

IDENTIFICAÇÃO ESPECÍFICA DO *M. Leprae* PELA TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Cristine HACKEL *

RESUMO - A autora descreve a metodologia baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) para identificação específica do DNA de *Mycobacterium leprae* e apresenta uma revisão das estratégias relacionadas à escolha dos oligonucleotídeos iniciadores de síntese do DNA ("**primers**") e dos critérios de especificidade e sensibilidade necessários à utilização desse método em estudos clínicos e experimentais

Palavras-chave: Polimerase. Reação em cadeia. *M. Leprae*. DNA. Identificação.

Os métodos moleculares atualmente utilizados para a detecção de microorganismos patogênicos baseiam-se no emprego de sondas de DNA e/ou RNA espécie específicas e na reação em cadeia de uma polimerase de DNA para aumento de sequências nucleotídicas específicas presentes em amostras clínicas. Esse último método, que vem revolucionando a prática da Biologia Molecular, foi inicialmente descrito por Saiki e cols¹⁸ em 1985 na revista Science, muito embora o princípio original já tivesse sido enunciado por Kleppe^o em 1971.

O princípio da reação PCR (de "polymerase chain reaction") se baseia na síntese enzimática dirigida por segmentos iniciadores de DNA, oligonucleotídeos sintéticos também chamados de "primers", numa reação cíclica que envolve três etapas.

A primeira delas consiste na desnaturação térmica da dupla fita de DNA que servirá como molde, o que é obtido por

incubação rápida (de 30 segundos a 1 minuto) à 95^o C.

A segunda consiste em permitir a hibridação dos "primers" (chamado "annealing") com a sequência alvo, o que se obtém com o abaixamento da temperatura para valores entre 37^o C e 60^o C, onde a reação é mantida durante cerca de um minuto. Nessa etapa, a temperatura de hibridação é calculada levando-se em consideração o tamanho e a composição de bases dos oligonucleotídeos utilizados como iniciadores de cópia de DNA.

Finalmente, a terceira etapa é a etapa de extensão (ou polimerização) dos oligonucleotídeos com o auxílio da enzima polimerase do DNA, o que se faz usualmente em temperatura em torno de 70^o a 72^o C, durante o intervalo de tempo de um a três minutos.

A cada ciclo, ambas as fitas de DNA servem de molde para a geração de duas novas moléculas de DNA dupla fita que passam também a servir como sequência alvo na próxima etapa de polimerização. Isto conduz, teoricamente, à duplicação do número de sequências alvo a cada ciclo, conduzindo a um acúmulo exponencial do número de

(*) Profa. Assistente Doutora do Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Caixa Postal 6111, CEP 13081, Campinas, SP, Brasil.

cópias sintetizadas. Assim, a partir de um único gene de aproximadamente 1pg pode-se obter cerca de 200ng de DNA ampliado após 20 ciclos de reação. Tal quantidade de DNA pode ser diretamente visualizada sob luz ultra-violeta após eletroforese em gel de agarose e coloração com brometo de etídio. A existência do produto de ampliação testemunha a presença de sequência de interesse no material.

A reação PCR passou a ser amplamente utilizada desde que Kogan e cols¹⁰, em 1987, introduziram o uso de uma enzima termoestável, a Taq DNA polimerase, identificada em um microorganismo termofílico (*Thermus aquaticus*)⁴ capaz de crescer em temperatura de 70 à 75° C. A resistência dessa enzima a temperaturas elevadas, associada a uma alta fidelidade de cópia e à sua atividade de síntese mesmo em temperaturas inferiores à temperatura de polimerização, permitem a sua edição a cada ciclo.

Uma reação típica é realizada num volume de 50 a 100 microlitros contendo, entre outros reagentes, os quatro desoxiribonucleotídeos dATP, dTTP, dGTP, dCTP os "primers" (10^6 a 10^{14} moléculas de cada nucleotídeo) e cerca de 1 a 2,5 unidades de enzima. Os ciclos podem ser realizados manualmente em banho-maria com temperaturas ajustadas a cada etapa, ou em incubadores termocíclicos programáveis já comercializados no mercado internacional.

