nuevos casos de lepra se diagnostican anualmente, siendo casi el 9% de estos niños y adolescentes.(49) Cifras oficiales de la OMS, reportan que la prevalencia global de lepra corresponde a 22,9 casos por millón de habitantes.(11) Esta enfermedad se distribuye por todo el mundo, no obstante, los países que aportan el 80% de todos los casos son India, Indonesia y Brasil.(50)

En Latinoamérica y el Caribe, entre 2011 y 2017, el número de nuevos casos descendió en un 20%.(51) Más allá de esta cifra, habría que detallar a profundidad esta aparente mejoría. Por ejemplo, la implementación de programas para el tratamiento y detección de pacientes en la región lograron reducir la carga de la enfermedad, pero en algunos países persisten conglomerados de casos sin tratamiento y población no diagnosticada por los programas de control.(52)

En Colombia, la lepra es considerada una enfermedad de notificación obligatoria y datos del INS para el 2019 reportan las siguientes cifras. Un total de 343 casos nuevos, siendo identificados un 24% de estos como con discapacidad grado 1 y en un poco más del 9% como grado 2. Así mismo, el 71% de los nuevos casos se reportaron como formas multibacilares y las entidades territoriales con una mayor tasa de nuevos casos reportados fueron Huila, Cesar y Arauca.(12) No se reportaron muertes en este informe.

## **2.7 Clasificación de la enfermedad**

La clasificación clínica más utilizada es la de Ridley-Jopling. Esta clasificación se basa en el estado clínico, histológico, bacteriológico e inmunológico del paciente. Se divide la enfermedad en 2 polos y un estadio intermedio de la siguiente manera, lepra lepromatosa (LL), lepra tuberculoide (LT) y lepra dimorfa (borderline). Los casos dimorfos se clasifican según se acerquen al polo Lepromatoso (L) o Tuberculoide (T) antecedidos por la palabra borderline (BL, BT y BB).(53)

Existe un grupo de casos indeterminados que se consideran etapa inicial de la enfermedad.(53,54) Posteriormente todos los casos dimorfos o indeterminados avanzan hacia uno de los polos, principalmente a LL. La LL a su vez se divide

en lepra lepromatosa difusa (LLD) y lepra lepromatosa nodular (LLN), ambas consideradas formas severas de la enfermedad.(3) Algunos países como la India adicionan una clasificación más, que incluye la lepra neural pura (LNP) clasificada como un tipo de lepra que solo tiene manifestaciones neurológicas, sin evidencia actual o antigua de lesiones en piel (55).

Existe otra clasificación propuesta por la OMS que divide la lepra dependiendo del número de lesiones que presenta el individuo. Cuando se presentan más de 5 lesiones en piel, o más de un nervio afectado, o el frotis de piel es positivo se clasifica como MB. El diagnóstico será PB cuando el paciente presenta menos de 5 lesiones en piel.(56) La lepra MB agrupa las formas LL, BL y BB, y la lepra PB las formas LT y BT de la clasificación de Ridley y Jopling.(57)

## **2.8 Clasificación de la discapacidad**

La clasificación de la discapacidad de la lepra según la OMS se basa en la valoración de manos y pies, y adicionalmente evalúa la agudeza visual.(58)

De acuerdo con los hallazgos en manos y pies se clasifica el paciente de la siguiente manera. Cuando no hay anestesia, ni deformidad, ni lesión visible en manos o pies, grado 0. Cuando hay anestesia de manos y/o pies, pero no hay deformidad ni lesión visible, grado 1. Cuando hay deformidad o lesión visible, grado 2.(58)

De acuerdo con el compromiso ocular clasifica la discapacidad de la siguiente manera. Cuando no hay problemas oculares causados por la lepra, ni indicios de pérdida visual, grado 0. Cuando hay problemas oculares causados por la lepra, por ejemplo, conjuntivitis o visión borrosa, grado 1. Cuando hay pérdida grave de la visión, lagofthalmos, iritis, queratitis, o catarata, grado 2.(58)

## **2.9 Reacciones lepromatosas**

Durante el curso crónico de la enfermedad los pacientes pueden cursar con reagudizaciones de síntomas y signos llamadas reacciones lepromatosas. Estas reacciones afectan entre el 30 y el 50% de los pacientes y pueden dejar como secuela el daño permanente de uno o varios nervios, y en ocasiones pueden causar la muerte del paciente.(19,59) Las reacciones pueden manifestarse antes, durante o después de haber recibido el tratamiento completo para lepra y

son desencadenadas por condiciones que desequilibren el estado inmunológico del paciente como infecciones recurrentes, estrés, anemia, o incluso presentarse de forma espontánea.(60)

Las reacciones lepromatosas se dividen en dos tipos. Reacción lepromatosa tipo 1 (LR1), o reacciones inversas, se caracterizan por presentar edema agudo asociado al aumento del eritema, con calor e inflamación dolorosa de placas o nódulos preexistentes, además de hinchazón aguda e hipersensibilidad de nervios periféricos pudiendo generar abscesos y necrosis de los nervios. La reacción lepromatosa tipo 2 (RL2), o Eritema Nodoso Leproso (ENL), se caracteriza por la aparición aguda de nuevos nódulos subcutáneos dolorosos y eritematosos con una respuesta inflamatoria sistémica acompañante. Este tipo de reacción puede manifestarse con características similares a las del shock séptico y, en los casos graves, poner en peligro la vida del paciente.(61)

El fenómeno de Lucio, o eritema necrosante, es otro tipo de reacción menos común, pero potencialmente mortal. Se presenta principalmente en personas LL no tratada, y se caracteriza por un marcado compromiso sistémico y presencia de vasculitis necrosante provocada por invasión endotelial de la micobacteria.(61) Este fenómeno ha sido asociado a infección por *M. lepromatosis* y es más frecuente en pacientes de ascendencia mexicana. Aun así, se han descrito casos en Brasil, Argentina, India, Malasia y Aruba.(19–21)

## **2.10 Diagnóstico de la enfermedad**

Para la OMS el diagnóstico clínico de la lepra debe hacerse teniendo en cuenta tres signos cardinales para definir al paciente como caso de lepra. Máculas hipopigmentadas o levemente eritematosas con pérdida de sensibilidad, nervios periféricos engrosados, y bacilos ácido alcohol resistentes en baciloscopia o biopsia de piel. Cualquiera de estos signos hace el diagnóstico clínico y cuando los tres signos son positivos, la sensibilidad es hasta de un 97%.(62)

El engrosamiento de los nervios generalmente aparece después de las lesiones en piel y suele ser más importante en los casos multibacilares.(54) La baciloscopia tiene una especificidad del 100 % y una sensibilidad del 50%.(3) Las muestras se obtienen del lóbulo de la oreja, lesiones en piel o de la mucosa nasal, y se utiliza la tinción de Ziehl-Nielsen para la visualización de la

micobacteria. El resultado se interpreta mediante la escala de Ridley o índice bacteriológico.(63–65)

Por otro lado, la biopsia de piel es un procedimiento esencial en el estudio del paciente. A través de la biopsia se confirma definitivamente la sospecha clínica y además ayuda a clasificar la enfermedad, a evaluar la respuesta al tratamiento, y establece diagnósticos diferenciales en las lesiones sospechosas.(66) La histología de los casos de pacientes que tienden a la polaridad lepromatosa, revela infiltrados inflamatorios con células de Virchow repletas de bacilos. En el polo tuberculoide, como no se espera encontrar bacilos, se buscan granulomas tuberculoideos con células epitelioides, células gigantes de Langerhans, infiltrado linfocitario, y afectación neural. (67)

En Colombia, adoptando la clasificación operativa de la OMS, con los resultados de la baciloscopia inicial los casos pueden ser clasificados como PB o MB. Esta clasificación operativa permite orientar adecuadamente el tratamiento y dar un diagnóstico inicial de la enfermedad.(68) Adicionalmente la preparación de cortes teñidos se realiza con hematoxilina eosina y coloración de Ziehl-Neelsen (Fite-Faraco). La biopsia de piel se realiza obligatoriamente en todos los casos sospechosos con baciloscopia negativa, siendo opcional si la baciloscopia es positiva.(69)

En la actualidad existen algunas pruebas serológicas que no se emplean para el diagnóstico de rutina de la enfermedad pero que son útiles para detectar una posible infección por *M. leprae* en individuos convivientes con pacientes diagnosticados con lepra.(6,70–72)

## **2.11 Tratamiento**

La OMS ha establecido como su objetivo garantizar que el tratamiento de la lepra sea gratis y se encuentre disponible en todos los centros de salud, particularmente en zonas endémicas. Este tratamiento consta de 3 medicamentos, la rifampicina, la clofazimina y la dapsona.(57,73,74)

Los esquemas de tratamiento dependen del tipo de lepra que haya sido identificada. Para los pacientes PB el tratamiento es por 6 meses y se constituye de una dosis supervisada de 600mg de rifampicina al mes y una dosis auto administrada de 100mg de dapsona al día. Para los pacientes MB el tratamiento es por 12 meses y se constituye de una dosis supervisada de 600mg de

rifampicina y una de 300mg de clofazimina al mes, seguido de una dosis auto administrada de 100mg de dapsona y de 50 mg de clofazimina al día (75).

## **2.12 *M. lepromatosis* como agente etiológico de lepra**

*M. lepromatosis* fue identificado por primera vez en 2008 en Arizona (EE. UU.) de biopsias recolectadas de tejido hepático y de lesiones activas de dos individuos de ascendencia mexicana que residían en esta ciudad.(15) En un principio la semejanza entre los genomas de *M. leprae* y *M. lepromatosis* llevó a pensar que este último era una cepa de *M. leprae*. Sin embargo, se descubrieron importantes diferencias genéticas entre ambos, incluida una divergencia del 2,1% del gen del ARN ribosómico (ARNr) 16S, un marcador de evolución bacteriana altamente conservado, y una discordancia del 6% al 14% entre 5 genes menos conservados. Análisis filogenéticos de los genes de ARNr 16S, rpoB y hsp65 indicaron que los dos organismos evolucionaron a partir de un ancestro común.(15). Estos resultados fundamentaron el reconociendo de *M. lepromatosis* como una nueva especie, pudiendo explicar en parte la variabilidad clínica y geográfica de la lepra.(14,15)

En el 2011 se reportó el primer caso de *M. lepromatosis* en México. Análisis de la secuencia de tres genes hsp65, rrs y sigA de una paciente del noreste del país confirmaron la identificación de esta micobacteria como agente etiológico de enfermedad.(76)

En el año 2012 en Singapur, investigadores analizaron biopsias almacenadas de dos pacientes de cuya causa de muerte había sido lepra. Este estudio reportó la presencia de coinfección por *M. leprae* y *M. lepromatosis*, esta última con un 99,9% de coincidencia con la cepa mexicana conocida. Este hallazgo permitió corroborar la presencia del microorganismo más allá del continente americano, al igual que sirvió para demostrar la utilidad de las muestras almacenadas en la identificación de estos, y la presencia de ambas micobacterias en un mismo individuo.(16)

En México en 2012, se realizó el estudio más grande en búsqueda de este agente etiológico de lepra utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que emplea cebadores para Gen 16S ARNr. Se incluyeron 120 muestras de pacientes con varias formas clínicas de lepra. El 63,2% presentaron *M. lepromatosis* aislada, el 16% eran infecciones mixtas con *M.*

*leprae*. Una de las conclusiones más importantes es probablemente que *M. lepromatosis* sea el agente causal de lepra más frecuente en México.(13).

