

---

---

## Reactividad serológica y celular frente a proteínas micobacterianas en la enfermedad de Hansen.

Elsa Rada<sup>1</sup>, Nacarid Aranzazu<sup>2</sup>, Vestalia Rodríguez<sup>3</sup>, Rafael Borges<sup>4</sup> y Jacinto Convit<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioquímica, <sup>2</sup>Sección Clínica, Unidad de Dermatología Sanitaria,

<sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología, <sup>4</sup>Sección de Epidemiología,

<sup>5</sup>Dirección. Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Ministerio del Poder Popular para la Salud. Caracas, Venezuela.

**Palabras clave:** enfermedad de Hansen, serología, linfoproliferación, proteínas micobacterianas.

**Resumen.** Se diseñó un estudio para evaluar la reactividad inmunológica frente a diferentes preparaciones proteicas micobacterianas utilizando pruebas serológicas y de inmunidad celular. Para el estudio fueron incluidos pacientes con manifestaciones clínicas de lepra predominantemente de la forma multibacilar. Todos los pacientes fueron adultos con edad comprendida entre 20 y 39 años. El 58% correspondía a la forma clínica de Lepra Lepromatosa (LL) n=81, el 29% a la forma Borderline Lepromatosa (BL) n=41 y 10% a Borderline Borderline (BB) n=14. Solo el 3% fueron pacientes Borderline Tuberculoide (BT): 74% masculino y 26% femenino. El fenómeno reaccional más frecuente fue del tipo eritema nodoso leproso (ENL). Las proteínas micobacterianas ensayadas fueron: antígenos proteicos crudos totales de *Mycobacterium leprae* (MISA), *Mycobacterium bovis* (MbSA y MbSA de excreción), antígeno proteico de excreción parcialmente purificado con una movilidad relativa de 30 kDa (MI 30) y proteínas recombinantes de *Mycobacterium* (Mt70, Mb 65, MI 36, 28, 18 y 10 kDa) encontrándose que las proteínas recombinantes (MI10 kDa, MI 36 kDa) a mayor carga bacilar presentaban una mayor reactividad serológica estadísticamente significativa ( $p=0,0051$  y  $0,050$  respectivamente). La proteína de 30 kDa fue predominantemente reconocida por anticuerpos de los pacientes multibacilares. Los resultados demuestran que el promedio de los valores de anticuerpos en pacientes no reaccionales fueron superiores en presencia de proteínas completas (MbSA y MbSA de exc) en comparación con el grupo de pacientes que presentaron fenómenos reaccionales ( $p=0,000567$  y  $0,000061$  respectivamente) Este mismo comportamiento se observó frente a las proteínas micobacterianas individuales (30 kDa, 10 kDa y 36 kDa). La respuesta prolife-

rativa de los linfocitos T en los pacientes multibacilares reaccionales y no reaccionales frente a las proteínas micobacterianas (MISA, MI 10 kDa, MbSA, MbSA de excreción) fue negativa en ambos grupos.

### **Serological and cellular reactivity to mycobacterial proteins in Hansen's disease.**

*Invest Clin 2010; 51(3): 325 - 340*

**Key words:** Hansen's disease, serology, lymphoproliferation, mycobacterial proteins.

**Abstract.** The study was designed for evaluating immunological reactivity to various mycobacterial protein preparations using serological and cell-mediated immunological tests in patients with clinical leprosy signs, predominantly, with the multibacillary forms. All patients were adults with ages between 20 and 30 years. Fifty eight (n= 81) percent corresponded to Lepromatous Leprosy (LL), 29% (n= 41) to Borderline Lepromatous Leprosy (BL) and 10% (n=41) to Borderline Borderline Leprosy (BB); only 3% were Borderline Tuberculoid (BT) patients: 74% males and 26% females. The most frequent reactional phenomenon was of the Erythema Nodosum (ENL) type. The mycobacterial proteins tested were: total crude *Mycobacterium leprae* antigens (MISA); *Mycobacterium bovis* (MbSA and excretion MbSA); partially purified excretion protein antigen, with a 30kDa relative mobility (MI30); and recombinant *M. leprae* proteins (Mt70, Mb 65, MI 36, 28, 18 and 10 kDa). Two of the recombinant proteins (MI10 and MI 36 kDa) presented a statistically significant higher serological reactivity, directly related with a larger bacillary load ( $p= 0.0051$  and  $0.050$  respectively). The 30 kDa protein was predominantly recognized by antibodies from multibacillary patients. Results show that mean antibody values were higher in non reactional patients when tested against complete proteins (MbSA and ex MbSA) when compared with the group of patients who presented reactional phenomena ( $p= 0.000567$  and  $0.000061$ , respectively). Comparing reactional with non reactional patients, it was seen that mean antibody values against complete proteins (MbSA and ex MbSA) were higher in non reactional individuals ( $p= 0.000567$  and  $0.000061$ , respectively). This same behavior occurred towards individual mycobacterial proteins (30, 10 and 36 kDa). The T lymphocyte proliferative response in reactional and non reactional patients towards mycobacterial proteins (MISA, MI 10 kDa, MbSA, ex MbSA) was negative.

*Recibido: 26-10-2009. Aceptado: 18-03-2010.*

### **INTRODUCCIÓN**

Es importante señalar que el conocimiento y secuenciación del genoma micobac-

teriano ha dado nuevas directrices para la búsqueda y síntesis de proteínas que nos permitan desarrollar nuevas alternativas para realizar un diagnóstico temprano dando un trata-

miento oportuno y de esta manera reducir la transmisión de la enfermedad (1, 2).

Los principios básicos para el control de la lepra más allá del año 2009 seguirán basándose en la detección y el tratamiento temprano de los pacientes. Actualmente la estrategia mundial por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es reducir la carga bacilar de la lepra mediante terapia multidroga (MDT) y brindar acceso de control a todas las comunidades afectadas. Si se toma en cuenta que el período de incubación de las formas más graves de la lepra puede ser de siete años o más y que puede haber transmisión durante la etapa pre-clínica de la enfermedad, se reconoce la necesidad de vigilancia continua durante un tiempo prolongado para lograr esta meta (3, 4).

A pesar de que hasta los momentos no se ha podido cultivar *in vitro* el *Mycobacterium leprae* (5) se ha hecho un gran avance en las diferentes disciplinas que estudian la enfermedad.

Hay aspectos de mucho interés que hay que seguir estudiando entre ellas las reacciones tipo I y II en lepra y los eventos responsables de su aparición en algunos pacientes. Por otra parte, también es un aspecto de suma importancia el estudio de los mecanismos involucrados en el daño a nivel de nervios y de esta manera lograr prevenir las discapacidades (6).

Algunos componentes específicos del *Mycobacterium leprae* entre ellos componentes proteicos podrían jugar un papel en el desarrollo de una respuesta protectora mediada por linfocitos T y servir como marcadores diagnóstico a etapas tempranas de la enfermedad. Recientemente, se ha avanzado en la búsqueda de antígenos que tengan un potencial inmunogénico con la finalidad de desarrollar una inmunidad protectora en el hospedador (7, 8).

En el presente trabajo evaluamos la reactividad inmunológica tanto serológica como de inmunidad celular frente a diferen-

tes preparaciones micobacterianas en pacientes con enfermedad de Hansen.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Características de los pacientes estudiados

Todos los pacientes de Hansen fueron examinados en la Sección Clínica, Unidad de Dermatología Sanitaria, del Instituto de Biomedicina, dependencia de la Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela y del Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas, Venezuela. Se elaboró una historia clínica que incluyó los datos personales, examen físico completo y clasificación clínica de su enfermedad. Se utilizó un formato especial para esta investigación que incluyó información adicional acerca del número de historia del paciente, procedencia, edad, sexo, diagnóstico clínico, tiempo estimado de evolución de la enfermedad, tiempo del diagnóstico de la enfermedad, tratamiento, pruebas intradérmicas aplicadas, biopsia inicial, frotis de piel para búsqueda de bacilo ácido alcohol resistente (BAAR), presencia de fenómenos reaccionales, tiempo de evolución del fenómeno, biopsia de lesiones reaccionales, respuesta al tratamiento, enfermedad concomitante y grado de discapacidad. Los pacientes incluidos dieron consentimiento previo por escrito para la toma de muestras biológicas.

