



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LUIZ ANTONIO CUSTODIO

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DETECÇÃO DE
Mycobacterium leprae EM RASPADO DE MUCOSA NASAL**

Londrina
2005

LUIZ ANTONIO CUSTODIO

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DETECÇÃO DE
Mycobacterium leprae EM RASPADO DE MUCOSA NASAL**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Shiduca Itow Jankevicius

Londrina
2005

LUIZ ANTONIO CUSTODIO

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR NA DETECÇÃO DE
Mycobacterium leprae EM RASPADO DE MUCOSA NASAL**

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Shiduca Itow Jankevicius
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Lourdes Botelho Garcia
Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 15 de março de 2005.

Para meus filhos, Louise e Luiz Victor :
É melhor arriscar coisas grandiosas e alcançar triunfos e glórias,
mesmo expondo-se à derrota,
do que formar fila com os pobres de espírito,
que nem gozam muito, nem sofrem muito,
porque vivem nessa penumbra cinzenta dos que não conhecem
nem vitórias, nem derrotas!

Para Mailin:
Obrigado por todo o incentivo e carinhosa ajuda em todos os momentos.

Para Joaquim e Iolete Custódio:
Pai e mãe é uma grande honra para mim, quando diante da vastidão do espaço e a imensidade
do tempo, ser seu filho.

AGRADECIMENTOS

A profa. Dra. Shiduca Itow Jankevicius, pela confiança depositada em mim e pela acolhida em seu laboratório depois de tantos anos, pela sabedoria em ser mestre e amiga. Muito obrigado por tantos conhecimentos transmitidos.

A Profa. Dra. Lourdes Botelho Garcia, por aceitar de maneira tão amável ser banca desta dissertação.

A Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis, pelos conselhos, opiniões e ajuda inestimáveis.

A Profa. Ms. Aparecida de Lourdes Perim, amiga de todos os momentos não mediu esforços para contribuir com este trabalho, a serenidade e o afeto nos momentos incertos, o carinho e paciência com que sempre me atendeu e apoiou. Sem você seria mais difícil.

Ao Prof. Ms. Jair Tonon, amigo insubstituível e alma forte amparando a todos os momentos incondicional e incansavelmente sou rico por sua amizade.

A Profa. Dra. Maria Angélica Ehara, pela confiança, conselhos, amiga sincera que sempre com muita sabedoria sabe o que falar e como falar, com desprendimento disponibilizou seu laboratório sempre que precisei.

A Edmundo Bragatto e Myrian M.M. Bragatto por incentivar, ajudar e apoiar todos estes anos.

A Profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta, pelas valorosas opiniões e carinho.

Aos professores da parasitologia, Francisco José de Abreu Oliveira, Ivete Conchon Costa, Regina Mitsuka Breganó e Maria Claudia Noronha Dutra de Menezes, Francisco Anaruma Filho, por terem facilitado meu trabalho como docente e pela amizade e pelos bons momentos.

A Profa. Dra. Jacinta Sanches Pelayo, pela amizade e por emprestar equipamentos de seu laboratório.

A Profa. Dra. Gilda Maria Rossinholi, pela amizade e conselhos e bons momentos na patologia.

A Profa Dra. Ionice Felipe, pela amizade, confiança e carinho por nosso bem estar.

Ao Prof. Mário Augusto Ono, pela amizade e disposição em ajudar nas dificuldades.

Ao Prof. Dr. Emerson José Venancio, pela amizade confiança e prontidão em atender sempre que solicitado.

Ao Prof. Dr. Phileo Pinger Filho, pela amizade e incentivo sempre alegre e encorajador.

Ao Prof. Dr. Dirceu Estevão, pela amizade, pelos conselhos e bons momentos nos corredores do departamento.

Ao prof. Dr. José Vitor Jankevicius, pela amizade e disposição em ajudar sempre que precisávamos.

Aos funcionários e bons amigos Jesus Antonio Vargas, Ediel Clementino, Pedro Sebastião Raimundo Dionizio Filho, Edna Eulália de Andrade, José Goanais e Vânia Darc de Castro sempre prontos a nos atender com carinho e paciência.