En 2014 un estudio extendió la investigación sobre *M. lepromatosis* a otros países como Brasil, Malasia, Myanmar y Uganda confirmando la presencia del microorganismo en otros continentes. En Brasil *M. lepromatosis* causó o contribuyó al 21,7% de las infecciones de los pacientes con especie confirmada por PCR y en Myanmar el 25%. Malasia y Uganda no reportaron muestras positivas.(18)

### **2.13 Factores socioeconómicos**

Un estudio indica que *M. lepromatosis* llegó a América con poblaciones humanas migrantes desde Asia a través del estrecho de Bering. Este mismo estudio también estableció que *M. leprae* llegó a América con los colonos y como resultado del tráfico de esclavos.(77)

En 2013, otra investigación realizada en Cuba determinó que la lepra afecta a cualquier raza, con igual incidencia en ambos sexos durante la niñez, pero con un predominio en varones a partir de la adolescencia. Su frecuencia de transmisión es 5 a 8 veces mayor dentro del núcleo familiar y se presenta mayormente en áreas susceptibles como son las poblaciones que viven bajo condiciones de hambre, hacinamiento e insalubridad.(78)

El estudio realizado en México en 2012 determinó que *M. lepromatosis* era más frecuente, relación 7:1, en el estado de Sonora. Los casos con infección mixta se encontraron en Sinaloa, Nayarit, Colima, Michoacán y Guerrero.(13)

En Colombia, datos publicados por el INS revelan que para el 2019 la enfermedad de Hansen fue más frecuente en hombres con el 62%, siendo el grupo de mayor porcentaje el de 65 años y más con un 22,4% y pertenecientes a cabeceras municipales en un 73,3%. Con relación a la pertenencia étnica se notificaron 4 indígenas y el 4,5% de los casos era afrocolombiano.(12) Estos datos señalan que la población económicamente activa es la más afectada generando un gran impacto social y económico.(68)

## **2.14 Presentaciones clínicas asociadas a *M. lepromatosis***

Del estudio realizado en México en el 2012 se puede concluir que todos los pacientes que cursaron con infección aislada o conjunta por *M. lepromatosis* presentaron cuadros de LLD de acuerdo con la clasificación de Ridley y Jopling. Específicamente se encontró que de los 55 casos con *M. lepromatosis* como único agente, 34 presentaron LL, 13 desarrollaron LLD, y los 8 restantes otras formas de lepra no especificadas. Los 14 pacientes con coinfección por ambas micobacterias presentaron diversas formas clínicas de la enfermedad y de los 18 con infección aislada por *M. leprae* ninguno manifestó LLD.(13) Otro estudio de 2015 en este mismo país analizó 38 muestras de pacientes con lepra reportando 5 casos de infección por *M. lepromatosis*, de estos últimos, 3 manifestaron LLD, 1 LLN y 1 BL.(79)

En contraste a estos hallazgos, el estudio realizado en 2014 en Brasil, Malasia, Myanmar y Uganda revela un comportamiento distinto de las manifestaciones clínicas de la infección por *M. lepromatosis*. En Brasil los pacientes positivos para *M. lepromatosis* como agente único presentaron LT y los que tenían coinfección por ambas micobacterias LL. En Myanmar manifestaron LL y los otros dos países no reportaron casos positivos.(18)

## **2.15 Formas graves de la enfermedad**

Los casos de infección o coinfección por *M. lepromatosis* han reportado tasas de morbilidad y mortalidad más altos que los de *M. leprae*.(76). Aún más, los pacientes de los estudios que han reportado la presencia de *M. lepromatosis* tienen en común que la mayoría de estos presentaron formas graves de la enfermedad. En los dos primeros casos reportados en pacientes de ascendencia mexicana en 2008 los pacientes tenían LLD.(15) Así mismo, en Singapur en el 2012 otros dos pacientes con LLD también fueron confirmados con infección por *M. lepromatosis*.(16) Estos descubrimientos sugestivos de que *M. lepromatosis* es un agente específico en LLD fueron respaldados subsecuentemente y se estableció que no solo eran del área endémica de México, sino también en diferentes partes del mundo.(77) Se hace relevante recordar que en Colombia para el 2019 un 71% de los nuevos casos de lepra se reportaron como formas multibacilares.(12)

Otra de las manifestaciones graves de la infección por *M. lepromatosis* es el fenómeno de Lucio, del cual se han reportado a la fecha varios casos. En el 2014 se realizó el primer reporte de este fenómeno en dos pacientes de origen mexicano.(80) Posteriormente en el 2016 un paciente de Sinaloa quien había sido admitido por fenómeno de Lucio también se le identificó *M. lepromatosis* como agente etiológico.(21)

## **2.16 Métodos moleculares de detección de *M. lepromatosis* y *M. leprae***

Existen dos elementos repetitivos específicos utilizados como objetivo de las PCR en tiempo real (qPCR) para la detección de cada una de estas dos micobacterias, el RLPM para *M. lepromatosis* y el RLEP para *M. leprae*.

El RLPM, o elemento repetitivo específico para *M. lepromatosis*, se identificó a partir de un análisis genómico comparativo de *M. lepromatosis* en donde se determinó una secuencia genómica con una mayor cobertura (>2000x) que la cobertura genómica promedio (aproximadamente 136x). Dichas áreas representan regiones de múltiples copias en el genoma y son el objetivo para un ensayo de qPCR altamente sensible. Un análisis de estas regiones de alta cobertura reveló, mediante la herramienta BLAST, una región única de aproximadamente 200pb que estaba presente en 6 contigs del ensamblaje del genoma de referencia Mx1-22 y en 5 contigs del ensamblaje del NHDP-385.(81) La amplificación y secuenciación de esta región genómica específica está ausente en *M. leprae*.(82) Al realizar una qPCR para este RLPM y probarla contra el ADN genómico purificado de otras 17 especies de micobacterias, incluida *M. leprae*, y otras 10 micobacterias asociadas con enfermedades humanas, 3 microorganismos grampositivos asociados con infecciones de la piel y *E. coli* el resultado fue negativo.(81) Por lo tanto, se podría interpretar hasta ahora que el ensayo tiene una especificidad y sensibilidad del 100%, no obstante, se requieren estudios diseñados específicamente para buscar el desempeño de esta prueba.

El RELP, o elemento repetitivo específico para *M. leprae*, se identificó mediante un análisis de la secuencia de nucleótidos de *M. leprae* en el cual se determinó que esta micobacteria contiene regiones conservadas de 545pb que puede estar flanqueadas por segmentos adicionales que van de 44 a 100pb. La presencia de

los extremos corriente arriba y abajo de la secuencia son variables y sugiere que no puede haber dos secuencias RLEP idénticas. Se ha encontrado que existen veintinueve copias de este RLEP en el cromosoma bacteriano de *M. leprae* y que estas tienen pocas características en común con las secuencias clásicas de inserción bacteriana.(83) El método qPCR-RLEP presenta una sensibilidad del 100% para pacientes MB y del 84,6% para pacientes PB.(84) La especificidad de este mismo método puede llegar a ser hasta del 100% para *M. leprae*, sin embargo, debido a la posible presencia de secuencias RLEP homólogas en micobacterias no identificadas, no cultivables o poco estudiadas estrechamente relacionadas a *M. leprae*, esta especificidad podría variar.(85)

## **2.17 Marco normativo**

La OMS tiene como finalidad reducir todavía más la carga de enfermedad por lepra a escala mundial y local mediante las siguientes metas. Que no se presente ninguna discapacidad grado 2 en los pacientes pediátricos con lepra, que se dé una disminución del número de casos nuevos de lepra con discapacidad grado 2 a menos de un caso por millón de habitantes y que en ningún país exista una legislación que permita la discriminación por causa de la lepra.(86)

En Colombia el gobierno nacional propone los siguientes tres pilares estratégicos para mantener el cumplimiento de los criterios internacionales de eliminación de la enfermedad. Primero, reforzar la rectoría y gobernanza de las entidades territoriales y la nación en el control de la enfermedad de Hansen a través de la coordinación y las alianzas. Segundo, detener la enfermedad de Hansen y sus complicaciones mediante la oferta de servicios integrales con oportunidad, calidad y eficiencia. Tercero, eliminar la discriminación y fomentar la inclusión con un enfoque de participación y garantía de derechos.(68)

La intención de esta estrategia es lograr a 2021 disminuir la discapacidad grado 2 por enfermedad de Hansen entre los casos nuevos a una tasa de 0,58 casos por un millón de habitantes y reducir la enfermedad de Hansen infantil en 60% respecto a la línea de base de 2015. Para 2025 se proyecta disminuir la discapacidad grado 2 por enfermedad de Hansen entre los casos nuevos a una

tasa de 0.46 casos por un millón de habitantes y reducir la enfermedad de Hansen infantil en 100% con respecto a la línea de base en 2015.(68)

### **3. HIPÓTESIS**

*M. lepromatosis* es agente etiológico de lepra en pacientes colombianos.

Hipótesis alterna

*M. lepromatosis* es agente etiológico de lepra en pacientes colombianos.

Hipótesis nula

*M. lepromatosis* no es agente etiológico de lepra en pacientes colombianos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo General**

Determinar la presencia de *M. lepromatosis* como causa de lepra en pacientes colombianos.

### **4.2 Objetivos específicos**

- Describir las características clínicas, poblacionales y ubicación demográfica de los pacientes con lepra en este estudio.
- Identificar la circulación de *M. lepromatosis* en muestras biológicas de pacientes del banco de muestras del ICMT, a través de la detección de un elemento repetitivo (RLPM) específico para *M. lepromatosis*.
- Especificar las principales características clínicas, poblacionales y ubicación demográfica de los pacientes infectados por *M. lepromatosis* en Colombia.

## **5. METODOLOGÍA**

### **5.1 Enfoque metodológico de la investigación**

Se trata de un estudio de enfoque cuantitativo y la unidad de análisis se fundamenta en biopsias de piel y muestras de líquido intersticial (skin scrapings) tomadas de pacientes colombianos (Atlántico, Antioquia, Bolívar, Choco, Cesar, Cundinamarca, Magdalena, Santander, Norte de Santander, Sucre y Tolima).

Las muestras se encontraban almacenadas en el biobanco del ICMT y fueron tomadas por investigadores de este centro entre 2006 y 2016. Luego fueron enviadas y procesadas en el NHDP Laboratory Research Branch. Los especímenes se analizaron de manera objetiva mediante una qPCR-RLEP para determinar la presencia de *M. leprae* y qPCR-RLPM para determinar la presencia de *M. lepromatosis*.