Los pacientes fueron remitidos al laboratorio para la toma de muestras: la sangre heparinizada fue usada para los ensayos de linfoproliferación (LTT) y la obtención de suero para los estudios serológicos, utilizando ensayo inmunoenzimático (ELISA) dirigido frente a diferentes proteínas micobacterianas.

### Agrupación de pacientes

Para el estudio de seguimiento de pacientes con proceso reaccional se trabajó con una población total de 140 adultos, con

un rango de edad entre 20 y 39 años, clasificados de acuerdo con los criterios de Ridley y Jopling (9), divididos en varios grupos, en su gran mayoría formas multibacilares: Lepra Lepromatosa (LL) n= 81, Borderline Lepromatosa (BL) n= 41 y el 10% Borderline Borderline (BB) n=14. Solo el 3% fueron pacientes Borderline Tuberculoide (BT) y por ser este grupo tan pequeño no se consideró en el análisis estadístico. En el estudio fue necesario controlar la coincidencia de fechas en la toma de muestras tanto en serología, en la prueba de transformación celular *in vitro* y en la bacteriología para luego poder interpretar los resultados de los ensayos realizados; por eso, en muchos casos los números de la muestra en el estudio fueron menores a 140.

En relación al grupo control utilizado en los ensayos de inmunidad celular, se incluyeron personas relativamente sanas, contacto de familiares enfermos y no relacionados (n= 117) y en los de serología se trabajó con un pool de sueros de personas sanas por cada placa.

### Índice bacteriológico

Como parte de la clasificación inicial y seguimiento de los pacientes, se determinó la densidad bacilar en las lesiones según escala logarítmica de la OMS (10). Se realizó la tinción de material obtenido de orejas, codos y rodillas con la coloración de Ziehl-Neelsen y se determinó el índice por microscopía (100X), actividad realizada en la Sección Clínica del Instituto de Biomedicina. Para esta investigación, se tomó el promedio de los seis valores obtenidos en las diferentes regiones, para tener un solo valor que representa el índice para cada paciente.

### Antígenos micobacterianos

Los antígenos utilizados para este estudio fueron los siguientes: BCG (bacilo completo de Calmette-Guerin, una cepa

atenuada de *Mycobacterium bovis* de Connaught Laboratories, Canadá; extracto soluble proteico de BCG (MbSA); extracto soluble proteico de *Mycobacterium leprae* (MISA); proteínas de excreción de *M. bovis* (MbSA excr); PPD (Statens Serum Institut, Tuberculin department D K, Copenhágen Dinamarca, batch RT 23), proteínas recombinantes *Mycobacterium tuberculosis* 70 kDa batch no: Mt70-7A; *M. bovis* 65 kDa batch no:MA 14; *M. leprae* 36 kDa batch no:MI 36 F-1; 28kDa batch no: MI 28-1A; 18 kDa batch no: MI 18-B y 10 kDa batch no: MI 10-2. Estas últimas facilitadas por el Banco de Proteínas recombinantes de la OMS. Otros antígenos utilizados en la prueba de inmunidad celular fueron: toxoide tetánico (TT) y uno no específico, la PHA; como activador policlonal.

### Obtención de los antígenos solubles

Los extractos solubles proteicos de *M. leprae* (MISA) y *M. bovis* (MbSA) se obtuvieron de la ruptura de los bacilos mediante el uso de una prensa francesa de presión a 10.000 lb/pulg<sup>2</sup>. Fueron utilizados ocho pasajes con la misma presión. Después de centrifugación para eliminar los restos bacilares, se concentraron las muestras mediante técnica de concentración utilizando el sistema Amicon (11, 12).

Para la obtención de las proteínas de excreción de *M. bovis* (MbSA excr), los bacilos se cultivaron en medio mínimo de Sauton (13) durante 6 semanas a 37°C. Al concluir este tiempo, el sobrenadante se obtuvo por filtración utilizando membranas Millipore de 1,2  $\mu$ m y 0,45  $\mu$ m; a cada litro de medio colectado se le añadió sulfato de amonio 85% de saturación durante 30 minutos. Posteriormente las muestras fueron sedimentadas y dializadas durante 48 horas. Finalmente fueron concentradas por ósmosis reversa con polietilenglicol (PM:2000). La determinación de la estimación de proteínas se hizo por el método del ácido bicin-

conínico (BCA) (14). Las proteínas completas micobacterianas MISA, MbSA y Mbexc fueron ensayadas tanto en serología como en respuesta de inmunidad celular.

El bacilo de *M. bovis* autoclavado, proveniente de la vacuna BCG (Connaught Laboratorios Canadá) se utilizó para ensayos de inmunidad celular, a una concentración 18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

La proteína de 30 kDa de *Mycobacterium leprae* parcialmente purificada se obtuvo a partir de un gel preparativo SDS-PAGE 10% en condiciones disociantes, no desnaturizantes (15). Un mg de antígeno micobacteriano proteico completo se resolvió en polipéptidos de distintas movilidades, los que fueron fraccionados por electroelución en un minielectroelutor BioRad (65-1256) según instrucciones del fabricante. Esta proteína, con movilidad relativa de 30 kDa, fue evaluada solo en los ensayos de anticuerpos.

Los antígenos recombinantes purificados micobacterianos Mt 70 kDa, Mb65 kDa, ML36 kDa, MI28 kDa, MI18 kDa, MI10 kDa fueron utilizados a una concentración de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  según estandarización previamente realizada en el espectro de Hansen (16).

La obtención de las proteínas recombinantes facilitadas por la OMS siguió el procedimiento estándar del manejo de fagos y plásmidos en el ADN incluidas en la bacteria *E. coli* K12, cepa 1688. En relación a las proteínas recombinantes de 36 y 10 kDa de *M. leprae*, estas fueron proteínas de fusión donde el vector de expresión utilizado es el pMAL-cRI de New England Biolab (17).

#### Ensayo de proliferación celular (LTT)

Las células mononucleares fueron obtenidas a partir de 20 ml de sangre heparinizada (Heparina sódica, Lilly) mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque (Sigma 1077-1), según protocolo Boyum (18). Las células mononu-

cleares (CMN) fueron lavadas en medio de cultivo RPMI 1640 suplementada con 25 mM buffer con HEPES, 2 mM L-Glutamina (Gibco BRL # 22400-089), 10% suero humano AB (Sigma H-4522) y con antibióticos penicilina y estreptomina 100 U/mL y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  respectivamente (Sigma P3539). Cien  $\mu\text{L}$  de una suspensión celular de  $2 \times 10^6$  cel/mL fueron sembrados en placas de 96 pozos fondo plano (Falcon 3072; Oxnard, California, EEUU). Para los ensayos de proliferación se utilizaron 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de los antígenos totales micobacterianos y PHA (Sigma, L8754) y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de toxoide tetánico (TT); cada antígeno, incluyendo el mitógeno PHA, fue sembrado por triplicado. Después de 6 días de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> para los antígenos micobacterianos y el TT y 3 días para el mitógeno PHA, los cultivos fueron marcados con metil-timidina tritiada, 1  $\mu\text{Ci}/2 \times 10^5$  células (NET 027A, NEN, Boston, MA 0218 USA). Los resultados se expresaron en índice de estimulación, el cual fue calculado como el promedio de cuentas por minuto (cpm) de células mononucleares en cultivo que contiene antígeno entre el promedio de cpm de células mononucleares en ausencia del antígeno. Un índice de estimulación (IE) mayor de 2 se consideró como positivo, teniendo como referencia que el 90% de personas sanas contactos (n=117) dieron valores de IE mayor de 2 frente a la proteína micobacteriana MISA con un intervalo de estimulación entre 2 y 75 veces más su respuesta proliferativa con respecto a su valor basal, siendo superior al observado en los pacientes multibacilares. El 90% del grupo control dieron valores de IE positivos con el mitógeno PHA los cuales variaron entre 12.34-283. El método de LTT utilizando timidina tritiada como precursor para el marcaje de linfocitos T, no discrimina el tipo de sub-población T activada.

