



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Identificación molecular de
Mycobacterium leprae y
Mycobacterium lepromatosis en
biopsias de piel, mediante la
detección del elemento repetitivo
RLEP y el gen *hemN***

T E S I S

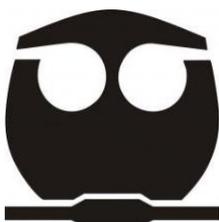
**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

SOFÍA LUCILA LUNA ROJAS

DIRECTOR DE TESIS

DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** María del Pilar Granada Macías

VOCAL: **Profesor:** Alejandro Camacho Cruz

SECRETARIO: **Profesor:** Rigoberto Hernández Castro

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Atziri Corona Romero

2° SUPLENTE: **Profesor:** Luis Ángel Maldonado Manjarrez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, CD. MX.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Rigoberto Hernández Castro



SUSTENTANTE:

Sofía Lucila Luna Rojas



Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt) por el financiamiento de este proyecto.

Contenido

Lista de abreviaturas.....	6
Lista de cuadros.....	7
Lista de figuras.....	7
Resumen	8
1. Introducción.....	9
2. Antecedente	11
2.1. Características generales.....	11
2.2. Genoma de <i>M. leprae</i> y <i>M. lepromatosis</i>	12
2.3. Epidemiología	15
2.3.1. Panorama mundial	15
2.3.2. Panorama continental	18
2.4. Descripción de la enfermedad	18
2.4.1. Hallazgos clínicos generales	18
2.4.2. Clasificación	20
2.4.3. Complicaciones y reacciones agudas.....	24
2.4.4. Transmisión.....	27
2.5 Diagnóstico y métodos de identificación para <i>M. leprae</i> y <i>M. lepromatosis</i> ..	29
2.5.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como técnica de diagnóstico.....	30
2.6 Tratamiento de la enfermedad	32
3. Justificación.....	34
4. Hipótesis.....	35
5. Objetivo general	35
5.1 Objetivos específicos.....	35
6. Material y Métodos.....	36
6.1. Amplificación del fragmento repetido RLEP y el gen <i>hemN</i> mediante la PCR punto final.....	36
6.2. Purificación de DNA	38
6.3. Secuenciación de los productos purificados obtenidos	38
6.4. Clonación de los productos RLEP y <i>hemN</i> purificados.....	39

6.4.1. Elaboración de células competentes por el método del cloruro de calcio	39
6.4.2. Clonación de los productos purificados.....	40
6.4.3. Extracción de plásmidos	41
6.4.4. Digestión del plásmido por medio de la enzima de restricción <i>EcoRI</i> ...	41
6.5. Amplificación del fragmento RLEP y el gen <i>hemN</i> presente en los plásmidos	42
6.6. Determinación de la concentración mínima de detección de DNA para cada especie	43
6.7. Secuenciación de los plásmidos	46
7. Resultados	47
7.1 Amplificación del fragmento repetitivo RLEP y el gen <i>hemN</i> mediante la PCR punto final.....	47
7.2. Clonación de los productos RLEP y <i>hemN</i> en el plásmido pGEM-T Easy ..	49
7.3. Amplificación del fragmento RLEP y el gen <i>hemN</i> de los controles.....	51
7.4. Secuenciación final.....	54
8. Discusión.....	56
9. Conclusiones.....	63
10. Referencias	64

Lista de abreviaturas.

Abreviatura	Significado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
BAAR	Bacilo ácido alcohol resistente
PDIM	Dimicocerosato de tiocerol
PGL-I	Glucolípido fenólico-1
rRNA	Ácido ribonucleico ribosómico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
OMS	Organización Mundial de la Salud
MDT	Multiterapia antibiótica
RJ	Clasificación de Ridley-Jopling (RJ)
TT	Lepra tuberculoide
BT	Lepra <i>borderline</i> -tuberculoide
BB	Lepra <i>borderline-borderline</i>
BL	Lepra <i>borderline</i> -lepromatosa
LL	Lepra lepromatosa
DLL	Lepra lepromatosa difusa
PB	Lepra paucibacilar
MB	Lepra multibacilar
RR	Reacción reversa
T1 R	Reacción de tipo I
ENL	Eritema nodoso leproso
T2 R	Reacción de tipo II
LPh	Fenómeno de Lucio
HLA	Antígeno leucocitario humano
ELISA	Enzimoimmunoanálisis de adsorción
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
LB	Caldo Luria Berthani
BHI	Caldo infusión cerebro corazón
UV	Luz ultravioleta

Lista de cuadros

Número de cuadro	Título	Página
1	Comparación de las características de los genomas entre diferentes especies de <i>Mycobacterium</i>	11
2	Relación entre los aspectos clínicos y biológicos de las dos principales clasificaciones de la lepra.	22
3	Principales características de las complicaciones de la lepra.	24
4	Identificación y procedencia de las biopsias de piel.	34
5	Identificación molecular de RLEP y <i>hemN</i> en las 22 biopsias de piel.	45

Lista de figuras

Número de figura	Título	Página
1	Árbol filogenético de varias especies de <i>Mycobacterium</i> basado en las secuencias de aminoácidos de la proteína RpoB.	12
2	Distribución geográfica de los casos nuevos de lepra reportados en el año 2019.	15
3	Esquema del procedimiento de dilución de ambos controles positivo.	43
4	Amplificación del fragmento repetitivo RLEP.	46
5	Amplificación del gen de <i>hemN</i> .	47
6	Digestión del plásmido pGEM-T Easy con el inserto RLEP por medio de la enzima <i>EcoRI</i> .	48
7	Digestión del plásmido pGEM-T Easy con el inserto <i>hemN</i> por medio de la enzima <i>EcoRI</i> .	49
8	Amplificación del fragmento repetitivo RLEP presente en los plásmidos pGEM-T Easy.	50
9	Amplificación del gen <i>hemN</i> presente en los plásmidos pGEM-T Easy.	51
10	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los aislamientos de <i>M. leprae</i> con el fragmento repetitivo RLEP.	52
11	Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los aislamientos de <i>M. lepromatosis</i> con el gen <i>hemN</i> .	53

Resumen

La lepra es una enfermedad crónica infecciosa causada por las micobacterias *M. leprae* y *M. lepromatosis*. Aunque no es una enfermedad potencialmente letal, es considerada altamente discapacitante e invalidante debido a las deformidades irreversibles que genera. Para su detección, la herramienta de diagnóstico más usada anteriormente era la baciloscopía de biopsias de piel, pero una sus principales limitaciones era el número de bacilos presentes en las muestras que se podía detectar, ya que la cantidad de dichas bacterias no es uniforme e incluso llega a ser inexistente en algunos pacientes, por lo que no representaba una prueba de diagnóstico confiable. Ante este problema, se introdujo el empleo de técnicas moleculares, como la PCR, que poseen una alta sensibilidad y especificidad para la identificación oportuna y correcta de ambas bacterias.

En el presente trabajo se realizó la identificación las micobacterias *M. leprae* y *M. lepromatosis* en biopsias de piel de 22 pacientes de distintos países de América Latina. Para ello, se llevó a cabo la amplificación del fragmento repetitivo RLEP presente en *M. leprae* y el gen *hemN* contenido en *M. lepromatosis* empleando la técnica de la PCR punto final. Con esta técnica se logró identificar al 50% del total de las muestras, y se encontró que 4 biopsias contenían a la especie *M. lepromatosis*, otras 4 presentaban una infección mixta por ambas micobacterias y las 3 biopsias restante únicamente poseían a la especie *M. leprae*. Posteriormente, los productos de amplificación obtenidos fueron secuenciados, y clonados en el plásmido pGEM-T Easy con el fin de generar controles positivos de ambos materiales genéticos para su posterior uso y estudio. Con estos resultados se demostró que la especie con mayor frecuencia fue *M. lepromatosis*, y además dicha especie se identificó por primera vez en pacientes de la República Dominicana. Adicionalmente, este es el primer trabajo en donde se reporta la clonación de ambos materiales genéticos como una solución para satisfacer la necesidad de contar con estándares de referencia para las pruebas de PCR.

1. Introducción

La lepra, también denominada la enfermedad de Hansen, ha sido descrita como la enfermedad más antigua conocida por el hombre^{16, 17, 38, 84} que a pesar del desarrollo de las herramientas de diagnóstico y tratamiento continúa siendo un problema de salud a nivel mundial¹⁰⁶. Si bien, hoy en día el número de casos nuevos anuales reportados presenta un mayor control que hace cincuenta años⁷⁸, las migraciones poblacionales (incluyendo el turismo) propician su distribución a prácticamente todos los países del mundo. Además, las áreas de endemidad de la lepra continúan presentando factores sociales y culturales que impiden su erradicación, tales como la pobreza y la desigualdad estructural¹⁰⁶. Ejemplo de esto es la Región de las Américas, la cual hasta finales del año 2018, fue registrada como el segundo lugar donde se reportó la mayor prevalencia y el mayor aumento de los casos nuevos identificados de la enfermedad, los cuales se concentraron en: 1) Brasil (el segundo país con más casos de lepra al año), 2) Paraguay, 3) Colombia, 4) Argentina y 5) Venezuela¹¹⁰, países que generalmente presentan flujos de migración intrarregionales importantes que se intensifican año con año²⁶, o bien, poseen destinos turísticos atractivos que indirectamente facilitan la transmisión internacional de la lepra.

De manera general, podemos definir a la lepra como una enfermedad granulomatosa infecciosa crónica^{32, 34, 51}, causada por las bacterias *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) y *Mycobacterium lepromatosis* (*M. lepromatosis*)^{46, 51}, las cuales causa afecciones principalmente en la piel, la mucosa de las vías respiratorias superiores, los nervios periféricos y los ojos^{27, 55, 59, 103, 106}, mismas que en un inicio

suelen pasar desapercibidas por los pacientes, pero eventualmente evolucionan a cuadros más severos aunque raramente mortales.

La evolución, la severidad y la forma clínica que va a presentar cada paciente, está influenciada por el estado inmunológico del hospedero y la(s) micobacteria(s) causante(s) de la infección^{25, 38, 78}. Generalmente, el desequilibrio o el deterioro inmunológico así como las exacerbaciones de la respuesta inflamatoria del paciente son los causantes de las complicaciones propias de la lepra, las cuales provocan el daño neurológico permanente en los nervios periféricos (lo que culmina en una discapacidad) o conducen al fallecimiento de la persona^{28, 68}.

Actualmente, la situación de la lepra ya no es prioritaria para la Organización Mundial de la Salud¹⁰⁸, pero a pesar de poseer un tratamiento que llevado a cabo de manera oportuna y adecuada logra curar a los pacientes, sigue siendo considerada como una de las enfermedades más temidas y más estigmatizadas por las personas, debido a las deformaciones irreversibles que se generan principalmente en el cartílago y extremidades³⁴.

2. Antecedente

2.1. Características generales

Los agentes etiológicos causantes de la lepra son las bacterias *M. leprae* y *M. lepromatosis*, ambas son bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR), consideradas Gram (+), que fueron descritas en los años 1873 (por G. Hansen) y 2008 (por X. Han *et. al*) respectivamente^{32, 46, 50, 51}.

Estas micobacterias taxonómicamente pertenecen al grupo de los actinomicetos, de la familia *Mycobacteriaceae*. Morfológicamente las identificamos bacilos ligeramente curvos, de un tamaño entre 1 a 8 μm de longitud por un diámetro de 0.3 μm en promedio, no son móviles ni esporulados, no presentan cápsula, su replicación es por fisión binaria, y son capaces de formar agrupaciones denominadas globis cuando se encuentran dentro de sus células blanco^{32, 34, 46, 86}.

Son organismos intracelulares obligados, que tienen tropismo por las células del sistema reticuloendotelial (específicamente los macrófagos) y las células de Schwann de los nervios periféricos, además presentan un largo periodo de replicación, el cual tarda en promedio de 11 a 14 días^{78, 86} lo que en conjunto, dificulta su cultivo *in vitro* el cual hasta la fecha no ha tenido éxito, únicamente se le han logrado replicar en los cojinetes de las patas de los armadillos y hembras de ratones Swiss^{16, 32, 65}.

La estructura de la pared celular de estas micobacterias es muy similar a la de *M. tuberculosis*, básicamente presentan los mismos componentes, pero en cantidades ligeramente diferentes¹⁴. Entre los lípidos principales que componen la pared celular resaltan el dimicocerosato de tiocerol (PDIM) y el glucolípido fenólico-1 (PGL-I),

ambos son blanco de las inmunoglobulinas M durante la respuesta humoral e inhiben la capacidad bactericida de los macrófagos favoreciendo la infección. Además, poseen una capa del lipoarabinomanano, cuya importancia recae en ser el antígeno de los macrófagos (lo que explica su predilección por estas células) y a su vez modula la actividad bactericida dentro de estos^{16, 34, 53, 55, 94}.

2.2. Genoma de *M. leprae* y *M. lepromatosis*

La investigación del genoma en ambas especies de micobacterias ha revelado diferencias significativas dentro del género *Mycobacterium*, y a su vez ha contribuido a la comprensión de la variabilidad clínica, filogenia, patogenia y distribución geográfica de la lepra. De la misma manera, ha permitido el desarrollo de mejores herramientas de diagnóstico, epidemiología molecular y tratamiento de la enfermedad^{50, 91, 106}.

Los diversos estudios que se han elaborado en la última década han reportado que los genomas de *M. leprae* y *M. lepromatosis* contienen 3.26 megabases (Mb) y 3.21 (Mb) respectivamente, lo que los convierte en los genomas más pequeños y estables de su género (Cuadro 1)^{12, 45, 50}. Además, se observó que muchos de los genes funcionales en otras micobacterias se encuentran silenciados o como pseudogenes, principalmente aquellos encargados de funciones metabólicas y la división extracelular, lo que explica su largo periodo de incubación y que sea una bacteria intracelular obligada³⁴.

Cuadro 1. Comparación de las características de los genomas entre diferentes especies de <i>Mycobacterium</i>						
Características	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>M. avium</i> K-10	<i>M. marinum</i> E11	<i>M. ulcerans</i>	<i>M. leprae</i>	<i>M. lepromatosis</i>
Tamaño del genoma (Mb)	4.41	4.83	6.34	5.63	3.26	3.21
GC%	65.6	69.3	65.8	65.5	57.8	57.9
Genes	4 008	4 546	5 326	5 255	2 875	2 857
Pseudogenes	30	183	162	1 370	812	742

Hoy en día, debido a la secuenciación de sus genomas, tenemos conocimiento de que ambas especies comparten similitudes genómicas, entre las cuales resaltan la degeneración del gen *mmaA3* a pseudogen, la presencia de secuencias insertadas únicas ricas en AT en el gen 16S rRNA, el porcentaje GC y las repeticiones en tándem idénticas de seis bases en *rpoT*^{50, 56}. Dichas similitudes sugirieron que la especie *M. lepromatosis* era el resultado de la evolución de *M. leprae*, pero el análisis de 20 genes y pseudogenes presentes en *M. lepromatosis* demostró que posee una diferencia global de nucleótidos de 9.1% con respecto a *M. leprae*, dicho de otra manera, una identidad de nucleótidos de 90.9% (93.1% para los genes codificadores y 79.1% para los pseudogenes)^{45, 50}, evidenciando una divergencia a nivel especie de un mismo antepasado común (Figura 1)^{91, 92}.

Además, se observó que ambas bacterias presentan un genoma constituido en general por 40% pseudogenes y 50% genes compartidos con el último ancestro común, por lo que las investigaciones sugieren que la divergencia que tuvieron fue aproximadamente hace 10 millones de años, y posiblemente se llevó a cabo en el mismo espacio y tiempo que la evolución humana, ocasionando que en algún punto estos bacilos utilizaran a los homínidos como sus hospederos^{45, 47}, y dicho evento

fue la causa de la inactivación genética masiva, lo que las hizo dependientes de su forma parasitaria^{47, 45, 50}.

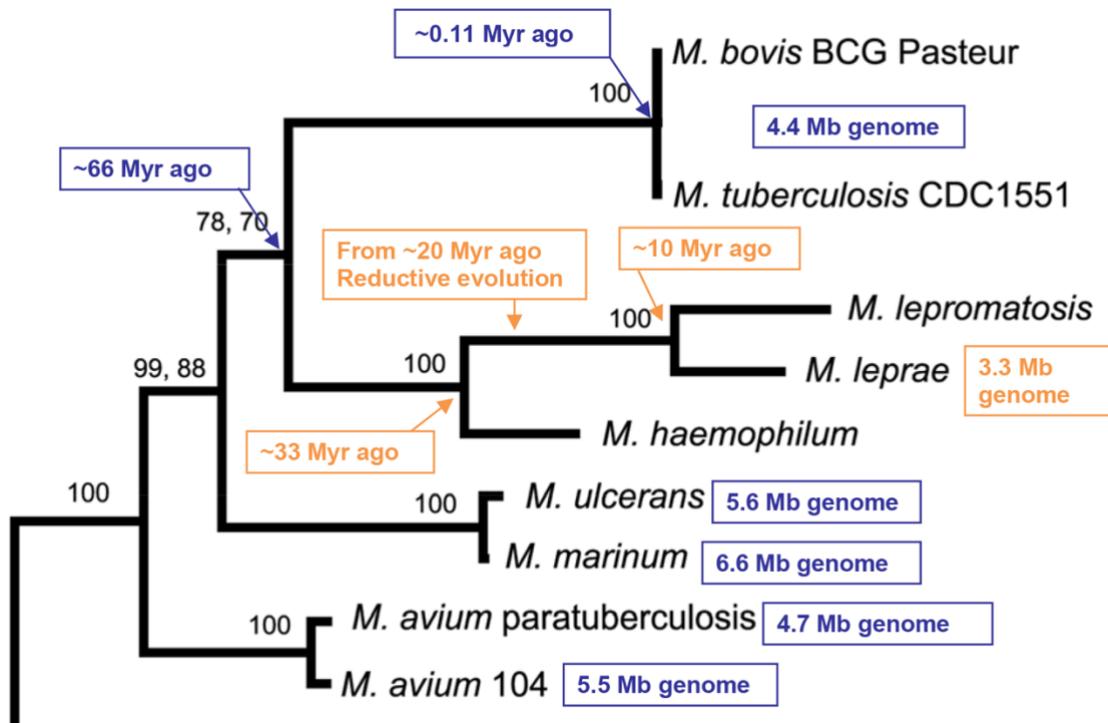


Figura 1. Árbol filogenético de varias especies de *Mycobacterium* basado en las secuencias de aminoácidos de la proteína RpoB. Han XY, Silva FJ. (2014).

El conocimiento de sus características genómicas también permitió la identificación de genes de virulencia que codifican y regulan la actividad de los factores encargados del desarrollo de la patogénesis de la enfermedad, la actividad metabólica de las bacterias y los genes diana que actualmente se utilizan para el desarrollo de las técnicas moleculares que permiten la identificación y diferenciación de ambas especies⁷¹.