Una vez obtenidos los resultados se realizaron descripciones de los hallazgos según la información disponible. Todo el proceso fue realizado de manera secuencial y utilizando herramientas estadísticas para el análisis de resultados.

### **5.2 Tipo de estudio**

Estudio descriptivo, transversal, ambispectivo con intención analítica.

### **5.3 Población**

#### **5.3.1 Población de estudio**

Biopsias de piel y muestras de líquido intersticial (skin scrapings) de pacientes con diagnóstico de lepra MB almacenadas en el biobanco del ICMT.

#### **5.3.2 Muestra**

Se analizaron 67 biopsias de piel y 25 muestras de líquido intersticial para un total de 92 especímenes.

#### **5.3.3 Muestreo**

El muestreo se hizo mediante selección no probabilística, o por conveniencia según el volumen de muestras biológicas disponibles del biobanco.

#### 5.3.4 Criterios de inclusión

Muestras biológicas disponibles en el biobanco del ICMT tomadas de pacientes con diagnóstico confirmado de lepra y clasificados como MB según la OMS.

#### 5.3.5 Criterios de exclusión

Muestras biológicas con ausencia de más del 10% de la información poblacional, geográfica y clínica estudiada.

### **5.4 Variables**

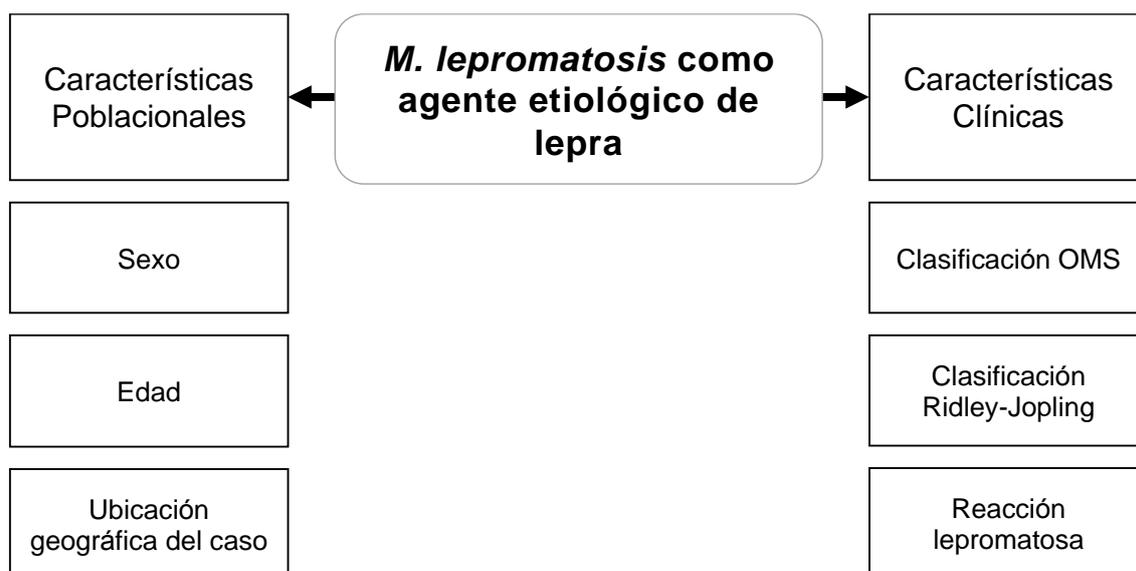
Presencia de *M. lepromatosis* como agente etiológico de lepra y características poblacionales, geográficas y clínicas de los pacientes positivos para la micobacteria.

#### 5.4.1 Tabla de variables

**Tabla 1. Operacionalización de variables**

Nombre	Definición	Naturaleza	Nivel de medición	Categorías	Unidad
<b>qPCR-RLPM</b>	Identificación de <i>M. lepromatosis</i>	Cualitativa	Nominal dicotómica	1. Si 2. No	N/A
<b>Sexo</b>	Distinción genética y biológica de características sexuales	Cualitativa	Nominal dicotómica	1. Femenino 2. Masculino	N/A
<b>Edad</b>	Tiempo desde el nacimiento a la actualidad	Cuantitativa	Razón	N/A	Años
<b>Ubicación geográfica</b>	Lugar de residencia	Cualitativa	Nominal politómica	1. Santander 2. Antioquia 3. Cundinamarca 4. Chocó 5. Bolívar 6. Sucre 7. Magdalena 8. Atlántico 9. Otros	N/A
<b>Clasificación OMS</b>	Clasificación Bacteriológica	Cualitativa	Nominal dicotómica	1. Paucibacilar 2. Multibacilar	N/A
<b>Clasificación Ridley y Jopling</b>	Clasifica los pacientes según sus características histológicas, inmunológicas, bacteriológicas y clínicas	Cualitativa	Nominal politómica	1. Indeterminada (I) 2. Tuberculoide (T) 3. Bordeline-bordeline (BB) 4. Lepromatosa (L) 5. Lepra lepromatosa (LL) 6. Lepra lepromatosa difusa (LLD)	N/A
<b>Reacción lepromatosa</b>	Reagudización de la enfermedad	Cualitativa	Nominal politómica	1. Tipo uno 2. Tipo dos 3. Fenómeno de Lucio	N/A
<b>Grado de discapacidad al realizar diagnóstico</b>	Grado de discapacidad al diagnóstico	Cualitativa	Ordinal	1. Grado 0 2. Grado 1 3. Grado 2	N/A
<b>RLPM: elemento repetitivo específico de <i>M. lepromatosis</i></b>					

#### 5.4.2 Diagrama de variables



#### 5.5 Recolección de información

##### 5.5.1 Fuentes de información

La fuente de información sobre la presencia de *M. lepromatosis* en las muestras biológicas fue primaria. La fuente de información para las variables poblacionales, geográficas y clínicas fue secundaria.

##### 5.5.2 Técnicas de recolección de información

Se utilizaron como técnicas de recolección de información qPCR-RLPM para determinar la presencia de *M. lepromatosis*, y qPCR-RLEP para determinar la presencia de *M. leprae*. Para las variables poblacionales, geográficas y clínicas se recolectó la información de encuestas, historias clínicas y bases de datos de pacientes realizadas entre 2006 y 2016.

##### 5.5.3 Instrumentos de recolección de información

Se utilizó una hoja de cálculo de Microsoft® Excel® para Microsoft 365 MSO (versión 2110 compilación 16.0.14527.20234) de 64 bits para la recolección de información sobre resultados de qPCR-RLPM para *M. lepromatosis*, qPCR-RLEP para *M. leprae*, y las variables poblacionales, geográficas y clínicas.

#### 5.5.4 Procedimientos de recolección de información

Las muestras biológicas se encontraban conservadas en etanol al 70% en el biobanco del ICMT y se enviaron las que cumplían los criterios de inclusión para análisis al NHDP Laboratory Research Branch. La identificación de *M. leprae* y *M. lepromatosis* se realizó mediante qPCR-RLEP y qPCR-RLPM respectivamente. Se consideró como positiva la presencia de las micobacterias en las muestras de que amplificaran las secuencias específicas RLEP para *M. leprae* y RLPM para *M. lepromatosis*. Los métodos de realización de las qPCR se describen a continuación.

#### Homogeneización, extracción y precipitación del ADN

En el primer día se descongelaron las muestras y se centrifugaron a 10.000 x g durante 10 minutos a 4°C, se aspiró el etanol y se añadió 1 ml de agua tratada con DEPC para rehidratar la muestra durante 1 hora a temperatura ambiente (20-22 °C), se centrifugó nuevamente el tubo a 10,000 X g durante 10 minutos a 4°C, se aspiró agua y se colocaron las muestras de tejido en una placa pequeña de Petri. Se agregaron 100µl de agua en el tejido y se maceró con un bisturí durante 1 minuto, luego se maceró nuevamente con unas tijeras durante 3 minutos. Se transfirió el tejido a un tubo FastPrep® de tapa azul y se llevó hasta 1,0 ml con 900µL de TRIzol. Se homogeneizó dos veces en el instrumento FastPrep® 24 usando un ajuste de velocidad de 6,5 m/s durante 45 segundos y se dejó que el homogeneizado se enfriara en la máquina durante 5 minutos. Al finalizar se enfriaron los tubos en hielo durante 5 minutos.

Se agregaron 200µl de cloroformo/alcohol isoamílico a cada tubo con el homogeneizado y se agitó en el Vortex por 10 segundos. Se dejaron reposar los tubos a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugaron a 700 X g durante 5 minutos a 4°C, luego se transfirió toda la fase líquida a un nuevo tubo de 1,5 ml y centrifugaron las muestras a 14.000 X g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el ARN y se guardó el ADN para la precipitación.

Se transfirió el ADN a un nuevo tubo cónico regular y se añadieron 100µl de 1X TE y 150µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se homogeneizó en el instrumento FastPrep® 24 dos veces, con 5 minutos de descanso entre ellos, ajuste de velocidad de 6,5 durante 45 segundos. Se centrifugó a 14.000 X g

durante 10 minutos a 4°C, luego se transfirieron aproximadamente 200µl de la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregaron 1,5 µL de azul de glicol al tubo. Las muestras se precipitaron con 20µl de 5M NH<sub>4</sub>OAc y 400µl de etanol frío al 100%, y finalmente se almacenaron a -70 °C durante la noche.

El segundo día se descongelaron las muestras y se centrifugaron a 10.000 X g durante 10 minutos a 4 °C, se lavó el ADN con 1ml de etanol al 70% frío, se volvió a centrifugar a 10.000 X g durante 10 minutos a 4 °C, y se dejó secar el sedimento a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se volvió a suspender el ADN en 30µl de 1X TE estéril, se agitó y centrifugó a 10.000 X g durante 30 segundos y se almacenó a -70 °C hasta su uso.

#### Secuencias de cebador y sonda de *M. leprae*

Para la detección de *M. leprae* los oligonucleótidos seleccionados en la qPCR-RLEP fueron Forward, 5'-GCA GCA GTA TCG TGT TAG TGA A-3', Reverse 5'-CGC TAG AAG GTT GCC GTA T-3', y la sonda 5'-CGC CGA CGG CCG GAT CAT CGA-3'.

#### Secuencias de cebador y sonda de *M. lepromatosis*

Para la detección de *M. lepromatosis* los oligonucleótidos seleccionados en la qPCR-RLPM fueron Forward, 5'-TTG GTG ATC GGG GTC GGC TGG A-3', Reverse 5'-CCC CAC CGG ACA CCA CCA ACC-3', y la sonda 5'-AAG TGA CGC GGG CGT GGA TT-3'

#### Preparación y realización de la qPCR para RLEP y RLPM

Para cada una de las muestras a analizar se creó la mezcla del Master Universal agregando 12,5µl del Master Universal, 7µl de agua esterilizada, 1,25µl del cebador Forward, 1,25 µl del cebador Reverse y 0.5µl de la sonda. Se cargaron 22,5µl de la mezcla en una placa de 96 pozos y 2,5 µl de la muestra de ADN homogenizada. Se centrifugó la placa a 2000rpm durante 2 minutos para eliminar las burbujas y se procesaron en el 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA).