### Evaluación de la inmunidad humoral

Inmunoensayo enzimático (ELISA). Placas de fondo redondo (Dynatech, Immulon 2) fueron sensibilizadas con extractos proteicos totales y antígenos recombinantes, a una concentración de  $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  ( $50 \mu\text{L}/\text{pozo}$ ), respectivamente. Se dejaron las placas a  $37^\circ\text{C}$  durante 16 horas. Al cabo de este período se realizaron 6 lavados con buffer fosfato (PBS), pH 7,2 con 0,1% de Tween-20 (Sigma, P1379) (PBS-T), se colocaron  $100 \mu\text{L}$  de solución bloqueadora (PBS-T + 1% de albúmina de suero bovino, BSA (Sigma, A-3803), en todos los pozos y se guardaron las placas a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora. Finalizado este tiempo, se colocaron los sueros de los pacientes o controles a una dilución de 1:200, previamente establecido en trabajos anteriores (16) como la concentración óptima a utilizar, durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente se añadió el suero secundario anti-IgG humano conjugado con peroxidasa (Fc específica, Sigma A-0170) en todos los pozos, previamente titulado y diluido en PBS-T/BSA (1:5000). Una vez finalizada la hora de incubación a  $37^\circ\text{C}$ , se lavaron de nuevo las placas con PBS-T y por último se colocó  $50 \mu\text{L}$  del sustrato, peróxido de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%, Merck) junto con el cromógeno ortofenilendiamino-2HCl (Sigma, P-1526) y se guardaron las placas en la oscuridad a temperatura ambiente durante 20 minutos. La reacción se detuvo con  $2,5 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ . Se leyeron las placas en un lector de ELISA (Lab Systems Multiskan EX, type 355, Finlandia) utilizando un filtro a 492 nm. Los valores de anticuerpos IgG circulantes dirigidos hacia los extractos completos (citósol y pared celular) y antígenos recombinantes fueron expresados en densidad óptica. Un valor de densidad óptica (D.O.) superior a 0,2 se consideró como positivo, tomando en cuenta el valor promedio de D.O. más tres desviaciones estándar del pool de suero de per-

sonas sanas evaluadas para cada ensayo realizado.

### Análisis estadístico

Se realizó la prueba exacta de Chi-cuadrado y correlación de Pearson utilizando programa Epi-info versión 3.3.2. Un valor de  $p \leq 0,05$  fue considerado como significativo.

## RESULTADOS

Se logró establecer una muy buena correlación entre el tiempo de diagnóstico de la enfermedad y los niveles de anticuerpos dirigidos a proteínas totales micobacterianas (MbSA, MbSA excr, MISA), con una  $p = 0,011$ ,  $0,005$  y  $0,002$ , respectivamente. No hubo correlación con la proteína inmunodominante de 30 kDa de *M.leprae* ni con las recombinantes *M. leprae* 10 kDa, *M. leprae* 36 kDa,  $p = 0,413$ ,  $0,256$ ,  $0,119$ , respectivamente (Tabla I).

Por otra parte, al comparar los niveles de anticuerpo IgG presentes frente a la proteína completa de MISA, Mbexcr, *Mbovis* ( $n=140$ ,  $138$  y  $138$  respectivamente), se observaron diferencias significativas entre los pacientes con reacción tipo ENL o sin ella. Los valores promedios de los niveles de anticuerpos dirigidos hacia estas proteínas completas micobacterianas siempre fueron mayores en aquellos pacientes que no presentaron reacción tipo ENL. Cuando se usó la proteína M10 kDa se observaron niveles de anticuerpos mayores en el grupo de pacientes LL en comparación con el grupo de pacientes BL, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ( $p= 0,036$ ). Con respecto a las otras proteínas micobacterianas utilizadas, Mt70, Mb65, M128 y 18 kDa, se observó que el valor promedio de absorbancia fue siempre menor de 0,2, por lo tanto, en estudios posteriores solo se trabajó con las proteínas completas y las indivi-

**TABLA I**  
CORRELACIÓN ENTRE NIVELES DE ANTICUERPOS ENTRE EXTRACTOS PROTEICOS CRUDOS:  
MbSA DE EXCRECIÓN, MbSA, MISA Y LAS PROTEÍNAS DE 30 kDa, 10 kDa Y 36 kDa  
DE *Mycobacterium leprae* Y SU RELACIÓN CON EL TIEMPO DE DIAGNÓSTICO

MbSA de excreción	r2 = 0,05	r = 0,22	p= 0,011*
MbSA	r2 = 0,06	r = 0,24	p =0,004*
MISA	r2 = 0,07	r = 0,26	p =0,001*
MI 30 kDa	r2 = 0,01	r = 0,10	p =0,413
MI 10 kDa	r2 = 0,01	r = 0,10	p =0,256
MI 36 kDa	r2 = 0,02	r = 0,14	p =0,119

\*Estadísticamente significativo. n=140 El 90% de los casos fueron evaluados entre 0 y 5 años después de ser diagnosticados, el 29,4% (0 años), 9,8% (1 año), 16% (2 años), 16,6% (3 años), 12,3% (4 años) y 6,1% (5 años). Nota: En cuanto al glicolípido fenólico no hubo diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos de proteínas micobacterianas ensayadas y GLP pero sí entre los niveles de anticuerpos hacia el GLP y el tiempo de diagnóstico p= 0.019.

duales de MI 30, 36 y 10 kDa (Fig. 1). La población de pacientes de la forma clínica BT fue menor a 10%, por lo que no se hizo análisis estadístico en los resultados de serología ni en linfoproliferación. En el estudio con respecto a la relación de la carga bacilar y los niveles de anticuerpo IgG dirigidos hacia las proteínas micobacterianas observamos que hay una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de anticuerpos dirigidos hacia las proteínas totales micobacterianas (MbSA, Mbexcr, MISA) MI 30, 36 y 10 kDa de pacientes que presentan baciloscopia negativa y aquellos pacientes que presentan 1 a 5+ de baciloscopia obteniéndose una  $p < 0,0001$ , 0,0000001, 0,000567, 0,00238, 0,0051 y 0,0507, respectivamente (Fig. 2).

En los pacientes multibacilares (BL y LL) se realizaron ensayos de proliferación utilizando como antígenos de referencia el PPD (n=125), BCG (n=123) y TT (n=104) y frente a diferentes proteínas micobacterianas MbSA (n=104), MbSA exc (n=105), MISA (n=125) y MI10 kDa (n=108). La proliferación celular fue expresada en índice de estimulación encontrándose una tendencia de mayor respuesta proliferativa frente a antígenos de referencia como PPD

y BCG (Fig. 3A) en comparación con los extractos crudos micobacterianos donde hubo una menor respuesta de estimulación frente a los antígenos MbSA y MISA (Fig. 3A). Cuando se realizaron las pruebas de proliferación con PHA los valores promedios obtenidos de índice de estimulación fueron los siguientes: BL:  $35,7 \pm 13,82$ , LL:  $16,0 \pm 1,92$ , ENL:  $23,98 \pm 4,32$ , NENL:  $18,14 \pm 9,78$  y todos (n=125)  $22,76 \pm 4,02$ .