Aos colegas de mestrado pelo companheirismo. A Marla Karine pela amizade, ajuda e a atenção sempre carinhosa.

Aos amigos Marcos dos Santos Correa, Irenice Xaves da Silva e seu filho pela confiança e apoio sempre carinhoso, desde o primeiro dia que cheguei em Cerejeiras – Ro.

Com chave de ouro, à querida e valorosa secretária do mestrado, Rosilda de Alvarenga, a quem considero “madrinha de tese” muito obrigado por me “salvar” nos momentos de esquecimento e pelo carinho ao nos atender.

Em especial à Sociedade Filantrópica Humanitas na pessoa de seu presidente Pe. Haruo Sasaki lutador incansável e imbatível pelos direitos e pela saúde dos hansenianos.

Uma vida contra a “lepra”.

ABREVIATURAS

aa - amino ácidos.

baar - bacilos álcool ácido resistentes.

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

Da - Daltons.

fg - fento grama.

kDa - quilo Daltons.

MDT - Multi Droga Terapia.

NCBI - National Center for Biotechnology Information.

OMS - Organização Mundial da Saúde.

pb - pares de base.

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase.

TN - Tamil Nadu.

WHO - World Health Organization

CUSTODIO, Luiz Antonio. **Avaliação da técnica de PCR na detecção de *Mycobacterium leprae* em raspado de mucosa nasal**. 2005. 54f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2005.

RESUMO

A hanseníase, doença debilitante, deformante e com elevado apelo social, causada pelo *Mycobacterium leprae* é um sério problema de saúde pública no Brasil e em outras regiões do mundo. A complexidade deste microrganismo tem desafiado os estudiosos durante anos. As novas técnicas de biologia molecular, como o PCR e seus avanços, podem permitir uma melhor compreensão e controle desta praga que assola a espécie humana há milhares de anos. Descrevemos uma técnica de next-PCR para amplificar uma seqüência do gene *lsr2* do *M. leprae* com 100% de especificidade com um limite de detecção de 30 fg de DNA padrão. Foi detectado presença de DNA do *M. leprae* na mucosa nasal de 41,2% dos pacientes com hanseníase tuberculóide, 7,2% dos pacientes com hanseníase indeterminada e em 23,1% dos contatos.

Palavras Chave: Hanseníase. Microbiologia. *Mycobacterium leprae*.

CUSTODIO, Luiz Antonio. **Avaliação da técnica de PCR na detecção de *Mycobacterium leprae* em raspado de mucosa nasal**. 2005. 54f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2005.

ABSTRACT

Leprosy, a debilitating and deforming disease, with a high social impact, is still a very serious public health problem in Brazil and in other countries of the world. The complexity of the interactions between its causative agent *Mycobacterium leprae* and its host has defied research for tens of years, but now the modern techniques of molecular biology might allow a better understanding and control of this longstanding disease. We applied next PCR to amplify one sequence of the *lsr2* gene of *M. leprae*, obtaining 100% of specificity for *M. leprae*, with a limit of detection of about 30fg of standardized DNA. With this technique, we detected the presence of *M. leprae* in the nasal mucus of 41.2% of patients with tuberculoid leprosy, 7.2% of patients with indeterminate leprosy, and 23.1% of contacts.