São inúmeras as aplicações dessa técnica de amplificação de DNA. Por seu intermédio, pode-se, por exemplo: 1) estudar variações de seqüências nucleotídicas e rearranjos cromossômicos, 2) realizar o sequenciamento direto de DNA genômico ou mitocondrial, 3) caracterizar as variações alélicas da região HLA a fim de esclarecer a sua relação com a suscetibilidade à determinadas doenças e 4) oferecer novas possibilidades para o diagnóstico pré-natal de algumas anomalias hereditárias, tais como as hemoglobinopatias, as distrofias musculares do tipo Duchenne e do tipo Becker e as deficiências de alfa 1 antitripsina e de hipoxantina fosforribosil-transferase, entre outras^{30,17}.

Ao nível diagnóstico, uma grande vantagem da reação PCR é a de poder ser realizada sobre um lisado celular bruto. dis-

pensando-se assim a extração e purificação do DNA. Os mais diversos tipos de tecido podem ser utilizados: bulbo capilar, muco nasal, biópsias de pele ou de vilosidades coriônicas e até de espécimes preservados em museus, tomando-se o cuidado apenas de eliminar os fatores inibidores da Taq DNA polimerase (tais como SDS, úreia e etanol) na preparação do material.

A sensibilidade dessa reação é tão grande que permite detectar a presença de uma única seqüência alvo em 10^6 células^o ou mesmo analisar o genótipo haplóide de um único espermatozóide humano². Não se deve esquecer, contudo, que essa grande sensibilidade da reação pode levar a resultados falsamente positivos., pois quantidades ínfimas de contaminação de DNA podem ser detectadas. Recomenda-se assim, que a manipulação dos reagentes e o preparo das soluções sejam realizados em ambientes separado daquele em que se manipulam as amostras de DNA, devendo-se sempre incluir um controle negativo (todos os reagentes, menos o DNA "molde") em todas as séries experimentais¹¹.

E feita uma seleção dos oligonucleotídeos destinados ao diagnóstico de *M. leprae*. Nos últimos dois anos, vários artigos foram publicados com o objetivo de avaliar as potenciais aplicações de técnicas de PCR no diagnóstico de micobactérias patogênicas, com o emprego de oligonucleotídeos específicos que foram selecionados com base na comparação das seqüências de DNA já descritas para organismos relacionados. Atualmente existem 3 grandes bancos de dados que podem ser consultados, via computador: EMBL, GENBANK e NBRF. Esses bancos de dados contêm tanto as seqüências nucleotídicas quanto as polipeptídicas mapeadas em procaríotos e eucariotos. Evidentemente, a cada ano novas seqüências são introduzidas, na medida em que os pesquisadores identificam novas proteínas e clonam e seqüenciam novos genes ou mesmo partes de genes. Em relação aos genes do *M. leprae*, de *M. tuberculosis* e de *M. bovis*, descreveram-se, até o momento, as seqüências correspondentes aos produtos gênicos discriminados na tabela 1,2,3,5,8,13,14,22,24,29,34,35

TABELA - SEQUÊNCIAS NUCLEOTIDICAS IDENTIFICADAS EM *M.leprae*, *M. tuberculosis* e *M.bovis*-BCG

ORGANISMO	PRODUTO	AUTORES
<u>M.leprae</u>	12KDa	<i>Hartskeerl e col. 1990 (8)</i>
	18KDa	<i>Booth e col. 1988 (3)</i>
	28KDa	<i>Thangaraj e col. (27)</i>
	36KDa	<i>Thole e col. 1990 (29)</i>
	65KDa	<i>Mehra e col. 1986 (14)</i>
	70KDa	<i>Garsia e col. 1989 (5)</i>
	16sRNA	<i>Stackenbrandt e col. 1989 (25)</i>
<u>M.tuberculosis</u>	10KDa	<i>Baird e col. 1989 (2)</i>
	12KDa	<i>Shinnick e col. 1989 (24)</i>
	19KDa	<i>Young e col. 1988 (35)</i>
	38KDa	<i>Andersen & Hansen 1989 (1)</i>
	65KDa	<i>Shinnick 1987 (22)</i>
	71KDa	<i>Garsia e col. 1989 (5)</i>
<u>M.bovis</u>-BCG	22KDa	<i>Yamaguchi e col. 1989 (34)</i>
	64KDa	<i>Thole e col. 1987 (28)</i>
	70KDa	<i>Garsia e col. 1989 (5)</i>
	antígeno	<i>Mitsuo e col. 1988 (13)</i>
	16sRNA	<i>Suzuki e col. 1988 (26)</i>

Algumas das proteínas codificadas por esses genes, como por exemplo os antígenos de 65KDa, de 70KDa e de 18 KDa assemelham-se às proteínas do tipo "heat shock" ou proteínas de estresse, de ampla distribuição no reino animal e vegetal. Anticorpos contra essas proteínas micobacterianas são encontrados em pacientes com tuberculose e hanseníase e podem ser produzidos mediante inoculação de lisados micobacterianos em camundongos³⁵.