Un grupo interesante incluido en el estudio comprende los pacientes diagnosticados multibacilares pero con bacteriología negativa después de tratamiento y los pacientes con bacteriología positiva. En estos últimos el índice de proliferación celular dirigido a las proteínas micobacterianas en la gran mayoría de los casos fue menor de 2, sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa en comparación con los pacientes de baciloscopia negativa los cuales presentaron índices de estimulación generalmente más altos. En cuanto a otros antígenos utilizados (BCG, PPD, PHA) se observó la misma tendencia mencionada anteriormente, siendo mayor la respuesta proliferativa con las proteínas de referencia PPD y BCG en aquellos individuos con 0+ de carga bacilar (dato no mostrado). Igual-

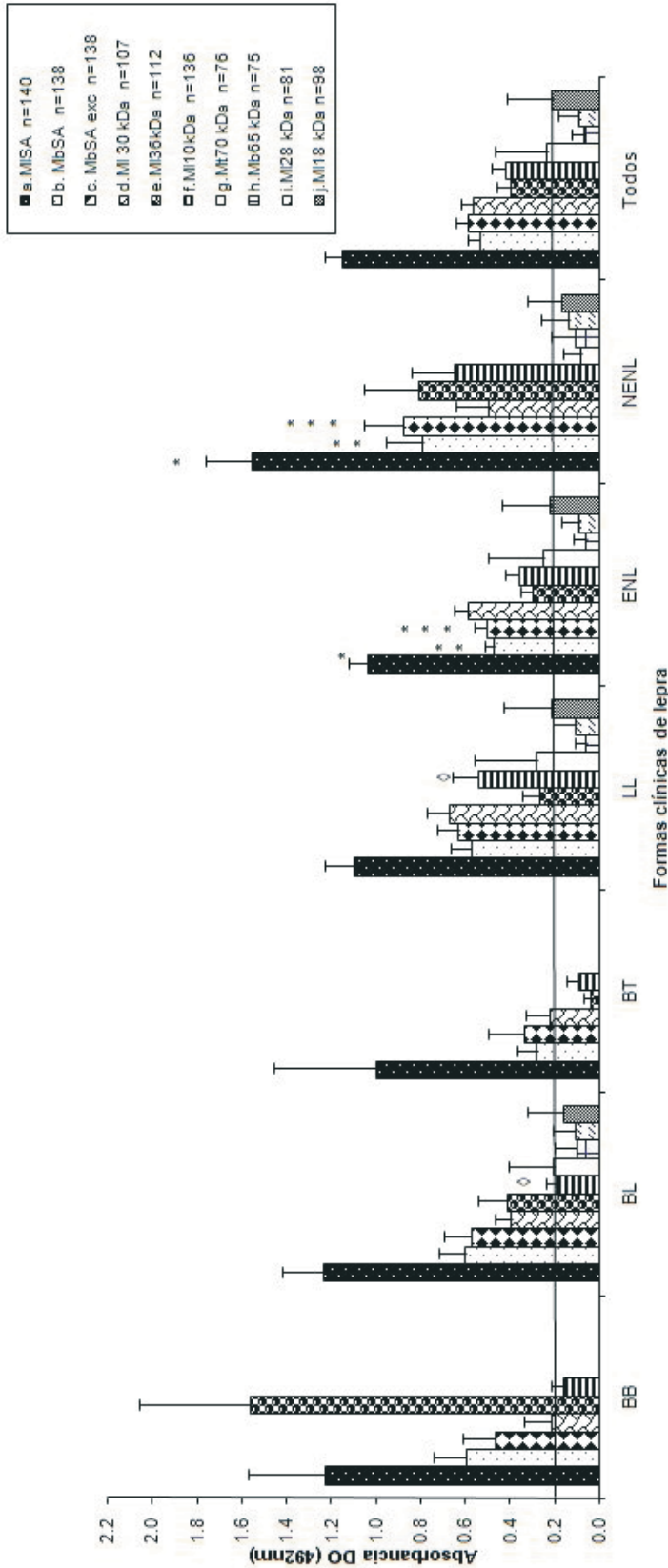


Fig 1. Reconocimiento serológico IgG dirigido hacia diferentes proteínas y su asociación con las formas clínicas: a. Extracto completo de completa de *Mycobacterium leprae* (MISA) n=140, b. Extracto completo de *M. bovis* (MbSA) n=138, c. Extracto completo de excreción *M. bovis* (MbSA exc) n=138, d. *M. leprae* de 30 kDa (MI30 kDa) n=107, e. *M. leprae* de 36 kDa (MI36 kDa) n=112, f. *M. leprae* de 10 kDa (MI10 kDa) n=136, fue relacionado con la presencia y/o ausencia de bacterias en los pacientes con enfermedad de Hansen utilizando metodología según esquema de la OMS. Los niveles de anticuerpos son expresados en promedio de medida de absorbancia (D.O.) ± error estándar. Un valor de D.O. > 0.2 es considerado positivo. Prueba estadística realizada Chi cuadrado. Diferencias estadísticamente significativas observadas en ENL Vs NENL con las proteínas MISA con una prueba de significancia p=0.0093\*, MbSA p=0.010\*, MbSA excreción p=0.0089\*\*\*. LL Vs BL sólo con la proteína *M. leprae* 10 kDa fue significativo con una p=0.0369 ◊. Con las demás proteínas ensayadas las diferencias fueron estadísticamente no significativas.



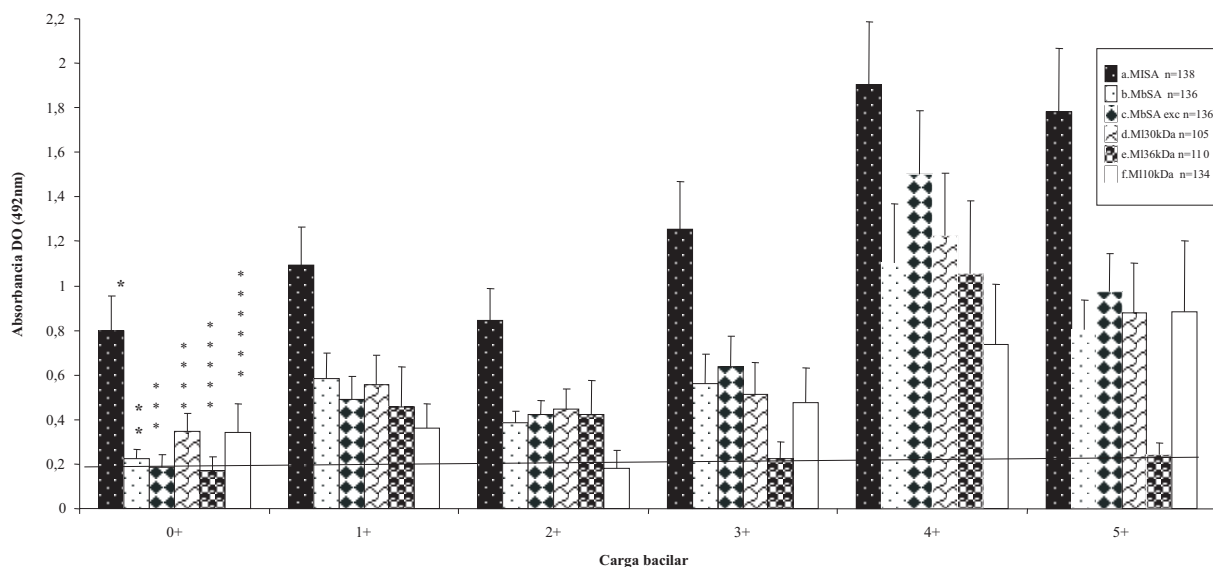


Fig. 2. Reconocimiento serológico IgG dirigido hacia diferentes proteínas: a. Extracto completo de completa de *Mycobacterium leprae* (MISA) n=138, b. Extracto completo de *M. bovis* (MbSA) n=136, c. Extracto completo de excreción *M. bovis* (MbSA excr) n=136, d. *M. leprae* de 30 kDa (Ml30 kDa) n=105, e. *M. leprae* de 36 kDa (Ml36 kDa) n=110, f. *M. leprae* de 10 kDa (Ml10 kDa) n=134, fue relacionado con la presencia y/o ausencia de bacterias en los pacientes con enfermedad de Hansen utilizando metodología según esquema de la OMS. Los niveles de anticuerpos son expresados en promedio de medida de absorbancia (D.O.)  $\pm$  error estándar. Un valor de D.O.  $>$  0.2 es considerado positivo. Prueba estadística realizada Chi cuadrado. Diferencias estadísticamente significativas observadas con las proteínas MISA con una prueba de significancia  $p=0.001^*$ , MbSA  $p=0.001^{**}$ , MbSA excreción  $p=0.001^{***}$ , *M. leprae* 30 kDa  $p=0.0023^{****}$ , *M. leprae* 36 kDa  $p=0.0051^{*****}$ , *M. leprae* 10 kDa  $p=0.0507^{*****}$  entre individuos que presentaron 0+ de carga bacilar con aquellos que sí presentaron baciloscopia positiva.