Keywords: Leprosy. Mycobacterioses. *Mycobacterium* infections.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Glicolipídio Fenólico I de <i>M.lepra</i> | 13 |
| Figura 2 – Molécula de Laminina 2 da célula de Schwann | 13 |
| Figura 3 – Representação da interação de componentes da parede celular de <i>M.leprae</i> com moléculas da lâmina basal da célula de Schwann | 14 |
| Figura 4 – BAAR em corte histológico de pele..... | 14 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Situação global da hanseníase em 2003 | 15 |
| Tabela 2 - Situação global da hanseníase em 2004 | 16 |
| Tabela 3 - Hanseníase, em alguns países da América Latina em 2003 | 16 |
| Tabela 4 - Prevalência de hanseníase nos cinco países mais endêmicos, 1998..... | 17 |
| Tabela 5 - Casos novos registrados em cada Unidade da Federação (UF), início de 2005... | 17 |
| Tabela 6 - Resultado de PCR de amostras de raspado nasal de pacientes com hanseníase, contatos domiciliares e pessoas sem história de contato com hansenianos..... | 28 |
| Tabela 7 - Especificidade do PCR com primers para região lrs2 de <i>M. leprae</i> frente a outras micobacterias | 29 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 HANSENÍASE NO MUNDO..... | 15 |
| 1.2 CULTURA DO <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> | 18 |
| 1.3 PERÍODO DE INCUBAÇÃO | 18 |
| 1.4 PORTAS DE ENTRADA E SAÍDA DO <i>M. LEPRAE</i> | 19 |
| 1.5 RESERVATÓRIO DO <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> | 19 |
| 1.6 O GENOMA DO <i>MYCOBACTERIUM LEPRAE</i> | 20 |
| 1.7 TRATAMENTO E CURA DA HANSENÍASE | 21 |
| | |
| 2 OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 JUSTIFICATIVA..... | 23 |
| | |
| 3 MATERIAL E MÉTODO | 25 |
| | |
| 4 RESULTADOS | 28 |
| | |
| 5 DISCUSSÃO | 30 |
| | |
| 6 CONCLUSÃO | 32 |
| | |
| REFERÊNCIAS | 33 |
| | |
| ANEXOS | 38 |
| ANEXO I: PUBLICAÇÃO | 39 |
| ANEXO II: ANÁLISE BLAST DO PRIMER 1 | 44 |
| ANEXO III: ANÁLISE BLAST DO PRIMER 2 | 47 |
| ANEXO IV: ANÁLISE BLAST DO GENE LSR2 DO <i>M. LEPRAE</i> | 50 |
| ANEXO V: TABELA DE DADOS SOBRE AMINO ÁCIDOS | 52 |

1 INTRODUÇÃO

Quando Gerhard Henrik Armauer Hansen estabeleceu, em 1873, a natureza contagiosa da hanseníase, e associou pela primeira vez uma bactéria a uma doença no ser humano, ele provavelmente não imaginava que mais de um século (132 anos) após, a hanseníase permaneceria como importante problema de saúde pública em vários países⁹ e o agente infeccioso *Mycobacterium leprae* ainda desafiaria os pesquisadores a entender sua biologia e inter-relação com o hospedeiro humano.⁴⁶

Parasita intracelular obrigatório, *M. leprae* apresenta a capacidade exclusiva de parasitar as células de Schwann, responsáveis pela formação da bainha de mielina nos axônios de células nervosas,²³ causando destruição das fibras nervosas e as manifestações relacionadas com o amplo espectro desta doença quando consideramos as relações parasita – hospedeiro. Esta característica está intimamente ligada à parede celular incomum deste microrganismo, que apresenta uma gama de moléculas e entre estas, o Glicolipídio Fenólico I (PGL-1) (fig.1), que ao se ligar a uma molécula de Laminina 2 (fig.2) presente na lâmina basal da célula de Schwann permite a entrada deste microrganismo na célula, conforme representado na figura 3.

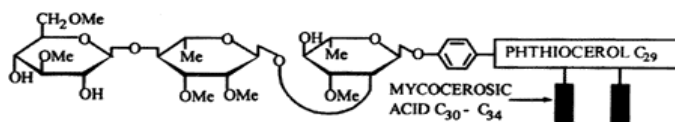


Figura 1 – Glicolipídio Fenólico I de *M.leprae*.

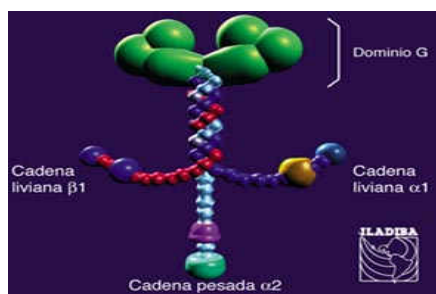


Figura 2 – Molécula de Laminina 2 da célula de Schwann.