Nos parágrafos que se seguem, pretende-se fazer uma breve revisão da estratégia de seleção dos oligonucleotídeos utilizados na reação PCR para a detecção de *Mycobacterium leprae*, bem como um breve resumo dos trabalhos publicados nessa área, entre os quais se situa o da autora⁶, realizado em colaboração com os pesquisadores do Serviço de Genética Aplicada da

Universidade Livre de Bruxelas e do Departamento de Microbiologia Instituto de Medicina Tropical de Antuérpia, Bélgica.

Nesse trabalho, os oligonucleotídeos específicos destinados ao diagnóstico de *M.leprae* foram escolhidos a partir de análise comparativa das seqüências nucleotídicas dos genes que codificam os antígenos de 65KDa de *M.leprae*, *M.tuberculosis* e de *M.bovis*. Como se pode visualizar na Figura 1, as seqüências nucleotídicas da região central desses genes são praticamente idênticas no bacilo de Koch e no BCG, sendo que ambas apresentam cerca de 87% de homologia com a região correspondente do gene de *M.leprae*. As seqüências de *M.tuberculosis* e de *M.bovis* BCG das regiões situadas acima ("upstream") e abaixo ("downstream") dessa região central também apresentam 99% de homologia. Entretanto, quando comparadas às de *M.leprae*, essas seqüências

divergem rapidamente, observando-se cerca de 80% de homologia entre as regiões acima da região central do gene e apenas 45% de homologia entre as regiões situadas abaixo dessa região central.²³

Escolheram-se assim, dois oligonucleotídeos situados na região de menor homologia (Figura 2), que foram então quimicamente sintetizados "in vitro". Esses dois "primers", denominados PLp1 e PLp2, foram utilizados como indicadores de síntese de DNA na reação PCR, determinando a formação de um fragmento de DNA de 386 pb. Esse fragmento foi visualizado em gel de agarose quando a reação foi realizada em amostras contendo DNA de *M. leprae* e de um controle positivo, o plasmídeo pIL161. Esse último é um plasmídeo recombinante que contém a sequência completa do gene do antígeno de 65 KDa do *M. leprae* (gentilmente cedido pelos Drs. Lamb e Colston do National Institute for Medical Research de Londres). Como esperado, não foram observadas bandas de amplificação quando os DNAs de *M.tuberculosis* e de *M.bovis BCG* eram colocados em reação.

Considerando-se que outras espécies de micobactérias podem colonizar a pele

humana^{20,21} e que as sequências do gene de proteína de 65 KDa dessas outras espécies ainda não são conhecidas, tornava-se necessário então demonstrar, com razoável margem de segurança, que nenhuma outra micobactéria poderia ter seu DNA amplificado com os oligonucleotídeos supostamente específicos para *M.leprae*. Assim, a reação PCR foi realizada em presença do DNA de outras 17 espécies de micobactérias (Figura 3). Ao mesmo tempo, dever-se-ia excluir a possibilidade de um resultado falso negativo, qual seja, ausência da formação do fragmento de 386 pb por inibição da enzima Taq polimerase, em virtude de algum contaminante residual na preparação do DNA. Isto foi solucionado mediante a escolha de dois oligonucleotídeos dentro da região de maior homologia do gene. Teoricamente, espera-se que uma região de grande homologia tenha sido bastante conservada durante o processo evolutivo, devendo estar presente em todas micobactérias. Esses dois novos "primers", denominados PMp1 e PMp2, se mostraram eficientes na produção de um fragmento de DNA de 154 pb nas diversas espécies de micobactérias testadas, confirmando o esperado teórico.