mente se observó un incremento proliferativo de las CMN de pacientes paucibacilares con los antígenos micobacterianos crudos, MISA y MbSA, cuando fueron comparados con CMN de pacientes con alta carga bacilar (5+), (Fig. 4). Los valores promedios  $\pm$  error estándar de índice de estimulación frente a la PHA y su relación con la carga bacilar fueron las siguientes: (0+)= 39,40  $\pm$  12,95, (1+)= 22,16  $\pm$  9,69, (2+)=13,28  $\pm$  1,70, (3+)= 17,15  $\pm$  3,83, (4+)= 11,47  $\pm$  2,01 y (5+)=23,29  $\pm$  9,89, observándose una tendencia a una respuesta proliferativa mayor en aquellas células de individuos con menor carga bacilar. En relación a los resultados obtenidos con el grupo control (n=117) frente a PHA el 83% presentaron

una respuesta proliferativa con un IE mayor de 30.

## DISCUSIÓN

El análisis de la interacción entre el sistema inmune del huésped y diferentes componentes proteicos micobacterianos nos permite conocer aspectos de la respuesta inmunológica diferencial tanto serológica como de linfoproliferación en los pacientes con enfermedad de Hansen. Hemos señalado anteriormente, que el *Mycobacterium leprae* no ha podido ser cultivado en medios artificiales, lo que impide la obtención de grandes cantidades de componentes bacterianos para estudios inmunológi-

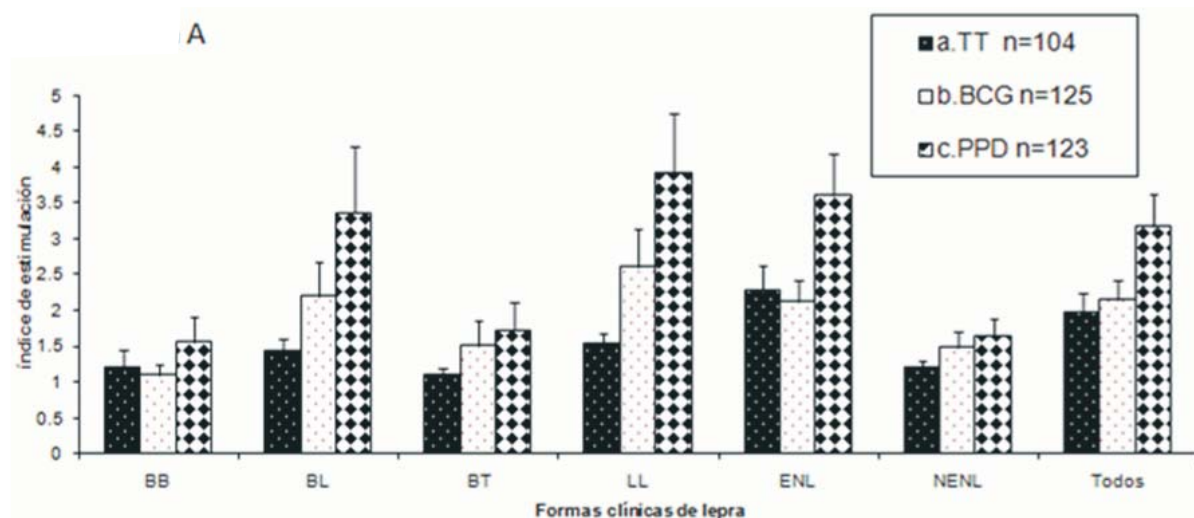


Fig 3 A. Prueba de linfoproliferación frente a diferentes antígenos a. TT (n=104), b. PPD (n=125), c. B.C.G (n=123). utilizando células mononucleares de pacientes con Hansen. LL: pacientes con Lepra Lepromatosa, ENL: pacientes con eritema nodoso leproso, NENL: pacientes en ausencia de episodio reaccional tipo ENL. Los resultados son expresados en promedio de índice de estimulación (I.E.)  $\pm$  error estándar. Un valor de I.E. > 2 es considerado positivo. Prueba estadística realizada Chi cuadrado. NS entre los tres antígenos ensayados.

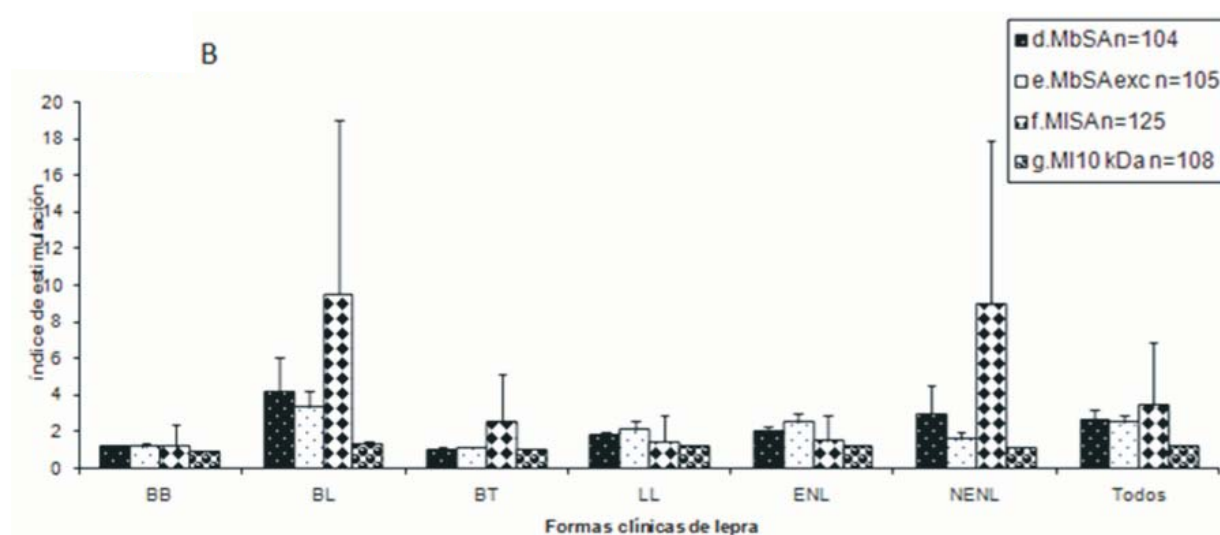


Fig 3 B. Prueba de linfoproliferación frente d. MbSA (n=104), e. MbSA exc (n=105), f. MISA (n=125), g. MI10kDa (n=108) utilizando células mononucleares de pacientes con Hansen. LL: pacientes con Lepra Lepromatosa, BL: pacientes Borderline Lepromatosa, ENL: pacientes con eritema nodoso leproso, NENL: pacientes en ausencia de episodio reaccional tipo ENL. Los resultados son expresados en promedio de índice de estimulación (I.E.)  $\pm$  error estándar. Un valor de I.E. > 2 es considerado positivo. Prueba estadística realizada Chi cuadrado. NS entre los cuatro antígenos ensayados.