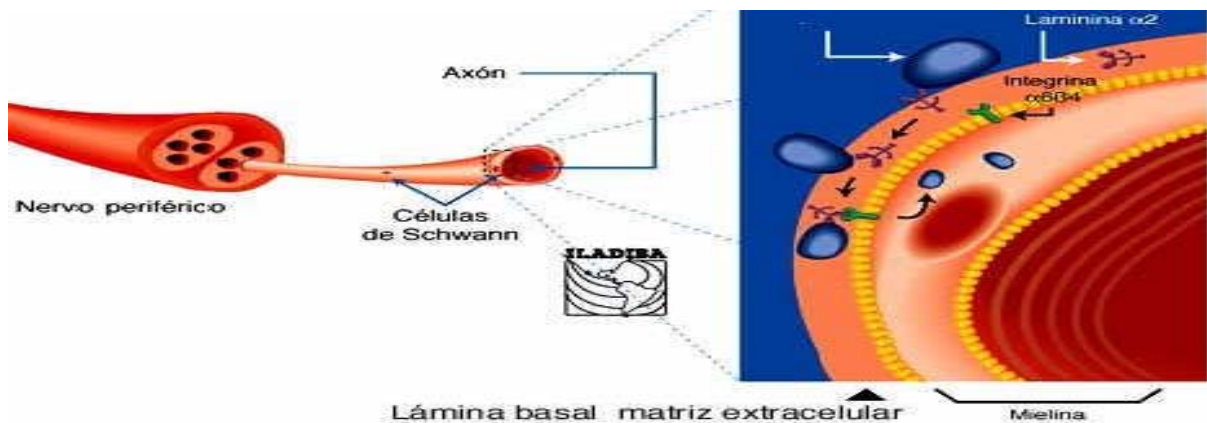


Figura 3 – Representação da interação de componentes da parede celular de *M.leprae* com moléculas da lâmina basal da célula de Schwann.

M. leprae está presente em grande número nas lesões de pacientes com a forma virchowiana da hanseníase, isoladamente ou na forma de aglomerados, chamados globias, afeta a pele, nervos periféricos, mucosa do trato respiratório superior, olhos e algumas vezes outras estruturas. As bactérias do gênero *Mycobacterium* são bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), que podem ser observados, por microscopia óptica em preparações coradas pela técnica de Ziehl Neelsen (fig.4).

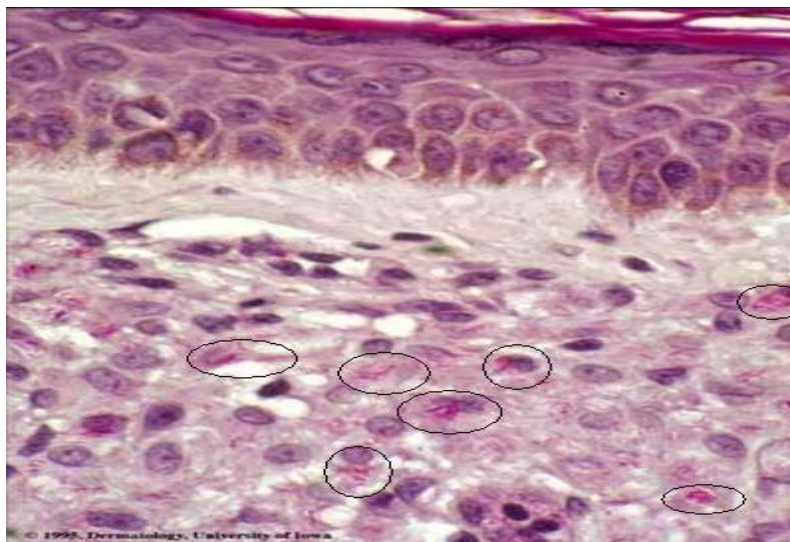


Figura 4 – BAAR em corte histológico de pele

O diagnóstico da hanseníase é comumente baseado em sinais e sintomas clínicos, sendo considerados sinais cardinais⁴⁰:

- Lesão de pele com perda de sensibilidade, com ou sem espessamento de nervo.
- Microscopia positiva para BAAR em esfregaço de linfa.^{9, 20, 46, 47}

Uma vez diagnosticado como portador da hanseníase, o paciente é submetido a tratamento baseado em multidrogas, preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e cuidados são tomados para prevenir seqüelas. Embora se tenha observado redução do número de pacientes com hanseníase, o número de novos casos ainda é preocupante, e justifica os esforços para melhor entendimento das causas do surgimento destes e outras intrigantes questões referentes à hanseníase.^{7, 46}

1.1 HANSENIASE NO MUNDO

No início de 2003, 110 países notificaram 534.311 portadores de hanseníase, com 620.672 novos casos detectados durante 2002 (tabela 1). No início de 2004, os números (tabela 2) indicam uma melhora na maioria das regiões, mas nas Américas onde o Brasil aparece como principal região endêmica (tabelas 3), a situação parece não ter mudado expressivamente.

Tabela 1 - Situação global da hanseníase em 2003*

| Região | Prevalência | Casos detectados durante o ano 2002 |
|------------------|----------------|-------------------------------------|
| África | 53 888 | 48 248 |
| Américas | 75 686 | 39 939 |
| Mediterrâneo | 7 899 | 4 665 |
| Sudeste Asiático | 385 458 | 520 632 |
| Pacífico Oeste | 11 335 | 7 154 |
| Europa | 45 | 34 |
| Total | 534 311 | 620 672 |

Fonte: WHO³⁸

*Dados reportados por 110 Países até o final de 2002.

Tabela 2 - Situação global da hanseníase em 2004*

| Região | Prevalência | Casos detectados durante o ano 2003 |
|-------------------|----------------|-------------------------------------|
| África | 50 691 | 46 205 |
| Américas | 86 652 | 52 435 |
| Mediterrâneo | 5 798 | 3 940 |
| Suldeste Asiático | 304 292 | 405 150 |
| Pacífico Oeste | 10 359 | 6 068 |
| Europa | - | - |
| Total | 457 792 | 513 798 |

Fonte: WHO⁴⁴

*Dados reportados por 103 Países até o final de 2003.

Tabela 3 - Hanseníase, em alguns países da América Latina em 2003.

| País | Prevalência | Casos detectado em 2002 |
|----------------------|--------------|-------------------------|
| Argentina | 1182 | 386 |
| Barbados | 0 | 0 |
| Belize | 0 | 0 |
| Brasil | 71139 | 38365 |
| Chile | 2 | 1 |
| Republica Dominicana | 283 | 205 |
| Granada | 0 | 1 |
| Guiana | 74 | 38 |
| Honduras | 8 | 2 |
| Jamaica | 11 | 2 |
| México | 1191 | 309 |
| Trinidad & Tobago | 68 | 34 |

Fonte: WHO⁴³

Embora as medidas de tratamento baseado em multidrogas, preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), tenham reduzido a prevalência da doença, o número de novos casos ainda é preocupante,^{5, 46} principalmente no Brasil e na Índia (tab.4).

Tabela 4 - Prevalência de hanseníase nos cinco países mais endêmicos, 1998.

| País | Prevalência | Prevalência por 10.000 | Deteção |
|---------------|---------------|------------------------|---------------|
| Índia | 518.163 | 5.25 | 519.952 |
| Brasil | 90.457 | 5.33 | 43.870 |
| Indonésia | 29.225 | 1.41 | 15.337 |
| Bangladesh | 13.248 | 1.03 | 11.320 |
| Nigéria | 12.878 | 1.06 | 7.176 |

Fonte: WHO⁴¹

Os dados fornecidos no site do datasus (tab. 5),¹³ informam 26.157 casos novos em registro ativo em todos os estados até outubro de 2004.