De acuerdo a los métodos estandarizados, este fue el proceso de las muestras:

Day 1: DNA Extraction

## Homogenization

1. Thaw tissue samples (stored in 70% ethanol) on ice.
2. Spin tube at 10,000 x g for 10 minutes at 4°C if the biopsy is in small pieces.
3. Suction off ethanol. For free bacteria, decant the ethanol. Do not suction it off.
4. Add 1 ml DEPC treated H<sub>2</sub>O and re-hydrate for 1 hour at American Room Temperature (20-22°C) for human biopsies. Do not rehydrate if working with free bacteria.
5. Spin tube at 10,000 X g for 10 minutes at 4°C.
6. Suction off H<sub>2</sub>O and place tissue sample on small Petri dish.
7. Under a fume hood, add 100µl of H<sub>2</sub>O on tissue and mince on top of the petri dish lid with number 10 scalpels for 1 minute. Then mince with again with scissors for 3 minutes until fine. If the sample is a pellet of free bacteria, add 500 µls of TRIzol and mix by pipetting gently.
8. Transfer the tissue homogenate to a blue cap Fast Prep tube and bring up to 1.0 ml with 900µLs of TRIzol. If it was a pellet of free bacteria, add the 500 ul of TRIzol containing the pellet from the previous step to a blue cap Fast Prep tube and bring everything up to 1 ml with an additional 500 µls of TRIzol.
9. Homogenize in the Fast Prep 24 instrument using a speed setting of 6.5 m/s for 45 seconds. For the Fast Prep 96 use a speed setting of 1600 RPM for 1 minute.
10. Allow the blue cap tubes containing the homogenate to cool in the machine for 5 minutes.
11. Repeat step 9. NEVER HOMOGENIZE A THIRD TIME!
12. Chill tubes on ice for 5 minutes.

## Extraction

13. Transfer the blue cap tubes to a tube rack and under a fume hood, add 200  $\mu$ ls of chloroform/isoamyl alcohol (labeled "CIA") to each tube that contains the homogenate.

VORTEX 10 SEC.

14. Let tubes sit at American Room Temperature for 3 minutes

15. Centrifuge the tubes at 700 X g for 5 minutes at 4°C, and then remove the tubes from the centrifuge and place on a rack.

16. Under a fume hood, transfer the entire liquid phase (both pink and clear layer) to a new 1.5ml well labeled microfuge tube. During the transfer, you may also pull up some of the white beads. This is OK.

17. Centrifuge tubes at 14,000 X g for 10 minutes at 4°C then remove the tubes from the centrifuge and place on a rack.

18. The mixture has separated into a pink, phenol-chloroform lower phase, an interphase, and a colorless upper aqueous phase. The RNA is in the colorless upper phase. The DNA is in the interphase. Remove ONLY 400  $\mu$ l of the top colorless aqueous phase (RNA) and transfer to a new 1.5 ml microfuge tube ( save for RNA to use later ) . After removing the 400  $\mu$ ls, save the original tube. This tube contains the DNA needed for DNA precipitation step 1 .

#### DNA Precipitation

1. From the tubes containing the interphase and phenol-containing portion (the tube saved at step 18), transfer the remaining solution to a new regular conical tube.

2. Add 100 $\mu$ ls of 1X TE and 150  $\mu$ ls chloroform/isoamyl alcohol (24:1) (CIA).

3. Homogenize in the FastPrep® FP 24 instrument twice, with 5 minutes rest in between, speed setting of 6.5 for 45 seconds. For the Fast Prep 96 use a speed setting of 1600 RPM for 1 minute twice, with a 5 minute rest in between.

4. Centrifuge at 14,000 X g for 10 min. at 4°C.

5. Transfer the aqueous phase (~200 $\mu$ l) to a new tube.

\*If there is not 200µls of aqueous phase, then add an additional ~150µls of 1X TE directly into tube, vortex and centrifuge again at 14,000 X g, 10mins, 4°C. Note to which tubes this is done.

6. Add 1.5µLs of Glycol Blue to the tube.
7. Precipitate with 20µls of 5M NH<sub>4</sub>OAc and 400µls of cold 100% ethanol. Store at -70°C until ready for “Day 2”, needs to be kept at -70°C at least overnight.

#### Day 2: DNA

8. Let tubes thaw on ice
9. Centrifuge at 10,000 X g for 10 minutes at 4°C.
10. Remove the supernatant and wash the DNA pellet in 1 ml cold 70% ethanol.
11. Centrifuge at 10,000 X g for 10 minutes at 4°C.
12. Remove the supernatant then dry pellet at room temperature 30 minutes.
13. Re-suspend DNA in 30 µls of sterile 1X TE then vortex and spin at 10,000 X g for 30 seconds.
14. Store at -70°C until use.

#### 96-well Plate Set-up for RLEP, RLPM

1. Allow all reagents (primers, probe, and universal master mix) to thaw and to come to American Room Temperature. While thawing, keep probe in the dark.
2. For all targets, the plate is set up the same except with the appropriate target-dependent primers and probe in the reaction mix.
  - a. Per each sample, mix:
    - i. 12.5µls of Universal Master

- ii. 7 $\mu$ ls of sterile water
  - iii. 1.25 $\mu$ ls of Forward primer
  - iv. 1.25 $\mu$ ls of Reverse primer
  - v. 0.5 $\mu$ ls of 1X probe
  - vi. Total: 22.5 $\mu$ ls
3. Once all reagents are mixed, load a 96-well plate with 22.5 $\mu$ ls of the reaction mix per well using a multi-channel pipettor.
  4. After loading the reaction mix into the plate, load 2.5 $\mu$ ls of each sample into the appropriate wells. Make sure to load each sample into two wells for replicates.
  5. Seal the top of the plate with optical adhesive film.
  6. Centrifuge the plate at 2000 rpm for 2 minutes to remove any bubbles.
  7. Run the plate on a 7500 Fast Real-Time PCR System (ABI).

#### Recolección de los datos para las variables de interés

Los datos para las variables poblacionales, geográficas y clínicas se recolectaron de manera presencial en el ICMT. La revisión se hizo de forma manual para las encuestas e historias clínicas alojadas en el instituto y adicionalmente se revisaron las bases de datos electrónicas de estudios en los que las muestras biológicas habían sido utilizadas. Se hizo una evaluación detallada de la información de las variables de interés y se verificaron los datos de manera cruzada entre las encuestas, las historias clínicas y las bases de datos.

### **5.6 Control de errores y sesgos**

#### 5.6.1 Sesgo de información

No fue posible evitar o mitigar el sesgo de información relacionado con la mala interpretación o inducción de respuesta por parte de los investigadores debido a la disposición retrospectiva de fuente secundaria de información. Sin embargo, en ocasiones la comparación de la información entre las encuestas, las historias

clínicas y las bases de datos ayudó a confrontar la información y evaluar la veracidad.

#### 5.6.2 Sesgo de memoria

No fue posible evitar el sesgo de memoria debido a la disposición retrospectiva de fuente secundaria de información. Sin embargo, en ocasiones la comparación de la información entre las encuestas, las historias clínicas y las bases de datos ayudó a confrontar la información y evaluar la veracidad.

#### 5.6.3 Sesgo de respuestas ausentes

No fue posible evitar el sesgo de respuestas ausentes debido a la disposición retrospectiva de fuente secundaria de información. Sin embargo, se excluyeron las muestras biológicas de pacientes que tuvieran información incompleta en más del 10% de las variables de interés del estudio.

#### 5.6.4 Sesgo de análisis de la información

Los investigadores encargados del procesamiento de las muestras biológicas y de la realización de las qPCR cuenta con el conocimiento y experiencia necesarios para realizar la tarea. Adicionalmente se utilizaron todos los métodos estadísticos necesarios para la evaluación de las variables según su naturaleza. Igualmente se realizó una detallada revisión de la literatura por parte de los investigadores y la interpretación de los resultados se evaluó en consenso.

### **5.7 Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

#### 5.7.1 Técnicas de procesamiento

Se diseñó un formulario para la recolección de los hallazgos del estudio de las muestras biológicas y los datos recolectados de los pacientes sobre las variables de interés en las encuestas, las historias clínicas y las bases de datos. Luego la información fue digitalizada y tabulada en una nueva base de datos en Microsoft® Excel®. Esta nueva base de datos se exportó para su análisis en los paquetes estadísticos IBM SPSS Statistics 22, Jamovi Versión 1.6.15.0 (Licencias universidad CES) y OpenEpi: Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health, Versión 3.01. [www.OpenEpi.com](http://www.OpenEpi.com), actualizado 2013/04/06.

### 5.7.2 Análisis de los datos

Se realizó el análisis univariado para presentar los resultados de los objetivos generales y específicos del proyecto. Para la descripción de los resultados de la qPCR-RLPM se emplearon frecuencias absolutas y proporciones, y se presentaron en la tabla 2. Para la descripción de las variables poblacionales, geográficas y clínicas se realizó el análisis a través de frecuencias absolutas y proporciones, y se presentaron en la tabla 3. Para la variable de la edad se calculó la mediana y el rango etario. La ubicación geográfica los resultados positivos para *M. lepromatosis* se representaron a través de un mapa.

**Tabla 2. Análisis de variables para el primer objetivo**

Variable	Naturaleza	Nivel de medición	Medida epidemiológica	Presentación de Resultados
<b>Presencia de <i>M. lepromatosis</i></b>	Cualitativa	Nominal dicotómica	Frecuencias absolutas, proporción	Tabla
<b>Presencia de <i>M. leprae</i></b>	Cualitativa	Nominal dicotómica	Frecuencias absolutas, proporción	Tabla

## 6. ASPECTOS ÉTICOS

Esta investigación es de riesgo mínimo. Las muestras a analizar estaban almacenadas en el biobanco del ICMT, fueron recolectadas entre los años 2006 y 2016, y los pacientes otorgaron un consentimiento informado ampliado en el momento de la toma de la muestra para la utilización de los datos en estudios futuros. Se siguieron las normas internacionales para investigación con humanos con énfasis en la declaración de Helsinki y en la resolución N°008430 de 1993 del Ministerio de la Protección Social de Colombia en la cual se establecen las normas técnicas, científicas y administrativas para la investigación en humanos.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Características poblacionales, geográficas y clínicas

Se evaluaron un total de 92 muestras biológicas de pacientes con lepra. El 87% de género masculino, y se calculó una mediana de edad de 50,8 años, con un rango etario de 12 a 84 años. El total de las muestras y la información de las encuestas fueron recolectadas entre los años 2006 y 2016. La ubicación geográfica de los pacientes era en el Santander en un 37% y en la Costa Atlántica en un 34,8% (tabla 3).

