



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

**UNIVERSIDAD DE CARTAGENA
FACULTAD DE MEDICINA
ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA INTERNA**

**LEPRA EN CARTAGENA: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL
MYCOBACTERIUM LEPRAE Y CORRELACIÓN CLÍNICA**

MARÍA CAROLINA FRAGOZO RAMOS

**CARTAGENA DE INDIAS D. T. H. Y C.
2020**



**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

**LEPRA EN CARTAGENA: IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL
MYCOBACTERIUM LEPRAE Y CORRELACIÓN CLÍNICA**

MARÍA CAROLINA FRAGOZO RAMOS

Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Medicina Interna

TUTORES:

RITA MAGOLA SIERRA MERLANO

Médico. Especialista en Medicina Interna y Reumatología. Doctorado en Ciencias de la Educación. Docente Medicina Interna. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia

FRANCISCO MIGUEL CAMACHO CHALJUB

Médico. Especialista en Dermatología. Docente Medicina Interna y Dermatología. Facultad de Medicina. Universidad de Cartagena. Colombia

DORIS ESTHER GÓMEZ CAMARGO

Bacterióloga. Magister en Microbiología Clínica. Doctorado en Biología Molecular. Directora Doctorado en Medicina Tropical y Grupo de Investigación Unidad de Investigación Molecular UNIMOL. Universidad de Cartagena

ESPECIALIZACIÓN EN MEDICINA INTERNA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD DE CARTAGENA

2020




**Universidad
de Cartagena**
Fundada en 1827

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

Jurado

 1827 ¡Siempre a la altura de los tiempos!	UNIVERSIDAD DE CARTAGENA Fundada en 1827		FECHA				
			DD	MM	AAAA		
		CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR			29	05	2020

1. Presentación del trabajo, (trabajo de grado, investigación o tesis).

Código	Documento de identidad		Apellidos	Nombres	Correo electrónico
	Tipo	Número			
1541720003	CC	11433355225	Fragozo Ramos	María Carolina	carolinafragozo@gmail.com
Programa	Especialización en Medicina Interna				
Facultad	Medicina				
Título al que opta	Especialista en Medicina Interna				
Asesor					
Título de la Obra: “Lepra en Cartagena: identificación Molecular del <i>Mycobacterium leprae</i> y Correlación Clínica”					
Palabras Clave (materias): Lepra, <i>Mycobacterium leprae</i> , <i>Mycobacterium lepromatosis</i> , Fenómeno de Lucio, Lepra Lepromatosa Difusa, Reacción en Cadena de Polimerasa					

2. Autorización de publicación de versión electrónica del trabajo de grado, (trabajo de grado, investigación o tesis).

Con esta autorización hago entrega del trabajo de grado (investigación o tesis) y de sus anexos (si existen), de forma gratuita en forma digital o electrónica (CD-ROM, DVD) y doy plena autorización a la Universidad de Cartagena, de forma indefinida, para que en los términos establecidos en la ley 23 de 1982, la Ley 44 de 1993, leyes y jurisprudencia vigente al respecto, haga la publicación de éste, con fines educativos. Esta autorización, es válida sobre la obra en formato o soporte material, digital, electrónico o virtual, para usos en red, internet, intranet, biblioteca digital o cualquier formato conocido o por conocer.

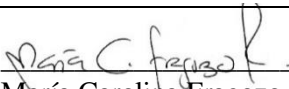
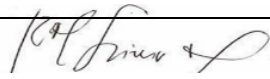
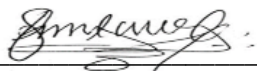

EL AUTOR, expresa que el trabajo de grado (investigación o tesis) objeto de la presente autorización, es original y la elaboró sin quebrantar ni suplantar los derechos de autor de terceros, de tal forma que el Trabajo es de su exclusiva autoría y tiene la titularidad sobre éste. En caso de queja o acción por parte de un tercero referente a los derechos de autor sobre el trabajo de grado en cuestión EL AUTOR, asumirá la responsabilidad total, y saldrá en defensa de los derechos aquí autorizados; para todos los efectos, la Universidad de Cartagena actúa como un tercero de buena fe.

Toda persona que consulte ya sea la biblioteca o en medio electrónico podrá copiar apartes del texto citando siempre las fuentes, es decir el título del trabajo, autor y año.

Esta autorización no implica renunciar a la facultad que tengo de publicar total o parcialmente la obra. La autorización debe estar respaldada por las firmas de todos los autores del trabajo de grado.

Si autorizo

3. Firmas

 María Carolina Fragozo Ramos	 Rita Magola Sierra Merlano
 Francisco Miguel Camacho Chaljub	 Doris Esther Gómez Camargo

AGRADECIMIENTOS

*A Dios por ser mi guía
A mis dos ángeles que me cuidan desde el cielo
A mi madre, por su apoyo incondicional y asesoría profesional
A mis tutores, por motivarme a dar cada día lo mejor de mí
Al grupo UNIMOL, por todo lo que me enseñaron
Al Departamento Administrativo Distrital de Salud por su confianza
A los pacientes y sus familias, por ellos y para ellos este trabajo fue posible
y por último a todas las personas que quizás no puedo nombrar pero que
contribuyeron con su cariño a hacer este proyecto realidad.*

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	14
METODOLOGÍA	16
DISEÑO DEL ESTUDIO Y POBLACIÓN:.....	16
ASPECTOS ÉTICOS:.....	17
OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	18
REMOCIÓN DE LA PARAFINA Y DIGESTIÓN DE LOS TEJIDOS.....	18
EXTRACCIÓN DE ADN Y DIFERENCIACIÓN DE <i>Mycobacterium spp.</i> POR PCR	19
ELECTROFORESIS.....	20
ANÁLISIS ESTADÍSTICO:	20
RESULTADOS.....	21
DISCUSIÓN	24
CONCLUSIONES	27
CONFLICTOS DE INTERESES.....	27
FINANCIACIÓN	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
TABLAS.....	32
FIGURAS	40

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. CEBADORES UTILIZADOS PARA CADA MIX DE PCR.....	32
TABLA 2. MIX DE PCR UTILIZADO EN CADA RONDA.....	32
TABLA 3. VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS EN PACIENTES CON LEPRA.....	33
TABLA 4. CLASIFICACIÓN DE PACIENTES CON LEPRA SEGÚN OMS.	33
TABLA 5. TIEMPO DE EVOLUCIÓN DE LOS SÍNTOMAS, CLASIFICACIÓN CLÍNICA DE LA LEPRA Y OTRAS VARIABLES CLÍNICAS DE INTERÉS.	34
TABLA 6. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA DE HISTOPATOLOGÍA.	35
TABLA 7. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LEPRA SEGÚN IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Mycobacterium spp.</i>	35
TABLA 8. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO DE LEPRA SEGÚN LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Mycobacterium spp.</i>	36
TABLA 9. CLASIFICACIÓN DE CASO Y COMPARACIÓN CON OTRAS VARIABLES.....	37
TABLA 10. DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y COMPARACIÓN CON OTRAS VARIABLES.....	38
TABLA 11. SEXO Y COMPARACIÓN CON OTRAS VARIABLES.	39
TABLA 12. GRADO DE DISCAPACIDAD Y COMPARACIÓN CON OTRAS VARIABLES.....	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. FLUJOGRAMA DE SELECCIÓN DE CASOS PARA EL ESTUDIO.	40
FIGURA 2. DISTRIBUCIÓN DE LOS CASOS DE LEPROA SEGÚN EL BARRIO.	40
FIGURA 3. DISTRIBUCIÓN DE CASOS DE LEPROA SEGÚN LOCALIDAD Y UCG.....	41
FIGURA 4. CONDICIÓN DEL TRATAMIENTO.....	42
FIGURA 5. DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO.....	42
FIGURA 6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE <i>Mycobacterium spp.</i>	43
FIGURA 7. DETECCIÓN DE MOLECULAR DE <i>M. leprae.</i>	43

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
BB	Lepra Borderline Borderline
CENDIPAT	Centro de Diagnóstico Histopatológico del Caribe
DE	Desviación estándar
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ENL	Eritema Nodoso Leproso
ESE	Empresa Social del Estado
FL	Fenómeno de Lucio
IB	Índice Bacilar
LI	Lepra Indeterminada
LL	Lepra Lepromatosa
LLD	Lepra Lepromatosa Difusa
LOC	Localidad
LT	Lepra Tuberculoide
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. lepromatosis</i>	<i>Mycobacterium lepromatosis</i>
MB	Multibacilar
OMS	Organización mundial de la salud
PB	Paucibacilar
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
qPCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en tiempo real
RIQ	Rango intercuartil
rRNA	Ácido Ribonucleico ribosomal
SIVIGILA	Sistema de Vigilancia en Salud Pública
UCG	Unidad Comunera de Gobierno
SNP	Polimorfismo de Nucleótido Simple

RESUMEN

Introducción: la lepra es una enfermedad crónica de curso lento y progresivo que en estadios avanzados se asocia a discapacidad y deformidad física. Es considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) una enfermedad tropical olvidada. En Colombia el Sistema de Vigilancia en Salud pública (SIVIGILA) registra más de 200 casos nuevos de lepra al año, la mayoría multibacilares y con discapacidad grado dos. Cartagena de Indias, Bolívar continúa siendo un área endémica de lepra. El *Mycobacterium leprae* (*M leprae*) fue el único germen causal de la enfermedad hasta cuando se identificó, el *Mycobacterium lepromatosis* (*M lepromatosis*). Algunos investigadores han propuesto que las diferencias genéticas del *Mycobacterium spp.*, estarían relacionadas con la forma de presentación clínica (fenotipos) e histopatológica de la lepra. El *M. lepromatosis* ha sido vinculado a la forma de Lepra Lepromatosa Difusa (LLD) y el Fenómeno de Lucio (FL) en México y otros países. En Cartagena no se acostumbra a realizar identificación microbiológica de la lepra y al uso de herramientas moleculares para su diagnóstico.