Tabela 5 - Casos novos registrados em cada Unidade da Federação (UF), início de 2005.

| UF | Registro Ativo | Caso encerrado | Total |
|---------------------|----------------|----------------|---------------|
| Acre | 202 | 10 | 212 |
| Alagoas | 198 | 18 | 216 |
| Amapá | 124 | 1 | 125 |
| Amazonas | 667 | 71 | 738 |
| Bahia | 2.262 | 112 | 2.374 |
| Ceara | 1.608 | 139 | 1.747 |
| Distrito Federal | 242 | 6 | 248 |
| Espírito Santo | 911 | 129 | 1.040 |
| Goiás | 2.040 | 140 | 2.180 |
| Maranhão | 279 | 27 | 306 |
| Mato Grosso | 2.209 | 280 | 2.489 |
| Mato Grosso do Sul | 405 | 72 | 477 |
| Minas Gerais | 1.542 | 26 | 1.568 |
| Pará | 4.068 | 456 | 4.524 |
| Paraíba | 396 | 19 | 415 |
| Paraná | 1.042 | 123 | 1.165 |
| Pernambuco | 1.819 | 142 | 1.961 |
| Piauí | 438 | 29 | 467 |
| Rio de Janeiro | 1.590 | 126 | 1.716 |
| Rio Grande do Norte | 200 | 9 | 209 |
| Rio Grande do Sul | 112 | 3 | 115 |
| Rondônia | 853 | 135 | 988 |
| Roraima | 144 | 14 | 158 |
| Santa Catarina | 72 | 5 | 77 |
| São Paulo | 1.647 | 145 | 1.792 |
| Sergipe | 334 | 80 | 414 |
| Tocantins | 753 | 126 | 879 |
| TOTAL | 26.157 | 2.443 | 28.600 |

Fonte: datasus (2005)

1.2 CULTURA DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

Houve clamores de sucesso no passado, no que se refere à cultura *in vitro* deste microrganismo, mas não ficou comprovada com evidências seguras e incontestáveis, portanto, *M. leprae* ainda não foi cultivado com sucesso *in vitro*. A elevada perda de genes e presença de pseudogenes tornou este microrganismo altamente dependente de seu hospedeiro, fato agora melhor entendido com o estudo do seu genoma.^{19, 46}

Avanços importantes ocorreram com a descoberta de que o tatu de nove listras, o *Dasypus novemcinctus*, conhecido popularmente no Brasil como “tatu galinha”, poderia ser infectado com *M. leprae* a partir daí esse animal tornou-se a fonte principal desta bactéria para a pesquisa bioquímica, imunológica e estudo do genoma, e o desenvolvimento de vacina.¹⁰ O tatu tem um sistema imunológico primitivo e baixa temperatura corporal e quando é inoculado por via intravenosa com *M. leprae*, produz uma disseminação ampla da doença com produção de grande número de microrganismos, facilitando os estudos a respeito.^{18, 27, 40}

1.3 PERÍODO DE INCUBAÇÃO

Na hanseníase, a maioria dos pontos de referência para medir o período de incubação, o tempo de infecção e o início da doença, são difíceis de definir, devido à ausência de ferramentas diagnósticas adequadas para este propósito e a natureza insidiosa de seu início, geralmente, tardiamente detectado.

O período mínimo relatado é de poucas semanas e é baseado na ocorrência muito ocasional de hanseníase entre crianças jovens. O período máximo de incubação relatado é de 30 anos, ou mais, fundamentado em observação do aparecimento de sintomas em veteranos de guerra, que comprovadamente ficaram expostos por curtos períodos de tempo em áreas endêmicas, e viveram posteriormente em áreas não endêmicas.⁴⁰