REGIÕES	"UPSTREAM"	CENTRAL (ORF*)	°DOWNSTREAM°
M. Tuberculosis	XXXXXXXXXXXXX 90%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 100%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 99%
M. bovis BCG	XXXX-XXXXXX 80%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 98%	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX 45%
M. leprae	XXX-XXX-XXX	XXXXXX-XXXXXX	X-X-X-X-X-X-X
	(66)	(1830) **	

FIGURA 1 - Porcentagem de homologia entre as sequências nucleotídicas dos genes das proteínas de 65, 64 e 65 KDa de *M.tuberculosis*, *Mbovis-BCG* e *M.leprae* (adaptado de Shinnick e cols.)

*ORF de "open reading frame", porção codificadora do gene

**Os dígitos entre parênteses correspondem à posição das bases que delimitam a ORF, segundo numeração utilizada por Mehra e col.

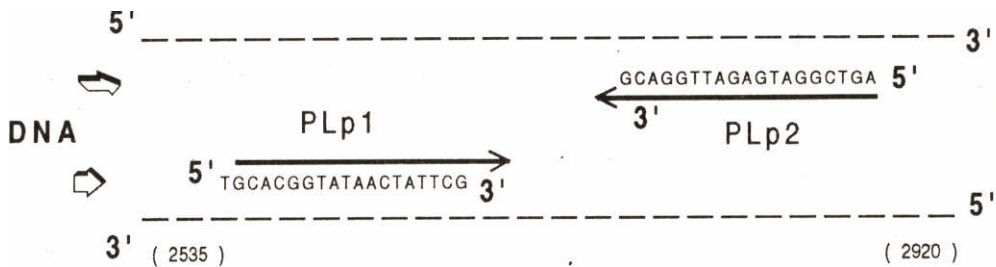


FIGURA 2 - Localização dos "primers" específicos na porção terminal do gene da proteína de 65 Kda de *M.leprae*

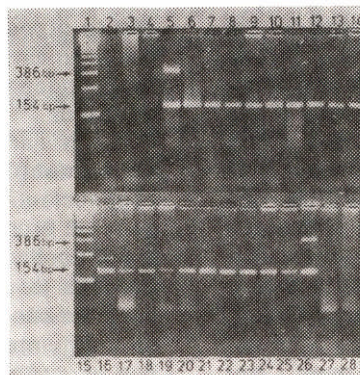


FIGURA 3 - Ampliação específica do DNA de *M.leprae* com o auxílio dos "primers" PLp1 e PLp2. A ampliação dos produtos não específicos dos DNAs micobacterianos foi realizada com o auxílio dos "primers" PMp1 e PMp2.

Visualização dos produtos ampliados corados com o brometo de etídio: 1 e 15 marcadores de peso molecular, 123 bp (Gibco-BRL)

2 - sistema sem DNA	11 - <i>M.chelonae</i> (*)	21 - MAIS 8 (*)
3 - DNA humano	12 - <i>M.malmoense</i> (*)	22 - <i>M.nonchromogenicum</i> (*)
4 - DNA de tatu	13 - <i>M.avium</i> (ATCC)	23 - <i>M.shimodei</i> (*)
5 - <i>M.leprae</i> (*)	14 - <i>M.scrofulaceum</i> (*)	24 - <i>M.fortuitum</i> (CI PT)
6 - <i>M.tuberculosis</i> (**)	16 - MAIS 3 (*)	25 - <i>M.smegmatis</i> (***)
7 - <i>M.bovis</i> -BCG(CIPT)	17 - MAIS 4 (*)	26 - Plasmídeo pIL161
8 - <i>M.terrae</i> (*)	18 - MAIS 5 (*)	27 - <i>E.coli</i>
9 - <i>M.marium</i> (*)	19 - MAIS 6 (*)	28 - DNA de arenque
10 - <i>M.gordonae</i> (*)	20 - MAIS 7 (*)	

MAIS = complexo *M.avium* = *intracellulare* = *scrofulaceum*

(*) isolados de tatu, Inst. de Medicina Tropical de Antuérpia

(**) isolado de "sputum" humano, Inst. de Medicina tropical, Antuérpia

(***) 607 Montreal

CI PT = Collection Institut Pasteur

ATCC = American Type Culture Collection

Os resultados de todos esses experimentos podem ser vistos nos gels de agarose reproduzidos na Figura 3. O fragmento de 154 pb é observado em todas as amostras de DNA micobacteriano (nº s 5 a 25), ao passo que a banda de 386 pb só é visualizada em **M.leprae** (nº 5) o no plasmídeo pIL161 (nº26). Como controle de reações, além do controle negativo preconizado, foram incluídos os DNAs humano, do **E.coll**, de tatu não infectado e de arenque (nºs 3,4,27 e 28).