Desde el punto de vista clínico, el 100% de los pacientes tenían una baciloscopia positiva y fueron clasificados como MB de acuerdo con la OMS. De acuerdo con la clasificación de Ridley-Jopling el 80,4% eran LL, el 10,9% BL y un 8,7% BT. Con respecto a la presencia de reacciones lepromatosas se encontró que los pacientes manifestaron LR1 y 2 en el 26%, fenómeno de Lucio en el 2,2% y ninguna reacción en el 17,4%. Finalmente, del grado de discapacidad encontramos que el 26,1% tenían grado 2 y el 67,4% grados 0 o 1 (tabla 3).

### 7.2 Detección de *Mycobacterium lepromatosis* en las muestras biológicas de los pacientes con lepra

El 100% de las muestras fueron analizadas mediante qPCR. El 72,8% correspondían a biopsias de piel y el 27,2% a muestras de líquido intersticial (skin scrapings). A través de este ensayo en tiempo real se logró amplificar la región específica para *M. lepromatosis* RLPM en 5 de las muestras representando el 5,4% del total de evaluadas. Es preciso señalar que en todas las muestras positivas para *M. lepromatosis* también se detectó material genético de *M. leprae*. La amplificación exclusiva de la región específica para *M. leprae* RLEP se dio de 83 pacientes representando un 90,2% de las muestras. En nuestro ensayo de PCR en tiempo real, se consideró un valor de Ct de 35 como punto de corte, 4 de las muestras tenían valores de Ct > 35 para *M. leprae* (sin señal para *M. lepromatosis*), por lo que según nuestro ensayo se consideraron negativas (tabla 4).

**Tabla 3. Caracterización de los pacientes evaluados**

	<b>Características</b>	<b>n=92 (%)</b>
<b>Sexo</b>	M	80 (87)
	F	12 (13)
<b>Edad en años</b>		50,8 (12-84)
<b>Mediana (rango)</b>		
<b>Año de toma de la muestra</b>	2006-2007	24 (26,1)
	2008-2009	32 (34,8)
	2010-2011	2 (2,2)
	2012-2013	7 (7,6)
	2014-2015	10 (10,9)
	2016	17 (18,5)
<b>Ubicación geográfica</b>	Santander	34 (37)
	Antioquia	9 (9,8)
	Cundinamarca	8 (8,7)
	Chocó	4 (4,3)
	Costa Atlántica (Bolívar, Sucre, Magdalena, Atlántico)	32 (34,8)
	Otros	5 (5,4)
<b>Baciloscopia</b>	(+)	92 (100)
<b>Clasificación OMS</b>	MB	92 (100)
<b>Clasificación R&amp;J</b>	BT	8 (8,7)
	BL	10 (10,9)
	LL	74 (80,4)
<b>Reacción lepromatosa</b>	LR (1 y 2)	24 (26)
	Fenómeno de Lucio	2 (2,2)
	Ninguna	16 (17,4)
	Sin datos	50 (54,4)
<b>Grado de discapacidad</b>	2	24 (26,1)
	0 y 1	62 (67,4)
	Sin datos	6(6,5)

**M:** masculino; **F:** femenino; **MB:** multibacilar; **LL:** lepra lepromatosa; **BL:** lepra lepromatosa borderline; **BT:** lepra tuberculoide borderline; **LR1:** reacción lepromatosa tipo 1; **LR2:** reacción lepromatosa tipo 2.

**Tabla 4. Detección molecular de *Mycobacterium lepromatosis* y *M. leprae***

Muestras Biológicas	n=92 (%)	Técnica qPCR Ct (DE - CV%)	n=92 (%)
Biopsias de piel	67 (72,8%)	*RLPM positiva ( <i>M. lepromatosis</i> ) 34,18 (0,49 - 1,43%)	5 (5,4%)
Líquido intersticial (skin scrapings)	25 (27,2%)	RLEP positiva ( <i>M. leprae</i> ) 34,84 (0,85 - 2,44%)	83 (90,2%)
		RLPM y RLEP negativas	4 (4,4%)

\*Todos los pacientes positivos para *M. lepromatosis* también fueron positivos para *M. leprae*

**qPCR:** PCR en tiempo real; **RLPM:** elemento repetitivo específico de *M. lepromatosis*; **RLEP:** elemento repetitivo específico de *M. leprae*; **Ct:** umbral del ciclo (Cycle threshold); **DE:** desviación estándar; **CV:** coeficiente de variación

### 7.3 Descripción de los pacientes con lepra coinfectados con *Mycobacterium lepromatosis*.

En las características poblacionales, geográficas y clínicas de los cinco pacientes en los cuales se detectó infección por *M. lepromatosis* se observó que todas las muestras biológicas pertenecían a pacientes de género masculino, fueron tomadas entre los años 2007 y 2010, y todos presentaban coinfección con *M. leprae* (tabla 5).

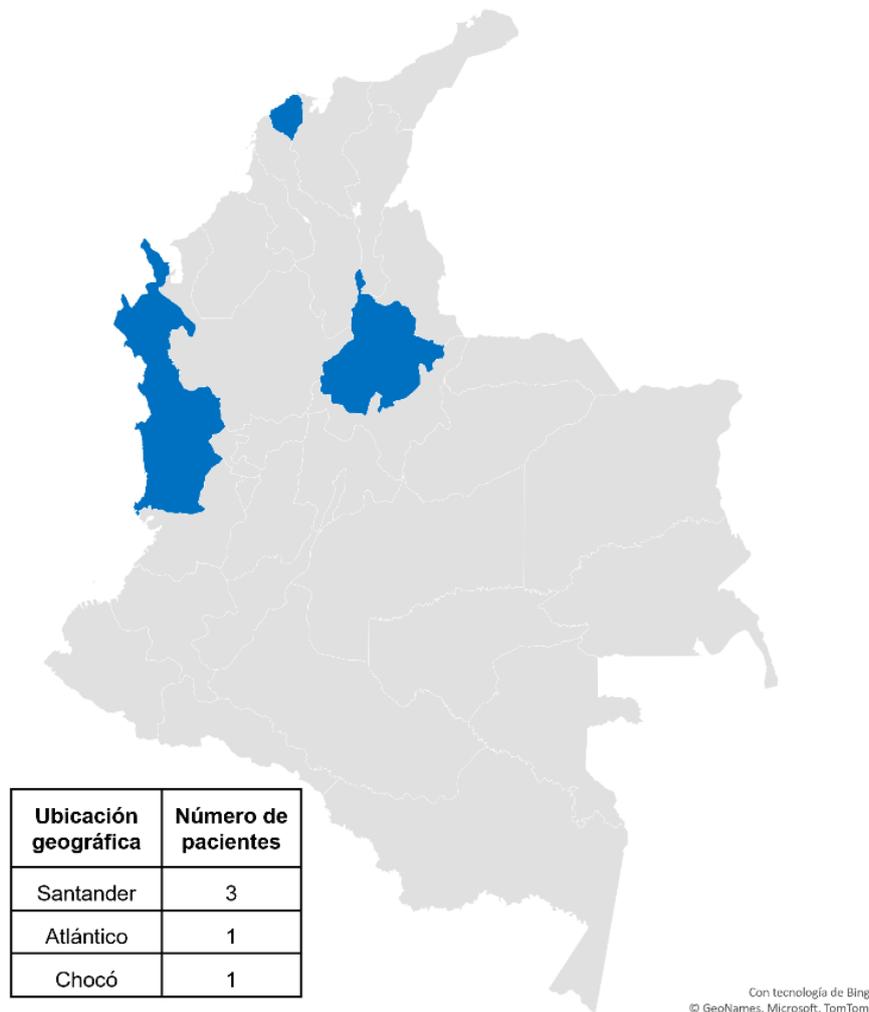
**Tabla 5. Descripción clínica y poblacional de los pacientes coinfectados con *M. lepromatosis* y *M. leprae***

#	Año de toma de muestra	Edad en años	Sexo	Ubicación geográfica	Ridley-Jopling	Reacción lepromatosa	Grado de discapacidad
1	2007	51	M	Atlántico	BL	No	2
2	2008	20	M	Santander	LL	No	0
3	2008	37	M	Santander	LL	LR1	0
4	2008	62	M	Santander	LL	No	0
5	2010	39	M	Chocó	LL	No	0

**LL:** lepra lepromatosa; **BL:** Lepra lepromatosa borderline; **LR1:** reacción lepromatosa tipo 1; **M:** masculino

Otras características encontradas en los pacientes positivos fue una mediana de edad de 48,1 años con un rango etario entre 20 y 62 años, y que además eran provenientes de zonas geográficas con una alta carga de esta enfermedad como son los departamentos de Santander, Atlántico y Chocó (figura 1). No se logró establecer la presencia de un nexo epidemiológico entre los pacientes de Santander debido a la no disponibilidad de los datos en las fuentes de información.

**Figura 1. Mapa colombiano de distribución geográfica de los pacientes con coinfección de *M. lepromatosis* y *M. leprae***



Con respecto a la clasificación Ridley-Jopling, cuatro casos fueron clasificados como LL y el restante como BL. Por otra parte, uno solo de los pacientes tenía antecedente de LR1, pero ninguno presentó fenómeno de Lucio, y en uno de los pacientes se evidenció discapacidad grado 2 (tabla 5). No se lograron recuperar datos sobre mortalidad en ninguno de los pacientes.

## 8. DISCUSIÓN

La OMS ha definido la eliminación de la lepra como problema de salud pública cuando se alcance una prevalencia de menos de 1 caso por 10.000 habitantes, meta que se consiguió globalmente desde el año 2000.(9) Sin embargo, esto no significa que los esfuerzos mundiales por controlar la enfermedad hayan cedido y la lepra se ha declarado una EID dando luz a estrategias centradas en evitar las discapacidades, especialmente entre los niños.(7,8)

En Colombia la prevalencia de lepra alcanzó la meta de menos de 1 caso por cada 10.000 habitantes desde 1997. No obstante, cada año se notifican entre 350 y 500 casos nuevos, siendo alrededor del 80% clasificados como MB y el 30% con grado de discapacidad 1 o 2.(87)

En años recientes se ha identificado a *M. lepromatosis* como un nuevo agente causal de lepra(15). Sin embargo, desde su primera descripción en 2008 otros estudios han venido reportando que *M. lepromatosis* es escasa, restringida a pacientes de México, y que se relaciona a formas multibacilares, principalmente LLD y reacciones lepromatosas como el fenómeno de Lucio.(13,82) Utilizando muestras de biopsias de piel y muestras de líquido intersticial (skin scrapings) de pacientes colombianos diagnosticados con lepra MB, nuestro estudio identificó 5 pacientes positivos para *M. lepromatosis* y *M. leprae* reforzando el concepto de la estrecha correlación entre ambas bacterias, su presentación en formas graves de enfermedad, pero adicionalmente, retando la teoría de la ubicación demográfica exclusiva de *M. lepromatosis* a pacientes mexicanos.