2.3. Epidemiología

2.3.1. Panorama mundial

En el año 1953 el Comité de Expertos en Lepra creado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), reportó que existía un total de 10,786,000 casos de lepra a nivel mundial⁷⁸. Ante este problema se implementó el uso de la multiterapia antibiótica (MDT), lo que contribuyó a reducir drásticamente la incidencia de la enfermedad, y para principios de los 90's únicamente se tenían registro de 5.5 millones de pacientes con esta condición^{78, 84}. Para disminuir más la prevalencia de la enfermedad en el año 1990 la OMS propuso la "Estrategia Final" para erradicar a la lepra a nivel mundial, y en el año 2000 la implementó, estableciendo una meta de 1 caso de lepra por cada 10,000 habitantes. Su objetivo, fue buscar la destinación de mayor cantidad de recursos a las acciones básicas del plan, las cuales consistían en la detección oportuna de casos a nivel regional y nacional y el ampliamiento de la cobertura del tratamiento multimedicamentoso. Gracias al apoyo político de cada país que participó, la meta fue alcanzada⁶.

Aunque se logró bajar la incidencia de casos nuevos en todo el mundo, durante el año 2019 un total de 113 países reportaron casos a la OMS (Figura 2), dando un total de 205,185 casos nuevos a nivel mundial, concentrándose el mayor número de ellos en: 1) India, 2) Brasil, 3) Indonesia, 4) Nepal, 5) Bangladesh, 6) Etiopía, 7) República Democrática del Congo, 8) Myanmar, 9) Somalia y 10) Nigeria¹¹⁰.

Actualmente la lepra sigue presentando una distribución mundial y continúa la existencia de las zonas endémicas, generalmente ubicadas en países tropicales, subtropicales y/o en vías de desarrollo, debido a la notable diferencia en las

comunidades rurales (y en algunos casos urbanas), el estado socioeconómico y la inaccesibilidad a centros de salud (entre otros factores) en comparación con países desarrollados^{57, 59, 84}.

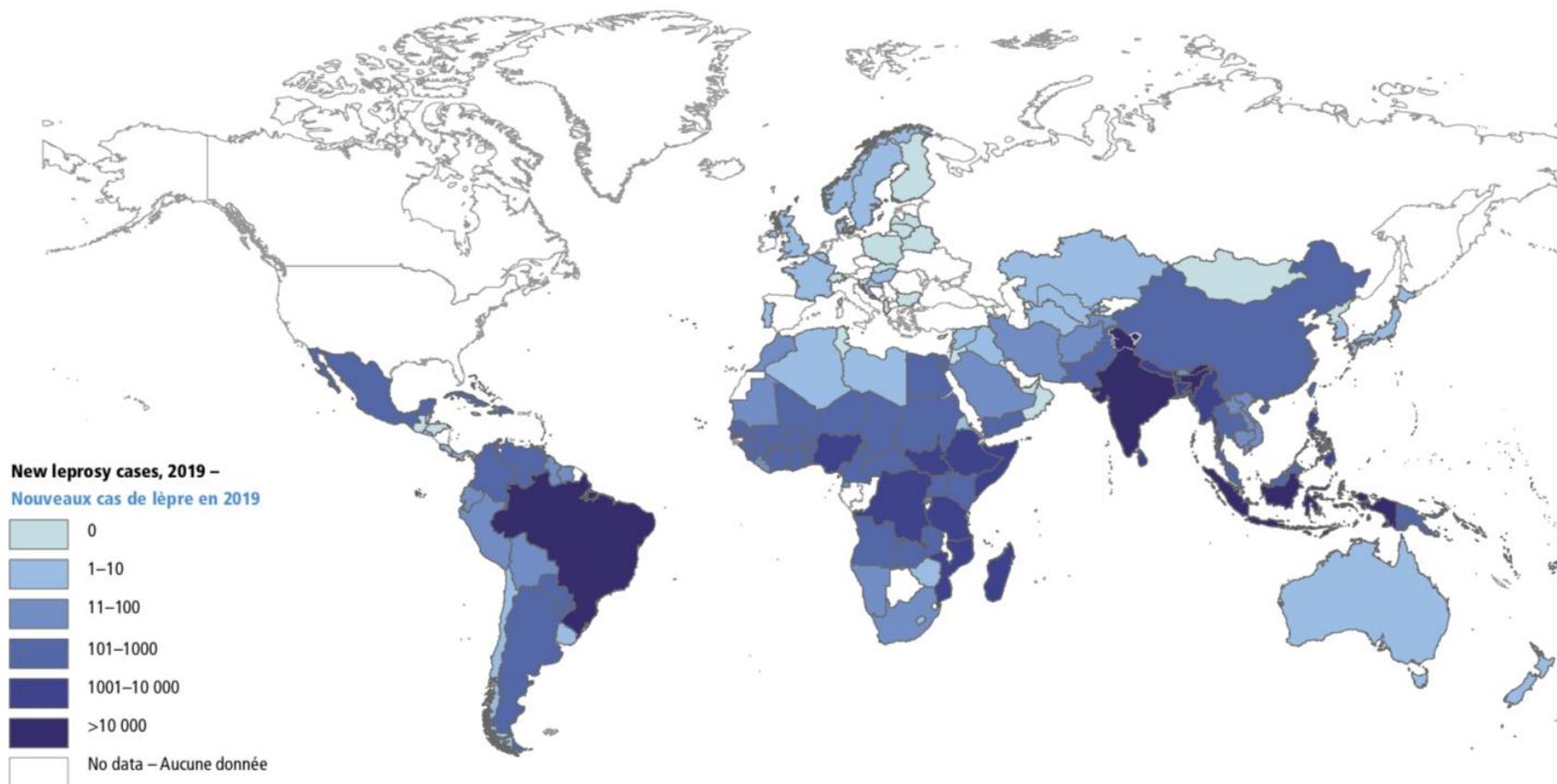


Figura 2. Distribución geográfica de los casos nuevos de lepra reportados en el año 2019. Weekly epidemiological record. (2020).

2.3.2. Panorama continental

El continente americano sigue considerándose una región endémica de lepra y durante el año 2019 se reportó un total de 29,936 casos nuevos diagnosticados, de los cuales el 93.07% de ellos se concentran en Brasil, el 5.79% en los siguientes 7 países: 1) Paraguay, 2) Colombia, 3) Venezuela, 4) Argentina, 5) Cuba, 6) México y 7) República Dominicana, y el resto del porcentaje en los demás países de la región¹¹⁰.

En México, el número de casos nuevos reportados ha disminuido en un 99.18% entre los años 1989 y 2018, al pasar de 16,694 a 136, la Secretaría de Salud reporta que existen 21 estados con incidencia de lepra, pero el 60% de la prevalencia nacional se concentra en: 1) Sinaloa, 2) Michoacán, 3) Nuevo León, 4) Guerrero y 5) Nayarit^{87, 110}.

2.4. Descripción de la enfermedad

2.4.1. Hallazgos clínicos generales

La lepra provoca afecciones en la piel, la mucosa de las vías respiratorias superiores, el sistema nervioso periférico y los ojos, aunque en casos avanzados está delimitación se pierde y se habla de un compromiso sistémico.

a) Afecciones en la piel

En etapas iniciales se presentan máculas hipopigmentadas, eritematosas o lesiones cutáneas similares a mixedemas especialmente en las manos y la cara^{55, 103}. En algunos casos se observan zonas alopecias con la piel tensa y lisa, y la mayoría de los pacientes pierden las cejas y las pestañas^{25, 27}. A medida que la enfermedad progresa, las lesiones comienzan a presentar telangiectasias que aparecen en el

tronco y la cara, la piel se pliega, se vuelve más delgada y atrofica, lo que da la apariencia de un envejecimiento prematuro^{55, 103}. Cuando se llega a una etapa avanzada, las manifestaciones clínicas son más severas e incluso pueden incluir la necrosis de la piel^{13, 25, 103}.

b) Afecciones de la mucosa

La zona más afectada es la mucosa nasal. Al inicio los pacientes experimentan rinitis, pero a medida que la enfermedad progresa la mucosa nasal se inflama, se reseca y se llena de costras, lo que conlleva a presentar secreción nasal, epistaxis e incluso obstrucción. En etapas avanzadas, la mucosa se ulcera y se perfora el tabique, lo que deforma la nariz, dando lugar a lo que medicamente se denomina “nariz torcida” o “ensillada”, y dependiendo de la severidad del caso, la laringe puede resultar afectada, lo que ocasiona disfonía en el paciente^{55, 103}.

c) Afecciones del sistema nervioso periférico

La enfermedad de Hansen se considera altamente discapacitante y deformante debido al daño nervioso que genera, el cual va a depender de la forma clínica de la lepra y la etapa de progresión de esta. De manera general, estas micobacterias poseen la capacidad de afectar la función sensorial, motora y autónoma de los nervios periféricos^{59, 103}. En etapas tempranas la mayoría de los pacientes presentan pérdida de la sensibilidad, debido a la inflamación y engrosamiento de los nervios periféricos, dicha afección suele comenzar en el nervio tibial posterior, es decir, los pacientes presentan anestesia en las plantas de los pies, pero si la enfermedad progresa, puede observarse afectando a los nervios cubital, mediano, poplíteo lateral y facial^{55, 59, 103}.

d) Afecciones oculares

Es raro observar complicaciones en pacientes que cursan etapas tempranas o formas no tan agresivas de lepra. Los problemas suelen presentarse en las formas lepromatosas difusas, produciendo madarosis, un brillo excesivo en los ojos, engrosamiento corneal y nódulos en los casos más severos⁵⁵. Además, se ha reportado que aproximadamente el 5.3% de los pacientes van a presentar ceguera, esto es igualmente causado por el daño nervioso o bien por la invasión de los bacilos a la piel cercana o al ojo mismo^{27, 103}.

2.4.2. Clasificación

Se ha mencionado anteriormente que la lepra presenta varias formas clínicas, determinadas principalmente por el estado inmunológico del paciente, y por ello se clasifica de distintas maneras.

a) Clasificación de Ridley-Jopling (RJ)

El principal sistema de clasificación se denomina Ridley-Jopling y se basa en las manifestaciones clínicas presentes, este sistema agrupa a la lepra en 5 grupos: 1) lepra tuberculoide (TT o polo tuberculoide), 2) lepra *borderline*-tuberculoide (BT), 3) lepra intermedia o *borderline-borderline* (BB), 4) lepra *borderline*-lepromatosa (BL) o 5) lepra lepromatosa (LL o polo lepromatoso)^{34, 79}.

a. Forma tuberculoide

Aquí las manifestaciones clínicas consisten en escasas máculas anestésicas (indoloras) hipopigmentadas bien definidas, los bordes de dichas lesiones están elevados y eritematosos con los centros atróficos, que pueden dar una apariencia anular, además presentan una distribución unilateral y ocurren predominantemente

en las extremidades^{38, 79}. Esta forma es poco perjudicial para los nervios periféricos y rara vez existe la pérdida de la sensibilidad, pero se asocia con el desarrollo de la anhidrosis y la pérdida de estructuras anexiales. Generalmente se observa en pacientes inmunocompetentes, por lo que las lesiones no suelen ser grandes ni numerosas, e incluso pueden presentar una resolución “espontánea”, por lo cual se le considera una forma autolimitada y poco contagiosa^{34, 38, 78}.

b. Formas intermedias o dimorfas

Frecuentemente, todos los casos dimorfos o *borderline* se presentan en las etapas tempranas de la enfermedad, pero sin el tratamiento oportuno eventualmente evolucionan a alguno de los dos polos^{34, 38}. En general, las lesiones presentadas son maculares e hipocrómicas, sin embargo, cada una de las tres formas dimorfas quedan definidas y delimitadas por varios signos clínicos compatibles con las lesiones tuberculoides o lepromatosas³⁸. En la presentación de lepra tuberculoides límite (BT) se observa la presencia de varias lesiones de gran tamaño (2 a 20 cm) asimétricas e hipoestésicas con partículas periféricas o infiltración de la piel^{3, 78, 79}. La presentación intermedia (BB) se define por el aumento en el número de lesiones anulares no anestésicas con bordes indistintos^{34, 38, 79}, y por último la forma lepromatosa límite (BL) presenta más de diez lepromas, con placas eritematosas y escamosas que pueden ser circulares o anulares, bilaterales y no anestésicas^{34, 29, 78, 79}. La duración de esta etapa es muy variada ya que depende del paciente, pero tiene un intervalo de tiempo de pocos meses hasta 5 años, y el síntoma con el cual se establece un cambio a una etapa más avanzada es la pérdida de la sensibilidad³⁸.

c. Forma lepromatosa

Es la presentación más agresiva de la enfermedad, la más contagiosa y la que conduce a las deformidades típicas de la lepra y sus complicaciones³⁸. A diferencia de la forma tuberculoide, las lesiones tienen una distribución bilateral, son simétricas y dolorosas. Medicamente se les denomina lepromas, y tienen apariencia de pápulas o nodulos de color rojo-marrón en la piel y en las mucosas^{25, 34, 38, 79}. Aunque pueden aparecer en todo el cuerpo tienen preferencia por la cara, los lóbulos de las orejas y los dedos de las manos y los pies. En casos avanzados, estos lepromas dan lugar a las deformaciones características de la lepra denominadas *facies leonina*, *madarosis* (pérdida total o parcial de pestañas y cejas) y la *nariz ensillada*^{25, 34}. A diferencia de la forma tuberculoide, este polo genera un daño severo a los nervios periféricos y al igual que los lepromas, es un daño bilateral, difuso y simétrico, que afecta tanto a nervios sensoriales como motores dependiendo de la etapa de la enfermedad^{8, 34, 78, 79}.

Ambas especies de lepra son capaces de generar las 5 formas, pero *M. lepromatosis* o la infección dual de *M. lepromatosis* y *M. leprae* son las que se relacionan más frecuentemente con la forma lepromatosa, así como con su complicación más severa denominada lepra lepromatosa difusa (DLL)^{25, 56, 92}.

b) Clasificación OMS

Existe otra clasificación más reciente adoptada por la OMS que hace más sencilla la elección del tratamiento^{78, 109}, esta se basa en los hallazgos clínicos de los pacientes y el índice bacteriológico^{41, 109}.

La primera forma se denomina lepra paucibacilar (PB), los pacientes presentan menos de cinco lesiones cutáneas (las cuales pueden sanar “espontáneamente” o no)³⁴. Al observar los frotis cutáneos se observan relativamente pocos bacilos, o más estrictamente, un índice bacteriológico menor o igual a 1, el cual se calcula contando de 6 a 8 frotis y expresando el resultado en escala logarítmica del 1 al 6+^{34, 41, 109}. Debido a esto, se determina que el paciente se encuentra inmunocompetente, y por lo mismo esta forma se relaciona con los casos de lepra tuberculoide^{38, 58}. La segunda forma de esta clasificación se denomina lepra multibacilar (MB), en la cual los pacientes presentan cinco o más lesiones cutáneas, que generalmente son rugosas y nodulares, y sus frotis cutáneos presentan una carga bacilar alta, o mayor o igual a 2^{34, 41, 109}. A diferencia de la lepra paucibacilar, los pacientes se encuentran en un estado inmunodeprimido, y debido a esto, la presentación clínica más observada en estos casos es la lepra lepromatosa^{34, 38, 58, 78}.

La relación entre ambas clasificaciones se resume en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Relación entre los aspectos clínicos y biológicos de las dos principales clasificaciones de la lepra.

Criterio	Características				
	Hallazgos clínicos	Escasas máculas indoloras hipopigmentadas bien definidas con apariencia anular, con distribución unilateral y predominio en extremidades. Escaso daño nervioso.		Máculas hipocrómicas. Inicio de la enfermedad. Sin daño nervioso.	Presencia de lepromas en piel y mucosas, dolorosas, distribución bilateral, predominio en cara, extremidades y lóbulos de las orejas. Daño nervioso severo. Defomaciones y complicaciones.
Clasificación RJ	TT	BT	BB	BL	LL
Clasificación OMS	Paucibacilar		Multibacilar		
Análisis microscópico	Sin presencia del bacilo o $BI \leq 1$		Presencia del bacilo o $BI \geq 2$		
Transmisión	Poco contagiosa		Contagiosa		
Estado inmunológico	Competente		Deprimido		
Agente etiológico más reportado	<i>M.leprae</i> y <i>M. lepromatosis</i> .		<i>M.leprae</i> y <i>M. lepromatosis</i> .	<i>M. lepromatosis</i> , infección dual.	

2.4.3. Complicaciones y reacciones agudas

En general, el desarrollo de la lepra está basado en el patrón de la respuesta inmunológica montada por el paciente en contra de las micobacterias¹¹¹, y por lo mismo, el deterioro del equilibrio inmunológico y las exacerbaciones inflamatorias propician complicaciones de la lepra, las cuales son la principal causa del daño neurológico permanente y en ocasiones el fallecimiento de la persona, por lo que actualmente se les considera una emergencia médica^{28, 34, 38, 68, 103}. En promedio, entre un 30% y 50% de los pacientes desarrollan este tipo de afecciones las cuales se pueden presentar durante el curso de la enfermedad o durante el tratamiento^{28, 38, 58} y, a la fecha, dichas complicaciones se dividen en tres tipos: 1) reacción reversa

(RR), reacción de reversión o reacción de tipo I (T1 R)^{78, 80, 104}, 2) eritema nodoso leproso (ENL) o reacción de tipo II (T2 R)^{24, 28, 70, 72, 73, 80} y 3) fenómeno de Lucio (LPh) o reacción de tipo III^{13, 29, 57, 50} (Cuadro 3).

Cuadro 3. Principales características de las complicaciones de la lepra.

Nombre	Formas clínicas en las que se presenta	Manifestaciones cutáneas	Otras afecciones	Periodo en el que se presenta
Reacción de reversión (RR)	Lepra tuberculoide, <i>borderline-tuberculoide</i> o <i>borderline-borderline</i> .	Exacerbación de las lesiones cutáneas, eritemas y edemas en cara y extremidades y aparición de máculas.	Engrosamiento de los nervios periféricos, neuralgia, neuritis, pérdida de la función motora y sensorial. Hipersensibilidad tipo IV.	Cambios hormonales, mujeres embarazadas o en puerperio, al inicio del tratamiento, cuando se interrumpe el tratamiento.
Eritema nodoso leproso (ENL)	Lepra lepromatosa o formas intermedias, especialmente formas multibacilares.	Nódulos eritematosos subcutáneos dolorosos que se ulceran con facilidad en la cara y las extremidades.	Síntomas sistémicos, afecta a cualquier tejido que contenga los antígenos de las micobacterias. Iridociclitis (inflamación del iris), epididimoorquitis, linfadenitis y hepatoesplenomegalia. Hipersensibilidad tipo III.	Durante el tratamiento (puede reaparecer varias veces).
Fenómeno de Lucio (LPh)	Lepra lepromatosa o lepromatosa- <i>borderline</i>	Aparición de eritemas, parches o máculas púrpuras que evolucionan a lesiones hemorrágicas con desprendimiento necrótico.	Vasculopatía necrosante con trombosis de vasos sanguíneos pequeños. Potencialmente mortal. Fiebre, vómito y madarosis.	Durante el tratamiento o entre 1 y 3 años después de las primeras manifestaciones de la enfermedad.