Demonstrada a especificidade da reação, necessitava-se verificar a sua sensibilidade, e a possibilidade de realizá-la diretamente em células do **M.leprae**, sem extração do DNA. Para tanto dever-se-ia procurar um procedimento simples para lise da parede celular que dispensasse a utilização de substâncias inibidoras da Taq polimerase e que minimizasse a perda de material que ocorre quando se purifica o DNA. com base nas observações de Portaels e col¹⁶, de que ciclos sucessivos de congelamento e aquecimento causam lesões de parede celular visíveis em microscopia eletrônica. Adotou-se o procedimento proposto por Woods e Cole³², onde os bacilos são submetidos a, pelo menos, 5 choques térmicos sucessivos (por exemplo, 5' a 95º C, 1' a 80ºC), para permitir o acesso dos "primers" e da enzima Taq polimerase ao DNA de **M.leprae** durante a reação PCR.

Mediante tal procedimento, pode-se estimar a sensibilidade da reação por intermédio de diluições seriadas realizadas a partir de uma suspensão bacilar contendo 2x 10⁸ **M. leprae/ml**, purificada de coxim plantar de camundongos segundo o protocolo TDR/**IMMLEP** da Organização Mundial de Saúde³³. Os resultados revelaram-se positivos até a diluição 10E⁻⁴, correspondente a presença de aproximadamente 100 bacilos no tubo de reação.

O mesmo nível de sensibilidade foi declarado por Woods e Cole³², que também utilizaram "primers" derivados da sequência nucleotídica do antígeno de 65KDa de **M. leprae**. Esses produtos testaram a eficiência da reação PCR em suspensões bacilares não-purificadas obtidas do coxim plantar do camundongo e de 4 biópsias de pacientes com hanseníase virchoviana. Contudo, esses

autores não verificaram a especificidade dos "primers" selecionados.

Hartskeerl e colaboradores' obtiveram excelentes resultados com a utilização de "primers" derivados da sequência do antígeno de 36 KDa de **M.leprae**. Os experimentos desses autores foram realizados em DNAs isolados de 17 espécies de micobactérias e de 7 bactérias comumente encontradas em amostras clínicas. Os oligonucleotídios utilizados se mostram específicos para o diagnóstico do bacilo de Hansen e permitem, segundo os autores, a detecção de 100 fg de DNA, o que corresponde a aproximadamente, 20 bactérias. Essa estimativa é válida quando a reação se processa na presença do DNA purificado, mas observa-se uma menor sensibilidade quando lisados celulares brutos são utilizados.

Williams e colaboradores³¹ realizaram experimentos semelhantes utilizando oligonucleotídios derivados da sequência do gene da proteína de 18 KDa, obtendo resultados positivos e específicos para **M.leprae** isolados de biópsias de pele de pacientes com hanseníase virchoviana e de animais naturalmente infectados de diferentes regiões geográficas do planeta. Para verificar a sensibilidade da reação, esses autores semearam diferentes alíquotas de **M.leprae** em homogenados de biópsia de pele humana não infectada, para simular as condições presentes em pacientes paucibacilares. Esses autores observaram resultados positivos para amostras contendo 100 bacilos e negativos para amostras contendo 10 bacilos ou menos, concluindo, assim, que o limite inferior para a detecção do **M.leprae** na presença de DNA humano é de 100 organismos.

Com o objetivo de melhorar a sensibilidade do método em suspensões não purificadas de **M.leprae**, Plikaytis e colaboradores¹⁵ desenvolveram o que poderia ser traduzido por PCR em ninho (nested PCR), com o auxílio de dois pares de "primers" derivados do gene do antígeno de 65 KDa. O procedimento consiste em promover a amplificação do DNA com dois oligonucleotídios "externos" que dirigem a síntese de um segmento de 714 bp nos primeiros 25 ciclos, e mais de 15 ciclos adicionais, introduzir dois oligonucleotídios "internos" que utilizam o segmento amplifica-

do como molde. Esse 2º par de "primers" dá origem então a um fragmento de 347 pb. Além do evidente aumento de especificidade, esses autores conseguiram detectar a presença de até 20 organismos em lisados celulares brutos de tecidos infectados de camundongo.