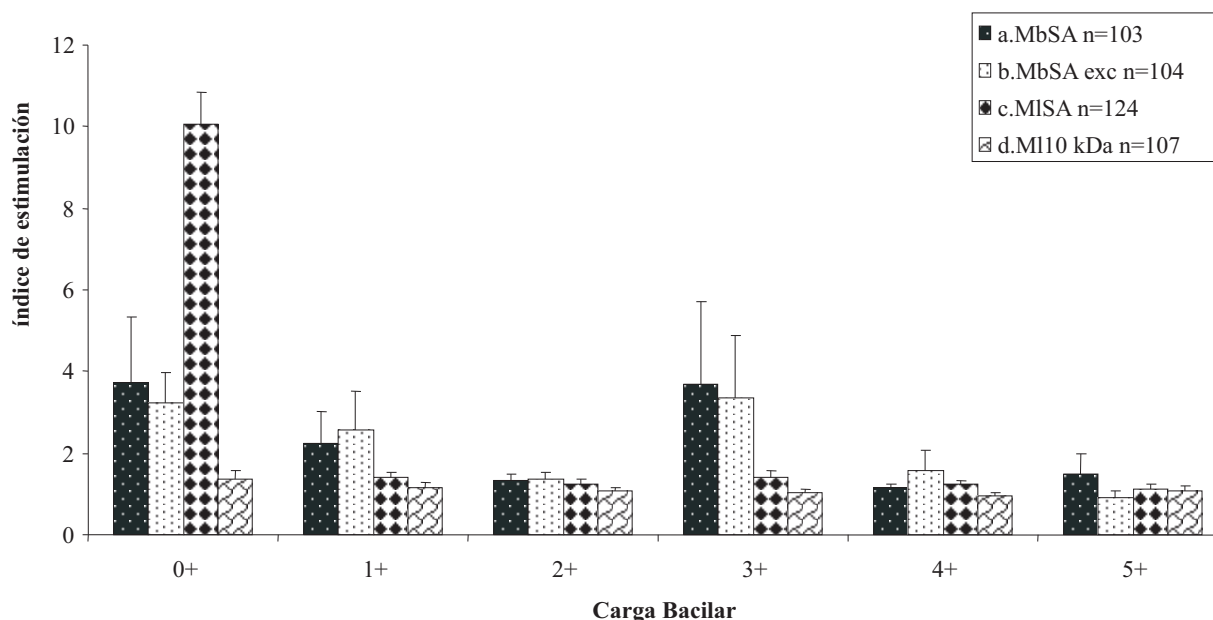


Fig. 4. Proliferación celular en presencia de diferentes antígenos a. MbSA (n=103), b. MbSA exc (n=104), c. MISA (n=124), d. MI10kDa (n=107) relacionado con la presencia y/o ausencia de bacterias en los pacientes con enfermedad de Hansen utilizando metodología según esquema de la OMS. Los resultados son expresados en promedio de índice de estimulación (I.E.)  $\pm$  error estándar. Un valor de I.E.  $>$  2 es considerado positivo. Prueba estadística realizada Chi cuadrado. NS con los cuatro antígenos ensayados entre individuos que presentaron 0+ de carga bacilar con aquellos que sí presentaron baciloscopia positiva.

cos y de otro tipo. Igualmente la infección experimental en animales está limitada al ratón desnudo y al armadillo, hospedadores de mantenimiento muy difícil. También conocemos que el glicolípido fenólico 1 (GLP-1) es el mayor componente entre otros, de la cápsula de la bacteria y ha sido utilizado ampliamente con fines diagnósticos, inmunoepidemiológicos (19-21). En la búsqueda de marcadores proteicos que nos permitan entender los mecanismos inmunológicos asociados con la enfermedad, hemos podido observar que hay una buena correlación entre los extractos proteicos crudos y el tiempo de diagnóstico de la enfermedad (Tabla I), lo que sucede igualmente con el GLP-1. Si bien el GPL-1, es una molécula de baja inmunogenicidad, su utilidad en estudios serológicos es limitada a infecciones con una carga bacilar relativamente alta. Con el conocimiento del comportamiento

de la respuesta inmune del paciente frente a diversas proteínas poco estudiadas previamente, podemos tener un mejor entendimiento de la infección ya establecida. En este trabajo se evaluó la relación de la respuesta de anticuerpos IgG y de linfocitos T frente a proteínas micobacterianas encontradas en los extractos proteicos totales de *M. leprae* y *M. bovis* obtenidos por la ruptura de los bacilos mediante la utilización de la prensa francesa y algunas otras proteínas recombinantes. Actualmente con la tecnología ADN-recombinante se dispone de proteínas micobacterianas individuales que pueden servir como marcadores inmunológicos para las diferentes formas clínicas de la enfermedad (7, 16, 22). En estudios previos se pudo demostrar que hay una disminución marcada de niveles de IgG frente a proteínas micobacterianas en los pacientes sometidos a MDT con una buena vigilancia

durante el tratamiento (23). Está documentado que los fenómenos reaccionales más frecuentes en Hansen son del tipo II especialmente del tipo ENL. Se quiso establecer si existen diferencias entre los niveles de anticuerpos de aquellos pacientes que presentaron episodios del tipo ENL con los que no presentaban episodios del tipo II frente a las proteínas totales micobacterianas y las proteínas individuales de *Mycobacterium leprae* de 30, 10 y 36 kDa. Los pacientes con ENL presentaron menores niveles de anticuerpos contra las proteínas completas micobacterianas (MbSA, MbSA excec y MISA), comparado con el grupo de pacientes que no presentaron reacciones. Esta observación algo sorprendente sugiere que el ENL es mucho más complejo que una reacción simple entre anticuerpos y antígenos. De alguna manera se puede pensar que altos niveles de anticuerpos protegen al paciente frente al desarrollo de fenómenos reaccionales. Los mecanismos que pudieran estar actuando y que sean mediados por inmunoglobulinas serían: mecanismos de neutralización mediados por anticuerpos IgG (opsonización), fagocitosis del Patógeno (*M. leprae*) debido a la presencia del receptor Fc en la superficie de los macrófagos y por último activación del complemento. Sería de mucho interés un estudio más completo de los diversos componentes de estas reacciones, incluyendo las proteínas micobacterianas presentes, el isotipo y la afinidad de los anticuerpos involucrados en los tejidos (24, 25).

Con respecto a las proteínas micobacterianas individuales de 30 kDa, 10 kDa y 36kDa, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los sueros de pacientes con ENL y los que no presentaron episodios reaccionales tipo ENL. Los valores promedio de anticuerpos tendieron a disminuir con las proteínas de 10 y 36 kDa de *M. leprae*; con la proteína de 30 kDa se observó un incremento de los niveles de anticuerpos

con una caída muy lenta en el tiempo de tratamiento (dato no mostrado). Otros investigadores han identificado diferentes clones de expresión que contienen inserto el DNA del *M. leprae* con 12 proteínas de membrana y de secreción, entre ellas ML2028 cuya movilidad relativa es cercana a 30 kDa. Ellos evaluaron el reconocimiento serológicos utilizando un pool de sueros de pacientes LL/BL y controles de zona endémica y encontraron una reactividad bien específica en algunas de estas proteínas recombinantes ensayadas (26).