2.4.4. Transmisión

Uno de los aspectos que le es más preocupante a la población es la transmisión de la enfermedad. Actualmente se sabe que la mayoría de las personas que se encuentran expuestas a la lepra no la contraen, esto debido a que la transmisión tiene como factores importantes el contacto estrecho y prolongado entre los pacientes (no tratados) y las personas sanas susceptibles^{15, 37}, la presentación clínica de la enfermedad (siendo la lepra lepromatosa la más contagiosa), la carga bacilar del paciente, la dieta de la persona³³ y la genética del hospedero²¹.

Aunque la ruta no ha sido completamente descrita todavía²² las principales formas de adquirir la infección son:

- Flügen o secreciones nasales (especialmente cuando una paciente tose o estornuda). Se considera la ruta principal^{77, 93}.
- Contacto directo con las heridas (úlceras) de los pacientes¹⁵.
- Madres lactantes con enfermedad activa (no tratadas)⁵⁸.
- Fomites¹⁵.
- Contacto con animales portadores⁸⁹ (enfermedad zoonótica).

En los última década han existido reportes de personas que han adquirido lepra debido a su contacto directo con armadillos infectados (especialmente la especie denominada “armadillo de nueve bandas” o *Dasypus novemcinctus*) en actividades como la caza o el consumo de su carne^{21, 69, 89}, Avanzi *et al.* reportaron la presencia de *M. leprae* en ardillas rojas en la isla Brownsea en Dorset y *M. lepromatosis* también en ardillas rojas pero en la Isla de Wirght, Escocia e Irlanda^{5, 85} pero, hasta

el momento no se han emitido casos de personas que hayan adquirido lepra vía zoonótica por estos animales.

Otros posibles portadores que se estudian recientemente son las amebas de vida libre, ya que en general las micobacterias poseen mecanismos para replicarse dentro de estas, especialmente en los géneros *Hartmannella*, *Echinamoeba*, *Acanthamoeba* y *Naegleria*⁸³. Aunque ninguna de las dos especies causantes de lepra es capaz de replicarse dentro de las amebas, se ha observado que pueden permanecer viables dentro de ellas o en los quistes por 72 horas, y son capaces de transmitirse a los humanos, por lo que empiezan a ser consideradas como reservorios naturales¹⁰⁵.

Pese a que la lepra se ha considerado una enfermedad altamente contagiosa, hoy en día disponemos la evidencia de que la infección se ve mediada por polimorfismos genéticos de los individuos^{22, 45, 75}, es decir, la mayoría de las personas ya no son susceptibles a ellas. Los genes exactos todavía se desconocen, pero se ha identificado que un conjunto de genes en el sistema de antígeno leucocitario humano (HLA) son los principales implicados en la susceptibilidad y la presentación clínica, especialmente: 1) HLA-II², 2) MICA y MICB, 3) TNFA y 4) LTA^{30, 37}. Adicionales a estos se han asociado regiones cromosómicas y más genes no vinculados con el HLA que también son responsables de la vulnerabilidad a la enfermedad; estos son 1) IL-10, 2) NRAMP1, 3) PARK2/PACRG, 4) VDR, 5) región cromosómica 10p13 y 20p12, 6) región cromosómica 6q25-q27 y 7) región cromosómica 17q11-q21^{59, 74, 75}.

2.5 Diagnóstico y métodos de identificación para *M. leprae* y *M. lepromatosis*

El diagnóstico inicial se orienta con los 3 signos cardinales específicos establecidos la OMS, los cuales se basan en la observación del paciente. Para establecer una sospecha de lepra el individuo implicado debe presentar al menos uno de los siguientes signos^{58, 67, 109}.

- Máculas o lesiones eritematosas o hipopigmentadas con pérdida sensorial.
- Compromiso de los nervios periféricos (que puede verse reflejado como engrosamiento y/o pérdida de la función asociada).
- Identificación positiva de BAAR en frotis o biopsia de piel^{16, 58, 107, 109}.

Para confirmar el diagnóstico inicial se deben realizar estudios adicionales o paraclínicos que proporcionen la suficiente evidencia para dictaminar la enfermedad, ya que existen diversas patologías con manifestaciones clínicas similares a la de la lepra en etapas tempranas e incluso en las complicaciones más graves^{43, 109}.

En un inicio la observación de los frotis realizados a las biopsias de piel se consideraban el estándar de oro para diagnosticar lepra, pero actualmente esto ha cambiado debido a que en diferentes formas clínicas de la enfermedad (especialmente la tuberculoide y la paucibacilar) las muestras pueden ser consideradas negativas o dudosas al momento de la identificación debido a la escasez o ausencia de los bacilos en ellas^{38, 64, 67, 109}, y las pruebas basados en enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), que generalmente emplean la detección de los anticuerpos IgM contra el glucolípidos fenólico 1 (PGL-1)^{34, 44}, están

asociados a una baja precisión en la detección de lepra en casos paucibacilares^{44, 109}.

Actualmente se dispone de una gran variedad de estudios y métodos confirmatorios, entre los cuales se encuentran.

- a) Baciloscopía en frotis cutáneo^{44, 64, 95}.
- b) Histopatología de las lesiones^{38, 58}, utilizada para determinar con mayor precisión la forma clínica de la lepra.
- c) Ultrasonido y pruebas de imagen⁵⁸.
- d) Técnicas serológicas e inmunológicas^{38, 58, 64}.
- e) Pruebas de flujo lateral¹⁰⁹.
- f) Técnicas moleculares^{38, 58, 96}.

2.5.1 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) como técnica de diagnóstico

El análisis de los genomas permitió la selección de marcadores moleculares específicos que permiten la identificación y diferenciación entre ambas especies⁷¹ por medio de la PCR^{1, 44, 46}. Debido a su sensibilidad y especificidad, esta técnica molecular es actualmente el estándar de oro para la detección de *M. leprae* y *M. lepromatosis*^{25, 44, 64, 71, 95}, y ha sido aplicada con éxito a diferentes tipos de muestras clínicas como biopsias de piel, nervio, orina, saliva, esputo y sangre, aunque hasta el momento los mejores resultados en el diagnóstico se siguen obteniendo a partir de biopsias de piel^{18, 64, 71, 82, 95}.

De manera general, para *M. leprae* se han empleado los marcadores moleculares RLEP^{64, 66, 96}, 16S rRNA^{61, 102}, 16STR⁶⁰, gen *pra*⁹⁵, gen *rpoT*^{50, 102}, *sodA*^{71, 102} y *groEL*^{23, 50}, de los cuales el más utilizado es la secuencia repetitiva RLEP aunque

no es un gen codificante, pero es el que ha demostrado tener mayor especificidad (al no estar presente en *M. lepromatosis*^{23, 50, 92}) y mayor sensibilidad^{44, 64, 100} con respecto a los otros. Por otra parte, para la segunda especie, los genes que se han utilizado son *hemN*^{50, 92}, *rpoT* y *groEL*⁵⁰, el gen hipotético MLPM_5094⁹² y el gen de lipoproteína putativo MLPM_5098⁹², actualmente el único blanco molecular que se usa para la identificación de *M. lepromatosis* es *hemN*. Este gen codifica para la enzima coproporfirinógeno III oxidasa, y le confiere a la bacteria un mecanismo para eliminar el grupo hemo del tejido del hospedero y poder contrarrestar las limitaciones de hierro que presenta al ser un patógeno intracelular⁹². La razón por la cual es el único utilizado hoy en día, es porque presenta exclusividad, no se encuentra presente en ninguna otra micobacteria, mientras que el resto de los blancos analizados presentaban coincidencias con *M. leprae*^{50, 92}.

La técnica continúa desarrollándose, su especificidad continúa aumentando gracias a las investigaciones enfocadas en la estructura y función del genoma de ambos bacilos^{44, 64} con lo que se detectan nuevos genes diana. Por otra parte, la sensibilidad de la PCR continúa siendo un problema, debido a que es dependiente de la cantidad de bacilos presentes en la muestra clínica. Si bien puede obtenerse el 93% de la sensibilidad de muestras multibacilares, en pacientes que presentan la forma paucibacilar este porcentaje se reduce y oscila entre 34 y 80%^{44, 64, 95}. Actualmente, la solución a este problema ha sido el implemento de protocolos de la PCR cuantitativa (qPCR), también denominada PCR en tiempo real, que posee una sensibilidad mayor, dicho de otra manera, un límite de detección más amplio que la PCR de punto final^{4, 20, 89}.

2.6 Tratamiento de la enfermedad

La lepra presenta una resistencia natural a la mayoría de los antibióticos debido a la gran cantidad de lípidos presentes en su pared celular^{1, 58}.

Tratamiento de primera línea:

En 1981, la OMS declaró como antibióticos de primera línea a la rifampicina, clofazimina y dapsona^{1, 34}. El régimen terapéutico varía dependiendo del paciente y la forma clínica de la lepra. La duración recomendada para el tratamiento de la lepra multibacilar (incluyendo a pacientes LL, BL y BB) es de 12 meses como mínimo, mientras que el tratamiento para la lepra paucibacilar es de únicamente 6 meses^{1, 58}.

Tratamiento de segunda línea:

El incumplimiento del régimen del tratamiento, así como la naturaleza propia de las bacterias, ha ocasionado el desarrollo de resistencia a los antibióticos de primera línea, especialmente a la dapsona⁵⁸ y la rifampicina¹.

Debido a la multiresistencia que se ha presentado desde entonces, los medicamentos de segunda línea establecidos igualmente por la ONU son minociclina, ofloxacina y la claritromicina^{34, 58}, los cuales también son actualmente considerados como alternativas para los pacientes que presentan alergia a la rifampicina o para una lepra resistente. El principal inconveniente de estos antibióticos es que deben ser administrados de manera diaria, durante 24 meses¹. Independientemente de cual sea el régimen a seguir, ninguna terapia debe ser administrada sin supervisión médica, debido a que existen complicaciones que surgen al inicio o durante el tratamiento. Como la reacción de reversión y la reacción

ENL se presentan con mayor frecuencia durante los tratamientos la OMS ha establecido un protocolo de atención para cada una:

Para la reacción de reversión o T1R, si el paciente no presenta manifestaciones neurológicas, se debe administrar analgésicos y antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Una vez recuperado el paciente se procede a cambiar los medicamentos por los antibióticos de segunda línea o bien realizar un seguimiento del régimen inicial adicionando azatiopurina y ciclosporina⁵⁸.

Para una reacción ENL leve se administran de igual manera AINEs y analgésicos, pero en casos graves es recomendable la administración de 400 mg/día de talidomida^{28,34}. No es necesario hacer cambio en los antibióticos una vez que se ha recuperado el paciente.

3. Justificación

La enfermedad de Hansen ha sido clasificada por la OMS como una enfermedad “desatendida” u “olvidada”, debido al bajo número de casos reportados en los últimos años, pero esto no implica que su severidad se haya reducido, ya que hasta la fecha representa una de las enfermedades infecciosas más discapacitantes e invalidantes que existen, y a pesar de las estrategias que ha empleado la OMS, no ha logrado ser erradicada, especialmente de países endémicos como México.

El diagnóstico oportuno de esta enfermedad es fundamental para evitar sus complicaciones y su progresión, y a su vez, la identificación de las especies de la micobacteria implicada es primordial para el tratamiento, ya que la especie *M. lepromatosis* se relaciona con los cuadros más agresivos de lepra denominados lepra lepromatosa difusa y su complicación más severa denominada fenómeno de Lucio, la cual puede ser fatal.

Hasta el momento, el diagnóstico de lepra sigue basándose en la observación de la histología y baciloscopía de las muestras, pero mediante estas técnicas no es posible lograr una diferenciación de la o las especies presentes en el paciente. Sin embargo, las técnicas moleculares ofrecen una solución a este problema, ya que son más sensibles y específicas que cualquier otro método de diagnóstico para esta y otras enfermedades.

4. Hipótesis

La presencia del elemento repetitivo RLEP en *M. leprae* y el gen *hemN* en *M. lepromatosis* permitirá la identificación de ambas especies de micobacterias en las biopsias de piel de pacientes sospechosos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa punto final.

5. Objetivo general

Determinar las especies de micobacterias causantes de lepra en biopsias de piel de pacientes mediante el uso de la reacción en cadena de polimerasa punto final.

5.1 Objetivos específicos

- Identificación de las dos especies de micobacterias asociadas a lepra mediante la detección del elemento repetitivo RLEP y el gen *hemN*.
- Clonación de ambos marcadores genéticos para desarrollar controles positivos para diagnóstico molecular.

6. Material y Métodos

6.1. Amplificación del fragmento repetido RLEP y el gen hemN mediante la PCR punto final

Se utilizaron un total de 22 biopsias de piel embebidas en parafina procedentes de varios países (Cuadro 4). Cada paciente fue diagnosticado inicialmente como una sospecha de lepra por su dermatólogo correspondiente.

#	Identificación	País original	#	Identificación	País original
1	617-14	México	12	689-19	México
2	402-19	México	13	Lepra-Feliciana A	Paraguay
3	442-19	México	14	Gea 19-412	México
4	443-19	México	15	16-10792	Rép. Dominicana
5	483-19	México	16	17-03645	Rép. Dominicana
6	484-19	México	17	18-03606	Rép. Dominicana
7	551-19	México	18	18-11442	Rép. Dominicana
8	564-19	México	19	19-07183	Rép. Dominicana
9	597-19	México	20	19-06866	Rép. Dominicana
10	686-19	México	21	230	México
11	687-19	México	22	809	México

- Metodología:

Las muestras fueron sometida a un proceso de desparafinación mediante el protocolo de xilol-etanol y, posteriormente, se llevó a cabo el proceso de extracción del DNA total empleando el kit PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Ventura, CA) y siguiendo las instrucciones establecidas por el fabricante a excepción de las velocidad de centrifugación, mientras que el protocolo establece

una velocidad de 10,000 g, se centrifugó a 13,300 rpm cada muestra, debido que a esta velocidad se obtuvo un mayor rendimiento en la extracción de DNA. Esta modificación fue estandarizada anteriormente en el laboratorio. Una vez terminado este proceso, todas las extracciones fueron cuantificadas mediante el uso de un espectrofotómetro NANODROP ONEc (Thermo Fisher Scientific).

Para la detección del elemento repetitivo RLEP (*M. leprae*) y el gen *hemN* (*M. lepromatosis*) se utilizó la técnica de PCR punto final. Para ello se emplearon los iniciadores RLEP-7 (5'-TGA-GGC-TTC-GTG-TGC-TTT-GC-3') a una concentración de 272 pmol/ μ L y RLEP-8 (5'-ATC-TGC-GCT-AGA-AGG-TTG-CC-3') en una concentración de 263 pmol/ μ L para la amplificación de RLEP los cuales generan un fragmento de 450 pb, y los iniciadores LPM 244-F (5'-GTT-CCT-CCA-CCG-ACA-AAC-AC-3') a una concentración de 229 pmol/ μ L y LPM 244-R (5'-TTC-GTG-AGG-TAC-CGG-TGA-AA-3') en una concentración de 281 pmol/ μ L para la amplificación del gen *hemN* los cuales generan un fragmento de 244 pb.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 20 μ L, con los siguientes elementos: 0.5 μ L de *Taq* DNA Polimerasa (Thermo Scientific®, 2.5 unidades), 7.5 μ L de Top *Taq* Master Mix (QIAGEN®), 0.5 μ L de cada iniciador y de 5 a 10 μ L de DNA bacteriano dependiendo de la concentración presente en cada extracción. En algunas muestras fue necesario el uso de 3.0 μ L de Solución Q (Qiagen, Palo Alto, CA) como *Enhancer*. Como control negativo se utilizaron los mismos reactivos en concentración y volumen, el ADN fue sustituido por agua destilada estéril.

El protocolo de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 33 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 30 s, 72°C por 40 s, y una extensión final a 72°C por 5 min. La visualización de los productos de PCR se realizó mediante el uso de geles de agarosa al 2% teñidos con 4 µL de bromuro de etidio a una concentración de 20 mg/mL. La electroforesis se llevo a cabo a 90 V por 75 min, y posteriormente el resultado fue digitalizado en un fotodocumentador (Gel Logic 212 Pro®, Carestream, Rochester, NY) mediante el uso de UV.

6.2. Purificación de DNA

Tres reacciones de PCR de cada fragmento amplificado fueron purificados utilizando el sistema comercial Qiaquick PCR purification kit. Brevemente, los productos de amplificación fueron cortados del gel de agarosa y depositados en un tubo de 1.5 mL, posteriormente se le adicionaron 500 µL de Buffer QG y se dejó disolver toda la agarosa a una temperatura 56°C en baño María. El sobrenadante se colocó en una columna de purificación y se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min. Al terminar, se realizó un lavado a la columna con el genomic wash buffer y centrifugarla a 10,000 g durante 2 min. Este paso se repite una vez más y la recuperación del DNA, se realizó al adicionaron 55 µL de agua estéril a la columna y se centrifugó a 13,300 rpm durante 1 min.

6.3. Secuenciación de los productos purificados obtenidos

Los productos purificados fueron secuenciados por el método de Sanger en ambos sentidos utilizando los mismos iniciadores de amplificación utilizando el equipo 3500xL Genetic Analyzer del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para ello se utilizaron los mismos iniciadores de amplificación (100 ng de producto amplificado

y 10 pmol de cada primer). La reacción contenía 1 μL de primer, 7.2 μL del producto purificado RLEP y 7.8 de agua estéril para obtener un volumen final de 16 μL .

La secuencia se analizó en el programa computacional Vector NTI 11.5.1 Advance® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). Una vez generada, la secuencia consenso fue utilizada para buscar homologías, para lo cual se empleó la plataforma Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

6.4. Clonación de los productos RLEP y *hemN* purificados

6.4.1. Elaboración de células competentes por el método del cloruro de calcio

El proceso se llevó a cabo empleando el método del cloruro de calcio (CaCl_2). Para iniciar, se inoculó una sola colonia de la bacteria *Escherichia coli* DH5 α en 10 mL de caldo Luria Berthani (LB) y se dejó en incubación a 37°C y 200 rpm durante toda la noche. Posteriormente se inocularon 100 mL del caldo LB con 1 mL de cultivo inicial y nuevamente se incubaron a 37°C y a 200 rpm durante 2 h. Posteriormente se transfirieron los 100 mL a 2 tubos cónicos de 50 mL y se dejaron reposar en hielo durante 30 min. A continuación, se realizó una centrifugación a 3,260 g por 10 min y los pellets generados fueron resuspendidos en 25 mL de MgCl_2 (frío) al 0.1 M. Luego, antes de llevar a cabo la siguiente centrifugación, ambos tubos cónicos fueron incubados en hielo durante 30 min. Posteriormente se realizó la segunda centrifugación a 3,260 g por 10 min y, nuevamente, los pellets generados se lavaron, esta vez 25 mL de CaCl_2 al 0.1 M. Una vez más fueron incubados en hielo durante 30 min y, por última vez, fueron centrifugados a 3,260 g por 10 min. En esta ocasión, los pellets generados se resuspendieron en 1.25 mL de la solución CaCl_2 al 0.1 M-

glicerol (fría). Al finalizar la resuspensión se tomó una alícuota de 100 μ L de las células y fueron congelarlas rápidamente usando baño de hielo seco LN 2/etanol, y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.4.2. Clonación de los productos purificados

Los productos fueron clonados directamente en el plásmido pGEM[®]-T Easy *Vectors* (Promega, Ventura CA. USA), el cual utiliza como gen reportero a *lacZ*. Para ello se elaboraron las reacciones de ligación empleando 5 μ L del Buffer 2x Rapid Ligation Buffer T4 DNA ligase, 1 μ L de pGEM-T Easy Vector, 2 μ L de T4 DNA ligase y 5 μ L del producto purificado RLEP y 3 μ L del producto purificado *hemN*.