Tendo-se em mente todas as considerações feitas acima, pode-se concluir que o aumento específico do ADN de **M.leprae**

constitui uma técnica promissora para a rápida identificação dessa micobactéria em amostras clínicas e experimentais. Graças à sua maior sensibilidade, a aplicação dessa técnica pode vir a facilitar o diagnóstico de quadros clínicos paucibacilares de hanseníase, como é o caso dos pacientes com hanseníase indeterminada ou com o tipo tuberculóide da doença.

*ABSTRACT - The author describes the methodology based on the polymerase chain reaction (PCR) for the specific detection of **Mycobacterium leprae** DNA, by reviewing the approaches concerning the choice of oligonucleotide primers and the criteria of specificity and sensitivity required for a useful tool in clinical and experimental studies.*

Key words: Polymerase, chain reaction, **M.leprae** DNA. Identification.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, A.B & HANSEN, E.B.
Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular protein of **Mycobacterium tuberculosis**. Infect. Immun. 57:2481-2488, 1989.
- BAIRD, P.N.; HALL, L.M.C., COATES, A.R.
Cloning and sequence analysis of the 10KDa antigen gene of **Mycobacterium tuberculosis**. J.Gen.Microbiol. 135:931-939, 1989.
- BOOTH, R.J.; HARRIS, D.P.; LOVE, J.M.; WATSON, J.D.
Antigenic proteins of **Mycobacterium leprae**: complete sequence of the gene for the 18-KDa protein. J.Immunol. 140:597-601, 1988.
- CHIEN, A.; EDGAR, D.B.; TRELA, J.M.
Desoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile **thermus aquaticus**. J. Bacteriol. 127:1550-1557, 1976.
- GARSIA, R.J.; HELLOVIST, L.; BOOTH, R.J.; RADFORD, A.J.; BRITTON, W.J.; ASTBURY, L.; TRENT, R.J.; BASTEN, A.
Homology of the 70-kilodalton antigens from **Mycobacterium leprae** and **Mycobacterium bovis** with the **Mycobacterium tuberculosis** 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock proteins 70 of eucaryoter. Infect, Immun. 57:204-212, 1989.
- HACKEL, C.; HOUARD, S.; PORTAELS, F.; VAN ELSEN, A.; HERZOG, A.; BOLLEN, A.
Specific identification of **Mycobacterium leprae** by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes. 4:205-210, 1990.
- HARTSKEERL, R. A.; DE WIT, M.Y.L.; KLASTSER, P.R.
Polymerase chain reaction for the detection of **Mycobacterium leprae**. Gen. Microbiol. 135:2357-2364, 1989.
- HARTSKEERL, R.A.; STABEL, L.F.E.M.; HERMANS, C.J.; KLASTSER, P.R.; THOLE, J.E.R.
Nucleotide and deduced amino acid sequence of a **Mycobacterium leprae** **12K** protein. Nucleic Acid Res. 8:1294, 1990.
- KLEPPE, K.; OHTSUKA, E.; KLEPPE, E.; MOLINEUX, I.; KHORANA, H.C.
Studies on polynucleotides XCVI: repair