1.4 PORTAS DE ENTRADA E DE ELIMINAÇÃO DE *MYCOBACTERIUM LEPRAE*

As duas portas de saída mais freqüentemente descritas são a pele e a mucosa nasal. Porém, a importância relativa dessas duas portas ainda não foi esclarecida. É verdade que os pacientes que apresentam hanseníase virchowiana mostram grande número de microrganismos localizados profundamente na derme. Todavia não está comprovado se eles alcançam a superfície da pele. Em relação à mucosa nasal, sua importância foi precocemente reconhecida, particularmente nos pacientes com hanseníase virchowiana, devido à grande quantidade de bacilos nas lesões de mucosa nasal, indicando que as secreções nasais destes pacientes contêm milhões de microrganismos viáveis que podem ser liberados por dia.²⁵

A(s) porta(s) de entrada do *M. leprae* no corpo humano não é (são) definitivamente conhecida(s). Porém, duas seriamente consideradas são a pele e o trato respiratório superior. Atualmente, as evidências de que a porta de entrada seja o trato respiratório superior são mais favoráveis do que a antiga crença de que a pele seria o portal de entrada exclusivo. Rees et McDougall (1977), obtiveram sucesso na transmissão experimental de hanseníase, por meio de aerossóis contendo *M. leprae*, em camundongos imunossuprimidos, sugerindo uma possibilidade similar em humanos. Resultados bem sucedidos foram relatados em experimentos com “nude mice”, quando *M. leprae* foi introduzido na cavidade nasal por meio de aplicação tópica. Embora não haja conclusões substanciais em relação à porta de entrada, a rota por meio do trato respiratório superior parece ser a mais provável, embora outras, particularmente a pele com solução de continuidade, não possam ser excluídas.^{9,40}

1.5 RESERVATÓRIO DE *M. LEPRAE*

O ser humano ainda é considerado o único reservatório de *M. leprae*, não obstante a ocorrência de uma doença entre tatus no sudoeste dos Estados Unidos, nos quais podem ser identificados microrganismos indistinguíveis de *M. leprae* e, foi demonstrado que 20% dos animais estudados tinham evidência sorológica de infecção por *M. leprae*. O significado epidemiológico do tatu é geralmente negligenciado, apesar de relatos ocasionais, entre indivíduos com história comprovada de manipulação de tatus e surgimento de sintomas.

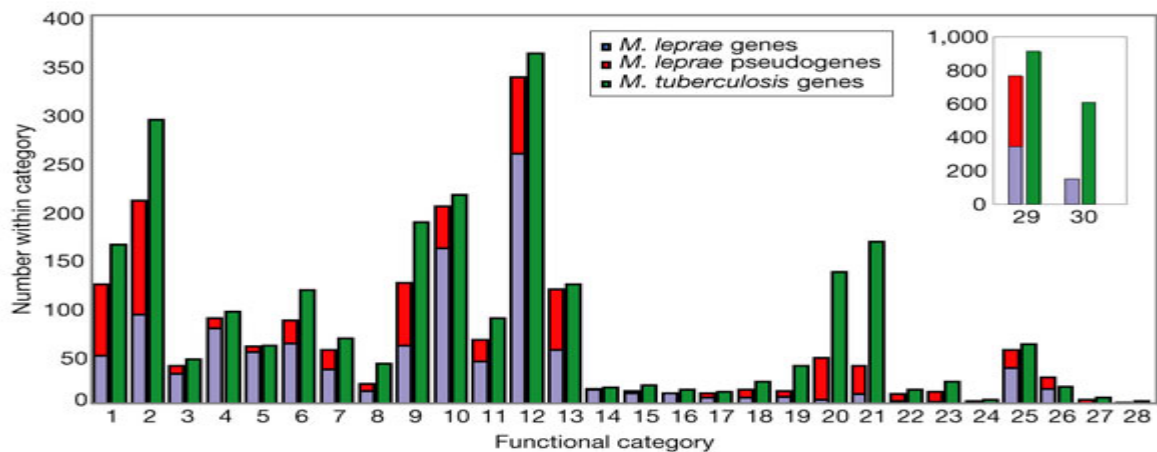
Entre seres humanos os casos virchowianos são os que apresentam a maior carga bacilífera e são estes os indivíduos que tem chance maior de transmitir a doença.^{28, 18}