Las reacciones fueron preparadas en tubos de 1.5 mL, y se incubaron por 1 h a temperatura ambiente. Para la selección de colonias recombinantes se utilizaron placas de agar LB con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, adicionado con 100 μ L de IPTG al 100 mM más 80 μ L de X-Gal. A la reacción de ligación se les adicionó 100 μ L de células competentes y se incubaron por 30 min en hielo. Después se colocaron en baño María a 42°C por 1 min y transcurrido ese tiempo, se colocaron en hielo por 2 min. Posteriormente se adicionaron 500 μ L de caldo infusión cerebro corazón (BHI) y se incubación a 37°C por 1 h con 30 min con agitación orbital a 200 rpm. Por último se colocaron 50 μ L, 100 μ L y 150 μ L de las reacciones en cada placa de LB con ampicilina, X-gal e IPTG y se incubaron a 37°C toda la noche. Una vez finalizada la incubación se seleccionaron colonias blancas y una colonia azul de cada producto clonado y se inocularon en caldo LB con ampicilina y se incubaron a 37°C con agitación orbital a 200 rpm toda la noche.

6.4.3. Extracción de plásmidos

A las colonias blancas y azul seleccionadas se les realizó la extracción de plásmidos de acuerdo al método de lisis alcalina utilizando el sistema comercial plasmid miniprep (Qiagen, Ventura CA. USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. El cultivo de 5 ml fue centrifugado a 3,000 rpm durante 10 min, el pellet se obtenido se dejó secar a temperatura ambiente.

A la pastilla bacteriana se le agregó 250 μ L de solución A fría y 250 μ L de solución de lisis el cual fue mezclado rápidamente por inversión del tubo. Inmediatamente después se depositaron 300 μ L de la solución neutralizante en el tubo y se mezclaron nuevamente por inversión 7 veces. Una vez completado todos los tubos fueron centrifugados a 11,600 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue colocado en una columna de afinidad y fueron centrifugadas a 11,600 rpm durante 2 min. Posteriormente, las columnas fueron lavadas con buffer de lavado a la misma velocidad y por el mismo tiempo. Por último, se le adicionaron 50 μ L de agua a cada una y se centrifugaron a 11 600 rpm durante 2 min.

La visualización de los plásmidos se realizó mediante el uso de geles de agarosa al 1% utilizando 40 mL de TAE 1X y teñidos con 4 μ L de bromuro de etidio, el marcador utilizado correspondió a 1 kb DNA ladder. La electroforesis se llevó a cabo a 100 V por 45 min, y posteriormente el resultado fue digitalizado en un fotodocumentador Gel Logic 212 Pro®, Carestream, Rochester, NY) mediante el uso de UV.

6.4.4. Digestión del plásmido por medio de la enzima de restricción *EcoRI*

Para verificar el producto clonado se utilizó una digestión de los plásmidos (colonias blancas y azules), para ello se utilizó la enzima de restricción *EcoRI*. Primero, se

colocaron 8 μL de DNA plasmídico con 1 μL de Buffer 10X y 1 μL de enzima *EcoRI* (10 unidades). La mezcla se dejó en incubación a 37°C por 45 min.

Para visualizar la digestión, se realizó una electroforésis en gel de agarosa al 1%, con 40 mL de TAE 1x teñido con 4 μL de bromuro de etidio. El marcador utilizado fue 1 kb DNA ladder. La electroforésis se llevó a cabo a 100 V por 60 min y posteriormente el resultado fue digitalizado en un fotodocumentador Gel Logic 212 Pro®, Carestream, Rochester, NY) mediante el uso de UV.

6.5. Amplificación del fragmento RLEP y el gen *hemN* presente en los plásmidos

Para verificar la clonación de los productos clonados se realizó una PCR de acuerdo a las características previamente descritas. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 16 μL , y contenían 0.5 μL de *Taq* DNA Polimerasa (ThermoScientific®, aproximadamente 2.5 unidades), 0.5 μL de cada iniciador correspondiente (RLEP-7, RLEP-8, LPM 244-F y LPM 244-R), 7.5 μL de Top *Taq* Master Mix (Qiagen, Ventura, CA), 1.0 μL de plásmido y 6.0 μL agua estéril. Para elaborar los controles negativos únicamente se colocaron 7.0 μL de agua destilada y no se adicionó el plásmido, el resto de la composición fue el mismo.

El protocolo de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 33 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 30 s, 72°C por 40 s, y una extensión final a 72°C por 5 min.

La visualización de los productos de PCR se realizó mediante el uso de geles de agarosa al 2% teñidos con 4 μL de bromuro de etidio. La electroforesis se llevo a cabo a 90 V por 75 min, y posteriormente el resultado fue digitalizado en un

fotodocumentador (Gel Logic 212 Pro®, Carestream, Rochester, NY) mediante el uso de UV.

6.6. Determinación de la concentración mínima de detección de DNA para cada especie

Una vez verificados que los productos clonados correspondían a los tamaños de los fragmentos de detección de RLEP y *hemN* se realizaron PCRs a distintas concentraciones de cada material genético para determinar su concentración mínima de detección mediante la técnica de PCR punto final. Para ello, se seleccionaron dos muestras representativas (una de RLEP y otra de *hemN*) con una concentración inicial mayor a 100 ng/μL y se realizaron en total 7 diluciones (5 seriadas) con las que se obtuvieron diferentes concentraciones finales de cada muestra (Figura 3) con las que posteriormente se realizaron los PCRs.

Para RLEP se utilizó una muestra con 117.1 ng/μL de DNA, y a partir de ella se generaron las siguientes concentraciones: 1) 55 ng/μL, 2) 25 ng/μL, 3) 11.17 ng/μL, 4) 1.17 ng/μL, 5) 0.117 ng/μL, 6) 0.0117 ng/μL y 7) 0.00117 ng/μL. Por otro lado, para *hemN* se utilizó una muestra con 105 ng/μL de DNA, y se realizó el mismo procedimiento para obtener las siguientes concentraciones: 1) 52.5 ng/μL, 2) 26.25 ng/μL, 3) 10.5 ng/μL, 4) 1.05 ng/μL, 5) 0.105 ng/μL, 6) 0.0105 ng/μL, 7) 0.00105 ng/μL.

Posteriormente, se realizó una PCR de acuerdo a las características iniciales ya descritas. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 16 μl, y contenían 0.5 μL de *Taq* DNA Polimerasa (ThermoScientific®, aproximadamente 2.5 unidades), 0.5 μL de cada iniciador correspondiente (RLEP-

7, RLEP-8, LPM 244-F y LPM 244-R), 7.5 μ L de Top *Taq* Master Mix (Qiagen, Ventura, CA), 1.0 μ L de cada dilución y 6.0 μ L agua estéril.

La PCR consistió de una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, seguida de 33 ciclos de 94°C por 30 s, 57°C por 30 s, 72°C por 40 s, y una extensión final a 72°C por 5 min. La visualización de los productos amplificados se realizó mediante el uso de geles de agarosa al 2% teñidos con 4 μ L de bromuro de etidio. La electroforesis se llevo a cabo a 90 V por 75 min, y posteriormente el resultado fue digitalizado en un fotodocumentador (Gel Logic 212 Pro®, Carestream, Rochester, NY) mediante el uso de UV.

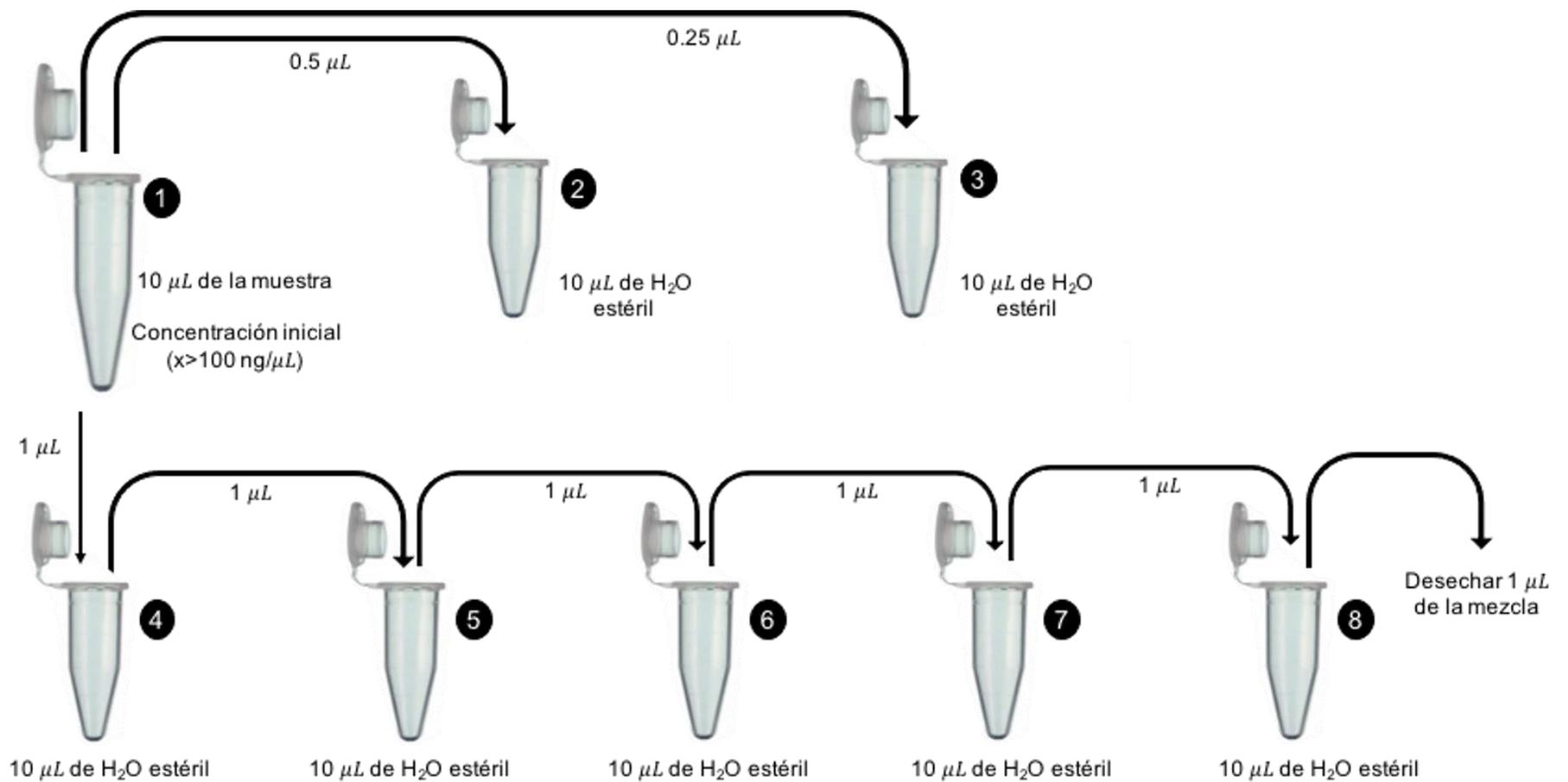


Figura 3. Esquema del procedimiento de dilución de ambos controles positivos.

6.7. Secuenciación de los plásmidos

Para verificar la secuencia de nucleótidos de los productos de amplificación fueron secuenciados mediante la técnica de Sanger en ambos sentidos con el equipo 3500XI Genetic Analyzer de Thermo Fisher Scientific® en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para ello se utilizaron los mismos iniciadores de amplificación (100 ng de producto amplificado y 10 pmol de cada primer). La reacción contenía 1 µL de primer, 5.1 µL del producto purificado RLEP y 9.9 de agua estéril para obtener un volumen final de 15 µL.

La secuencia se analizó en el programa computacional Vector NTI 11.5.1 Advance® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). Una vez generada, la secuencia fue utilizada para buscar homologías, para lo cual se empleó la plataforma Blast (*Basic Local Alignment Search Tool*) del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

7. Resultados

7.1 Amplificación del fragmento repetitivo RLEP y el gen *hemN* mediante la PCR punto final

Por medio de la PCR se identificó el fragmento repetitivo RLEP y/o el gen *hemN* en el 50% del total de las muestras (11/22). De este porcentaje el 27.27% (3/11) correspondió a *M. leprae* (Figura 4), 36.36% (4/11) a *M. lepromatosis* (Figura 5) y el restante del 36.36% (4/11) a una infección mixta por *M. leprae* y *M. lepromatosis* (Cuadro 5). El resto de las biopsias fueron negativas.

Cuadro 5.
Identificación molecular de *RLEP* y *hemN* en las 22 biopsias de piel

Muestra	Cuantificación del DNA			Gen amplificado	
	ng/μL	A 260/280	A 260/230	RLEP	<i>hemN</i>
617-14	15.00	1.51	0.79	-	-
402-19	6.90	1.67	0.65	-	-
442-19	54.60	1.75	1.40	-	+
443-19	42.30	1.53	0.79	-	+
483-19	47.70	1.55	0.74	-	-
484-19	24.50	1.72	1.15	-	-
551-19	15.00	1.65	0.79	-	-
564-19	11.40	1.67	0.62	-	-
597-19	5.20	2.12	0.55	-	-
686-19	14.70	1.60	0.65	-	-
687-19	6.00	1.60	0.37	-	-
689-19	12.20	1.56	0.64	-	-
Lepra-Feliciana A	174.50	1.27	0.27	+	+
Gea 19-412	64.50	1.05	0.15	-	+
16-10792	50.60	1.55	1.83	+	+
17-03645	53.30	1.69	1.87	+	-
18-03606	15.20	1.72	1.70	-	+
18-11442	74.30	1.55	0.59	+	+
19-07183	55.70	1.61	1.11	+	-
19-06866	55.50	1.49	0.69	+	-
230	52.90	1.46	0.55	-	-
809	113.80	1.53	0.63	+	+

Abreviaturas: (+) identificación positiva, (-) identificación negativa.

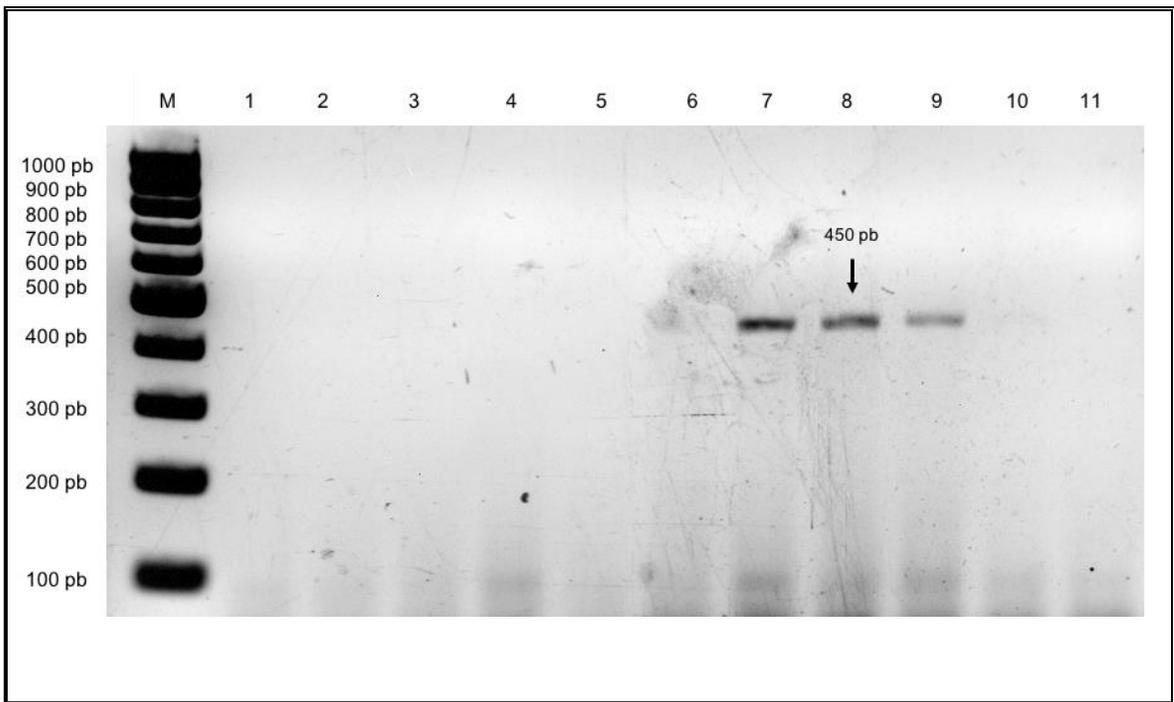
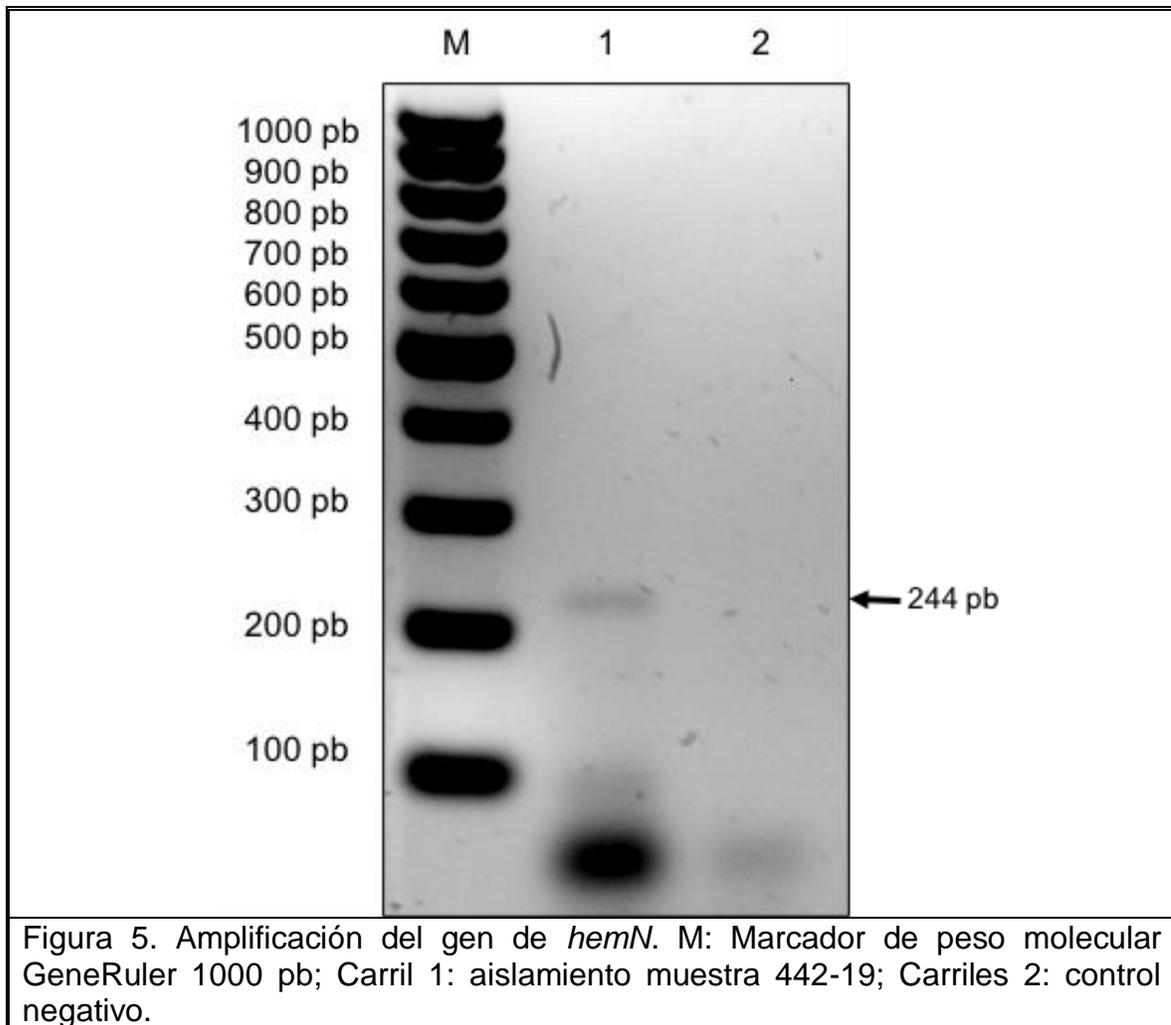


Figura 4. Amplificación del fragmento repetitivo RLEP. M: Marcador de peso molecular GeneRuler 1000 pb; Carriles 1 al 6: aislamiento de las muestras 230, 617-14, 402-19, 483-19, 484-19 y 551-19; Carril 7: muestra 17-03645; Carril 8: aislamiento muestra 19-07183; Carriles 9 y 10: aislamiento de las muestras 19-06866 y Gea 19-412; Carril 11: control negativo.