Objetivos: identificar a través de ensayos de biología molecular el *Mycobacterium spp.*, en un área endémica de lepra en Colombia y correlacionarla con las formas de presentación clinicopatológicas de la enfermedad.

Métodos: estudio observacional descriptivo, ambispectivo. Los criterios de inclusión fueron: casos con diagnóstico de lepra confirmado por clínica o laboratorio y con muestra histopatológica disponible. Se excluyeron: los casos con expediente clínico incompleto, que no contaran con muestra de patología o consentimiento informado. Se analizaron variables sociodemográficas, clínicas e histopatológicas. A partir de biopsias parafinadas, se realizó extracción y amplificación de ADN, dos rondas semianidadadas de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se llevaron a cabo utilizando *primers* específicos para *M lepromatosis* y *M leprae*.

Resultados: se analizaron 41 casos, con muestras procesadas en tres laboratorios de patología en la ciudad de Cartagena, 61% de casos con lepra multibacilar, 53,7% de sexo femenino. La media de edad de 50,5 años (DE; 16,4), 73,2% afiliados al régimen de salud subsidiado. El 85.4% fueron procedentes de la ciudad de Cartagena. Seis casos de otros municipios de Bolívar. El diagnóstico clínico más frecuente fue Lepra Lepromatosa (LL) 36,6% seguido de Lepra Tuberculoide (LT) con el 22% y un caso con LLD. Dos sujetos cursaron con reacción lepromatosa necrotizante severa o FL. Del total de casos, cinco se presentaron con discapacidad grado uno y siete con discapacidad grado dos. El hallazgo histopatológico más frecuente fue LT 36,59% seguido de Lepra Indeterminada (LI) con 35,3%. En tres casos la histopatología no favoreció el diagnóstico de lepra. La detección molecular de las especies se logró en el 82,9% de las muestras estudiadas de estas el 100% correspondió a *M leprae* incluyendo las formas fenotípicas de LLD y FL al igual que los casos con histopatología negativa para lepra. No hubo casos de *M lepromatosis*. Cuando se comparó la distribución de las variables en diferentes grupos se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre el grado máximo de discapacidad y el tipo de caso (p=0.000).

Conclusiones: en este estudio la realización de ensayos de PCR específicos para la identificación de *M lepromatosis* y *M leprae* permitió un mejor diagnóstico de la lepra y mostró que en nuestro medio el *M leprae* es la especie relacionada con las formas fenotípicas más severas de la enfermedad incluidas reacciones lepromatosas altamente mortales como el FL en consecuencia, elementos ligados al huésped deben ser considerados como los principales factores de riesgo y no exclusivamente la especie de Micobacteria. Adicionalmente, estos resultados ponen en manifiesto la necesidad de reeducarnos en lepra e integrar de forma rutinaria dentro del arsenal diagnóstico la biología molecular para la detección precoz de los casos.

PALABRAS CLAVES: Lepra, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, Lepra Lepromatosa Difusa, Fenómeno de Lucio, Reacción en Cadena de Polimerasa.

ABSTRACT

Introduction: leprosy is a chronic disease with a slow and progressive course, in advanced stages it is associated with disability and physical deformity. It is considered by the World Health Organization (WHO) a neglected tropical disease. In Colombia, the Public Health Surveillance System (SIVIGILA) registers more than 200 new cases of leprosy a year, most of them multibacillary and with degree two disabilities. Cartagena de Indias, Bolívar continues to be an endemic area for leprosy. *Mycobacterium leprae* (*M leprae*) was the only etiology agent of the disease until *Mycobacterium lepromatosis* (*M lepromatosis*) was identified. Some researchers have proposed that the genetic differences of *Mycobacterium spp.*, would be related to the clinical presentation (phenotypes) and histopathology of leprosy. *M. lepromatosis* has been linked to the form of Diffuse Lepromatous Leprosy (DLL) and the Lucio Phenomenon (LPh) in Mexico and other countries. In Cartagena, it is not customary to perform microbiological identification of leprosy and to use molecular tools for its diagnosis.

Objectives: identify *Mycobacterium spp.*, using molecular biology assays in an endemic area of leprosy in Colombia and correlate it with the clinicopathological presentation of the disease

Methods: observational, descriptive, ambispective study. The inclusion criteria were: cases with leprosy diagnosis confirmed by clinic or laboratory and with available histopathological sample. Cases with an incomplete clinical record that did not have a pathology sample or informed consent were excluded. Sociodemographic, clinical and histopathological variables were analyzed. In paraffinized biopsies, DNA extraction and amplification was performed. Two semi-nested rounds of Polymerase Chain Reaction (PCR) were done using primers specific for *M lepromatosis* and *M leprae*.

Results: 41 cases were analyzed, with samples processed in three pathology laboratories in the city of Cartagena, finding 61% of cases with multibacillary leprosy, 53.7% female. The mean age of 50.5 years (SD; 16.4), 73.2% affiliated with the subsidized health system. 85.4% from Cartagena. Six cases from other municipalities of Bolívar. The most frequent clinical diagnosis was Lepromatous Leprosy (LL) 36.6% followed by Tuberculoid Leprosy (TL) with 22% and one case with DLL. Two subjects had severe necrotizing lepromatous reaction or LPh. Of the total number of cases, five are with degree one disability and seven with degree two disability. The most frequent histopathological finding was LT 36.59% followed by Indeterminate Leprosy (IL) with 35.3%. In three cases, histopathology did not favor the diagnosis of leprosy. Molecular detection of the species is found in 82.9% of the samples studied, of which 100% correspond to *M leprae*, including the phenotypic forms of LLD and FL, as well as cases with negative histopathology for leprosy. There were no cases of *M lepromatosis*. When the distribution of the variables in different groups was compared, a statistically significant difference was found between the maximum degree of disability and the type of case ($p = 0.000$).

Conclusions: in this study, the performance of specific PCR tests to identify *M lepromatosis* and *M leprae* improved the diagnosis of leprosy and showed that in our region *M leprae* is the species related to the most severe phenotypic forms of the disease including highly deadly lepromatous reactions such as LPh consequently, host-linked elements should be the main risk factors and not exclusively the species of mycobacteria. Furthermore, these results show the need to re-educate ourselves in leprosy and to routinely integrate molecular biology into the diagnostic arsenal for the early detection of cases.

KEYWORDS: Leprosy, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, Diffuse Lepromatous Leprosy, Lucio Phenomenon, Polymerase Chain Reaction

INTRODUCCIÓN

La lepra también conocida como enfermedad de Hansen es una micobacteriosis crónica que afecta principalmente la piel y el sistema nervioso periférico resultando en neuropatía, deformidad y discapacidad a largo plazo (1, 2). Es una de las enfermedades infecciosas más antiguas del mundo, se dispersó a través de las migraciones humanas durante los últimos 10.000 años (3). Pese a haber sido eliminada como problema de salud pública (4, 5) (definido como una prevalencia <1/10.000 habitantes) la transmisión de la enfermedad no se ha interrumpido, según estadísticas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para 2018 se registraron a nivel mundial 208.641 casos nuevos y 184.238 casos prevalentes. El 5,33% con discapacidad grado dos al momento del diagnóstico lo que refleja la detección tardía de estos casos (6).

En Colombia, durante el 2019 fueron notificados 381 casos nuevos (tasa de incidencia nacional de 0,76/100.000 habitantes), el 61,9% fueron formas multibacilares de la enfermedad. Entre los departamentos y distritos con mayor tasa de incidencia se encuentran: Cesar (3,15), Huila (2,31), Norte de Santander (2,28), Tolima (2,20), Arauca (1,76), Bolívar (1,65), Barranquilla (1,38) y Cartagena (1,34) (7).

Respecto a su curso clínico, la lepra posee un comportamiento heterogéneo, la respuesta inmune y genética del huésped determinan su manifestación fenotípica (8-10) cuyo espectro va desde una lepra indeterminada y el polo tuberculoide paucibacilar pasando por las formas límite o bordeline hasta el polo lepromatoso con alta carga bacilar (1, 11), algunos pacientes tendrán leproreacciones que corresponden a eventos inmunológicos de curso agudo con síntomas cutáneos y sistémicos. Se clasifican como tipo 1 o Reacción Reversa (12), tipo 2 que corresponde al Eritema Nodoso Leproso (ENL) (13) y de tipo 3 denominada Fenómeno de Lucio o eritema necrotizante (14).

El *Mycobacterium leprae* (*M leprae*) se consideraba el único agente causal de la lepra hasta el 2008 cuando se identificó una nueva especie el *Mycobacterium lepromatosis* (*M lepromatosis*) aislada en dos nativos mexicanos con Lepra Lepromatosa Difusa (LLD) un subtipo especial de lepra multibacilar cuya característica clínica relevante es la infiltración cutánea no nodular y reacción lepromatosa necrotizante severa o FL (15). Un análisis posterior de 20 genes y pseudogenes evidenció una diferencia genética del 9.1% entre ambos bacilos revelando, además, que la divergencia a nivel especie ocurrió hace aproximadamente 10 millones de años (16).

Si bien la expresión clínica de la lepra está bien descrita su reconocimiento puede ser desafiante en algunos casos adicionalmente, tanto *M leprae* como *M lepromatosis* son bacilos incultivables en medios axénicos y morfológicamente indistintos sólo pueden diferenciarse por medio de extracción, secuenciación y amplificación de ADN. Aunque es poco lo que se sabe acerca de *M lepromatosis*, se plantea que este último posee mayores factores de virulencia y un índice de reproducibilidad menor respecto a *M leprae* que explicarían su identificación en formas fenotípicas de la enfermedad donde la carga bacilar es masiva (15), asimismo, distinguir entre ambos microorganismos parece no ser necesario para prescribir un tratamiento óptimo porque ambos bacilos responden a los mismos regímenes de poliquimioterapia (17, 18) no obstante, la identificación de las especies del “complejo *M leprae*” es una herramienta de valor para comprender mejor la epidemiología de la lepra, sus rutas de transmisión, y el desarrollo de una nueva gamma de herramientas de biología molecular para el diagnóstico de la enfermedad (19, 20).