Múltiples estudios han identificado casos de infección mixta por ambas micobacterias de manera global. Por ejemplo, en Latinoamérica el estudio que ha reportado el mayor número de casos de *M. lepromatosis*, un total de 69 pacientes positivos para la micobacteria fue realizado en México y reportó que 14 de estos pacientes también fueron positivos para *M. leprae*. Seguido a este hallazgo, un estudio hecho en cuatro países alrededor del mundo reportó coinfección por ambas bacterias en Brasil y más recientemente se reportó coinfección en Paraguay en un paciente con ENL.(18,23) Nuestro estudio es el primero en Colombia en sumar evidencia de la correlación de ambas micobacterias en un mismo paciente con diagnóstico de lepra. De igual manera,

abre la puerta a una nueva etapa de identificación de microorganismos causantes de lepra en el país.

Más aún, es importante resaltar que las muestras analizadas en este estudio, y que evidencian la presencia de *M. lepromatosis*, fueron tomadas por el grupo de investigación antes de 2008, año en que se identificó la bacteria como agente causal de lepra.(15) Por tanto, inferimos que esta micobacteria siempre habría coexistido con *M. leprae* en territorio colombiano, surgiendo el interrogante de si *M. lepromatosis* pudo haber sido o será en algún momento el principal agente causal de la lepra, o tener una prevalencia similar a la que tienen países latinoamericanos como México (63,21%) y el sur de Brasil (21,7%).(13,88) Es así como se hace esencial proponer estudios de vigilancia genómica en el país para monitorear la dinámica de infección de ambas micobacterias.

En cuanto a las características clínicas de los pacientes con coinfección con *M. lepromatosis*, en nuestro estudio 4 de los 5 pacientes positivos padecían LL, muy similar a lo reportado en la literatura en México en el 2015 donde el predominante de la enfermedad fue LL variedad nodular y difusa.(79) Esto también fue reportado en Brasil y Myanmar donde todos los casos de coinfección también eran de pacientes con LL.(18) Resultados clínicos similares se presentan el estudio más grande realizado en México, en donde se encontró que de los 55 casos con *M. lepromatosis* como único agente etiológico, 34 presentaban LL, 13 desarrollaron LLD y los 8 restantes otras formas de lepra. En este mismo estudio, 14 pacientes que tenían coinfección con *M. leprae* presentaron todas las formas clínicas. Es así como reportaron que todos los pacientes con LLD tenían infección por *M. lepromatosis*, ya sea sola o junto con *M. leprae*.(13) En contraste, en Brasil el 15% de los pacientes que presentaban lepra por *M. lepromatosis* como único agente, tenían lepra tuberculoide como única presentación clínica y ninguno tenía lepra lepromatosa. Los pacientes con infección por ambas micobacterias presentaron LL.(18)

Ahora, hablando de las características poblacionales de los pacientes positivos para *M. lepromatosis*, el estudio de México en 2012 logró establecer una mayor prevalencia de *M. lepromatosis* en infecciones a edades tempranas, menores de 46 años, ya sea de manera individual o en coinfección con *M. leprae*.(13) Los hallazgos de nuestro estudio van en línea con los de México y encontramos que

los pacientes positivos para *M. lepromatosis* en Colombia tienen una mediana de edad de 41,8 años. Sin embargo, el número de pacientes positivos en nuestro estudio no es suficiente para establecer una correlación y habría que ampliar el número de la muestra para esclarecerlo en estudios futuros.

Finalmente, al examinar la ubicación geográfica de los pacientes, un estudio que analizó la presencia de *M. lepromatosis* y *M. leprae* en el continente americano señaló que la primera habría llegado con poblaciones humanas que migraron desde Asia por el estrecho de Bering, y la segunda fue traída por los colonos como resultado del comercio triangular.(77) Estas observaciones profundizan los interrogantes sobre la aparente ubicación geográfica exclusiva de *M. lepromatosis*.

Estudios y reportes de casos alrededor del mundo han aportado más información epidemiológica sobre la presencia *M. lepromatosis* como agente causante de enfermedad en distintas latitudes. Son los casos de los dos pacientes de Singapur con lepra MB, los cuatro pacientes con LL en India, los tres pacientes de Brasil que representan el 9,4% del total de muestras del estudio positivas para *M. lepromatosis*, uno de los dos pacientes de Malasia positivos con LL, el paciente de Canadá con infiltración vascular difusa en la biopsia de piel, y el paciente con ENL en Paraguay.(16–18,20,89). Este estudio realizado en Colombia ha encontrado 5 pacientes con *M. lepromatosis* en coinfección con *M. leprae* en zonas endémicas de lepra en el país, aportando así a la perspectiva de que *M. lepromatosis* no es un microorganismo exclusivamente encontrado en pacientes de ascendencia mexicana.

## 9. LIMITACIONES

La información poblacional, geográfica y clínica de los pacientes incluidos en el estudio fue recuperada de manera retrospectiva de distintos proyectos, esto impidió obtener información sobre otras variables de interés como consumo de armadillo, estrato socioeconómico y datos de mortalidad. Debido a esta misma razón no se logró establecer la presencia de un nexo epidemiológico entre los pacientes positivos para *M. lepromatosis* en Santander.

Por otro lado, el número de pacientes positivos para *M. lepromatosis* no fue suficiente para establecer asociaciones entre las variables de estudio y solo se realizaron descripciones.

Adicionalmente es posible que se haya presentado pérdida del material genético de las muestras debido al tiempo prolongado de almacenamiento o incluso durante su transporte y manipulación, pudiendo alterar el proceso de detección de las micobacterias en las muestras.

## **10. CONCLUSIONES**

Este estudio es el primero en Colombia en demostrar la presencia de *M. lepromatosis*. Los casos se encontraron principalmente en zonas geográficas endémicas de lepra en el país y los pacientes de donde se obtuvieron las muestras se caracterizaron por ser de sexo masculino, tener una mediana de edad de 41,8 años, tener una clasificación de lepra MB según la OMS y que la mayoría eran LL según la clasificación de Ridley-Jopling.

A partir de estos hallazgos se hace fundamental continuar la vigilancia epidemiológica dentro de la población colombiana y así profundizar el conocimiento del comportamiento de esta micobacteria recientemente identificada como agente causal de lepra a nivel mundial y nacional.

## REFERENCIAS

1. Gelber RH. Leprosy. En: Jameson JL, Fauci AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J, editores. Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018 [citado 9 de noviembre de 2021]. Disponible en: [accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1155968410](https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1155968410)
2. Ryan KJ. Mycobacteria. En: Sherris & Ryan's Medical Microbiology, 8e [Internet]. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2022 [citado 9 de noviembre de 2021]. Disponible en: [accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1185632367](https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?aid=1185632367)
3. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Lepra: puesta al día. Definición, patogénesis, clasificación, diagnóstico y tratamiento. Actas Dermosifiliogr. 1 de septiembre de 2013;104(7):554-63.
4. Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. Mycobacterium leprae's evolution and environmental adaptation. Acta Tropica. septiembre de 2019;197:105041.
5. Morales J. Por un mundo sin lepra, cero discriminación. Organización Panamericana de la Salud. Colombia [Internet]. 2020 [citado 9 de abril de 2020]. Disponible en: [https://www.paho.org/col/index.php?option=com\\_content&view=article&id=3318:por-un-mundo-sin-lepra-cero-discriminacion&Itemid=487](https://www.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=3318:por-un-mundo-sin-lepra-cero-discriminacion&Itemid=487)
6. Romero-Montoya M, Beltran-Alzate JC, Cardona-Castro N. Evaluation and Monitoring of Mycobacterium leprae Transmission in Household Contacts of Patients with Hansen's Disease in Colombia. PLOS Neglected Tropical Diseases. 23 de enero de 2017;11(1):e0005325.
7. Lepra. Organización Panamericana de la Salud [Internet]. [citado 8 de abril de 2020]. Disponible en: <http://www.paho.org/es/temas/lepra>
8. Información general: Enfoque integrado de las enfermedades infecciosas desatendidas. Organización Panamericana de la Salud. [Internet]. [citado 7 de noviembre de 2021]. Disponible en: [https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5753:2011-informacion-general-enfoque-integrado-enfermedades-infecciosas-desatendidas&Itemid=4141&lang=es](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5753:2011-informacion-general-enfoque-integrado-enfermedades-infecciosas-desatendidas&Itemid=4141&lang=es)
9. Lepra. Organización Mundial de la Salud [Internet]. 2021 [citado 7 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leprosy>
10. Lepra o enfermedad de Hansen. Ministerio de Salud y Protección Social. Colombia. 2020 [Internet]. [citado 2 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PET/Paginas/lepra.aspx>

11. Leprosy (Hansen's disease): interrupting transmission and achieving zero autochthonous cases. Organización Mundial de la Salud. [Internet]. [citado 24 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leprosy>
12. Informe de evento. Lepra, Colombia 2019. Instituto Nacional de Salud. 2020 [Internet]. [citado 2 de noviembre de 2021]. Disponible en: [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEPRA\\_2019.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/LEPRA_2019.pdf)
13. Han XY, Sizer KC, Velarde-Félix JS, Frias-Castro LO, Vargas-Ocampo F. The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. *Int J Dermatol*. agosto de 2012;51(8):952-9.
14. Levis WR, Zhang S, Martiniuk F. *Mycobacterium lepromatosis*: emerging strain or species? *J Drugs Dermatol*. febrero de 2012;11(2):158.
15. Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *Am J Clin Pathol*. diciembre de 2008;130(6):856-64.
16. Han XY, Sizer KC, Tan H-H. Identification of the leprosy agent *Mycobacterium lepromatosis* in Singapore. *J Drugs Dermatol*. febrero de 2012;11(2):168-72.
17. Jessamine PG, Desjardins M, Gillis T, Scollard D, Jamieson F, Broukhanski G, et al. Leprosy-like illness in a patient with *Mycobacterium lepromatosis* from Ontario, Canada. *J Drugs Dermatol*. febrero de 2012;11(2):229-33.
18. Han XY, Aung FM, Choon SE, Werner B. Analysis of the leprosy agents *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in four countries. *Am J Clin Pathol*. octubre de 2014;142(4):524-32.
19. Hoyos-Gómez C, Cardona-Castro N. Reacciones leprosas. *CES Med*. 2016;200-9.
20. Vargas-Ocampo F. Diffuse leprosy of Lucio and Latapí: a histologic study. *Lepr Rev*. septiembre de 2007;78(3):248-60.
21. Velarde-Félix JS, Alvarado-Villa G, Vera-Cabrera L. "Lucio's phenomenon" associated with *Mycobacterium lepromatosis*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2 de marzo de 2016;94(3):483-4.
22. Esquivel PG. Primer caso clínico de lepra lepromatosis en costa rica. *Rev Med Cos Cen*. 15 de julio de 2016;73(618):179-84.
23. Aldama Olmedo OM, Escobar M, Martínez MJ, Aldama M, Montoya Bueno C, Celias LF, et al. Eritema nodoso necrosante en lepra lepromatosa asociada a infección mixta por *Mycobacterium lepromatosis* y *Mycobacterium leprae*. *Revista del Nacional (Itauguá)*. diciembre de 2020;12(2):107-15.