7.2. Clonación de los productos RLEP y *hemN* en el plásmido pGEM-T Easy

Después de clonar los productos RLEP y *hemN* en el plásmido pGEM-T Easy se realizó la digestión de las colonias blancas seleccionadas utilizando la enzima de restricción *EcoRI*.

El plásmido sin digerir presenta 3 diferentes topologías que se aprecian en el gel: el peso de 6000 pb corresponde a la forma cicular, el producto de 3000 pb corresponde a la forma linealizada y el peso de 2000 pb corresponde a la topología súper enrollada. Sin embargo, al poseer el fragmento RLEP o *hemN* y sin haber

sido digerido su peso aproximado de 3500 pb, el cual al ser cortado por la enzima libera el inserto, y genera un fragmento de aproximadamente 500 pb si es RLEP (Figura 6) y 250 pb si presenta a *hemN* (Figura 7).

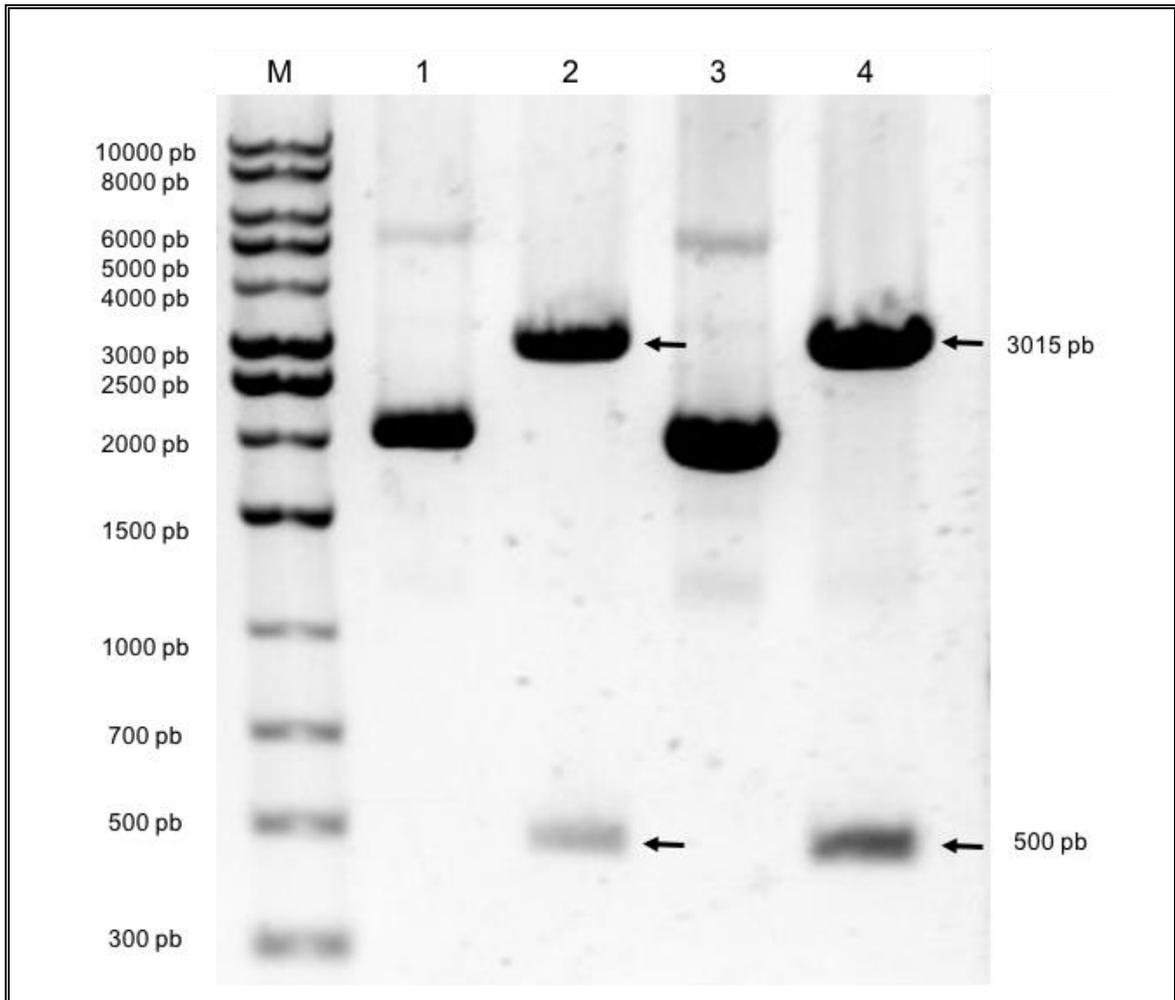


Figura 6. Digestión del plásmido pGEM-T Easy con el inserto RLEP por medio de la enzima *EcoRI*. M: marcador de peso molecular de 1Kb DNA ladder; Carril 1: muestra RLEP B1.1 sin digerir; Carril 2: Muestra RLEP B1.1 digerida con la enzima *EcoRI*; Carril 3: Muestra RLEP B2.1 sin digerir; Carril 4: Muestra RLEP B2.1 digerida con la enzima *EcoRI*.

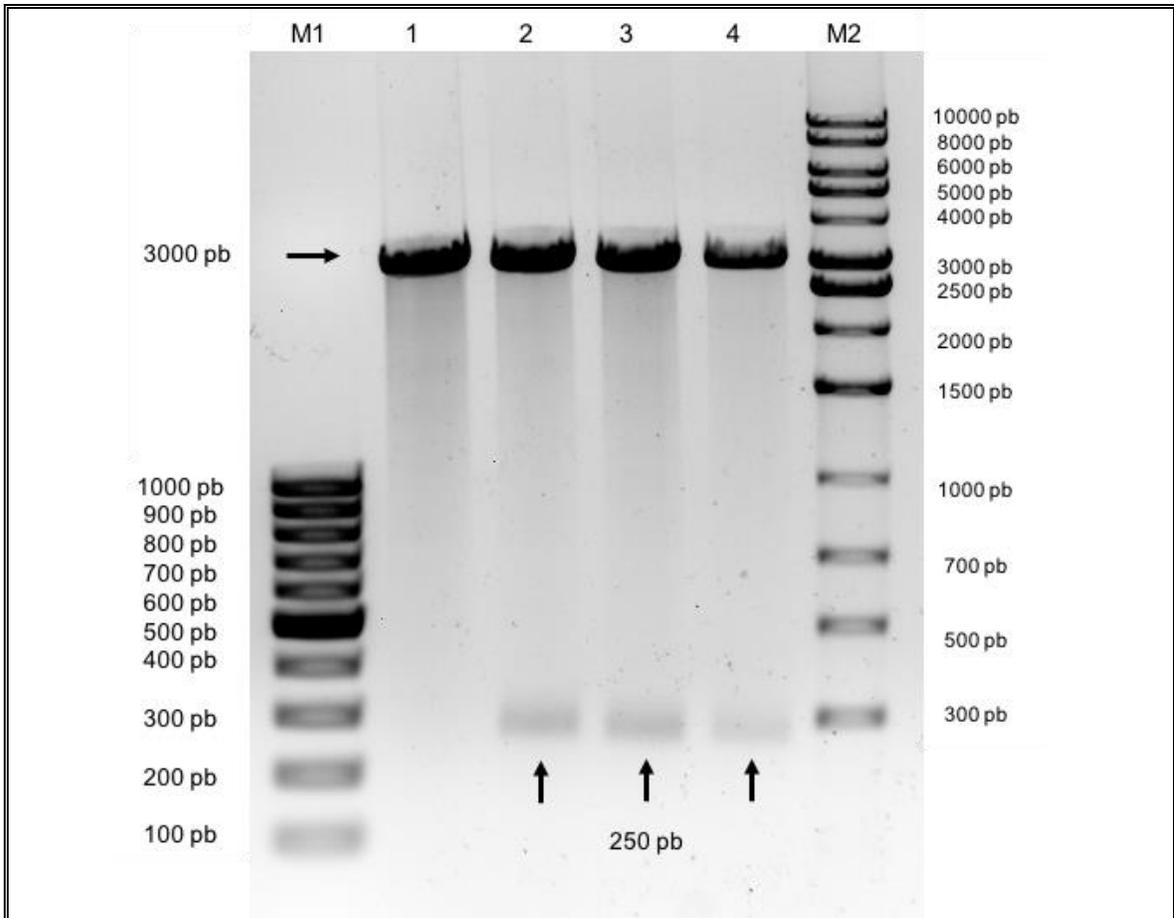


Figura 7. Digestión del plásmido pGEM-T Easy con el inserto *hemN* por medio de la enzima *EcoRI*. M1: marcador de peso molecular de 1000 pb DNA ladder; Carril 1: muestra sin plásmido proveniente de una colonia azul; Carril 2-4: Muestras *hemN* 1, *hemN* 2 y *hemN* 3 digeridas con la enzima *EcoRI*.

7.3. Amplificación del fragmento RLEP y el gen *hemN* de los controles

De las muestras seleccionadas se realizó la amplificación del fragmento RLEP y *hemN* y posteriormente se realizaron las diluciones de los controles positivos que se obtuvieron de cada uno (Figuras 8 y 9).

Para RLEP de *M. leprae* se utilizó una muestra con una concentración inicial de 117.1 ng/ μ L en un volumen de 10 μ L. Las concentraciones de las diluciones fueron las siguientes: dilución 1 = 55 ng/ μ L, dilución 2 = 25 ng/ μ L, dilución 3 = 11.171 ng/ μ L,

dilución 4 = 1.17 ng/μL, dilución 5 = 0.117 ng/μL, dilución 6 = 0.0117 ng/μL y dilución 7 = 0.00117 ng/μL.

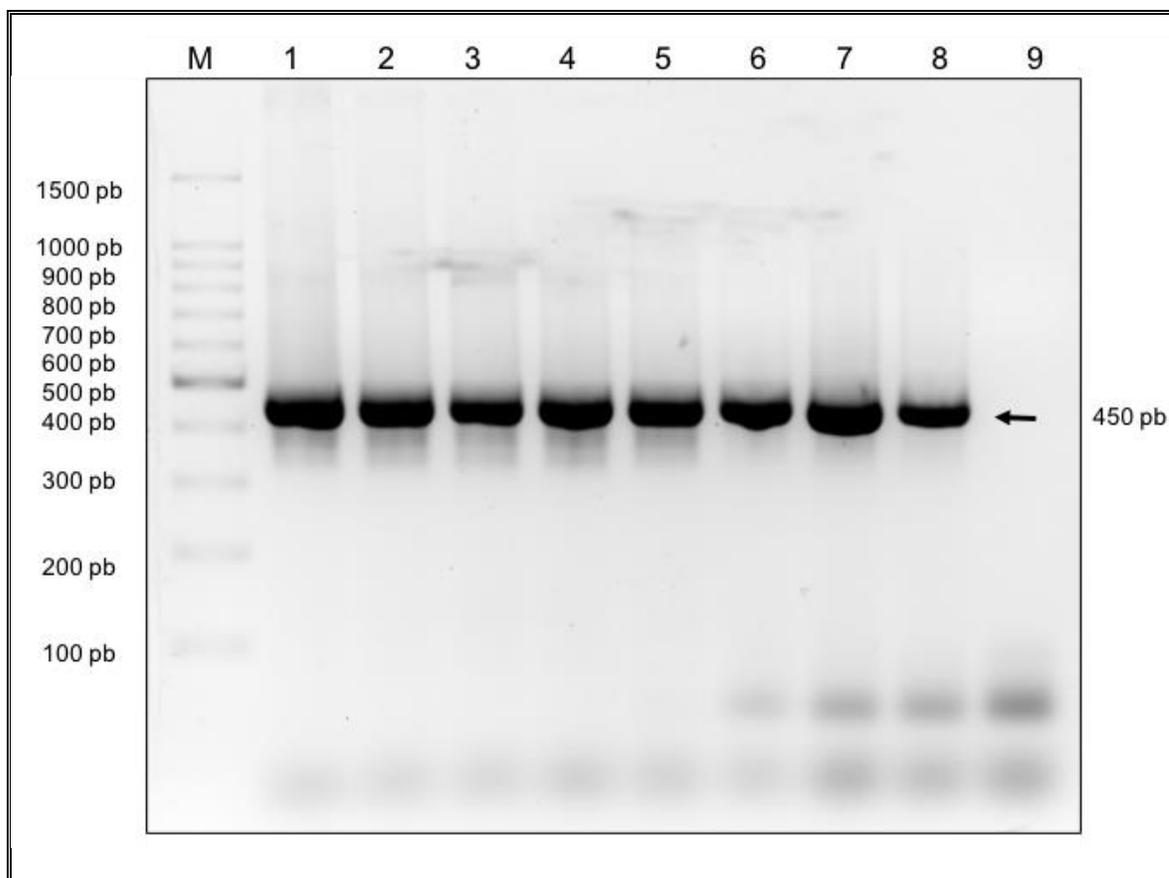


Figura 8. Amplificación del fragmento repetitivo RLEP presente en los plásmidos pGEM-T Easy. M: Marcador de peso molecular GeneRuler 1000 pb; Carriles 1 al 8: fragmento RLEP amplificado a una concentración de 117.1 ng/μL, 55 ng/μL, 25 ng/μL, 11.171 ng/μL, 1.17 ng/μL, 0.117 ng/μL, 0.0117 ng/μL y 0.00117 ng/μL; Carril 9= Control negativo.

Para *hemN* de *M. lepromatosis* se utilizó una muestra con una concentración inicial de 105 ng/μL en un volumen de 10 μL. Las concentraciones de las diluciones fueron las siguientes: dilución 1 = 52.5 ng/μL, dilución 2 = 26.25 ng/μL, dilución 3 = 10.5 ng/μL, dilución 4 = 1.05 ng/μL, dilución 5 = 0.105 ng/μL, dilución 6 = 0.0105 ng/μL y dilución 7 = 0.00105 ng/μL.

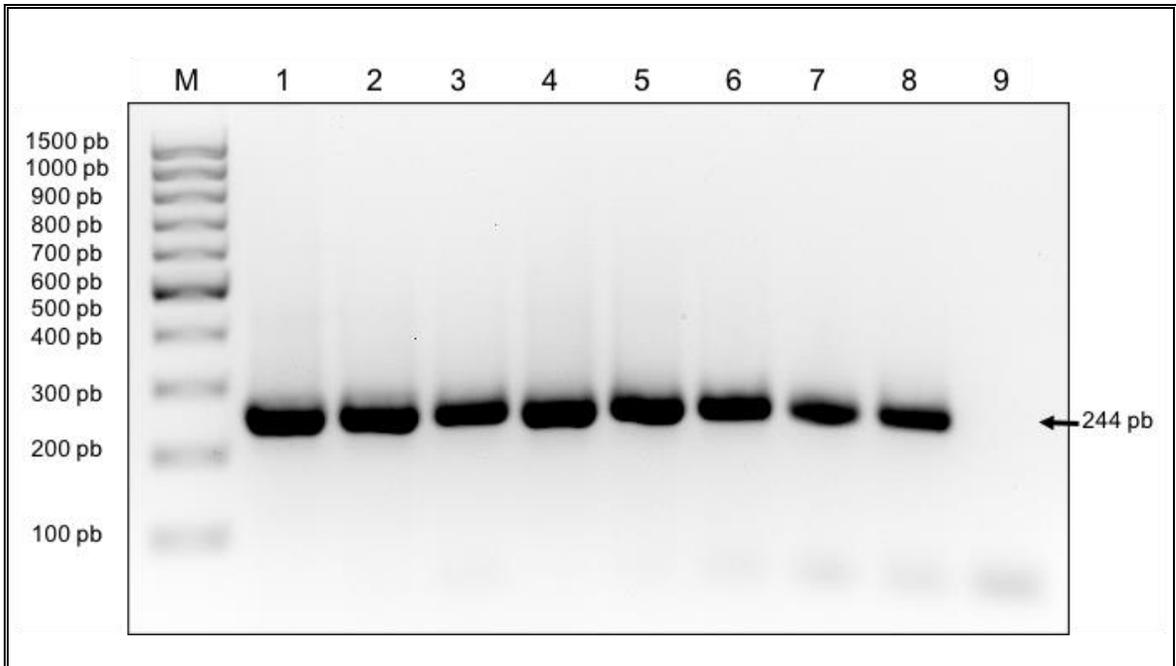


Figura 9. Amplificación del gen *hemN* presente en los plásmidos pGEM-T Easy. M: Marcador de peso molecular GeneRuler 1000 pb; Carriles 1 al 8: fragmento *hemN* amplificado a una concentración de 105 ng/μL, 52.5 ng/μL, 26.25 ng/μL, 10.5 ng/μL, 1.05 ng/μL, 0.105 ng/μL, 0.0105 ng/μL y 0.00105 ng/μL; Carril 9= Control negativo.