El presente estudio tiene como objetivo identificar por primera vez mediante ensayos de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) el agente etiológico causal de la lepra en Cartagena y Bolívar, un área endémica de lepra en Colombia y su correlación con las formas de presentación clínica e histopatológica.

METODOLOGÍA

Diseño del estudio y población:

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, ambispectivo. Participaron tres laboratorios de histopatología de la ciudad de Cartagena, Bolívar: ESE hospital Universitario del Caribe, Centro de Diagnóstico Histopatológico del Caribe (CENDIPAT) y Unidad de Patología Clínica Dr. Alex Tejada. Se incluyeron casos con diagnóstico de lepra confirmado por clínica o laboratorio, que aceptaran participar del estudio mediante firma de consentimiento informado desde enero de 2015 hasta febrero de 2020. Se excluyeron los casos que no tenían muestra histopatológica disponible y con expediente de notificación obligatoria incompleto.

Definiciones:

- Caso confirmado por clínica (5): lesiones cutáneas eritematosas o hipocrómicas que al examen clínico presenten alteración de la sensibilidad térmica, dolorosa y/o táctil; engrosamiento, dolor espontáneo o la palpación de uno o varios troncos nerviosos asociados con signos de afección neural, pérdida sensitiva, disminución de la fuerza muscular o parálisis en el territorio o músculos por ellos inervados.
- Caso confirmado por laboratorio (5): identificación de bacilos ácido alcohol resistentes (compatibles con bacilo de Hansen) en los frotis de moco, linfa o líquido intersticial; biopsia con infiltrados inflamatorios que lesionan o destruyen los nervios con la presencia o no de bacilos.
- Paucibacilar (5): caso de lepra con uno a cinco lesiones cutáneas, sin evidencia de presencia de bacilos en el frotis de piel.
- Multibacilar (5): caso de lepra con más de cinco lesiones cutáneas; o con afectación nerviosa (neuritis pura, o cualquier cantidad de lesiones cutáneas

y neuritis); o con el que se demostró la presencia de bacilos en un frotis de piel, independientemente del número de lesiones cutáneas.

Las variables recolectadas fueron:

- a) Sociodemográficas: edad, sexo, lugar de residencia, régimen de seguridad social en salud.
- b) Clínicas: tipo de caso, clasificación del caso, tiempo de evolución de los síntomas, diagnóstico clínico, baciloscopia, número de lesiones, leproreacciones, máximo grado de discapacidad, condición de tratamiento.
- c) Histopatológicas: laboratorio de procedencia de la muestra, tipo de tejido, cantidad de bloques parafinados, fijación de la muestra, edad de almacenamiento y diagnóstico histopatológico.
- d) Identificación molecular del *Mycobacterium spp*: *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepromatosis*, ninguna especie.

Aspectos Éticos:

Este estudio en el marco de las normas legales en Colombia para investigación se consideró un estudio de investigación con riesgo mayor al mínimo, basado en el artículo 11 de los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, resolución número 8430 de 1993 (21). Se obtuvo consentimiento informado verbal y escrito de los sujetos para revisión y registro de datos sociodemográficos, clínicos e histopatológicos por parte del investigador al igual que la obtención de bloques parafinados en laboratorios de histopatología, manteniendo los principios de privacidad y confidencialidad. Fue aprobado por el comité de ética de la Universidad de Cartagena.

Obtención de las muestras

Este estudio se realizó a partir de biopsias embebidas en parafina, obtenidas de tres laboratorios de patología de la ciudad de Cartagena posterior a la recolección de firma de consentimientos informados de los sujetos del estudio. Los tejidos fueron fijados en formaldehído y embebidos en parafina según los protocolos de rutina de cada laboratorio y posteriormente almacenados. Estos bloques de tejido fueron recuperados, envueltos individualmente y transportados al Laboratorio Unidad de Investigación Molecular (UNIMOL) de la Universidad de Cartagena para las pruebas de laboratorio.

Remoción de la parafina y digestión de los tejidos

Se realizaron cortes de los tejidos parafinados con la ayuda de un bisturí, la cuchilla se cambió por cada muestra para evitar la contaminación cruzada. Las secciones de cada tejido se introdujeron en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml rotulado, seguidamente se le añadió 800 μ l de xilol incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente y agitando cuidadosamente para remover la parafina. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm por 3 minutos y se descartó el sobrenadante; se repitieron los pasos de lavado con xilol 2 o 3 veces hasta que la parafina se removiera completamente. El pellet fue rehidratado en un ciclo de etanol en concentraciones descendentes (800 μ l de etanol absoluto, etanol al 70% y al 50%). Cada cambio fue precedido por homogenización en vórtex y centrifugación a 13.000 rpm por 3 minutos.

El material resultante fue digerido a 60°C en 400 μ l de solución de digestión (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 100 mM pH 8.0, NaCl 50 mM, SDS 0.5%, proteinasa K 150 μ g/ml) entre 36 a 48 horas. Pasado el tiempo de digestión las muestras se incubaron a 90°C por 10 minutos para inhibir la acción de la proteinasa K.

Cuando no fue posible la digestión total del tejido, se utilizó mortero y pistilo para macerar el resto de tejido, seguidamente el material lisado se pasó de 3 a 5 veces por una jeringa 21G hasta homogenizar la muestra. Posteriormente se centrifugaron

a 13.000 rpm por 3 minutos para remover el exceso de proteínas. Por último, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de centrifuga y se almacenó para la posterior extracción de ADN.

Extracción de ADN y diferenciación de *Mycobacterium* por PCR

Para la diferenciación de las especies de *Mycobacterium*, se extrajo previamente el ADN de las muestras empleando el kit comercial Illustra GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, USA) siguiendo el protocolo de manufactura. La detección específica de *M. leprae* y *M. lepromatosis* se realizó mediante PCR utilizando un ciclador ProFlex PCR System (Applied Biosystems, USA). El algoritmo diagnóstico por este método constó de dos rondas de PCR semianidadas para aumentar la sensibilidad y especificidad de la detección. La primera ronda comprendía 1 mix de reacción con los cebadores AFBFO y MLER4 que amplifican una región del gen 16S rRNA comunes a todas las *Mycobacterium* conocidas (> 100 especies). Una segunda ronda se llevó a cabo a partir de los productos de amplificación de la primera PCR, esta segunda ronda comprendía 2 mix de reacciones independientes, uno con los primers LPMF2 y MLER4 para identificar *M. lepromatosis* y otro con los primers LERF2 y MLER4 para identificar *M. leprae* (17). La secuencia de los cebadores y los tamaños de los amplicones se detallan en la **Tabla 1**. Cada mix de reacción fue ajustado a un volumen final de 25 µl (**Tabla 2**) y amplificado bajo las siguientes condiciones de ciclado: activación de la enzima a 95°C durante 2 minutos; 35 ciclos de desnaturalización (95°C durante 20 segundos), anillamiento de los cebadores (58°C durante 20 segundos para la primera ronda de PCR o 48°C durante 20 segundos para la segunda ronda de PCR) y extensión (72°C por 40 segundos); en último lugar, la extensión final por 5 minutos. Como control negativo para todas las reacciones se utilizó agua y como controles positivos, ADNs de muestras positivas para *M. lepromatosis* y *M. leprae* según el caso.

Electroforesis

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, utilizando marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI, EU). La separación de las bandas se llevó a cabo a 90 voltios constantes por 40 minutos, posteriormente las imágenes fueron reveladas y digitalizadas.

Análisis estadístico:

La base de datos fue registrada en Excel y posteriormente analizada en el SPSS versión 21. Las variables de tipo categórico (ej; sexo o el régimen de afiliación) fueron analizadas con frecuencias absolutas (recuento) y frecuencias relativas (%), las variables de tipo numérico (ej.; edad, tiempo de evolución de los síntomas) fueron primero valoradas por medio del estadístico de Shapiro Wilk (por contar con una muestra menor a 50 pacientes), este estadístico permitió determinar si las variables numéricas seguían o no la curva de distribución normal (distribución normal entendida como un valor p igual o mayor a 0,05). Cuando la variable numérica seguía el supuesto de normalidad como el caso de la edad, se representó por medio de la media y la desviación estándar, cuando la variable numérica no seguía la curva de distribución normal fue analizada por medio de la mediana, los percentiles o cuartiles, con el respectivo rango intercuartil (RIQ). Para todas las variables numéricas se determinó el valor mínimo y máximo. Se diseñaron gráficos de barras en las variables categóricas con más de dos variables de respuesta y se representaron variables dicotómicas por medio de un gráfico de sectores, con sus respectivos %. Para determinar las diferencias estadísticas significativas se tomó como punto de corte un valor p de 0,05. Se utilizó el test exacto de Fisher en tablas simétricas de 2 x 2 con frecuencias esperadas menores a 5, en caso contrario y en los casos con tablas asimétricas se calculó la prueba Chi Cuadrado de Pearson.

RESULTADOS

Durante el periodo de estudio, 64 sujetos cumplieron con los criterios de inclusión, 23 se excluyeron, quedando finalmente para el análisis, 41 casos. La principal razón de exclusión fue la no disponibilidad de muestra histopatológica. En la **Figura 1** se observa el flujograma.