- replication of short synthetic DNAs as catalyzed by DNA polymase. J. Mol.Biol. 56:341-361, 1971
10. KOGAN,S.C; DOHERTY,M.,GITSCHIER,J.
An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. N. Engl. J. Med. 317:985-990, 1987.
 11. KWOK, S.
Procedures to minimize PCR product carry over. In: PCR PROTOCOLS. A guide to methods and applications. San Diego, Academic Press, 1990. 482p.
 12. LI, H; CYLLENSTEN, U.B; CUI, X.; SAIKI, R.K.; BRILICH, N.A.; ARNHEIM, N. application and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. Nature. 335:414-417,1988
 13. HATSUO, K.; YAMAGUCHI, R.; YAMAZAKI, A.; TASAKA, G.; YAMADA, T. Cloning and expression of the **Mycobacterium bovis** BCG gene for extracellular antigen. J. Bacteriol. 170:3847-3854, 1988.
 14. MEHRA,V.; SWEETSER,C.; YOUNG, R.A
Efficient mapping of protein antigenic determinants. Proc. Natl. Acad. Sci. 83:7013-7017, 1986.
 15. PLIKAYTIS, B. B.; GELBER, R. H.; SHINNICK, T.M. Rapid and sensitive detection of **Mycobacterium leprae** using a nested primer gene amplification assay. J. Clin. Microbiol. 28:1913-1917, 1990.
 16. PORTAELS, F.; FISSETE, K.; DE RIDDER, K.; MACEDO, P.M.; DE MUYNCK, A.; SILVA, M.T. Effects of freezing and thawing on the viability and the ultrastructure of in vivo grown mycobacteria. Int. J. Lepr. 56:5805 87, 1988.
 17. REISS, J. & COOPER, D.N. Application of the polymerase chain reaction to the diagnosis of human genetic disease. Ilumen Genetics. 85:1-8, 1990.
 18. SAIKI, R.K; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.D.; HORN, C.T.; ERLICH, H.A.; ARHNEIM, N. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle celi anemia. Science. 230:1350-1354,1985.
 19. SAIKI,R.K.; CELFAND,D.H.; STOFFEL,S.; SCHAFF, S.J.; HIGUCHI, R. HORN, C.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 239:487-491, 1988
 20. SALEM,J.I.; CADELHA, A.R.; MAROJA,F.; DAVID, H.L. Non cultivable mycobacteria in ulcers of the skin. Acta Leprol. 7 (Suppl.1):10-15, 1989.
 21. SALEM, J.I.; CONTIJO FILHO, P.; LEVY FREDAULT, V.; DAVID, H.L. Isolation and characterization of mycobacteria colonizing the healthy skin. Acta Leprol. 7 (Suppl.1):18-20, 1989.
 22. SHINNICK, J.I.; CONTIJO FILHO, P.; LEVY FREDAULT, V.; DAVID, H.L. Isolation and characterization of micobacteria colonizing the healthy skin. Acta Leprol. 7(Suppl.1):18-20 1989.
 23. SHINNICK,T.M.; SWEETSER, D.; THOLE,J.; VAN EMBDEN, J.; EONG, R.A. The etiologic agents of leprosy and tuberculosis share an immunoreactive protein antigen with the vaccine strain **Mycobacterium bovis** BCG. Infect. Immun. 55:1932-1935, 1987.
 24. SHINNICK, T.M.; PLIKATIS, B.B.; HYCHE, A.D.; VAN LANDIGHAM, R.M.; WALKER, L.L. **Mycobacterium tuberculosis** BCG a protein has homology with the **Escherichla coil** Groes protein. Nucleic Acid Res. 17:1254, 1989.

25. STACKEMDRANDT, E.; SMIDA,; KAZDA,J.
The primary structure of the 16SrRna of **Mycobacterium leprae**: its use in phylogeny and development of •NA probes. Acta Leprol. 7(Suppl. 1):222-225, 1989.
26. SUZUKI, Y.; NAGATA, A.; ONO, Y.; YAMADA, T. Complete nucleotide sequence of the 16SrRNA gene of **Mycobacterium bovis** BCG, J.Bacteriol. 170:2886-1889, 1988.
27. TRANOCARAJ, H.S.; LAMB, F.I.; DAVIS, E.O.; JENNER, P.J., JEYAKUMAR, L.H., COLSTON, M.J. Identification, sequencing, and expression of **Mycobacterium leprae** superoxide dismutase, a major antigen. Infect. Immun. 58:1937-1942, 1990.
28. THOLE, J.E.R.; KEULEN, W.J.; KOLK, A.H.J.; GROOTHUIS, D.C; BERWALD, L.G.;TIESJEMA,, R.H.; VAN EMBDEN,J.D.A. Characterization, sequence determination, and immunogenicity of a 64 kilodalton protein of **Mycobacterium bovis** BCG expressed in **Escherichia coil** K-12. Infect. Immun.55:1466 1475, 1987.
29. THOKE, J.E.; STADEL, L.F.; SUYKERBUYK, D.E.; DE WITH, M.Y.; KLATSER, P.R.; KOLK, a.h.; HARTSKEERL, R.A. A major immunogenic 36000 molecular antigen from **Mycobacterium leprae** contains an immunoreactive region of proline- rich repeats. Infect. Immun. 58:80-87, 1990.