7.4. Secuenciación final

```

1 GTCAGCCTCG AATCCAGCCT CAGCGAACAC CGTGATACCC AGCGCACCTA AGACTTCCTT AGTGATGTCG ATCTGGCCGT GGAACTCAGC GGGGATTGAT
  CAGTCGGAGC TTAGGTCGGA GTCGCTTGTG GCACTATGGG TCGCGTGGAT TCTGAAGGAA TCACTACAGC TAGACCCGCA CCTTGAGTCG CCCCTAACTA
101 GACCGATTAG CCTTGTATCC CGCATAGCAC TCGGAGCGAA ACGTTTTCCG CGATACATCG AACGCCGAG CGATATGCGT TGGAGCCTCC TCACGCAGCA
  CTGGCTAATC GGAACATAGG GCGTATCGTG AGCCTCGCTT TGCAAAAGGC GCTATGTAGC TTGCGGCGTC GCTATACGCA ACCTCGGAGG AGTGCGTCTG
201 AGTTGATCAG CATGGCGGTG AAGCCGTACA CCGCGTTGGT GGTGAGGCCA CCGCGGGTCT TGAAATTCTC TGTGTCAGT GCGTAAAATG CGCGAAATGC
  TCAACTAGTC GTACCGCCAC TTCGGCATGT GGGCACAACA CCACTCCGGT GGGCGCCAGA ACTTTAAGAG ACAACCGTCA CGCATTTTAC GCGCTTTACG
301 CAGCGAATTG CCGTCCAGCA GCATCAGCAT TGGCTTGGTG TGGTCTTCGC AGACTTCAGC GGTCAATTGCT GCACTCACGG CTCATACTCT AGGGTCTCGT
  GTCGCTTAAC GGCAGGTCGT CGTAGTCGTA ACCGAACCAC ACCAGAAGCG TCTGAAGTCG CCAGTAACGA CGTGAGTGCC GAGTATGAGA TCCCAGAGCA
401 GTTTGTGTCT GTGGCGGTGA GTTGTTCGGT TGGTTTCATA GGTGGTGGT GAAATGGCTT TTTTTCGGT TTATGACTGG CCGATATGTT CGGTAGTCGT
  CAAACACAGA CACCGCCACT CAACAAGCCA ACCAAAAGTAT CCACCACCCA CTTTACCAGC AAAAAACGCAA AATACTGACC GGCTATACAA GCCATCAGCA
501 GGGGGGCAGC CCGGAATCCT GTTGACGTGT TTTGCTGTGT TGCGGGGTTT TTGTGGTGG GTGGCTGACT GCCTGCTTTC GATGAGGCTT CGTGTGCTTT
  CCCCCGTCG GGCCTTAGGA CAACTGCACA AAACGACACA ACGCCCCAAA AACAACCACC CACCGACTGA CGGACGAAAG CTACTCCGAA GCACACGAAA
601 CGCGCAGTGG ACACGATTAG CGCGGCGCAC GTAAGCATGT CGGTGGTGGG TGCTGCTTGG TCTACATGTT GATGATGCCA GGGGCTGGGC ACCTGGGCTG
  CGGCGTCACC TGTGCTAATC GCGCCGCGTG CATTTCGTACA GCCACCACCC ACGACGAACC AGATGTACAA CTACTACGGT CCCCGACCCG TGGACCCGAC
701 TGCTGAAGGC GATATCGATG CAGGCGTGAG TGTGAGGATA GTTGTTAGCG CCGCGGGGTA GGGCGGTTTT AGTGTGCATG TCATGGCCTT GAGGTGTCCG
  ACGACTTCCG CTATAGCTAC GTCCGCACTC ACACTTCAT CAACAATCGC GGCGCCCAT CCCCGAAAA TCACACGTAC AGTACCGGAA GCTCCAGCC
801 CGTGGTCAAT GTGGCCGCAC CTGAACAGGC ACGTCCCCGT GCACGGTATA ACTATTCCGA CCTGATGTTA TCCCTGCAC CATTCTGCC GCTGGTATCG
  GCACCAGTTA CACCGGCGTG GACTTGTCCG TGCAGGGGCA CGTGCCATAT TGATAAGCGT GGACTACAAT AGGGAACGTG GTAAAGACGG CGACCATAGC
901 GTGTCGGCGG CTTGTGACC GGCCCTCAGC CAGCAAGCAG GCATGCCGCC GGGTGCAGCA GTATCGTGTT AGTGAACAGT GCATCGATGA TCCGGCCGTC
  CACAGCCGCC GAACAACCTG CCGGGAGTCG GTCGTTTCGTC CGTACGGCGG CCCACGTCTG CATAGCACAA TCACTTGTCA CGTAGCTACT AGGCCGGCAG
1001 GGCGGCACAT ACGGCAACCT TCTAGCGCAG ATCAACCACC CACACCCAC CAGCCCACCA CAACACCACC CAAACCAAAC CAGCAAAAAA TAACCACCAA
  CCGCCGTGTA TGCCGTTGGA AGATCGCGTC TAGTTGGTGG GTGTGGGGTG GTGCGGTGGT GTTGTGGTGG GTTTGGTTTT GTCGTTTTTT ATTGGTGGTT
1101 ATGACCATCA CGACGACACC TTGAAGTCTA AACGGACAAG TTACTGGTTA CTGGCCGGGG CGCGCTTAC CCGATAGCAG CGGACGGCTG TCAACGCGAT
  TACTGGTAGT GCTGCTGTGG AACTTCAGAT TTGCCTGTTC AATGACCAAT GACCGGCCG CGCCGAAATG GGCTATCGTC GCCTGCCGAC AGTTGCGCTA
1201 ACTTCACGCC CCCATGGCCA AGACGGCTCA CTGAGCAATG ATTTCACTCA CCGCTAGAA TCGCACTTCG CGCCTGGCAG ATGAAATCAT AGTCAGCTCG
  TGAAGTGCAG GGGTACCGGT TCTGCCGAGT GACTCGTTAC TAAAGTCAGT GGCGGATCTT AGCGTGAAGC GCGGACCGTC TACTTTAGTA TCAGTCGAGC
1301 GGTAAGAACG ATCGAGTCTA TCCTAGACCC CAAACACCAC ACGATGTCGA TCACGCACTG AATGGTCGGC AGCACGAAAA GCGTCGTAAG TGCCGCCTCG
  CCATTCTTGC TAGCTCAGAT AGGATCTGGG GTTTGTGGTG TGCTACAGCT AGTGCCTGAC TTACCAGCCG TCGTGCTTTT CGCAGCATT ACGGCGGAGC
1401 CTGCCCCGTA GGAACCTGCG CAGCATCGCG ATCCCAGGG TGGCCGCTTT AGGGTTGGCA CTACCAACC ACCCTACCGT CATACTCGCT AACCGTGCCG
  GACGGGCCAT CCTTGACGCC GTCGTAGCGC TAGGGTCCC ACCGGCGAAA TCCAACCGT GATGGGTTGG TGGGATGGCA GTATGAGCGA TTGGCACGGC
1501 C
      G

```

Figura 10. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los aislamientos de *M. leprae* con el fragmento repetitivo RLEP. En amarillo se observa la homología en las secuencias y en color azul se encuentran señalados los iniciadores que se utilizaron

```

1 ATGACTGTTC GTGAGGTACC GGTGAAA TTG CCTGGCGTGC AGCCCAACGC CGGATCGCCT TTCGGGGTGT ATGTGCATGT CCCCTTCTGC ATAACCCGTT
TACTGACAAG CACTCCATGG CCACTTTAAC GGACCGCACG TCGGGTTGCG GCCTAGCGGA AAGCCCCACA TACACGTACA GGGGAAGACG TATTGGGCAA
101 GTGGCTATTG TGATTTTAAC ACCTACACTC CGGCCGAACT GGGTGGTGTG AACCCCGATA CCTGGTTGGC GACATGTGCG ACTGAGCTCG AACTGGCGGC
CACCGATAAC ACTAAAATTG TGGATGTGAG GCCGGCTTGA CCCACCACAG TTGGGGCTAT GGACCAACCG CTGTAACGCC TGACTCGAGC TTGACCGCCG
201 TGCTCGGCTG GTTGCGCCCA CAGTGAACAC CGTGTTTGTC GGTGGAGGAA CGCCATCGCT GTTGGGTGGT GGGCGCCTGG CCACGCTGCT CGACATGATG
ACGAGCCGAC CAACGCGGGT GTCAC TTGTG GCACAAACAG CCACCTCCTT GCGGTAGCGA CAACCACCA CCCGCGGACC GTGCGACGA GCTGTACTAC
301 CGGGAGCATT TCGTGCTGGC ACCGGATGTC GAGGTGAGCA CTGAGGCCAA TCCTGAATCC ACCTGGCCGG AATTTTTCGA AACGATCCGC GCGGCTGGTT
GCCCTCGTAA AGCACGACCG TGGCCTACAG CTCCACTCGT GACTCCGGTT AGGACTTAGG TGGACCGGCC TTAAAAAGCT TTGCTAGGCG CGCCGACCAA
401 ACACGCGAAT ATCACTTGGC ATGCAGTCTG TGGCGCCACG GGTGTTGGCC GCTCTCGGTC GGTGCACTC ACCTGGCCGG GCATTGACTG CGGCTCGCGA
TGTGCGCTTA TAGTGAACCG TACGTCAGAC ACCGCGGTGC CCACAACCGG CGAGAGCCAG CCCACGTGAG TGGACCGGCC CGTAACTGAC GCCGAGCGCT
501 GCGGGTGGCC GCAGGCTTCG AACACGTCAA CCTCGACTG ATCTACGGGA CGCCGGGGGA GTCTGATGAT GACTTGGTGT GTTCTGTCTGA CGCTGCACTC
CCGCCACCGG CGTCCGAAGC TTGTGCAGTT GGAGCTGGAC TAGATGCCCT GCGGCCCCCT CAGACTACTA CTGAACCACA CAAGACAGCT GCACAGTGAG
601 GAAGCCGGTG TCGATCACAT ATCTGCGTAT GCCTTGGTGG TCGAGGATGG CACCCGCTTG GTGCGGCGGA TCCGGTGC GG TGAAGTGCAG ACTCCCAGC
CTTCGGCCAC AGCTAGTGTG TAGACGCATA CGGAACCACC AGCTCCTACC GTGGCGCAAC CACGCCGCCT AGGCCACGCC ACTCGACTGG TGAGGGCTGC
701 AAGATGTGTT GCGCATCGT TACGAGCTGG TCGACGCTCG CTTTCCGCT GCTGGGTGTA GCTGGTACGA GGTGTCCAAC TGGTCTAGAC CAGGCGGTGA
TTCTACACAA CCGCGTAGCA ATGCTCGACC AGCTGCGAGC GGAAAGCGGA CGACCAACT CGACCATGCT CCACAGGTTG ACCAGATCTG GTCCGCCACT
801 ATGCCGGCAC AACCTTGGCT ACTGGAACGG CGGTCAATGG TGGGGAGTAG GACCCGGGGC GCACAGTTAC GTCGGCACA CGCGCTGGTG GAATGTTAAG
TACGGCCGTG TTGGAACCGA TGACCTTGCC GCCAGTTACC ACCCCTCATC CTGGCCCCG CGTGTCAATG CAGCCGTGTT GCGCGACCAC CTTACAATTC
901 CACCCCAAAG CCTATTCCCA AATGCTGGGC AATGCAATGC TTCTATGTC GGATTCGAA CAGCTTGGTG CGGATGCTCT TCATACTGAA GATGTACTGT
GTGGGGTTTC GGATAAGGGT TTACGACCCG TTACGTTACG AAGGATAACG CTTAAAGCTT GTCGAACCAC GCCTACGAGA AGTATGACTT CTACATGACA
1001 TGAAAACCC TCTACGCCAA GGTATTCCCC TTGCTCAGCT GAGGGCTGCT GAACGCAAAC GCGCCGATGA TGTGGTCGCT GAAGGTCTGT TGGTATTCTGA
ACTTTTGGGA AGATGCGGTT CCATAAGGGG AACGAGTCGA CTCCCACAG CTTGCGTTTG CGCGGCTACT ACACCAGCGA CTCCAGACA ACCATAAGCT
1101 GGGGGACAGT CTGGTTCTTA CCCTCCGCGG AAGGCTGCTC GCCGATGCGG TGGTGCAC GCTGCTGGGA TAA
CCCCCTGTCA GACCAAGAAT GGGAGGCGCC TTCCGACGAG CGGCTACGCC ACCACGCGTG CGACGACCCT ATT

```

Figura 11. Alineamiento de la secuencia de nucleótidos de los aislamientos de *M. lepromatosis* con el gen *hemN*. En amarillo se observa la homología en las secuencias y en color azul se encuentran señalados los iniciadores que se utilizaron.

8. Discusión

La lepra es una enfermedad que ha afectado a los humanos desde la antigüedad y continúa siendo un problema de salud pública, especialmente en países tropicales⁹⁷. Si bien, la incidencia de la enfermedad tuvo una disminución considerable desde la aplicación de la MDT y la implementación “Estrategia Final para erradicar a la lepra” en el año 2000, no se han observado un decrecimiento significativo en el número de casos nuevos identificados desde el año 2013, cuando se reportó un número total de 215,656 casos a nivel mundial, y el último registro, en el año 2019, arrojó un total de 205,185¹¹⁰. Su control es difícil, debido a que la transmisión de la enfermedad puede darse en el periodo de tiempo en el que los síntomas no parecen significativos para el paciente (el cual puede durar 5 años) y el contacto estrecho con otras personas es suficiente para su propagación³¹. Para poder romper con este ciclo de transmisión y evitar que la lepra genere secuelas permanentes en los pacientes, tanto el diagnóstico como el tratamiento temprano son indispensables, sin embargo, por lo general existen diversos factores que influyen en la demora del diagnóstico de la enfermedad, tanto por parte de las personas afectadas como de los centros de salud y los estudios clínicos. Por parte de los pacientes, las razones más frecuentes por las que no acuden al médico de manera oportuna se encuentra la suposición de que los síntomas no son tan graves como para buscar una consulta médica y que eventualmente sanarán de manera espontánea, la lejanía o inaccesibilidad a los centros de salud, las visitas a curanderos tradicionales e incluso el temor a ser aislados de su comunidad⁶. Sin

embargo, el diagnóstico erróneo de la enfermedad por parte del personal de salud también es un factor común^{6, 42, 52}.

La propia patogenia de la enfermedad, así como varias de sus manifestaciones físicas, pueden ser confundidas con infecciones de hongos, alergias cutáneas y enfermedades autoinmunes (como lupus eritematoso sistémico, dermatomiositis o sinovitis simétrica seronegativa remitente con síndrome de edema con fovea)³⁵ especialmente debido a la ausencia de las micobacterias en frotis de lesiones cutáneas como es el caso de los pacientes paucibacilares. Por lo mismo, se necesita el uso de herramientas más sensibles y específicas que sean capaces de detectar a las micobacterias en etapas tempranas y en cualquiera de las formas clínicas. Aunque ya se han intentado diversas pruebas “rápidas”, la mayoría basadas en la detección inmunológica de los antígenos presentes en las micobacterias, ninguna de ellas ha tenido éxito en diagnosticar más del 60% de casos de lepra en etapa temprana¹⁰⁰, y recientemente se ha observado la necesidad de que dichos métodos sean capaces de discernir entre ambas especies.

En un inicio, el único agente etiológico identificado fue *M. leprae*, hasta que, en el año 2008, X. Han y colaboradores reportaron a *M. lepromatosis* y la relacionaron con los casos más severos de esta enfermedad^{49, 51}. Determinar cuál especie se encuentra presente el paciente permite evaluar y ajustar el tratamiento, comprender los procesos clínicos de la enfermedad y prevenir posibles complicaciones que se relacionan más frecuentemente con una especie que con otra en el futuro⁹⁹, pero esto no ha sido posible si únicamente se emplean estudios histopatológicos o inmunológicos para el diagnóstico. La solución a este problema fue la introducción de los métodos moleculares que se han estado desarrollando en las últimas

décadas los cuales cubren estas dos necesidades primordiales, son más sensibles, y específicos, y pueden utilizar una amplia variedad de muestras biológicas como lo son biopsias de piel, orina, secreciones orales y nasales, sangre e incluso muestras de lesiones oculares¹⁰⁰. Una de estas técnicas es la reacción en cadena de la polimerasa, que a su vez se apoya en la información obtenida a partir de la secuenciación y análisis de los genomas de ambas micobacterias, con los cuales se han logrado identificar diferentes marcadores genéticos con los que se puede llevar a cabo esta técnica. Para el caso de *M. leprae* diversos estudios utilizan RLEP^{64, 66, 99}, 16S rRNA^{61, 102}, 16STR⁶⁰, *pra*⁹⁵, *rpoT*^{50, 102}, *sodA*^{62, 71, 102}, *groEL*^{23, 50} y la 16S rDNA⁶² para su identificación. Aunque la variedad de genes que se pueden emplear es amplia, hoy en día se recurre únicamente a la identificación de RLEP, debido a que posee mayor sensibilidad que cualquier otro material genético, ya que es capaz de detectar al DNA del bacilo en muestras de pacientes que han presentan un índice bacteriano muy bajo^{63, 112} y su especificidad también es muy alta, de hecho, diversos estudios comparativos que se le han realizado comprueban que una PCR dirigida únicamente a la detección de RLEP sólo resultan positiva para el DNA de *M. leprae*, a diferencia del resto de los marcadores genéticos antes mencionados que arrojan resultados positivos ante microorganismos asociados a infecciones cutáneas como lo son *E. coli*, *S. epidermidis*, *C. perfringens* y al menos 16 especies diferentes de micobacterias diferentes a *M. leprae*⁹⁹.

Para el caso de *M. lepromatosis* el análisis fue un poco más complicado. Inicialmente se tuvo que amplificar, clonar y secuenciar los genes 16S rRNA, *hsp65*, *rpoB* y *rpoT* para asegurar que se trataba de una especie diferente^{6, 48}, y al comprobarlo se empezaron a buscar sus genes específicos, los más empleados

fueron *rrs*, *rpoB*, *sigA*, *hsp65*^{101, 102} y *hemN*⁹² siendo este último el más utilizado en la actualidad, debido a que únicamente se encuentra presente en esta especie de micobacteria y además propicia su alta patogenicidad al ser responsable de la codificación de la enzima coproporfirinógeno III oxidasa que le confiere a la bacteria un mecanismo para eliminar el grupo hemo del tejido del hospedero y poder contrarrestar las limitaciones de hierro⁹².

Recientemente, Sharma y sus colaboradores lograron identificar un elemento genómico multicopia específico para *M. lepromatosis* denominado RLPM con el cual desarrollaron un ensayo de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y que ha demostrado ser más sensible para la detección de este bacilo en muestras de pacientes con un índice bacteriano igual a cero⁹⁰.