La media de edad fue de 50,5 años (DE; 16,4), el sexo femenino fue el más frecuente con 53.7%, procedentes en su mayoría de la ciudad de Cartagena con 85,4%, de la localidad dos con 39% y afiliados al régimen subsidiado en el 73,2% (**Tabla 3**)

La distribución de los casos de lepra según los Barrios de Cartagena se observa en la **Figura 2**. El barrio que presentó un mayor número de casos fue Olaya Herrera con 14,2%, seguido de Pozón con 8,5% y de Bayunca, Boston, La Piedra de Bolívar y Santa María con 5,7% cada uno. Seis casos pertenecían a otros municipios de Bolívar: dos a San Estanislao de Kostka y un caso en Magangué, San Jacinto, San Cristóbal y Arjona (**Figura 3**).

En cuanto a las características clínicas, la **Tabla 4** describe la clasificación de los casos de lepra según la OMS. La clasificación más común correspondió a lepra multibacilar con 61%. De los 41 sujetos del estudio, 24 contaban con el Índice Bacilar (IB), la media fue de 0,6 (DE 1,3), el IB mínimo fue de 0 y el IB máximo fue de 6.4. Según este índice el 39% se clasificó como paucibacilar ($< 0,1$), el 19,5% como multibacilar ($\geq 0,1$) y el 41,5% no contaban con el índice.

La **Tabla 5** describe el tiempo de evolución de los síntomas, la clasificación clínica de la lepra y otras variables clínicas de interés. La mediana de tiempo de evolución de los síntomas fue de 2 años, el diagnóstico clínico más frecuente fue Lepra Lepromatosa (LL) con 36,6%, seguido de Lepra Tuberculoide (LT) con 22% y Lepra Bordeline Bordeline (BB) con 14,6%, se presentó un caso con LLD.

El 82,9% correspondió a casos nuevos, no se presentó ningún tipo de reacción en el 85,4%, cuatro casos presentaron una reacción tipo 2 o ENL y dos pacientes debutaron con un FL o leproreacción de tipo 3. De los sujetos de estudio el 70,7% se presentó con ningún grado de discapacidad al momento del diagnóstico. Los casos fueron clasificados en su mayoría como prevalentes en el 65,9%. La **Figura 4** describe la condición de tratamiento, el 48,7% completo tratamiento y el 31,7% se encuentra actualmente en tratamiento.

Respecto a las variables histopatológicas, las muestras de biopsia provienen de tres laboratorios, pero la mayoría corresponden a la ESE Hospital Universitario del Caribe con 48,8% y la Unidad de Patología Clínica Dr. Alex Tejada con 46,3%. La mediana de tiempo de almacenamiento de la muestra fue de 2,4 años, la piel fue el único tipo de tejido y en todos los casos se fijó la muestra con formaldehído, en el 82,9% solo estuvo disponible un bloque parafinado (**Tabla 6**).

La **Figura 5** representa el diagnóstico histopatológico. Se observa como los hallazgos más comunes corresponden a LT con 36,5%, Lepra Indeterminada (LI) con 29,2% y LL con 19,1%.

En relación a la identificación molecular del *Mycobacterium spp.*, en la **Figura 6**, se puede observar que en el 82,9% de los casos se identificó *M. leprae*. No se observó ningún caso de *M. lepromatosis*. La **Figura 7**, ilustra la detección del bacilo para dos casos representativos. El tipo clínico de lepra más frecuente en el grupo que se aisló *M. leprae* fue LL con 41,2%, seguido de LT con 17,6%. En el grupo que no amplificó con la PCR el tipo clínico de lepra más común fue LT con 57,1%. No hubo diferencias significativas ($p = 0,235$) (**Tabla 7**).

En el grupo con detección por PCR de *M. leprae* se observa como el tipo de diagnóstico histopatológico más frecuente a la LI con 35,3%, seguido de LT con 26,5%. Dentro de este mismo grupo tres casos tuvieron una histopatología negativa para lepra. En los sujetos donde no hubo amplificación de especie el tipo

histopatológico de lepra más común fue LT con 85,7% seguido de la LL con 14,3%. No existen diferencias con significancia estadística ($p > 0,153$) (**Tabla 8**).

Se comparó la distribución de las variables entre diferentes grupos. No existen diferencias estadísticas significativas entre la clasificación del caso y las variables: régimen de afiliación, localidad, grado máximo de discapacidad, identificación molecular del *Mycobacterium spp.*, y leproreacciones ($p > 0,05$) (**Tabla 9**).

Asimismo, no se observa diferencia estadística entre el diagnóstico clínico y las variables: régimen de afiliación, localidad, grado máximo de discapacidad y leproreacción ($p > 0,05$). No existen diferencias estadísticas significativas entre las variables sexo con tipo de caso, máximo grado de discapacidad y leproreacción ($p > 0,05$) (**tabla 10 y 11**).

Existe diferencia estadística significativa entre las variables grado de discapacidad y tipo de caso (nuevo vs recidiva) ($p > 0,000$), no se observaron diferencias estadísticas entre las variables grado máximo de discapacidad y reacción lepromatosa ($p > 0,05$) (**Tabla 12**).

DISCUSIÓN

Colombia alcanzó la meta de eliminación de lepra propuesta por la OMS en 1997, una prevalencia menor a uno en 10 000 habitantes. Aun cuando se considera en etapa de post-eliminación, se continúan diagnosticando en promedio 400 nuevos casos de lepra al año (22, 23). El presente es el primer estudio que describe la frecuencia *M leprae* y *M lepromatosis* en población colombiana, específicamente en Cartagena, ciudad capital del departamento de Bolívar un área endémica de lepra donde se ubicaron en el pasado dos de lo más importantes lazaretos del país; el Real Hospital de San Lázaro de Cartagena de Indias (1760-1810) y Lazareto de Caño de Loro (1870-1930) (24, 25).

Los casos analizados, la mayoría correspondían a formas multibacilares de la enfermedad, afiliados al régimen de salud subsidiado y residentes en el área urbana de Cartagena. La mediana de evolución de los síntomas fue de dos años, con un diagnóstico clínico más frecuente de LL, se incluyó un caso con LLD. Respecto a las leproreacciones, cuatro pacientes se presentaron con un ENL y dos cursaron con un FL. 12 casos tenían discapacidad; cinco con discapacidad grado uno y siete con discapacidad grado dos. El diagnóstico histopatológico más frecuente fue LT, tres casos tuvieron una histopatología que no favorecía la enfermedad. El *M. lepromatosis* no se identificó en ninguna de las muestras estudiadas, todos los casos correspondieron a *M leprae* incluyendo los sujetos con histopatología negativa. Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre el grado máximo de discapacidad y el tipo de caso (nuevo vs recidiva).

Han et al, en un estudio realizado en 120 casos con criterios clinicopatológicos de lepra provenientes de 12 estados Mexicanos (20) logró la identificación de especie en el 72,5% de las muestras. 55 casos para *M lepromatosis*, 18 casos con *M leprae* y 14 con infección dual. *M lepromatosis* fue aislado en todos los sujetos con LLD (n=13). Se concluyó que *M lepromatosis* causaba específicamente LLD (p=0.023).

En contraste con los hallazgos descritos por Han, nuestros datos muestran que la LLD y la reacción de Lucio pueden ser causados por *M leprae*. Sharma R y cols, desarrollaron un ensayo específico de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR, por sus siglas en inglés) para la identificación de *M lepromatosis* y *M leprae* a partir de muestras histológicas archivadas. De forma similar, a nuestro estudio se observó que el FL ocurrió en pacientes infectados con *M. leprae* (26). Reportes de FL con identificación molecular de *M leprae* también se han realizado en Indonesia (27), India (28) y sólo un caso en Colombia (29). Pese a que el número total de casos es pequeño estos resultados sugieren un componente del huésped, en lugar del agente etiológico, como el factor de riesgo principal para esta reacción.

En términos de filogenética, *M lepromatosis* y *M leprae* provienen de un ancestro común y deben haberse separado hace más de 13.9 millones de años (30). En un estudio llevado a cabo por Han et al (31), donde se analizaron los agentes etiológicos de la lepra en cuatro países: Brasil (n = 52), Malasia (n = 31), Myanmar (n = 9) y Uganda (n=4), se demostró dominancia de *M leprae* con detección variable de *M lepromatosis* en diversas formas clínicas de lepra, lo que llevó a proponer que esta última especie y su expresión fenotípica más frecuente la LLD es principalmente endémica en México y que su presencia en Myanmar, Malasia y previamente en Singapur (32) favorece la hipótesis del origen asiático de la enfermedad. Llama la atención, que un trabajo realizado en la provincia de Shandong, China que involucró 85 casos de lepra para análisis genético del *Mycobacterium spp.*, no logró al igual que en nuestra población aislar *M lepromatosis* en ninguna de las muestras estudiadas (33).

En Colombia se ha utilizado la tipificación molecular de *M. leprae* usando VNTR (acrónimo en inglés, variable number tandem repeat) para diferenciar las cepas; así se han encontrado dos grupos que evidencian diferentes orígenes de la lepra que llegó a Colombia. En la región andina se encuentra un grupo micobacteriano aislado que coincide con cepas europeas y por su parte en Cartagena, Bolívar que corresponde a la región norte del país donde la lepra llegó con los esclavos africanos durante la colonia se encuentra otro tipo de *M leprae* (34). Estos hallazgos

podrían explicar también diferencias en la distribución geográfica de las especies del “complejo *Mycobacterium leprae*” y coinciden con modelos a partir de Polimorfismos de Nucleótido Simple (SNP, por sus siglas en inglés) previamente descritos por Monot et al (35, 36).

Adicionalmente, en la población analizada se evidencia que cinco de siete pacientes recaídos presentaban anestesia de manos o pies y/o deformidad visible en contraste con siete de 34 casos nuevos ($p < 0,000$). Hallazgos afines fueron reportados en una cohorte retrospectiva conducida por Rajkumar Prabu et al (37), donde se identificaron 58 recaídas, 31% ($n=18$) con deformidad. Estos datos apuntan a que si bien la carga de recaídas es baja la presencia de deformidad física en este grupo es mucho más frecuente. La alta carga bacilar y la presencia de leproreacciones también se han descrito como factores relacionados con discapacidad física (38).