24. Cano E, Fragozo M. Agentes causales de lepra: identificación molecular de *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepromatosis* en un área endémica de lepra en Colombia. *Infectio* 24(3):45-46. septiembre de 2020;
25. Fragozo-Ramos MC, Cano-Pérez E, Sierra-Merlano RM, Camacho-Chaljub F, Gómez-Camargo D. Clinical, histopathological, and molecular characterization of leprosy in an endemic area of the colombian caribbean. *Int J Mycobacteriol.* 2021 Apr-Jun;10(2):155-161. doi: 10.4103/ijmy.ijmy\_43\_21. PMID: 34558467.
26. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet.* 2004;363(9416):1209-19.
27. Scollard DM. Infection with *Mycobacterium lepromatosis*. *Am J Trop Med Hyg.* 7 de septiembre de 2016;95(3):500-1.
28. Bolognia JL, Schaffer JV, Cerroni L. En: *Dermatología.* 4° ed. Barcelona, España: Elsevier Health Sciences; 2018. p. 1296.
29. Sehgal VN. Leprosy. *Dermatol Clin.* octubre de 1994;12(4):629-44.
30. *Mycobacterium leprae* in Colombia described by SNP7614 in *gyrA*, two minisatellites and geography [Internet]. [citado 3 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.ncbi-nlm-nih-gov.bdigital.ces.edu.co:2443/pmc/articles/PMC3668693/>
31. Programs NHD. *NHDP Guide to the Management of Hansen's Disease.* :82.
32. Enfermedad de Hansen- *ClinicalKey* [Internet]. [citado 3 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www-clinicalkey-es.bdigital.ces.edu.co:2443/#!/content/journal/1-s2.0-S1138359310000833>
33. Penna G, Andrade-Pontes M, Talhari C, Gonçalves H, Penna M. Leprosy. En: *Conn's Current Therapy 2020.* Elsevier Health Sciences; p. 580-6.
34. Mi Z, Liu H, Zhang F. Advances in the Immunology and Genetics of Leprosy. *Front Immunol* [Internet]. 2020 [citado 1 de julio de 2020];11. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00567/full>
35. Burstein-Alva Z. La lepra (enfermedad de Hansen) Parte I: manifestaciones clínicas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica.* marzo de 2005;22(1):83-4.
36. Lapenta J, Lapenta JM. Lepra tuberculoide. Presentación de 2 casos en la república de Venezuela [Internet]. *Ocronos - Editorial Científico-Técnica.* 2018 [citado 4 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://revistamedica.com/lepra-tuberculoide-casos/>
37. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 22 de febrero de 2001;409(6823):1007-11.

38. Gulia A, Fried I, Massone C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. *F1000 Med Rep* [Internet]. 27 de abril de 2010 [citado 4 de mayo de 2020];2. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2948396/>
39. Honap TP, Pfister L-A, Housman G, Mills S, Tarara RP, Suzuki K, et al. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 30 de enero de 2018 [citado 4 de mayo de 2020];12(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5790234/>
40. Oliveira IVP de M, Deps PD, Antunes JMA de P. Armadillos and leprosy: from infection to biological model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. [citado 4 de mayo de 2020];61. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6746198/>
41. Tortoli E. Microbiological Features and Clinical Relevance of New Species of the Genus *Mycobacterium*. *Clin Microbiol Rev.* octubre de 2014;27(4):727-52.
42. White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st Century. *Clin Microbiol Rev.* enero de 2015;28(1):80-94.
43. Sharma M, Gupta Y, Dwivedi P, Kempaiah P, Singh P. *Mycobacterium lepromatosis* MLPM\_5000 is a potential heme chaperone protein HemW and mis-annotation of its orthologues in mycobacteria. *Infection, Genetics and Evolution.* 24 de julio de 2021;105015.
44. Nardell E. Lepra (Enfermedad de Hansen) [Internet]. Manual MSD versión para profesionales. 2018 [citado 4 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-co/professional/enfermedades-infecciosas/micobacterias/lepra>
45. Avanzi C, Del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science.* 11 de 2016;354(6313):744-7.
46. Adams Lb. Susceptibility and resistance in leprosy: Studies in the mouse model. *Immunological reviews* [Internet]. mayo de 2021 [citado 28 de julio de 2021];301(1). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33660297/>
47. Davey TF, Rees RJ. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr Rev.* junio de 1974;45(2):121-34.
48. Lupi O, Madkan V, Tying SK. Tropical dermatology: Bacterial tropical diseases. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 1 de abril de 2006;54(4):559-78.
49. Serrano-Coll H, Mora HR, Beltrán JC, Duthie MS, Cardona-Castro N. Social and environmental conditions related to *Mycobacterium leprae* infection in children and adolescents from three leprosy endemic regions of Colombia.

- BMC Infect Dis [Internet]. 13 de junio de 2019 [citado 12 de mayo de 2020];19. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6567403/>
50. Renault C, Ernst J. Mycobacterium leprae (Leprosy). 1 de enero de 2014;2:2819-2831.e2.
  51. Lepra en Colombia [Internet]. Vigilancia en Salud Pública. 2019 [citado 5 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://temas.sld.cu/vigilanciaensalud/2019/01/29/lepra-en-colombia/>
  52. Plan de acción para acelerar el logro de la eliminación de la lepra en América Latina y el Caribe. Líneas de acción para alcanzar las metas y sostener los logros regionales, 2012–2015. Organización Mundial de la Salud. [citado 6 de noviembre de 2021]; Disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2014/2014-cha-plan-accion-eliminacion-lepra-lac.pdf>
  53. 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.
  54. Moschella SL. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. Journal of the American Academy of Dermatology. 1 de septiembre de 2004;51(3):417-26.
  55. Leprosy WEC on, Organization WH. WHO Expert Committee on leprosy & World Health Organization. (2012). WHO Expert Committee on leprosy: eighth report. World Health Organization [Internet]. World Health Organization; 2012 [citado 5 de mayo de 2020]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/75151>
  56. Lockwood DNJ, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients - Searching for the perfect solution? Leprosy Review. 2007;78(4):317-20.
  57. Guía para la eliminación de la Lepra como problema de Salud Pública. Organización Mundial de la Salud. Primera edición. 2000. [Internet]. [citado 22 de julio de 2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/250241>
  58. Obregón-Valdivia P, Pérez-Jiménez A, Sotolongo-Díaz D, Fuente-Rodríguez H, Navarro-Pérez I. La Lepra y sus discapacidades. MEDICIEGO 2015; Vol.21 No.2 ISSN: 1029-3035 / RNPS: 1821. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/mediciego/mdc-2015/mdc152l.pdf>
  59. Domínguez G, Espínola R. Reacciones lepromatosas en pacientes adultos y pediátricos en un centro de referencia. Programa Nacional de Lepra, Paraguay. DEL NACIONAL. 10 de diciembre de 2016;8:4-18.
  60. Alva ZB. La lepra (enfermedad de Hansen) cie-9; cie-10 a30\* parte II: reacciones lepróticas y secuelas. Rev Peru Med Exp Salud Publica. 2005;3.

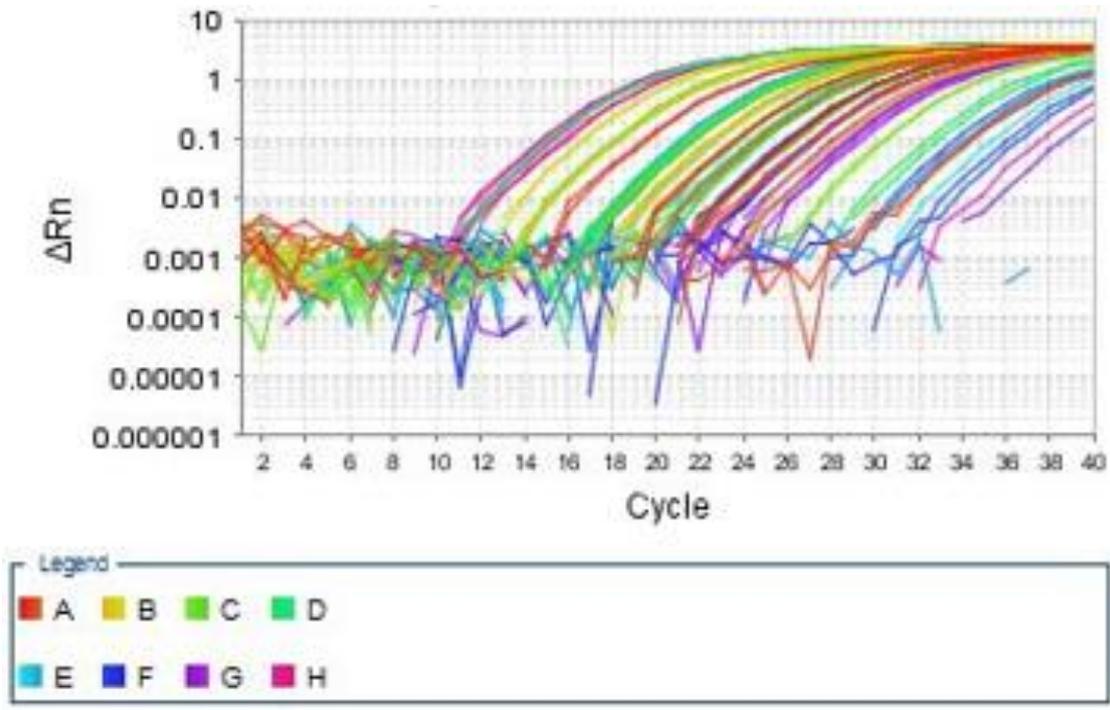
61. Garcia-Mauriño, Cristina, Mejias, Asuncion. Capítulo 243. Enfermedad de Hansen (*Mycobacterium leprae*). En: Nelson Tratado de pediatría., 21.<sup>a</sup> ed. Elsevier España; p. 1582-6.
62. López-Antuñano FJ. Diagnóstico y tratamiento de la lepra. Salud pública Méx. enero de 1998;40:66-75.
63. Hatta 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.
64. Abha A, Pandey A. Inverse sampling to study disease burden of leprosy. The Indian journal of medical research. 1 de octubre de 2010;132:438-41.
65. Ramaprasad P, Fernando A, Madhale S, Rao JR, Edward VK, Samson PD, et al. Transmission and protection in leprosy: indications of the role of mucosal immunity. Lepr Rev. diciembre de 1997;68(4):301-15.
66. Fleta Zaragoza J. Lepra: aspectos clínicos y tratamiento. Med Integr. 31 de octubre de 2001;38(7):309-14.
67. Toro GR. La biopsia de piel en Lepra. Biomédica. 1989;9(1-2):64-7.
68. Plan estratégico para aliviar la carga y sostener las actividades de control en lepra, Colombia. 2016-2025 “Compromiso de todos hacia un país libre de enfermedad de Hansen”. Colombia. Ministerio de Salud. Dirección General de Promoción y Prevención. Versión 3. 2018 [Internet]. Disponible en:  
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/VS/PP/ET/Plan-strategico-enfermedad-hansen-2016-2025.pdf>
69. Faizal M, Rincón G, Betancourth M, Calderón CA, Pardo R, Gaitán H, et al. Guía de atención de la lepra. 2011;30.
70. Leturiondo AL, Noronha AB, do Nascimento MOO, Ferreira C de O, Rodrigues F da C, Moraes MO, et al. Performance of serological tests PGL1 and NDO-LID in the diagnosis of leprosy in a reference Center in Brazil. BMC Infectious Diseases. 7 de enero de 2019;19(1):22.
71. Martins AC da C, Miranda A, Oliveira MLW-R de, Bühner-Sékula S, Martinez A. Estudo da mucosa nasal de contatos de hanseníase, com positividade para o antígeno glicolípido fenólico 1. Brazilian Journal of Otorhinolaryngology. octubre de 2010;76(5):579-87.
72. Banerjee, S., Sarkar, K., Gupta, S. et al. Multiplex PCR technique could be an alternative approach for early detection of leprosy among close contacts - a pilot study from India. BMC Infect Dis 10, 252 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-252>.