Como es conocido hasta el presente, los dos más importantes antígenos de *M. leprae* identificados son el glicolípido fenólico-I (GLP-I) y la HSP de 10 kDa. GLP-I es el antígeno más característico, específico e inmunoreactivo de la pared celular del *M. leprae*; induce una respuesta fundamentalmente de IgM importante en pacientes con lepra, en una manera relacionada con la carga bacterial (21, 27). Recíprocamente, la HSP 10-kDa es la mayor proteína citosólica de *M. leprae* (MCP-I) y representa una de las proteínas más abundantes (1% de la masa bacteriana). Igualmente que otros autores, hemos demostrado que la HSP 10-kDa es capaz de inducir una respuesta IgG y esta respuesta está estrechamente asociada con la cantidad de bacilos presentes (28). Otros investigadores han señalado que los pacientes que presentan episodios tipo ENL difieren considerablemente de los grupos controles, contactos y pacientes que no presentan ENL en relación a la formación de complejos inmunes. También han reportado que determinaciones de anticuerpo libre anti-GLP-I y anti-10kDa siendo estas menores mostraron diferencias entre los pacientes que presentaron ENL y el grupo control. Sin embargo, en nuestros estudios no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los pacientes en presencia del fenómeno y los que no presentaban reacción frente a la proteína de 10 kDa. Otros

investigadores, realizando ensayos de anticuerpos asociados a complejos inmunes pudieron establecer diferencias entre las dos condiciones clínicas ensayadas (29).

Como se ha señalado anteriormente, las reacciones del tipo ENL son episodios que causan una importante morbilidad en pacientes con lepra lepromatosa. Sería importante conseguir marcadores que nos permitan establecer diferencias entre las formas estables de esta enfermedad con los procesos reaccionales de manera de lograr predecir estos fenómenos y tratarlos preventivamente. Trabajos realizados con sueros de pacientes pertenecientes a zonas geográficas del sur de la India y de una región de baja endemicidad del área de Nueva Delhi, reportaron que utilizando dos péptidos (péptido 2 y péptido 3), cuyas secuencias fueron las siguientes: GVTYEIDLTKNAA y IDLTNKNAAKLRGD, respectivamente, pueden ser utilizados como potenciales marcadores para la identificación de pacientes con lepra lepromatosa con alto riesgo a desarrollar cuadros del tipo ENL (30-32).

Con los resultados encontrados en la respuesta proliferativa de los linfocitos T y con las proteínas ensayadas, observamos que no hubo diferencia significativa entre los que presentaban reacciones del tipo II y los que no presentaban fenómeno reaccional, a pesar que los valores de índice de estimulación (IE) fue siempre menores en aquellas células T de individuos reaccionales frente a las proteínas micobacterianas (MbSA, MbSA exc., MISA, MI 10 kDa) donde los valores de IE oscilaron entre 1,17 y 3,60 en comparación con los que no presentaron reacciones del tipo II cuyos valores promedio estuvieron entre 1,09 y 8,93. Por otra parte, con los antígenos micobacterianos de referencias BCG, PPD y TT la respuesta proliferativa fue contraria de lo observado con las proteínas crudas micobacterianas. Es interesante mencionar, primero que los valores de respuesta celular en los indivi-

duos con procesos reaccionales fueron menores a medida que el número de episodios se incrementaba lo cual puede explicarse por el tipo de tratamiento (antiinflamatorios) utilizados en estos pacientes que provocan una alteración de la síntesis y liberación de citocinas entre ellas TNF- $\alpha$ , IL1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 e INF- $\gamma$  (24). Teniendo en cuenta que con los antígenos de referencia BCG, PPD los valores de estimulación de los linfocitos fueron mayores, sería conveniente utilizar otros tipos de antígenos incluyendo la proteína de 30 kDa o la combinación de más de una proteína con carácter antigénico en los antígenos utilizados de referencia. En los pacientes que presentaron 5 ó más episodios reaccionales, los valores de IE fueron siempre más elevados al menos solo cuando se utilizó la proteína PPD en comparación con los pacientes que presentaron un solo episodio. Esto concuerda con observaciones hechas por Convit y col quienes señalan que aquellos individuos que presentaban episodios a repetición podían mejorar su cuadro inmunológico (11).

En cuanto a la asociación de la inmunidad celular y la carga bacilar frente a las proteínas ensayadas, no hubo diferencias significativas entre los que presentaban negatividad bacilar o una carga positiva (1 a 5 +) con las proteínas de *M. bovis* PPD y *M. leprae* 10 kDa. Sin embargo en la Fig. 4 se puede observar que los índices de estimulación en aquellos individuos bacteriológicamente negativos fueron siempre positivos y mayores en comparación a los que presentaron 5+ de BAAR. En esta Fig. están contenidos entre los pacientes bacteriológicamente negativos un pequeño grupo de pacientes BT. Otros investigadores han demostrado en lepra que la HSP-10kDa es un potente antígeno, estimulante de linfocitos T y es reconocido por poblaciones linfocitarias de las formas clínicas Borderline y Tuberculoide (33).

No podemos dejar de mencionar la importancia que presenta conocer el comportamiento de otras proteínas micobacterianas que podrían ser utilizadas con fines diagnósticos y a su vez su interrelación con el huésped ya que esto tendría implicación para el desarrollo de futuras vacunas (34-36). Igualmente, hay mucha información en relación a los procesos de inflamación aguda presente en la enfermedad pero hasta el momento se desconoce los factores que lo inician. Por eso la importancia de lograr anticiparse antes que aparezcan los primeros signos y síntomas del mismo en la búsqueda de algún marcador que permita hacer el diagnóstico selectivo.

Actualmente estamos estudiando la reactividad serológica frente a proteínas recombinantes ML 40,7 kDa (ML405-FL), ML 26,5 kDa (ML2331) y una proteína de fusión (LID-1) facilitadas gentilmente por el Dr Malcom Duthie del Instituto de Investigaciones de Enfermedades Infecciosas, Seattle USA, las cuales pueden ser utilizadas conjuntamente con el GLP-1 con fines diagnósticos (37).

También hemos realizado un estudio en áreas hiperendémicas de lepra, en case-ríos del Estado Cojedes y del Estado Portuguesa, orientado hacia la utilización de marcadores proteicos específicos que nos permitan discriminar entre pacientes y personas sanas, más aun con valor predictivo de la enfermedad (38). En esta experiencia se recolectaron 160 sueros (58 sueros de pacientes y 102 sueros de controles zona endémica) donde fueron probados con la proteína completa MISA. De los 102 controles de zona hiperendémica solo 14 sueros (14%) dieron prueba positiva frente a MISA y uno (1/14) resultó caso cuando se corroboró con otras pruebas diagnósticas para Hansen entre ellas serología frente a GLP-I.

## AGRADECIMIENTO

Este proyecto fue financiado por Proyecto S1-2001000859 Fonacit. A todos los inspectores de Salud Pública de la sección Clínica del Instituto de Biomedicina especialmente a Nancy Bravo, Ramón Sosa, Jose Morales y al personal técnico: Francis Rodríguez y Migdalia Marcano quienes colaboraron en la toma de la muestra y búsqueda activa de los pacientes.

## REFERENCIAS

1. Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson JR, Wheeler RP, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Color R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornshy T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001; 409:1007-1011.
2. Vissa VD, Brennan P. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Gen Biol* 2001; 2(8):reviews 1023.1-1023.8.
3. Global leprosy situation, 2006. *Wkly Epidemiol Rec* 2006; 81: 309-316.
4. Fine PE. Leprosy: What is being "eliminated" *Bull World Health Org* 2007; 85:2.
5. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr* 2001; 69:1-12.
6. Scollard DM. The biology of nerve injury in leprosy. *Lepr Rev* 2008; 79:242-253.
7. Duthie M, Ireton GC, Kanaujia GV, Goto W, Liang H, Bhatia A, Busceti JM, Macdonald M, Neupane KD, Ramjit C, Sapkota BR, Balagon M, Esfandiari J, Carter D, Reed SG. Selection of antigens