Por último, el diagnóstico de la lepra continúa siendo predominantemente clínico, sin embargo, la variabilidad en sus formas fenotípicas conduce a diagnósticos errados y tardíos sobre todo en formas paucibacilares de la enfermedad. Las ayudas diagnósticas convencionales tales como baciloscopia, histopatología y test serológicos carecen de sensibilidad especialmente en estadios tempranos de la enfermedad o en individuos asintomáticos (39-41). Una revisión sistemática y metaanálisis realizado por Gurung P et al (42), evidenció una sensibilidad de qPCR de 78.5% (IC 95% 61.9-89.2) y especificidad 89.3% (IC 95% 61.4-97.8). La PCR convencional mostró una sensibilidad de 75.3% (IC 95% 67.9-81.5) y especificidad 94.5% (IC 95% 91.4-96.5) tal como se observó en nuestra población hasta el 70% de los pacientes con lepra pueden tener baciloscopia negativa y una proporción mucho menor de histopatologías que no favorecen el diagnóstico o inconclusas. La PCR es una herramienta precisa en la identificación del bacilo y su implementación puede ser útil para el triage de casos en etapas más precoces de la enfermedad.

Este estudio tiene como fortaleza el haber incluido sujetos recién diagnosticados y pese a su naturaleza predominantemente retrospectiva los datos clínicos y epidemiológicos fueron cuidadosamente recolectados y verificados en entrevistas directas con cada uno de los casos lo que permitió describir ampliamente

información clínica relevante tales como leproreacciones, discapacidad y condición de tratamiento. Asimismo, esta investigación propone la creación de una línea de investigación en lepra favoreciendo la generación de otros estudios que involucren la medicina traslacional y casos provenientes de otras regiones del país. Dentro de sus limitaciones esta la condición misma de las muestras (biopsias embebidas en parafina) y de manera especial la escasez de tejido presente en algunos bloques que pudieron haber limitado el aislamiento de la especie en contados casos. Se sugiere para futuros estudios la utilización de métodos moleculares en muestras de tejido fresco.

CONCLUSIONES

La identificación genética del “complejo *Mycobacterium leprae*”, permite una mejor comprensión de las rutas de transmisión, variaciones geográficas y clínicas de la lepra. Se debe avanzar en el arsenal de ensayos moleculares que permitan la detección de ambas especies y realizar la búsqueda activa de *M lepromatosis* en casos con PCR negativa para *M leprae*. En el futuro se espera que las técnicas de diagnóstico molecular sean integradas de forma rutinaria en los programas de control y vigilancia de la enfermedad de Hansen de modo que más pacientes se detecten en una etapa temprana de la enfermedad y puedan tratarse tan pronto como sea posible lo que significa menos discapacidad, pero también significa romper la cadena de transmisión.

CONFLICTOS DE INTERESES

Ninguno que declarar

FINANCIACIÓN

Recursos propios de los autores

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clinics in Dermatology*. 2015;33(1):26-37.
2. Franco-Paredes C, Marcos LA, Henao-Martínez AF, Rodríguez-Morales AJ, Villamil-Gómez WE, Gotuzzo E, et al. Cutaneous Mycobacterial Infections. *Clinical Microbiology Reviews*. 2018;32(1):e00069-18.
3. Couto Dal Secco RG, França K, Castillo D, AlHarbi M, Lotti T, Fioranelli M, et al. A synopsis of the history of Hansen's disease. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2017;167(1):27-30.
4. Organización Panamericana de la Salud. Epidemiological profiles of neglected diseases and other infections related to poverty in Latin America and the Caribbean 2009 [17 de Mayo de 2020]. Available from: https://www.paho.org/per/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=274-epidemiological-profiles-neglected-diseases-other-infections-related-to-poverty-in-latin-america-caribbean-4&category_slug=enfermedades-desantendidas-001&Itemid=1031.
5. World Health Organization. Regional Office for South-East A. Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. New Delhi: World Health Organization. Regional Office for South-East Asia; 2018 2018.
6. World Health Organization = Organisation mondiale de la S. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy-free world – Situation de la lèpre dans le monde, 2018: parvenir à un monde exempt de lèpre. *Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire*. 2019;94(35/36):389-411.
7. Instituto Nacional de Salud. Lepra. Periodo epidemiologico XIII. Colombia, 2019 [17 de Mayo de 2020]. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Info-Evento.aspx>.
8. de Souza VNB, Iyer AM, Lammas DA, Naafs B, Das PK. Advances in leprosy immunology and the field application: A gap to bridge. *Clinics in Dermatology*. 2016;34(1):82-95.
9. Fava V, Orlova M, Cobat A, Alcaïs A, Mira M, Schurr E. Genetics of leprosy reactions: an overview. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107:132-42.
10. Fonseca ABdL, Simon MdV, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infectious Diseases of Poverty*. 2017;6(1):5.
11. Ridley D, Jopling W. Classification of Leprosy According to Immunity A Five-group System. *Internacional Journal of Leprosy*. 1966;34(3):255-73.

12. Lambert SM, Alembo DT, Nigusse SD, Yamuah LK, Walker SL, Lockwood DNJ. A Randomized Controlled Double Blind Trial of Ciclosporin versus Prednisolone in the Management of Leprosy Patients with New Type 1 Reaction, in Ethiopia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(4):e0004502.
13. Lambert SM, Nigusse SD, Alembo DT, Walker SL, Nicholls PG, Idriss MH, et al. Comparison of Efficacy and Safety of Ciclosporin to Prednisolone in the Treatment of Erythema Nodosum Leprosum: Two Randomised, Double Blind, Controlled Pilot Studies in Ethiopia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(2):e0004149.
14. Jurado F, Rodriguez O, Novales J, Navarrete G, Rodriguez M. Lucio's leprosy: A clinical and therapeutic challenge. *Clinics in Dermatology*. 2015;33(1):66-78.
15. Han XY, Seo Y-H, Sizer KC, Schoberle T, May GS, Spencer JS, et al. A New Mycobacterium Species Causing Diffuse Lepromatous Leprosy. *American Journal of Clinical Pathology*. 2008;130(6):856-64.
16. 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. *Journal of Bacteriology*. 2009;191(19):6067.
17. Han XY, Jessurun J. Severe Leprosy Reactions Due to Mycobacterium lepromatosis. *The American Journal of the Medical Sciences*. 2013;345(1):65-9.
18. Han XY, Quintanilla M. Diffuse Lepromatous Leprosy Due to Mycobacterium lepromatosis in Quintana Roo, Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(11):3695.
19. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(14):4459.
20. Han XY, Sizer KC, Velarde-Félix JS, Frias-Castro LO, Vargas-Ocampo F. The leprosy agents Mycobacterium lepromatosis and Mycobacterium leprae in Mexico. *International Journal of Dermatology*. 2012;51(8):952-9.
21. Ministerio de Salud. Resolucion Número 8430 de 1993 [18 de Mayo de 2020]. Available from: <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/DE/DIJ/RESOLUCION-8430-DE-1993.PDF>.
22. Beltrán-Alzate C, López Díaz F, Romero-Montoya M, Sakamuri R, Li W, Kimura M, et al. Leprosy Drug Resistance Surveillance in Colombia: The Experience of a Sentinel Country. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(10):e0005041.

23. Instituto Nacional de Salud. Informe de Evento. Lepra, Colombia. 2018 [18 de Mayo de 2020]. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Info-Evento.aspx>.
24. Jaramillo NB, Rivas DP, Rueda LS. La Lepra en Colombia: Estigma, Identidad y Resistencia en los Siglos XX y XXI. *Revista Salud Bosque* 2015;5(1):67-80.
25. Fragozo-Ramos MC, Sierra-Merlano RM, Camacho-Chaljub FM, Carcamo-Marrugo L. Caracterización Fénotípica y Demográfica de la Lepra en Cartagena. *Acta Médica Colombiana* 2018;44.
26. 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*. 2019.
27. Prakoeswa C, Herwanto N, Agusni R, Natalya F, Listiawan M, Adriaty D, et al. Lucio phenomenon of leprosy LL type on pregnancy: A Rare Case. *Leprosy review*. 2016;87:526-31.
28. Suvirya S, Pathania S, Malhotra KP, Jain A, Verma P, Kumari P. A case of diffuse lepromatous leprosy with Lucio phenomenon. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2019;113(2):138-9.
29. Serrano-Coll HA, Beltrán-Alzate JC, Buitrago SM, Cardona-Castro N. Lepromatous leprosy and human immunodeficiency virus co-infection associated with phenomenon of Lucio versus immune reconstitution inflammatory syndrome. *Infectio*. 2016;20:272-5.
30. Han XY, Silva FJ. On the Age of Leprosy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(2):e2544.
31. Han XY, Aung FM, Choon SE, Werner B. Analysis of the Leprosy Agents *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in Four Countries. *American Journal of Clinical Pathology*. 2014;142(4):524-32.
32. Han X, Sizer K, Tan H-H. Identification of the Leprosy Agent *Mycobacterium lepromatosis* in Singapore. *Journal of drugs in dermatology : JDD*. 2012;11:168-72.
33. Zhang Y, Sun Y, Wang C, Liu D, Chen M, Fu XSa, et al. Failure to detect *Mycobacterium lepromatosis* as a cause of leprosy in 85 Chinese patients. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*. 2015;81(5):499-500.
34. Cardona-Castro N, Cortés E, Beltrán C, Romero M, Badel-Mogollón JE, Bedoya G. Human Genetic Ancestral Composition Correlates with the Origin of *Mycobacterium leprae* Strains in a Leprosy Endemic Population. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015;9(9):e0004045.

35. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée J-Y, Lacroix C, et al. On the Origin of Leprosy. *Science*. 2005;308(5724):1040.
36. Monot M, Honoré N, Garnier T, Zidane N, Sherafi D, Paniz-Mondolfi A, et al. Comparative genomic and phylogeographic analysis of *Mycobacterium leprae*. *Nature Genetics*. 2009;41(12):1282-9.
37. Rajkumar Dr P. Relapse and deformity among 2177 leprosy patients released from treatment with MDT between 2005 and 2010 in South India: A retrospective cohort study. *Leprosy review*. 2015;86:345-55.
38. de Paula HL, de Souza CDF, Silva SR, Martins-Filho PRS, Barreto JG, Gurgel RQ, et al. Risk Factors for Physical Disability in Patients With Leprosy: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatology*. 2019;155(10):1120-8.
39. Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 2015;45(9):383-93.
40. Martinez AN, Ribeiro-Alves M, Sarno EN, Moraes MO. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2011;5(10):e1354.
41. Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014;8(4):e2655.
42. Gurung P, Gomes CM, Vernal S, Leeflang MMG. Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2019;25(11):1315-27.

TABLAS

Tabla 1. Cebadores utilizados para cada mix de PCR.

Organismo	Cebador	Sentido	Secuencia	Tamaño de amplicón	PCR
Género <i>Mycobacterium</i>	AFBFO	Forward	5'GCGTGCTTAACACATGCAAGTC	171 pb	Primera ronda de PCR
	MLER4	Reverse	5'CCACAAGACATGCGCCTTGAAG		
<i>Mycobacterium lepromatosis</i>	LPMF2	Forward	5'GTCTCTTAATACTTAAACCTATTAA	142 pb	Segunda ronda de PCR
	MLER4	Reverse	5'CCACAAGACATGCGCCTTGAAG		
<i>Mycobacterium leprae</i>	LERF2	Forward	5'CTAAAAAATCTTTTTTAGAGATAC	135 pb	
	MLER4	Reverse	5'CCACAAGACATGCGCCTTGAAG		

Tabla 2. Mix de PCR utilizado en cada ronda.

PCR Master Mix	Ronda 1	Ronda 2	
	<i>Mycobacterium</i> spp	<i>M. lepromatosis</i>	<i>M. leprae</i>
5X GoTaq PCR Buffer	5 µl	5 µl	2 µl
dNTPs (2.5 mM)	2 µl	2 µl	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl	1 µl	1,25
Primer Forward (40 uM)	1,25	1,25	1,25
Primer Reverse (40 uM)	1,25	1,25	1,25
Enzima GoTaq Polimerasa	0,25	0,25	0,25
Agua libre de nucleasas	9,25	9,25	9,25
ADN/productos de 1er ronda	5 µl	5 µl	5 µl
Volumen final	25 µl	25 µl	25 µl

Tabla 3. Variables sociodemográficas en pacientes con lepra.

Variable sociodemográfica	Resultados n= 41
Edad en años	
Media (DE)	50,5 (16,4)
Mínima	16
Máxima	85
Sexo	
Femenino	22 (53,7%)
Masculino	19 (46,3%)
Procedencia	
Cartagena	35 (85,4%)
Bolívar	6 (14,6%)
Localidad	
Uno	8 (19,5%)
Dos	16 (39%)
Tres	10 (24,4%)
Otros municipios Bolívar	6 (14,6%)
No aplica	1 (2,4%)
Régimen de Afiliación	
Subsidiado	30 (73,2%)
Contributivo	11 (26,8%)

Tabla 4. Clasificación de pacientes con Lepra según OMS.

Clasificación	Resultado n = 41
Multibacilar	25 (61%)
Paucibacilar	16 (39%)

Tabla 5. Tiempo de evolución de los síntomas, clasificación clínica de la lepra y otras variables clínicas de interés.

Variable clínica	Resultado n = 41
Tipo de caso	
Incidente	14 (34,1%)
Prevalente	27 (65,9%)
Tiempo de evolución en años	
Mediana (RIQ)	2 (2)
Q1	1
Q3	3
Mínimo	0,16
Máximo	13
Diagnóstico clínico	
Lepra Lepromatosa	15 (36,6%)
Lepra Tuberculoide	9 (22%)
Lepra Bordeline Bordeline	6 (14,6%)
Lepra Indeterminada	4 (9,8%)
Lepra Bordeline Tuberculoide	3 (7,3%)
Lepra Bordeline Lepromatosa	1 (2,4%)
Lepra Indeterminada	1 (2,4%)
Lepra Lepromatosa Difusa	1 (2,4%)
Lepra Tuberculoide	1 (2,4%)
Clasificación del caso	
Nuevo	34 (82,9%)
Recidiva	7 (17,1%)
Tipo de reacción	
Ninguna	35 (85,4%)
Tipo 1	0 (0%)
Tipo 2	4 (9,8%)
Tipo 3 (Fenómeno de Lucio)	2 (4,9%)
Máximo grado de discapacidad	
Ninguna	29 (70,7%)
Grado 1	5 (12,2%)
Grado 2	7 (17,1%)
Numero de lesiones	
Una	5 (12,2%)
Una (Mayor compromiso de Nervios)	1 (2,4%)
Dos	5 (12,2%)
Tres	2 (4,9%)
Cuatro	0 (0%)
Cinco	3 (7,3%)
Más de cinco	25 (61%)

RIQ: Rango intercuartílico

Tabla 6. Características de la muestra de histopatología.

Variable	Resultado n = 41
Laboratorio de procedencia	
Hospital Universitario del Caribe	20 (48,8%)
Alexa Tejada	19 (46,3%)
CENDIPAT	2 (4,9%)
Tiempo del almacenamiento de la muestra en años	
Mediana (RIQ)	2,4 (3,2)
Q1	0,4
Q3	2,4
Mínimo	0,16
Máximo	5,16
Tipo de tejido	
Piel	41 (100%)
Fijación	
Formaldehido	41 (100%)
Cantidad de bloques	
Uno	34 (82,9%)
Dos	6 (14,6%)
Seis	1 (2,4%)

RIQ: Rango intercuartílico

Tabla 7. Diagnóstico clínico de lepra según identificación molecular del *Mycobacterium spp.*

Diagnóstico Clínico	<i>M leprae</i> n = 34	No amplificó n = 7
Lepra Bordeline Bordeline	4 (11,8%)	2 (28,6%)
Lepra Bordeline Lepromatosa	1 (2,9%)	0 (0,0%)
Lepra Bordeline Tuberculoide	3 (8,8%)	0 (0,0%)
Lepra indeterminada	5 (14,7%)	0 (0,0%)
Lepra Lepromatosa	14 (41,2%)	1 (14,3%)
Lepra Lepromatosa Difusa	1 (2,9%)	0 (0,0%)
Lepra tuberculoide	6 (17,6%)	4 (57,1%)

Tabla 8. Diagnóstico histopatológico de lepra según la identificación molecular del *Mycobacterium spp.*

Diagnóstico histopatológico	<i>M leprae</i> n = 34	No amplificó n = 7
Lepra Bordeline	2 (5,9%)	0 (0,0%)
Lepra Indeterminada	12 (35,3%)	0 (0,0%)
Lepra Lepromatosa	7 (20,6%)	1 (14,3%)
Lepra Lepromatosa (con Fenómeno de Lucio)	1 (2,9%)	0 (0,0%)
Lepra Tuberculoide	9 (26,5%)	6 (85,7%)
Negativo para lepra	2 (5,9%)	0 (0,0%)
Dermatitis crónica perivascular	1 (2,9%)	0 (0,0%)

Tabla 9. Clasificación de caso y comparación con otras variables.

	Multibacilar n= 25	Paucibacilar n=16	Valor p
Clasificación de caso según régimen de afiliación			
Contributivo	5 (20,0%)	6 (37,5%)	0,287*
Subsidiado	20 (80,0%)	10 (62,5%)	
Clasificación de caso según localidad			
No aplica	1 (4,0%)	0 (0,0%)	0,335**
1	4 (16,0%)	4 (25,0%)	
2	11 (44,0%)	5 (31,3%)	
3	4 (16,0%)	6 (37,5%)	
Otros municipios Bolívar	5 (20,0%)	1 (6,3%)	
Clasificación de caso según grado de discapacidad			
Grado 1	3 (12,0%)	2 (12,5%)	0,331**
Grado 2	6 (24,0%)	1 (6,3%)	
Ninguno	16 (64,0%)	13 (81,3%)	
Clasificación de caso según identificación molecular del <i>Mycobacterium spp.</i>			
<i>M. leprae</i>	21 (84,0%)	13 (81,3%)	1,000*
No amplificó ninguna especie	4 (16,0%)	3 (18,8%)	
Clasificación de caso según Leproreacciones			
No	19 (76,0%)	16 (100,0%)	0,105**
Tipo 2	4 (16,0%)	0 (0,0%)	
Tipo 3 (Fenómeno de Lucio)	2 (8,0%)	0 (0,0%)	

*Test exacto de Fisher ** Chi Cuadrado de Pearson

Tabla 10. Diagnóstico clínico y comparación con otras variables.