73. De las Aguas J. Estado actual de la terapéutica de la lepra Current therapeutics in leprosy. *DermatologíaCMQ*2008;6(2):118-125.
74. Vieira JLF, Riveira JGB, Martins A de NS, Silva JP da, Salgado CG. Methemoglobinemia and dapsone levels in patients with leprosy. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. junio de 2010;14(3):319-21.
75. Guía de atención de la lepra. Colombia. Ministerio de Salud. Dirección General de Promoción y Prevención. 2020 [Internet]. [citado 3 de noviembre de 2021]. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Paginas/freeseachresults.aspx?k=&k=lepra>
76. Vera-Cabrera L, Escalante-Fuentes WG, Gomez-Flores M, Ocampo-Candiani J, Busso P, Singh P, et al. Case of Diffuse Lepromatous Leprosy Associated with “Mycobacterium lepromatosis” ▽. *J Clin Microbiol*. diciembre de 2011;49(12):4366-8.
77. Kowalska M, Kowalik A. Mycobacterium leprae: pathogenic agent in leprosy. Discovery of new species Mycobacterium lepromatosis. Perspectives in research and diagnosis of leprosy. *Int Marit Health*. 2012;63(4):213-8.
78. Guerrero ET, Martínez FV, Diéguez CEA, Arrazola J, Guzmán RA. Lepra. Clasificación y cuadro clínico. 2012;8.
79. Vera-Cabrera L, Escalante-Fuentes W, Ocampo-Garza SS, Ocampo-Candiani J, Molina-Torres CA, Avanzi C, et al. Mycobacterium lepromatosis infections in Nuevo Leon, Mexico. *J Clin Microbiol*. junio de 2015;53(6):1945-6.
80. Han XY, Jessurun J. Severe leprosy reactions due to Mycobacterium lepromatosis. *The American Journal of the Medical Sciences*. enero de 2013;345(1):65-9.
81. Sharma R, Singh P, McCoy RC, Lenz SM, Donovan K, Ochoa MT, et al. Isolation of Mycobacterium lepromatosis and Development of Molecular Diagnostic Assays to Distinguish Mycobacterium leprae and M. lepromatosis. *Clinical Infectious Diseases*. 16 de noviembre de 2019;ciz1121.
82. Singh P, Benjak A, Schuenemann VJ, Herbig A, Avanzi C, Busso P, et al. Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of Mycobacterium lepromatosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 7 de abril de 2015;112(14):4459-64.
83. Woods SA, Cole ST (1990) A family of dispersed repeats in Mycobacterium leprae. *Mol Microbiol* 4: 1745–1751.
84. Truman RW, Andrews PK, Robbins NY, Adams LB, Krahenbuhl JL, Gillis TP. Enumeration of Mycobacterium leprae Using Real-Time PCR. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 4 de noviembre de 2008;2(11):e328.

85. Braet S, Vandelannoote K, Meehan C, Fontes A, Hasker E, Rosa P.s, Lucena-Silva N, Rigouts L, Suffys P.N, Jong B.C. The repetitive element RLEP is a highly specific target for the detection of Mycobacterium leprae. *Journal of Clinical Microbiology*. 56. 2018. JCM.01924-17. 10.1128/JCM.01924-17.
86. Estrategia mundial para la lepra 2016–2020. Acelerar la acción hacia un mundo sin lepra Manual operativo. Organización Mundial de la Salud. 2017. ISBN: 978-92-9022-559-1 [Internet]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250119/9789290225591-Spa.pdf>
87. Cardona-Castro N. Leprosy in Colombia. *Current Tropical Medicine Reports*. 1 de junio de 2018;5(2):85-90.
88. Han XY, Sizer KC, Thompson EJ, Kabanja J, Li J, Hu P, et al. Comparative Sequence Analysis of Mycobacterium leprae and the New Leprosy-Causing Mycobacterium lepromatosis. *J Bacteriol*. octubre de 2009;191(19):6067-74.
89. Ahuja M, Lavania M, Singh I, Turankar RP, Chhabra S, Narang T, Dogra S, Sengupta U. Detection of in patients with leprosy in India. *Infect Drug Resist* - January 1, 2018; 11; 1677-1683.

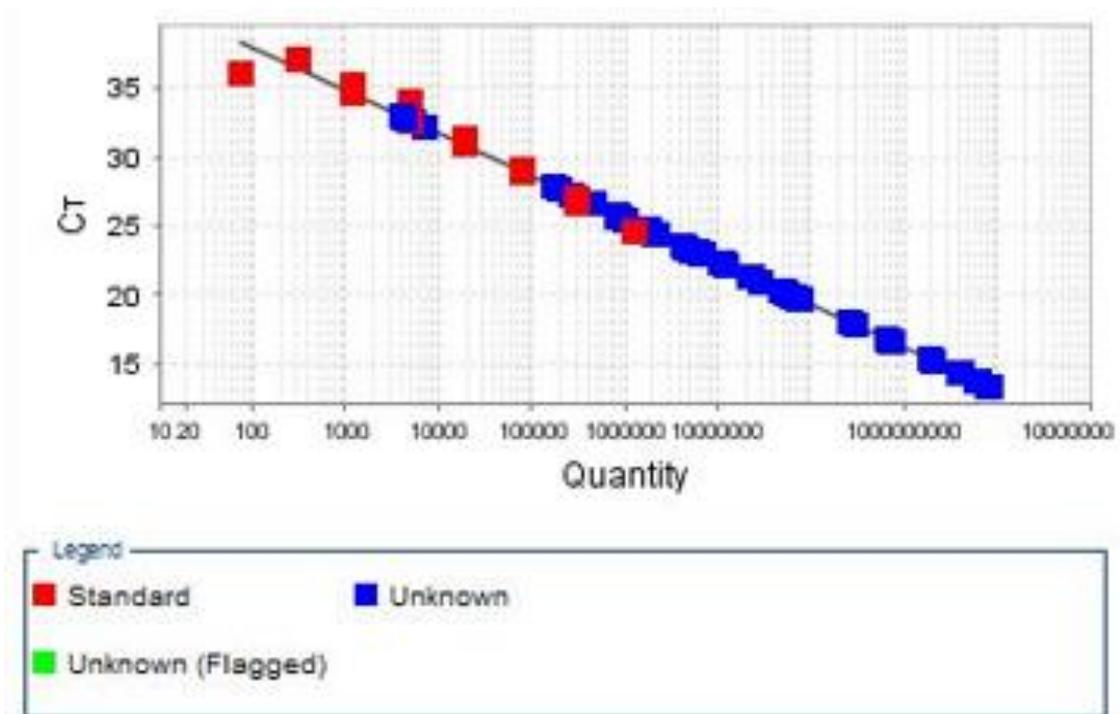
## ANEXOS

### Anexo 1. Curva de amplificación de qPCR



Muestras procesadas representadas con los diferentes colores.  
A= control positivo.

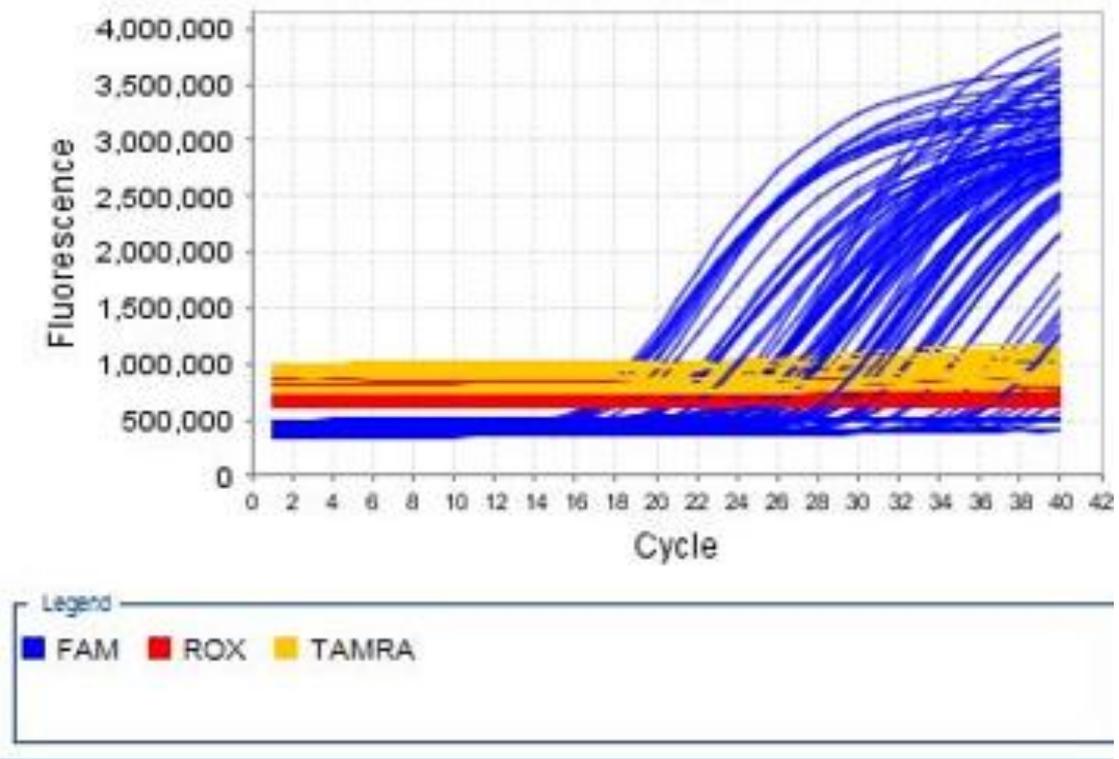
## Anexo 2. Curva estándar de qPCR



Concentración de DNA. Rojo= controles positivos.

Azules= muestras del ICMT

### Anexo 3. Curva multicomponente de qPCR



Lectura de la qPCR.

#### Anexo 4. Curva de datos crudos de qPCR