- and development of prototype tests for point-of-care leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15:1590-1597.
8. **Duthie MS, Hay MN, Morales CZ, Carter L, Mohamath R, Ito L, Oyafuso LK, Manini MI, Balagón MV, Tan EV, Saunderson PR, Reed SG, Carter D.** Rational design and evaluation of a multiepitope chimeric fusion protein with the potential for leprosy diagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2010; 17:298-303.
  9. **Ridley DS, Jopling WH.** Classification of leprosy according to immunity; a five-group system. *Int J Lepr* 1966; 34:255-273.
  10. **WHO Expert Committee on Leprosy.** Sixth report Tech Rep Ser 768,WHO, Geneva, 1988.
  11. **Convit J, Aranzazu N, Ulrich M, Pinaridi ME, Reyes O, Alvarado J.** Immunotherapy with a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG in different forms of leprosy and Mitsuda negative contacts. *Int J Lepr* 1982; 50:415-424.
  12. **Rada E, Convit J, Ulrich M, Gallinoto ME, Aranzazu N.** Immunosuppression and cellular immunity reactions in leprosy patients treated with a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG. *Int J Lepr* 1987; 55:646-650.
  13. **Wayne LG.** Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* for Research purposes. In Bloom BR, ed, *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*, ASM Press, Washington (1994), pp. 73-83.
  14. **Rada-Schlaefli E, Santaella C, Aranzazu N, Convit J.** Detection of antibodies toward secreted mycobacterial antigen 85 in untreated leprosy patients' sera. *Int J Lepr* 1999; 67: 168-170.
  15. **Rada E.** Estudio comparativo de la reactividad inmunológica frente a diferentes proteínas micobacterianas en pacientes con Hansen. [Tesis para optar al título de Doctor mención Inmunoparasitología]. Instituto de Biomedicina, Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela; 2007.
  16. **Rada E, Aranzazu N, Convit J.** Immunological reactions to mycobacterial proteins in the spectrum of leprosy. *Int J Lepr* 1997; 65: 497-500.
  17. **Young DB, Kaufmann SHE, Hermans PWM, Thole JER.** Mycobacterial protein antigens. *Mol Microbiol* 1992; 6:133-145.
  18. **Boyum A.** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21:77-89.
  19. **Brennan PJ, Barrow WW.** Evidence for species-specific lipid antigens in *M. leprae*. *Int J Lepr* 1980; 48:382-387.
  20. **Meeker HC, Shuller-Levis G, Fusco F, Giardina-Becket M, Sersen E and Levis W.** Sequential monitoring of leprosy patients with serum antibody levels to phenolic glycolipid-I and mycobacterial lipoarabinomannan. *Int J Lepr* 1990; 58:503-511.
  21. **Ulrich M, Smith PG, Sampson C, Zúñiga M, Centeno M, García V, Manrique X, Salgado A, Convit J.** IgM antibodies to native phenolic glycolipid-I in contacts of leprosy patients in Venezuela: Epidemiological observations and prospective study of the risk of leprosy. *Int J Lepr* 1991; 59: 405-415.
  22. **Duthie MS, Goto W, Ireton GC, Reece ST, Sampaio LH, Grassi AB, Sousa ALM, Martelli CMT, Stefani MMA, Reed SG.** Antigen-specific T-cell responses of Leprosy Patients. *Clin and Vacc Immunol* 2008; 15:1659-1665.
  23. **Rada E, Aranzazu N, Ulrich M, Convit J.** Serologic response to mycobacterial proteins in Hansen's patients during multi-drug treatment. *Int J Lepr* 1999; 67:414-421.
  24. **Rada E, Aranzazu N, Convit J.** Ciertos aspectos inmunológicos en los estados reaccionales en la enfermedad de Hansen. Revisión. *Invest Clin* 2005; 46:381-389.
  25. **Rambukkana A, Das PK, Krieg S, Faber WR.** Association of the mycobacterial 30 kDa region proteins with the cutaneous infiltrates of leprosy lesions. Evidence for the involvement of the major mycobacterial secreted proteins in the local immune response of leprosy. *Scand J Immunol* 1992; 36:35-48.
  26. **Reece ST, Ireton G, Mohamath R, Guderian J, Goto W, Gelber R, Groat-house N, Spencer J, Brennan P, Reed S.** ML0405 and ML2331 are antigens of *Mycobacterium leprae* with potential for diag-

- nosis of leprosy. Clin Vacc Immunol 2006; 13:333-340.
27. **Levis WR, Meeker HC, Schuller-Levis GB, Gillis TP, Marino LJ Jr, Jabriskie J.** Serodiagnosis of leprosy: relationships between antibodies to *M. leprae* phenolic glycolipid I and protein antigens. J Clin Microbiol 1986; 24:917-921.
  28. **Rojas RE, Segal-Eiras A.** IgG response against 10-kDa and 65-kDa heat shock proteins in leprosy patients and their household contacts. FEMS Immunol Med Microbiol 1996; 15:189-198.
  29. **Rojas RE, Demichelis SO, Sarno EN, Segal-Eiras A.** IgM anti-phenolic glycolipid I and IgG anti-10 kDa heat shock protein antibodies in sera and immune complexes isolated from leprosy patients with or without erythema nodosum leprosum and contacts. FEMS Immunol Med Microbiol 1997; 19: 65-74.
  30. **Sela S, Thole JER, Ottenhoff HM, Clark-Curtis JE.** Identification of *Mycobacterium leprae* from a cosmid library: characterization of a kilodalton antigen that is recognized by both humoral and cellular immune system in leprosy patients. Infect Immun 1991; 59:4117-4124.
  31. **Singh S, Shankar Narayanan NP, Jenner PJ, Ramu G, Colston MJ, Krishna Prasad H, Nath I.** Sera of leprosy patients with type 2 reactions recognize selective sequences in *Mycobacterium leprae* recombinant LSR protein. Infect Immun 1994; 62: 86-90.
  32. **Singh S, Lenner PJ, Shanker Narayan NP, Ramu G, Colston MJ, Prasad HK, Nath I.** Critical residues of the *Mycobacterium leprae* LSR recombinantprotein discriminate clinical activity in erythema nodosum leprosum reactions. Infect Immun 1994; 62:5702-5705.
  33. **Mehra V, Bloom BR, Bajardi AC, Grisso CL, Sieling PA, Alland D, Convit J, Fan XD, Hunter SW, Brennan PJ, Rea TH, Modlin RL.** A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10 kD heat shock cognate protein. J Exp Med 1992; 175: 275-284.
  34. **Geluk A, Klein MR, Franken KL, van Meijgaarden KE, Wieles B, Pereira KC, Buhrer-Sèkula S, Klatser PR, Brennan PJ, Spencer JS, Williams DL, Pessolani MCV, Sampaio EP, Ottenhoff THM.** Postgenomic approach to identify novel *Mycobacterium leprae* antigens with potential to improve immunodiagnosis of infection. Infect Immun 2005; 73:5636-5644.
  35. **Aráoz R, Honoré N, Cho S, Kim J, Cho S, Monot M, Demangel C, Brennan P, Cole S.** Antigen Discovery: a Postgenomic approach to leprosy diagnosis. Infect Immun 2006; 74:175-182.
  36. **Groathouse NA, Amin A, Marques MAM, Spencer JS, Gelber R, Knudson DL, Belisle JT, Brennan PJ, Slayden RA.** Use of protein microarrays to define the humoral immune response in leprosy patients and identification of disease state specific antigenic profiles. Infect Immun 2006; 74:6458-6466.
  37. **Rada E, Rodríguez V, Duthie M, Aranzazu N, Zerpa O, Convit J.** Proteínas Recombinantes de *Mycobacterium leprae*: ML0405 FL, ML2331 y LID-1 con potencial diagnóstico en la enfermedad de Hansen. (Resumen) Memorias de LVIII Convención Anual de AsoVAC, 2008. San Felipe, Venezuela.
  38. **Rada E, Rodríguez V, Duthie M, Aranzazu N, Zerpa O, Borges R, Convit J.** Utilización de proteínas recombinantes para diagnóstico de la enfermedad de Hansen en zona hiperendémica de Venezuela, llanos centrales Estado Cojedes y Portuguesa, bajo vigilancia epidemiológica. (Resumen) Memorias de LIX Convención Anual de AsoVAC, 2009. Mérida, Venezuela.