	Lepra Bordeline Bordeline n = 6	Lepra Bordeline Lepromatosa n = 1	Lepra Bordeline Tuberculoide n = 3	Lepra indeterminada n = 5	Lepra Lepromatosa n = 15	Lepra Lepromatosa Difusa n = 1	Lepra tuberculoide n = 10	Valor p
Diagnóstico clínico según régimen de afiliación								
Contributivo	1 (16,7%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	1 (20,0%)	3 (20,0%)	0 (0,0%)	5 (50,0%)	0,633*
Subsidiado	5 (83,3%)	1 (100,0%)	2 (66,7%)	4 (80,0%)	12 (80,0%)	1 (100,0%)	5 (50,0%)	
Diagnóstico clínico según localidad								
No aplica	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (6,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0,500*
1	1 (16,7%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	2 (13,3%)	0 (0,0%)	4 (40,0%)	
2	2 (33,3%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	2 (40,0%)	7 (46,7%)	1 (100,0%)	3 (30,0%)	
3	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	2 (40,0%)	4 (26,7%)	0 (0,0%)	3 (30,0%)	
Otros municipios Bolívar	3 (50,0%)	1 (100,0%)	0 (0,0%)	1 (20,0%)	1 (6,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Diagnóstico clínico según grado de discapacidad								
Grado 1	1 (16,7%)	0 (0,0%)	1 (33,3%)	0 (0,0%)	2 (13,3%)	0 (0,0%)	1 (10,0%)	0,926*
Grado 2	1 (16,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (26,7%)	0 (0,0%)	2 (20,0%)	
Ninguno	4 (66,7%)	1 (100,0%)	2 (66,7%)	5 (100,0%)	9 (60,0%)	1 (100,0%)	7 (70,0%)	
Diagnóstico clínico según Leproreacción								
No	6 (100,0%)	1 (100,0%)	3 (100,0%)	5 (100,0%)	9 (60,0%)	1 (100,0%)	10 (100,0%)	0,431*
Tipo 2	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (26,7%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Tipo 3 (Fenómeno de Lucio)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (13,3%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	

* Chi Cuadrado de Pearson

Tabla 11. Sexo y comparación con otras variables.

	Femenino N = 22	Masculino N = 19	Valor p
Sexo y tipo de caso			
Nuevo	20 (90,9%)	14 (73,7%)	0,219*
Recidiva	2 (9,1%)	5 (26,3%)	
Sexo y grado máximo de discapacidad			
Grado 1	2 (9,1%)	3 (15,8%)	0,226**
Grado 2	2 (9,1%)	5 (26,3%)	
Ninguno	18 (81,8%)	11 (57,9%)	
Sexo y Leproreacción			
No	21 (95,5%)	14 (73,7%)	0,074**
Tipo 2	0 (0,0%)	4 (21,1%)	
Tipo 3 (Fenómeno de Lucio)	1 (4,5%)	1 (5,3%)	

*Test exacto de Fisher ** Chi Cuadrado de Pearson

Tabla 12. Grado de discapacidad y comparación con otras variables.

	Grado 1 N = 5	Grado 2 N = 7	Ninguno N = 29	Valor p
Grado de discapacidad y reacción Lepromatosa				
No	4 (80,0%)	5 (71,4%)	26 (89,7%)	0,255
Tipo 2	1 (20,0%)	2 (28,6%)	1 (3,4%)	
Tipo 3 (Fenómeno de Lucio)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (6,9%)	
Grado de discapacidad y tipo de caso				
Nuevo	1 (20,0%)	6 (85,7%)	27 (93,1%)	0,000
Recidiva	4 (80,0%)	1 (14,3%)	2 (6,9%)	

FIGURAS

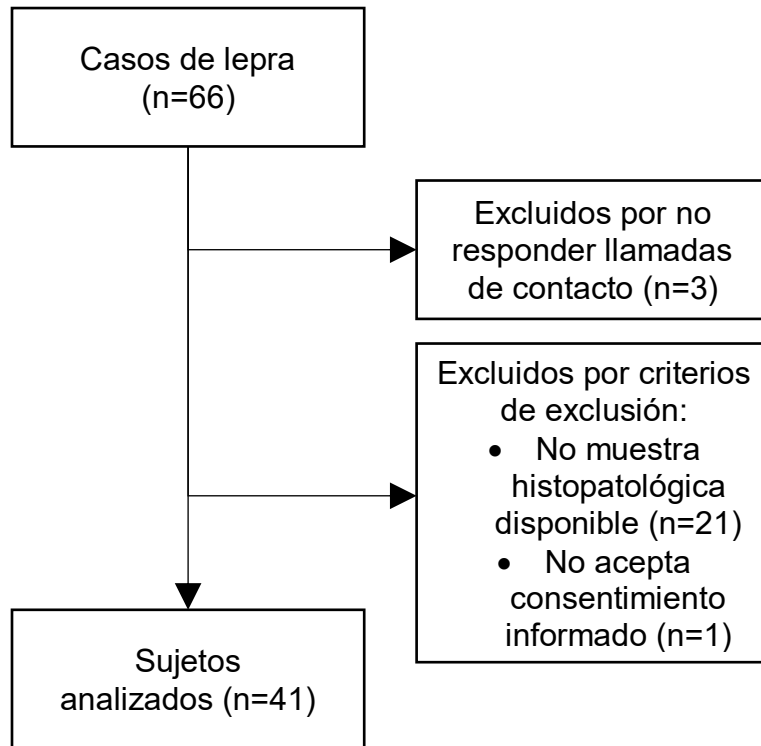


Figura 1. Flujograma de selección de casos para el estudio.

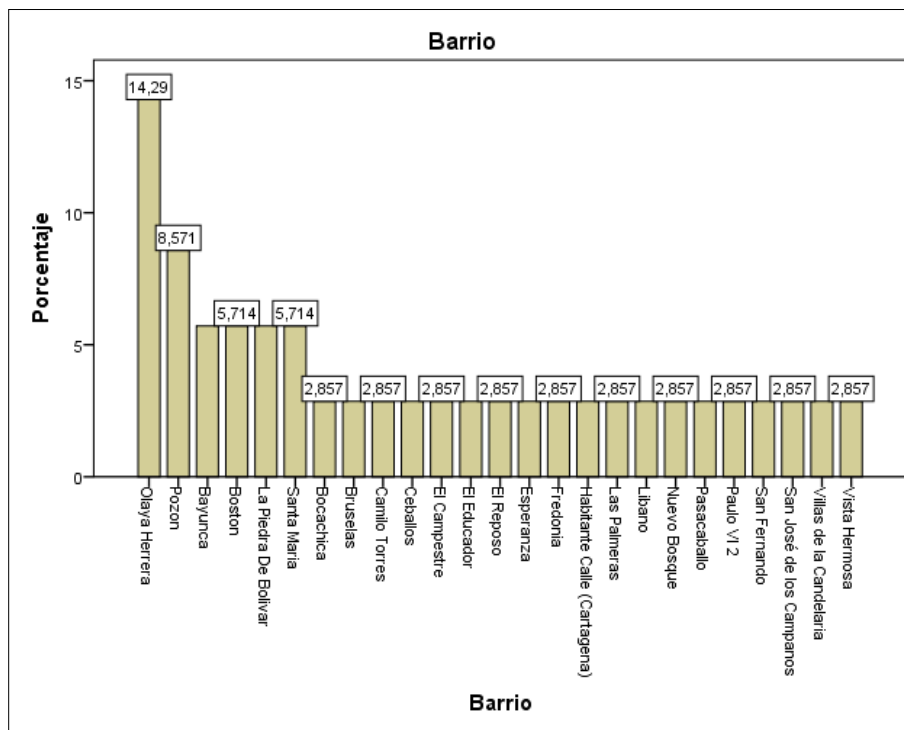


Figura 2. Distribución de los casos de lepra según el barrio.

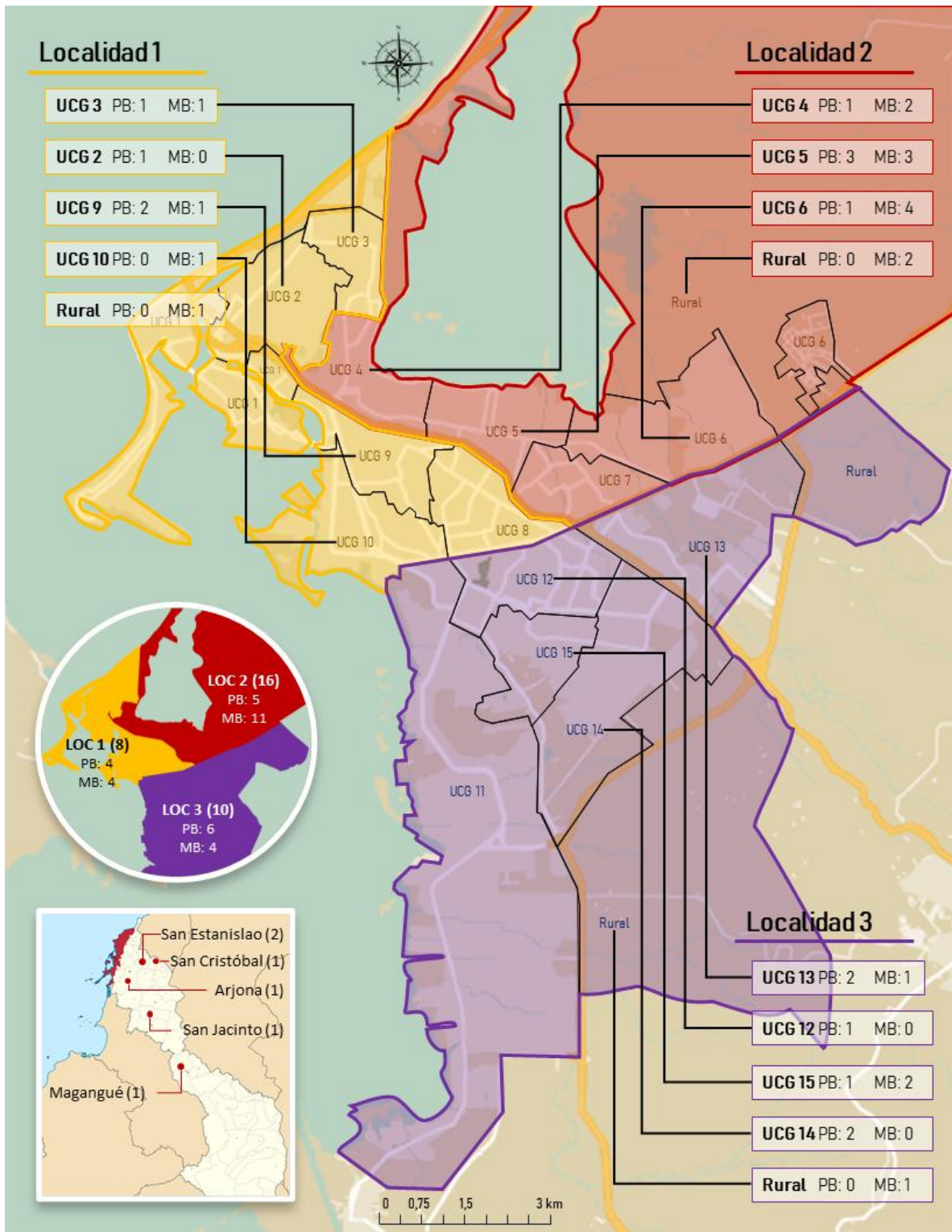


Figura 3. Distribución de casos de lepra según localidad y UCG.