Actualmente, las investigaciones epidemiológicas moleculares para esta enfermedad comienzan a ser más relevantes que en años anteriores, ya que estos estudios proporcionan las bases para la comprensión de la evolución y distribución de las cepas alrededor del mundo y permiten analizar la transmisión de la lepra a corto y largo plazo⁶. En el presente trabajo se observó que la identificación de la especie *M. lepromatosis* y la infección mixta por ambas micobacterias fue la más común, con un total de 4 casos, y *M. leprae* únicamente la encontramos presente en 3 pacientes. Aunque no se dispone de una estadística mundial sobre el número de casos originados por cada especie¹¹⁰, en general, la micobacteria más frecuentemente reportada en casos clínicos es *M. leprae*^{23, 46, 69}, pero a raíz del descubrimiento de *M. lepromatosis* en México, se realizaron diversos estudios epidemiológicos para su caso particular, y se llegó a la conclusión de que esta es la especie predominante en el país⁵¹. Mundialmente no se han realizado este tipo de

estudios y la especie más reportada es *M. leprae*^{6, 90}, pero la mayoría de los estudios de laboratorio únicamente se centran en los genes capaces de identificar a esta especie o no se logran llevar a cabo. Esta situación puede tener muchas explicaciones: se debe considerar que el descubrimiento de *M. lepromatosis* todavía es reciente y ha sido identificada en pocos países hasta la fecha, únicamente se tienen reportes de casos en Singapur⁴⁹, Canadá⁵⁴, México, Brasil y Myanmar⁴⁶; la mayoría de los casos de lepra se dan en comunidades rurales o con un acceso limitado a centros de salud (situación de la población mexicana)⁵¹ Además, es común que no se indague en la especie de micobacteria presente a menos que el o los pacientes se encuentren cursando complicaciones propias de la enfermedad, especialmente aquellos que sufren un importante daño neurológico, deformidad y la forma lepromatosa difusa, o bien aquellas muestras que presentan una alta carga bacilar al momento de la basiloscopía, debido a la asociación que se le ha reportado a *M. lepromatosis* ante estas situaciones^{39, 98}. La cifra de casos positivos a esta especie podría ser mayor, debido a que la zona del Caribe y Brasil sigue siendo una región de endemidad de la DLL^{7, 51, 81, 97, 98}. Los resultados de este estudio apoyan esta hipótesis, ya que se identificó la presencia de *M. lepromatosis* en biopsias de piel procedentes de la República Dominicana, especie que no había sido reportada anteriormente en este país y además los pacientes mexicanos también presentaron mayor prevalencia de esta especie sobre *M. leprae* o bien presentaban una infección mixta.

Por otra parte, uno de los principales problemas que continúa complicando el estudio genético de estas micobacterias es que no han logrado ser cultivados en laboratorio y la única manera de reproducirlas sigue siendo mediante técnicas *in*

vivo donde se inoculan las bacterias vivas en patas de armadillos o ratones, y aún así la cantidad de bacterias obtenidas sigue siendo muy variable, por lo que la capacidad de recuperar suficiente material genético para los estudios moleculares se ve muy limitada⁶ y no satisface la necesidad de contar con estándares de referencia para las pruebas de PCR, por lo que todavía se siguen comparando los resultados clínicos con análisis histopatológicos⁹. Sin embargo, en este trabajo se plantea una solución debido a que se logró realizar la clonación de RLEP y *hemN* empleando las mismas biopsias de los pacientes. Esto nos ha permitido secuenciar ambos productos genéticos para realizar futuros análisis y además poseer controles comparativos para esta técnica molecular, es decir, ahora disponemos de un stock de ambos fragmentos. Adicionalmente, todo el protocolo podría ser empleado para futuras clonaciones en genes de interés, como sería el caso del nuevo fragmento RLPM descrito por Sharma y sus colaboradores⁹⁰.

Antes de concluir, es necesario señalar que no se logró identificar el 100% de las biopsias, pero se observó que el 90.91% de las muestras no identificadas poseían una concentración de DNA menor a 50 ng/ μ L después de la extracción del mismo. Dichas biopsias se habían conservado en parafina durante un periodo de tiempo muy extenso, el cual pudo ser la causa de la degradación de DNA, aunque también es válido pensar que la lesión no poseía la suficiente carga bacilar, es decir, se trataron muestras paucibacilares. Con esto, se debe mencionar que la calidad de la muestra clínica también influye en el resultado al momento de realizar ensayos, aunque es cierto que la parafina conserva el tejido en buenas condiciones para su posterior análisis histológico, el procedimiento de fijación induce degradación de los

ácidos nucleicos, lo que complica los procedimientos de biología molecular que impliquen el uso de DNA y RNA extraído, y a la fecha ningún kit de extracción es capaz de compensar la extensa degradación de DNA^{32, 40}. Además, para una buena detección de lepra por PCR punto final, es necesario contar con al menos 10 cortes de muestra de 5 micras para tener mayor probabilidad de extraer el DNA de la bacteria que puede no encontrarse presente en una sola lesión. Posiblemente, todas estas muestras que no pudieron ser diagnosticadas tendrían mayor probabilidad de ser identificadas empleando la técnica de PCR en tiempo real (qPCR)^{11, 23, 64}, ya que dispone de mayor sensibilidad y especificidad que la técnica empleada en el presente trabajo, y ha resultado muy útil en tres áreas en particular a lo largo de la última década: 1) para la identificación de la multiresistencia de los bacilos a la terapia MDT¹⁹, 2) para el diagnóstico de casos difíciles^{10, 64} y 3) para analizar la viabilidad del bacilo y de esta manera detectar recaídas en pacientes que ya habían sido tratados con MDT⁶², un ejemplo de esto fueron los estudios de Martínez *et al*⁶² quienes detectaron los efectos del tratamiento de la rifampicina en esta bacteria mediante la diferenciación de células vivas y muertas de *M. leprae*. La especificidad de la técnica continúa aumentando gracias a las investigaciones enfocadas en la estructura y función del genoma de ambas micobacterias^{44, 64}. Sin embargo, la mayoría de los protocolos de qPCR se enfocan a *M. leprae* y en la detección de RLEP^{11, 20, 40, 90}, de manera general, han mostrado tener mayor capacidad para detectar fragmentos genéticos de la bacteria en concentraciones menores que por lo general son indetectables para otras técnicas (como la del presente estudio). Para el caso de *M. lepromatosis* el empleo de la qPCR comienza

a hacerse más común y hoy en día disponemos de un protocolo diseñado por Sharma *et al*⁹⁰, en el cual lograrán identificar el fragmento RLPM.

Aunque el uso de esta técnica confiere una mayor confiabilidad y sensibilidad en el diagnóstico de lepra, especialmente en pacientes paucibacilares, sus limitaciones involucran una infraestructura más costosa, equipo y recursos que no cualquier laboratorio puede costearse⁹.

9. Conclusiones

En este trabajo se identificaron por medio de la técnica molecular de PCR las especies *M. leprae* y *M. lepromatosis* mediante la detección del fragmento repetitivo RLEP y *hemN*, respectivamente, en biopsias de piel de pacientes provenientes de América Latina. La principal especie identificada fue *M. lepromatosis*, tanto de manera individual como en una infección mixta con *M. leprae*.

Este es el primer trabajo en donde se identificó a la especie *M. lepromatosis* en pacientes de la República Dominicana y el primero que realiza una clonación de ambos materiales genéticos para su uso posterior como estándares de referencia para las pruebas de PCR.

10. Referencias

1. Aamir, M., Sadaf, A., Khan, S., Perveen, S., & Khan, A. (2018). Recent Advancement in the Diagnosis and Treatment of Leprosy. *Current topics in medicinal chemistry*, 18(18), 1550–1558. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181025100434>
2. Aguilar-Medina, M., Escamilla-Tilch, M., Frías-Castro, L. O., Romero-Quintana, G., Estrada-García, I., Estrada-Parra, S., Granados, J., Arambula Meraz, E., Sánchez-Schmitz, G., Khader, S. A., Rangel-Moreno, J., & Ramos-Payán, R. (2017). HLA Alleles are Genetic Markers for Susceptibility and Resistance towards Leprosy in a Mexican Mestizo Population. *Annals of human genetics*, 81(1), 35–40. <https://doi.org/10.1111/ahg.12183>
3. Ankad, B. S., & Sakhare, P. S. (2018). Dermoscopy of borderline tuberculoid leprosy. *International journal of dermatology*, 57(1), 74–76. <https://doi.org/10.1111/ijd.13731>
4. Araujo, S., Goulart, L. R., Truman, R. W., Goulart, I., Vissa, V., Li, W., Matsuoka, M., Suffys, P., Fontes, A. B., Rosa, P. S., Scollard, D. M., & Williams, D. L. (2017). qPCR-High resolution melt analysis for drug susceptibility testing of *Mycobacterium leprae* directly from clinical specimens of leprosy patients. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(6), e0005506. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005506>
5. Avanzi, C., Del-Pozo, J., Benjak, A., Stevenson, K., Simpson, V. R., Busso, P., McLuckie, J., Loiseau, C., Lawton, C., Schoening, J., Shaw, D. J., Piton, J., Vera-Cabrera, L., Velarde-Felix, J. S., McDermott, F., Gordon, S. V., Cole, S. T., & Meredith, A. L. (2016). Red squirrels in the British Isles are infected

with leprosy bacilli. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6313), 744–747.

<https://doi.org/10.1126/science.aah3783>

6. Avanzi, C., Singh, P., Truman, R. W., & Suffys, P. N. (2020). Molecular epidemiology of leprosy: An update. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 104581. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104581>
7. Azulay-Abulafia, L., Pereira Spinelli, L., Hardmann, D., Kawa Kac, B., Levy, R. A., Talhari, C., & Ruzicka, T. (2006). Lucio-Phänomen. Vaskulitis oder okklusive Vaskulopathie? [Lucio phenomenon. Vasculitis or occlusive vasculopathy?]. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, 57(12), 1101–1105. <https://doi.org/10.1007/s00105-005-1086-3>
8. Baeza, I., Wong-Baeza, C., Valerdi, E., Serafin-Lopez, J., Ibáñez, M., Estrada-Parra, S., Wong, C., & Estrada-Garcia, I. (2012). Lepromatous leprosy patients produce antibodies that recognise non-bilayer lipid arrangements containing mycolic acids. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107 Suppl 1, 95–103. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000900016>
9. Barbieri, R. R., Manta, F., Moreira, S., Sales, A. M., Nery, J., Nascimento, L., Hacker, M. A., Pacheco, A. G., Machado, A. M., Sarno, E. M., & Moraes, M. O. (2019). Quantitative polymerase chain reaction in paucibacillary leprosy diagnosis: A follow-up study. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(3), e0007147. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007147>

10. Barbieri, R. R., Sales, A. M., Illarramendi, X., Moraes, M. O., Nery, J. A., Moreira, S. J., Sarno, E. N., Machado, A., & Bozza, F. A. (2014). Diagnostic challenges of single plaque-like lesion paucibacillary leprosy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109(7), 944–947. <https://doi.org/10.1590/0074-0276140212>
11. Beissner, M., Woestemeier, A., Saar, M., Badziklou, K., Maman, I., Amedifou, C., Wagner, M., Wiedemann, F. X., Amekuse, K., Kobara, B., Herbinger, K. H., Kere, A. B., Löscher, T., & Bretzel, G. (2019). Development of a combined RLEP/16S rRNA (RT) qPCR assay for the detection of viable *M. leprae* from nasal swab samples. *BMC infectious diseases*, 19(1), 753. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4349-9>
12. Benjak, A., Avanzi, C., Singh, P., Loiseau, C., Girma, S., Busso, P., Fontes, A., Miyamoto, Y., Namisato, M., Bobosha, K., Salgado, C. G., da Silva, M. B., Bouth, R. C., Frade, M., Filho, F. B., Barreto, J. G., Nery, J., Bühner-Sékula, S., Lupien, A., Al-Samie, A. R., ... Cole, S. T. (2018). Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nature communications*, 9(1), 352. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02576-z>
13. Bernardes Filho, F., Pess, D., Akabane, A. L., Foss, N. T., & Frade, M. (2018). Lucio's phenomenon: A life-threatening medical emergency. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 69, 94–95. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.02.010>
14. Bhamidi, S., Scherman, M. S., Jones, V., Crick, D. C., Belisle, J. T., Brennan, P. J., & McNeil, M. R. (2011). Detailed structural and quantitative analysis

reveals the spatial organization of the cell walls of in vivo grown *Mycobacterium leprae* and in vitro grown *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of biological chemistry*, 286(26), 23168–23177. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.210534>

15. Bratschi, M. W., Steinmann, P., Wickenden, A., & Gillis, T. P. (2015). Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Leprosy review*, 86(2), 142–155.
16. Britton, W. J., & Lockwood, D. N. (2004). Leprosy. *Lancet (London, England)*, 363(9416), 1209–1219. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15952-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15952-7)
17. Browne S. G. (1975). Some aspects of the history of leprosy: the leprosie of yesterday. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 68(8), 485–493.
18. Caleffi, K. R., Hirata, R. D., Hirata, M. H., Caleffi, E. R., Siqueira, V. L., & Cardoso, R. F. (2012). Use of the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium leprae* in urine. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 45(2), 153–157. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2012007500011>
19. Cambau, E., Saunderson, P., Matsuoka, M., Cole, S. T., Kai, M., Suffys, P., Rosa, P. S., Williams, D., Gupta, U. D., Lavania, M., Cardona-Castro, N., Miyamoto, Y., Hagge, D., Srikantam, A., Hongseng, W., Indropo, A., Vissa, V., Johnson, R. C., Cauchoux, B., Pannikar, V. K., ... WHO surveillance network of antimicrobial resistance in leprosy (2018). Antimicrobial resistance in leprosy: results of the first prospective open survey conducted by a WHO surveillance network for the period 2009-15. *Clinical microbiology and*

- infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24(12), 1305–1310.
<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.02.022>
20. Carvalho, R. S., Foschiani, I. M., Costa, M., Marta, S. N., & da Cunha Lopes Virmond, M. (2018). Early detection of *M. leprae* by qPCR in untreated patients and their contacts: results for nasal swab and palate mucosa scraping. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(10), 1863–1867. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3320-9>
21. Centers for Disease Control and Prevention. (2017). *Hansen's Disease (Leprosy)*. U.S. Department of Health & Human Services.
<https://www.cdc.gov/leprosy/transmission/index.html>
22. Chavarro-Portillo, B., Soto, C. Y., & Guerrero, M. I. (2019). Mycobacterium leprae's evolution and environmental adaptation. *Acta tropica*, 197, 105041.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105041>
23. Cheng, X., Sun, L., Zhao, Q., Mi, Z., Yu, G., Wang, Z., Sun, Y., Wang, C., Man, C., Fu, F., Liu, H., & Zhang, F. (2019). Development and evaluation of a droplet digital PCR assay for the diagnosis of paucibacillary leprosy in skin biopsy specimens. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(3), e0007284.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007284>
24. Chiaratti, F. C., Daxbacher, E. L., Neumann, A. B., & Jeunon, T. (2016). Type 2 leprosy reaction with Sweet's syndrome-like presentation. *Anais brasileiros de dermatologia*, 91(3), 345–349. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20164111>

25. Cleary, L. C., Suraj, S., Haburchak, D., & Turrentine, J. E. (2017). The Armadillo Factor: Lepromatous Leprosy. *The American journal of medicine*, 130(10), 1163–1166. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2017.06.001>
26. Comisión Económica para América Latina y el Caribe. (2018). Demographic Observatory Latin America and the Caribbean. International migration. CEPAL. ISBN: 978-92-1-058641-2.
27. Concha RM, Cossio T ML, Salazar SI, Fich S F, Pérez C C & González B S. (2008). Enfermedad de Hansen: reporte de un caso y revision de la literatura. *Revista Chilena de Infectologia: Organo Oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, 25(1), 64-69. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000100013>
28. Costa, P., Fraga, L. R., Kowalski, T. W., Daxbacher, E., Schuler-Faccini, L., & Vianna, F. (2018). Erythema Nodosum Leprosum: Update and challenges on the treatment of a neglected condition. *Acta tropica*, 183, 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.026>
29. Curi, P. F., Villaroel, J. S., Migliore, N., Albertengo, A., Aquino, M. L., Ceccato, F., & Paira, S. (2016). Lucio's phenomenon: report of five cases. *Clinical rheumatology*, 35(5), 1397–1401. <https://doi.org/10.1007/s10067-014-2683-2>
30. da Silva, S. A., Mazini, P. S., Reis, P. G., Sell, A. M., Tsuneto, L. T., Peixoto, P. R., & Visentainer, J. E. (2009). HLA-DR and HLA-DQ alleles in patients from the south of Brazil: markers for leprosy susceptibility and

- resistance. *BMC infectious diseases*, 9, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-134>
31. Das, M., Diana, D., Wedderburn, A., Rajan, L., Rao, S., Horo, I., Vedithi, S.C. (2020). Molecular epidemiology and transmission dynamics of leprosy among multicase families and case-contact pairs. *International Journal of Infectious Diseases*, 96, 172–179. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.064>
32. Dugaard, I., Kjeldsen, T. E., Hager, H., Hansen, L. L., & Wojdacz, T. K. (2015). The influence of DNA degradation in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue on locus-specific methylation assessment by MS-HRM. *Experimental and molecular pathology*, 99(3), 632–640. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.11.007>
33. Dwivedi, V. P., Banerjee, A., Das, I., Saha, A., Dutta, M., Bhardwaj, B., Biswas, S., & Chattopadhyay, D. (2019). Diet and nutrition: An important risk factor in leprosy. *Microbial pathogenesis*, 137, 103714. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103714>
34. Eichelmann, K., González González, S. E., Salas-Alanis, J. C., & Ocampo-Candiani, J. (2013). Leprosy. An update: definition, pathogenesis, classification, diagnosis, and treatment. *Actas dermo-sifiliograficas*, 104(7), 554–563. <https://doi.org/10.1016/j.adengl.2012.03.028>
35. El-Gendy, H., El-Gohary, R. M., Shohdy, K. S., & Ragab, G. (2016). Leprosy Masquerading as Systemic Rheumatic Diseases. *Journal of clinical rheumatology: practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*, 22(5), 264–271. <https://doi.org/10.1097/RHU.0000000000000379>

36. Elwan, N. M., & Neinaa, Y. (2019). Borderline Lepromatous Leprosy: Uncommon Clinical Presentation. *The American Journal of dermatopathology*, 41(3), 211–213. <https://doi.org/10.1097/DAD.0000000000001262>
37. Fischer, E., De Vlas, S., Meima, A., Habbema, D., & Richardus, J. (2010). Different mechanisms for heterogeneity in leprosy susceptibility can explain disease clustering within households. *PloS one*, 5(11), e14061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014061>
38. Fischer M. (2017). Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology: JDDG*, 15(8), 801–827. <https://doi.org/10.1111/ddg.13301>
39. Franco-Paredes, C., Marcos, L. A., Henao-Martínez, A. F., Rodríguez-Morales, A. J., Villamil-Gómez, W. E., Gotuzzo, E., & Bonifaz, A. (2018). Cutaneous Mycobacterial Infections. *Clinical microbiology reviews*, 32(1), e00069-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00069-18>
40. Gama, A., Carrillo-Casas, E. M., Hernández-Castro, R., Vázquez-Aceituno, V. A., Toussaint-Caire, S., Xicohtencatl-Cortes, J., Fernández-Martínez, R., & Moreno-Coutiño, G. (2017). *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* identification by real-time PCR targeting the *polA* gene in paraffin-embedded samples positive by immunohistochemistry. *International journal of STD & AIDS*, 28(13), 1299–1304. <https://doi.org/10.1177/0956462417704123>
41. Gaschignard, J., Grant, A. V., Thuc, N. V., Orlova, M., Cobat, A., Huong, N. T., Ba, N. N., Thai, V. H., Abel, L., Schurr, E., & Alcaïs, A. (2016). Pauci- and