LOC: Localidad; MB: Multibacilar; PB: Paucibacilar; UCG: Unidad Comunera de Gobierno

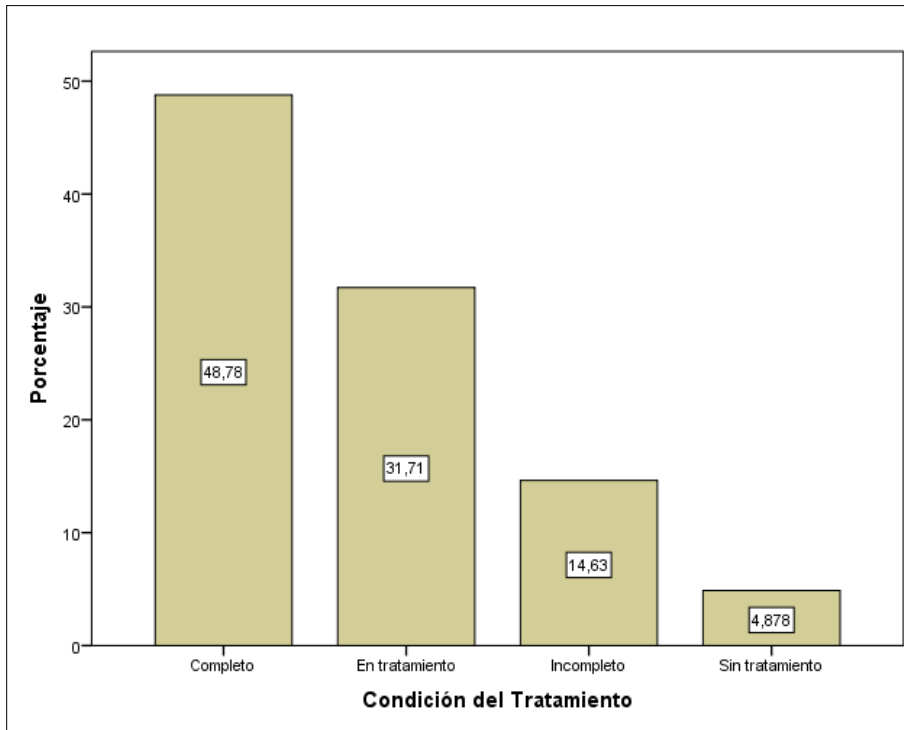


Figura 4. Condición del tratamiento.

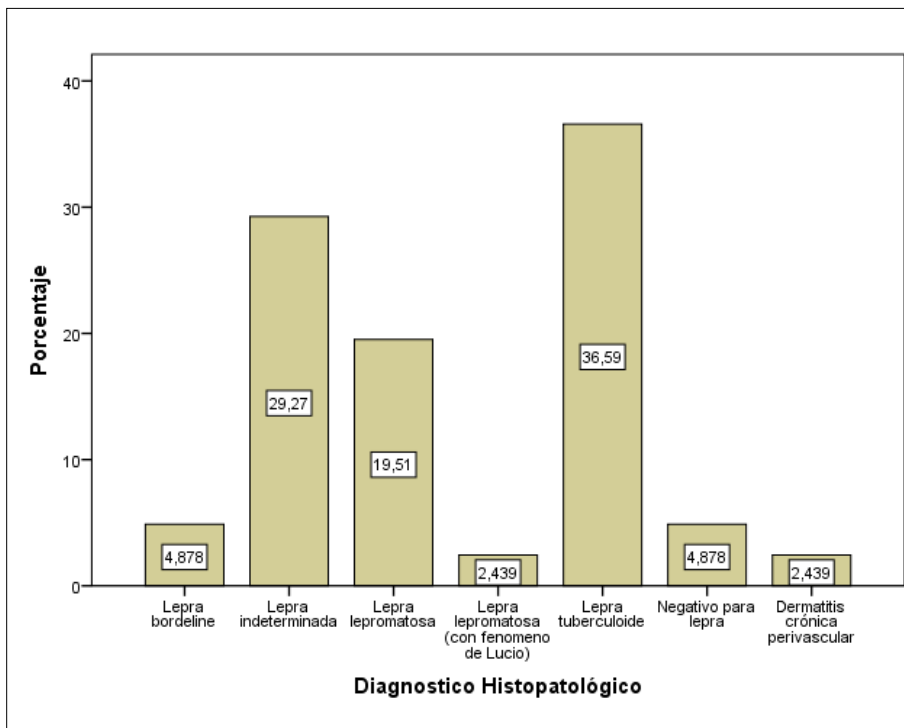


Figura 5. Diagnóstico Histopatológico.

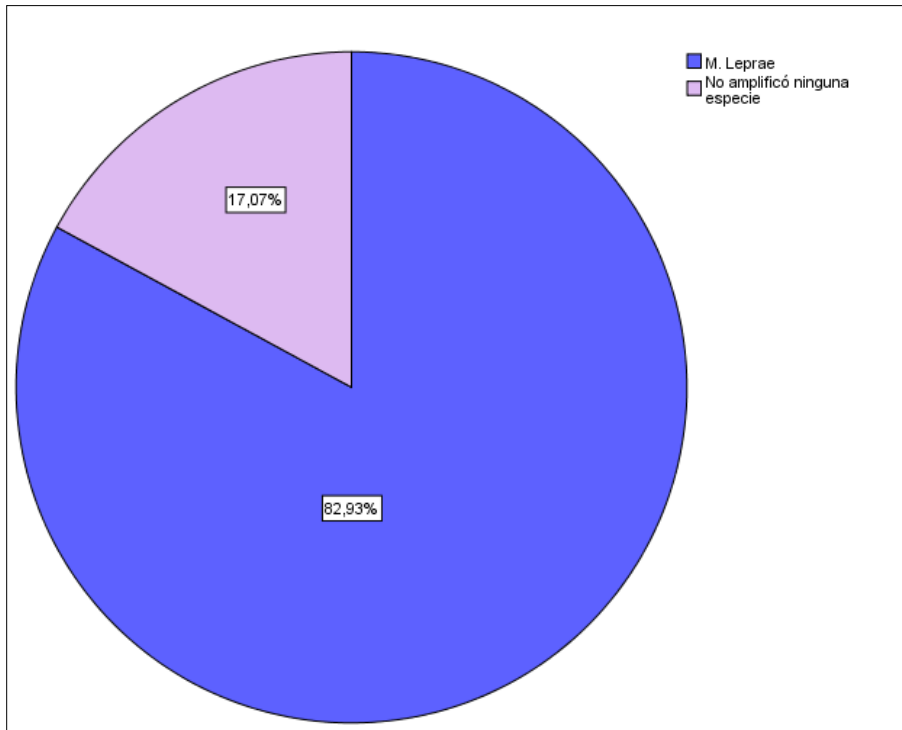


Figura 6. Identificación Molecular de *Mycobacterium spp.*

Carril 1: Marcador de peso molecular

Carril 2: Muestra caso 1, primera ronda de PCR (género *Mycobacterium*).

Carril 3: Muestra caso 1, segunda ronda de PCR (*M. leprae*).

Carril 4: Muestra caso 1, segunda ronda de PCR (*M. lepromatosis*).

Carril 5: Muestra caso 2, primera ronda de PCR (género *Mycobacterium*).

Carril 6: Muestra caso 2, segunda ronda de PCR (*M. leprae*).

Carril 7: Muestra caso 2, segunda ronda de PCR (*M. lepromatosis*).

Carril 8: Control positivo.

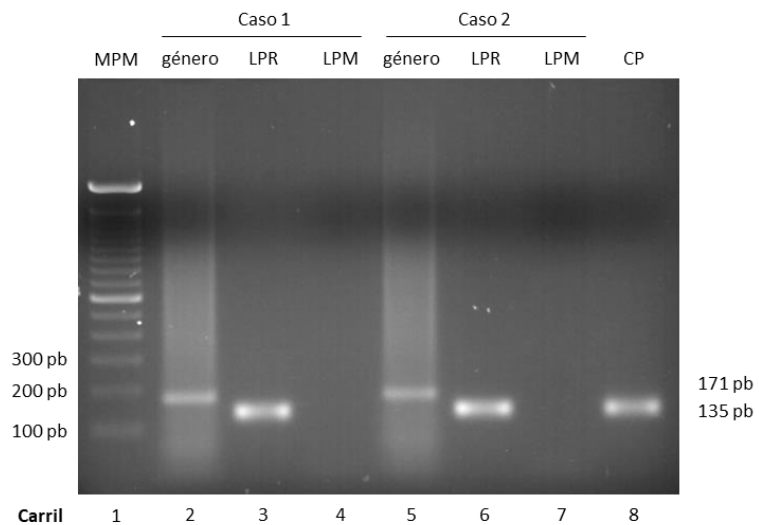


Figura 7. Detección de Molecular *M. leprae*.