- Multibacillary Leprosy: Two Distinct, Genetically Neglected Diseases. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(5), e0004345. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004345>
42. Gómez, L., Rivera, A., Vidal, Y., Bilbao, J., Kasang, C., Parisi, S., Schwienhorst-Stich, E. M., & Puchner, K. P. (2018). Factors associated with the delay of diagnosis of leprosy in north-eastern Colombia: a quantitative analysis. *Tropical medicine & international health: TM & IH*, 23(2), 193–198. <https://doi.org/10.1111/tmi.13023>
43. Guevara, B., Saleem, S., Chen, W. T., Hsiao, P. F., & Wu, Y. H. (2019). Lucio phenomenon mimicking antiphospholipid syndrome: The occurrence of antiphospholipid antibodies in a leprosy patient. *Journal of cutaneous pathology*, 46(5), 347–352. <https://doi.org/10.1111/cup.13425>
44. Gurung, P., Gomes, C. M., Vernal, S., & Leeflang, M. (2019). Diagnostic accuracy of tests for leprosy: a systematic review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(11), 1315–1327. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.05.020>
45. Han, X. Y., & Silva, F. J. (2014). On the age of leprosy. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(2), e2544. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002544>
46. Han, X. Y., Aung, F. M., Choon, S. E., & Werner, B. (2014). Analysis of the leprosy agents *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in four countries. *American journal of clinical pathology*, 142(4), 524–532. <https://doi.org/10.1309/AJCP1GLCBE5CDZRM>

47. Han, X. Y., Mistry, N. A., Thompson, E. J., Tang, H. L., Khanna, K., & Zhang, L. (2015). Draft Genome Sequence of New Leprosy Agent *Mycobacterium lepromatosis*. *Genome announcements*, 3(3), e00513-15. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00513-15>
48. Han, X. Y., Seo, Y. H., Sizer, K. C., Schoberle, T., May, G. S., Spencer, J. S., Li, W., & Nair, R. G. (2008). A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy. *American journal of clinical pathology*, 130(6), 856–864. <https://doi.org/10.1309/AJCPP72FJZZRRVMM>
49. Han, X. Y., Sizer, K. C., & Tan, H. H. (2012). Identification of the leprosy agent *Mycobacterium lepromatosis* in Singapore. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 11(2), 168–172.
50. Han, X. Y., Sizer, K. C., Thompson, E. J., Kabanja, J., Li, J., Hu, P., Gómez-Valero, L., & Silva, F. J. (2009). Comparative sequence analysis of *Mycobacterium leprae* and the new leprosy-causing *Mycobacterium lepromatosis*. *Journal of bacteriology*, 191(19), 6067–6074. <https://doi.org/10.1128/JB.00762-09>
51. Han, X. Y., Sizer, K. C., Velarde-Félix, J. S., Frias-Castro, L. O., & Vargas-Ocampo, F. (2012). The leprosy agents *Mycobacterium lepromatosis* and *Mycobacterium leprae* in Mexico. *International journal of dermatology*, 51(8), 952–959. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2011.05414.x>
52. Henry, M., GalAn, N., Teasdale, K., Prado, R., Amar, H., Rays, M. S., Roberts, L., Siqueira, P., de Wildt, G., Virmond, M., & Das, P. K. (2016). Factors Contributing to the Delay in Diagnosis and Continued Transmission of Leprosy in Brazil--An Explorative, Quantitative, Questionnaire Based

- Study. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004542.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004542>
53. Jankute, M., Cox, J. A., Harrison, J., & Besra, G. S. (2015). Assembly of the Mycobacterial Cell Wall. *Annual review of microbiology*, 69, 405–423.
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091014-104121>
54. Jessamine, P. G., Desjardins, M., Gillis, T., Scollard, D., Jamieson, F., Broukhanski, G., Chedore, P., & McCarthy, A. (2012). Leprosy-like illness in a patient with Mycobacterium lepromatosis from Ontario, Canada. *Journal of drugs in dermatology: JDD*, 11(2), 229–233.
55. Jurado, F., Rodriguez, O., Novales, J., Navarrete, G., & Rodriguez, M. (2015). Lucio's leprosy: a clinical and therapeutic challenge. *Clinics in dermatology*, 33(1), 66–78.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.004>
56. Kowalska, M., & Kowalik, A. (2012). Mycobacterium leprae: pathogenic agent in leprosy. Discovery of new species Mycobacterium lepromatosis. Perspectives in research and diagnosis of leprosy. *International maritime health*, 63(4), 213–218.
57. Krishnamurthy, P., Rao, P. S., Subramanian, M., & Inderparkash (1994). The influence of operational factors in the profile of monolesional leprosy cases in south India. *Leprosy review*, 65(2), 130–136. <https://doi.org/10.5935/0305-7518.19940012>
58. Kundakci, N., & Erdem, C. (2019). Leprosy: A great imitator. *Clinics in dermatology*, 37(3), 200–212.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.01.002>

59. Lastória, J. C., & Abreu, M. A. (2014). Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - part 1. *Anais brasileiros de dermatologia*, 89(2), 205–218. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20142450>
60. Machado, A. S., Lyon, S., Rocha-Silva, F., Assunção, C. B., Hernandez, M. N., Jorge, D. S., Cunha, A., Barbosa, V. G., Fernades, B., Abreu, A., Goulart, L. R., Goulart, I., Coelho, E., & Caligiorne, R. B. (2020). Novel PCR primers for improved detection of *Mycobacterium leprae* and diagnosis of leprosy. *Journal of applied microbiology*, 128(6), 1814–1819. <https://doi.org/10.1111/jam.14592>
61. Manta, F., Leal-Calvo, T., Moreira, S., Marques, B., Ribeiro-Alves, M., Rosa, P. S., Nery, J., Rampazzo, R., Costa, A., Krieger, M. A., & Moraes, M. O. (2020). Ultra-sensitive detection of *Mycobacterium leprae*: DNA extraction and PCR assays. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(5), e0008325. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008325>
62. Martinez, A. N., Lahiri, R., Pittman, T. L., Scollard, D., Truman, R., Moraes, M. O., & Williams, D. L. (2009). Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *Journal of clinical microbiology*, 47(7), 2124–2130. <https://doi.org/10.1128/JCM.00512-09>
63. Martinez, A. N., Ribeiro-Alves, M., Sarno, E. N., & Moraes, M. O. (2011). Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(10), e1354. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001354>

64. Martinez, A. N., Talhari, C., Moraes, M. O., & Talhari, S. (2014). PCR-based techniques for leprosy diagnosis: from the laboratory to the clinic. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(4), e2655. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002655>
65. Misch, E. A., Berrington, W. R., Vary, J. C., Jr, & Hawn, T. R. (2010). Leprosy and the human genome. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 74(4), 589–620. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00025-10>
66. Mohanty, P. S., Naaz, F., Bansal, A. K., Kumar, D., Sharma, S., Arora, M., Singh, H., Katara, P., Soni, N., Patil, S. A., & Singh, M. (2020). Molecular detection of Mycobacterium leprae using RLEP-PCR in post elimination era of leprosy. *Molecular biology research communications*, 9(1), 17–22. <https://doi.org/10.22099/mbr.2020.35658.1464>
67. Moschella S. L. (2004). An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 51(3), 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2003.11.072>
68. Naafs, B., & van Hees, C. L. (2016). Leprosy type 1 reaction (formerly reversal reaction). *Clinics in dermatology*, 34(1), 37–50. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2015.10.006>
69. Oliveira, I., Deps, P. D., & Antunes, J. (2019). Armadillos and leprosy: from infection to biological model. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 61, e44. <https://doi.org/10.1590/S1678-9946201961044>
70. Panda, P. K., Prajapati, R., Kumar, A., Jana, M., Immanuel, P., Tanwar, P., & Wig, N. (2017). A case of leprosy, erythema nodosum leprosum, and hemophagocytic syndrome: A continuum of manifestations of same agent-

- host interactions. *Intractable & rare diseases research*, 6(3), 230–233.
<https://doi.org/10.5582/irdr.2017.01048>
71. Pathak, V. K., Singh, I., Turankar, R. P., Lavania, M., Ahuja, M., Singh, V., & Sengupta, U. (2019). Utility of multiplex PCR for early diagnosis and household contact surveillance for leprosy. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 95(3), 114855.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.06.007>
72. Polycarpou, A., Walker, S. L., & Lockwood, D. N. (2017). A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. *Frontiers in immunology*, 8, 233. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00233>
73. Pretty, M., Bifi, J., Radhakrishnan, K., & Hashba, H. (2018). Systemic nocardiosis in a lepromatous leprosy patient with type 2 reaction. *International journal of dermatology*, 57(5), 620–622.
<https://doi.org/10.1111/ijd.13961>
74. Prevedello, Flávia & Mira, Marcelo. (2007). Hanseníase: uma doença genética?. *Anais Brasileiros De Dermatologia*. 82(5): 451-459.
75. Rada, E., Aranzazu, N., & Convit, J. (2009). Respuesta inmunitaria de la enfermedad de Hansen. Revisión [Immune response of Hansen's disease. Review]. *Investigacion clinica*, 50(4), 513–527.
76. Ranugha, P., Chandrashekar, L., Kumari, R., Thappa, D. M., & Badhe, B. (2013). Is it Lucio Phenomenon or Necrotic Erythema Nodosum Leprosum?. *Indian journal of dermatology*, 58(2), 160.
<https://doi.org/10.4103/0019-5154.108087>

77. Rees, R. J., & McDougall, A. C. (1977). Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. *Journal of medical microbiology*, 10(1), 63–68. <https://doi.org/10.1099/00222615-10-1-63>
78. Reibel, F., Cambau, E., & Aubry, A. (2015). Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Medecine et maladies infectieuses*, 45(9), 383–393. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2015.09.002>
79. Ridley, D. S., & Jopling, W. H. (1966). Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 34(3), 255–273.
80. Ridley, D. S., & Radia, K. B. (1981). The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases: official organ of the International Leprosy Association*, 49(4), 383–392.
81. Romero, A., Brenes, Ibarra, A., & Fallas, M. (1949). Clinical study of lepromatous leprosy in Costa Rica. *International journal of Leprosy*, 17(1-2), 27–33.
82. Rosa, F. B., Souza, V. C., Almeida, T. A., Nascimento, V. A., Vásquez, F. G., Cunha, M., & Naveca, F. G. (2013). Detection of *Mycobacterium leprae* in saliva and the evaluation of oral sensitivity in patients with leprosy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(5), 572–577. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762013000500006>
83. Salah, I. B., Ghigo, E., & Drancourt, M. (2009). Free-living amoebae, a training field for macrophage resistance of mycobacteria. *Clinical*

microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 15(10), 894–905.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03011.x>

84. Sarode, G., Sarode, S., Anand, R., Patil, S., Jafer, M., Baeshen, H., & Awan, K. H. (2020). Epidemiological aspects of leprosy. *Disease-a-month: DM*, 66(7), 100899. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.100899>
85. Schilling, A. K., Avanzi, C., Ulrich, R. G., Busso, P., Pisanu, B., Ferrari, N., Romeo, C., Mazzamuto, M. V., McLuckie, J., Shuttleworth, C. M., Del-Pozo, J., Lurz, P., Escalante-Fuentes, W. G., Ocampo-Candiani, J., Vera-Cabrera, L., Stevenson, K., Chapuis, J. L., Meredith, A. L., & Cole, S. T. (2019). British Red Squirrels Remain the Only Known Wild Rodent Host for Leprosy Bacilli. *Frontiers in veterinary science*, 6, 8. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00008>
86. Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., & Williams, D. L. (2006). The continuing challenges of leprosy. *Clinical microbiology reviews*, 19(2), 338–381. <https://doi.org/10.1128/CMR.19.2.338-381.2006>
87. Secretaría de Salud, Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud. Dirección General Adjunta de Epidemiología. (2019). Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de las Micobacteriosis (Tuberculosis y Lepra). Pags 53 - 62. http://187.191.75.115/gobmx/salud/documentos/manuales/18_Manual_Mico_bacteriosis.pdf

88. Sharma, P., Kumar, A., Tuknayot, A., Thami, G. P., & Kundu, R. (2019). Lucio Phenomenon: A Rare Presentation of Hansen's Disease. *The Journal of clinical and aesthetic dermatology*, 12(12), 35–38.
89. Sharma, R., Singh, P., Loughry, W. J., Lockhart, J. M., Inman, W. B., Duthie, M. S., Pena, M. T., Marcos, L. A., Scollard, D. M., Cole, S. T., & Truman, R. W. (2015). Zoonotic Leprosy in the Southeastern United States. *Emerging infectious diseases*, 21(12), 2127–2134.
<https://doi.org/10.3201/eid2112.150501>
90. Sharma, R., Singh, P., McCoy, R. C., Lenz, S. M., Donovan, K., Ochoa, M. T., Estrada-Garcia, I., Silva-Miranda, M., Jurado-Santa Cruz, F., Balagon, M. F., Stryjewska, B., Scollard, D. M., Pena, M. T., Lahiri, R., Williams, D. L., Truman, R. W., & Adams, L. B. (2019). Isolation of Mycobacterium lepromatosis and Development of Molecular Diagnostic Assays to Distinguish M. leprae and M. lepromatosis. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, ciz1121. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz1121>
91. Singh, P., & Cole, S. T. (2011). Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future microbiology*, 6(1), 57–71.
<https://doi.org/10.2217/fmb.10.153>
92. Singh, P., Benjak, A., Schuenemann, V. J., Herbig, A., Avanzi, C., Busso, P., Nieselt, K., Krause, J., Vera-Cabrera, L., & Cole, S. T. (2015). Insight into the evolution and origin of leprosy bacilli from the genome sequence of Mycobacterium lepromatosis. *Proceedings of the National Academy of*

Sciences of the United States of America, 112(14), 4459–4464.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1421504112>

93. Smith, W. C., & Aerts, A. (2014). Role of contact tracing and prevention strategies in the interruption of leprosy transmission. *Leprosy review*, 85(1), 2–17.
94. Takade, A., Umeda, A., Matsuoka, M., Yoshida, S., Nakamura, M., & Amako, K. (2003). Comparative studies of the cell structures of *Mycobacterium leprae* and *M. tuberculosis* using the electron microscopy freeze-substitution technique. *Microbiology and immunology*, 47(4), 265–270.
<https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2003.tb03394.x>
95. Tatipally, S., Srikantam, A., & Kasetty, S. (2018). Polymerase Chain Reaction (PCR) as a Potential Point of Care Laboratory Test for Leprosy Diagnosis-A Systematic Review. *Tropical medicine and infectious disease*, 3(4), 107.
<https://doi.org/10.3390/tropicalmed3040107>
96. Tió-Coma, M., Wijnands, T., Pierneef, L., Schilling, A. K., Alam, K., Roy, J. C., Faber, W. R., Menke, H., Pieters, T., Stevenson, K., Richardus, J. H., & Geluk, A. (2019). Detection of *Mycobacterium leprae* DNA in soil: multiple needles in the haystack. *Scientific reports*, 9(1), 3165.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39746-6>
97. Torres-Guerrero, Edoardo & Sánchez-Moreno, Elisa & Atoche-Diéguéz, Carlos & Carrillo Casas, Erika Margarita & Arenas, Roberto & Xicohtencatl-Cortes, Juan & Hernández-Castro, Rigoberto. (2018). Identification of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepromatosis* in Formalin-Fixed

- and Paraffin-Embedded Skin Samples from Mexico. *Annals of Dermatology*. 30. 562. <http://doi.org/10.5021/ad.2018.30.5.562>
98. Trave, I., Barabino, G., Cavalchini, A., & Parodi, A. (2020). Long-term ulcerations caused by Mycobacterium lepromatosis. *International journal of mycobacteriology*, 9(2), 223–225. https://doi.org/10.4103/ijmy.ijmy_40_20
99. Truman, R. W., Andrews, P. K., Robbins, N. Y., Adams, L. B., Krahenbuhl, J. L., & Gillis, T. P. (2008). Enumeration of Mycobacterium leprae using real-time PCR. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(11), e328. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000328>
100. Turankar, R. P., Pandey, S., Lavania, M., Singh, I., Nigam, A., Darlong, J., Darlong, F., & Sengupta, U. (2015). Comparative evaluation of PCR amplification of RLEP, 16S rRNA, rpoT and Sod A gene targets for detection of M. leprae DNA from clinical and environmental samples. *International journal of mycobacteriology*, 4(1), 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.11.062>
101. Vera-Cabrera, L., Escalante-Fuentes, W. G., Gomez-Flores, M., Ocampo-Candiani, J., Busso, P., Singh, P., & Cole, S. T. (2011). Case of diffuse lepromatous leprosy associated with "Mycobacterium lepromatosis". *Journal of clinical microbiology*, 49(12), 4366–4368. <https://doi.org/10.1128/JCM.05634-11>
102. Vera-Cabrera, L., Escalante-Fuentes, W., Ocampo-Garza, S. S., Ocampo-Candiani, J., Molina-Torres, C. A., Avanzi, C., Benjak, A., Busso, P., Singh, P., & Cole, S. T. (2015). Mycobacterium lepromatosis Infections in

- Nuevo León, Mexico. *Journal of clinical microbiology*, 53(6), 1945–1946.
<https://doi.org/10.1128/JCM.03667-14>
103. Walker, S. L., & Lockwood, D. N. (2007). Leprosy. *Clinics in dermatology*, 25(2), 165–172.
<https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2006.05.012>
104. Walker, S. L., & Lockwood, D. N. (2008). Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Leprosy review*, 79(4), 372–386.
105. Wheat, W. H., Casali, A. L., Thomas, V., Spencer, J. S., Lahiri, R., Williams, D. L., McDonnell, G. E., Gonzalez-Juarrero, M., Brennan, P. J., & Jackson, M. (2014). Long-term survival and virulence of *Mycobacterium leprae* in amoebal cysts. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(12), e3405.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003405>
106. White, C., & Franco-Paredes, C. (2015). Leprosy in the 21st century. *Clinical microbiology reviews*, 28(1), 80–94.
<https://doi.org/10.1128/CMR.00079-13>
107. World Health Organization. (1998). Expert Committee on Leprosy, 7th Report, 1998: 1-43.
108. World Health Organization. (2017). Integrating Neglected Tropical Diseases Into Global Health and Development. ISBN 978-92-4-156544-8. pag 212-216.
109. World Health Organization. (2018). Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. ISBN: 978 92 9022 638 3
110. World Health Organization. (2019). Weekly epidemiological record leprosy 2019. Nos. 35/36; 94:389–412.

111. Ya, S., Muhamad, R., Zakaria, R., Ishak, A., & Abdullah, W. (2020). Lucio Phenomenon: Sequelae of Neglected Leprosy. *Korean journal of family medicine*, 10.4082/kjfm.19.0068. Advance online publication. <https://doi.org/10.4082/kjfm.19.0068>
112. Yoon, K. H., Cho, S. N., Lee, M. K., Abalos, R. M., Cellona, R. V., Fajardo, T. T., Jr, Guido, L. S., Dela Cruz, E. C., Walsh, G. P., & Kim, J. D. (1993). Evaluation of polymerase chain reaction amplification of *Mycobacterium leprae*-specific repetitive sequence in biopsy specimens from leprosy patients. *Journal of clinical microbiology*, 31(4), 895–899. <https://doi.org/10.1128/JCM.31.4.895-899.1993>