1.6 O GENOMA DE *M. LEPRAE*

Um dos pontos excitantes de se viver na era do sequenciamento genético, é que neste momento começamos a entender em detalhes, antes inimagináveis, os patógenos enigmáticos e, aprendemos que o sequenciamento genético não é a conclusão de muitas pesquisas sobre qualquer microrganismo em particular, mas, meramente o “fim do início”, um início marcado por pesquisas racionais, realizadas por Louis Pasteur, Entner e Doudoroff, Stamp e Green, entre muitos outros que dedicaram seus esforços para o grande desenvolvimento que vivenciamos hoje.³⁰

Muitas questões poderão ser respondidas, com os estudos de genoma de *M. leprae*, como a persistência no surgimento de novos casos de hanseníase em um momento em que se tem obtido bons resultados com o tratamento, o entendimento de como os genes de um microrganismo conferem benefícios em um ambiente, os quais falhariam completamente em outro contexto ecológico, como *M. leprae* e sua interação com as células de Schwann em humanos, o que fez deste microrganismo um especialista extremo. Assim, reconhecemos e entendemos que as pesquisas sistemáticas sobre a seqüência e a estrutura do DNA e os mecanismos de controle e expressão gênica são acompanhadas do entendimento dos organismos e suas inter-relações.^{7, 20, 22, 24, 47, 34}

O DNA utilizado para o sequenciamento foi obtido de uma cepa denominada cepa TN do *M. leprae*, por ter sido isolada originalmente em Tamil Nadu na Índia. Esta cepa revelou um genoma constituído por 3.268.203 pb contendo 57,79% de CG, com 1.604 (59,5%) genes codificando para proteínas e o expressivo número de 1.116 pseudogenes. A presença destes pseudogenes (figura 1) em algumas categorias e funções torna *M. leprae* em um microrganismo extremamente dependente de seu hospedeiro.^{3, 4, 8, 30}



Distribution of genes by functional category. The number of complete (blue) and pseudogenes (red) within each category for *M. leprae* is shown. Data for *M. tuberculosis* (green) were taken from the published genome sequence⁸. Functional categories: 1, small-molecule catabolism; 2, energy metabolism; 3, central intermediary metabolism; 4, amino-acid biosynthesis; 5, nucleoside and nucleotide biosynthesis and metabolism; 6, biosynthesis of cofactors, prosthetic groups and carriers; 7, lipid biosynthesis; 8, polyketide and non-ribosomal peptide synthesis; 9, proteins performing regulatory functions; 10, synthesis and modification of macromolecules; 11, degradation of macromolecules; 12, cell-envelope constituents; 13, transport/binding proteins; 14, chaperones/heat-shock proteins; 15, cell-division proteins; 16, protein and peptide secretion; 17, adaptations and atypical conditions; 18, detoxification; 19, virulence determinants; 20, IS elements and phage-derived proteins; 21, PE and PPE families; 22, antibiotic production and resistance; 23, cytochrome P450 enzymes; 24, coenzyme F420-dependent enzymes; 25, miscellaneous transferases; 26, miscellaneous phosphatases, lyases and hydrolases; 27, cyclases; 28, chelataes. Inset, y axis shows the number of genes within each functional category; x axis shows the functional categories: 29, conserved hypothetical proteins; 30, hypothetical proteins that share no significant similarity with any protein currently in the databases

Fonte: Nature³⁴

Gráfico 1 - Distribuição dos genes de *M.leprae* comparados com *M. tuberculosis*, separados função(x) e categoria(y).

O sequenciamento do DNA de *M. leprae* facilita a possibilidade de desenvolvimento e padronização de técnicas apropriadas, principalmente voltadas para diagnóstico, pesquisa de novas drogas e vacina.^{2,4,6}

1.7 TRATAMENTO E CURA

Atualmente, a hanseníase é perfeitamente curável¹¹ e, desde que as orientações da terapia com múltiplas drogas (MDT) da Organização Mundial da Saúde (OMS) sejam seguidas, será improvável que um paciente tenha seqüelas ou que *M. leprae*

desenvolva resistência às drogas. O esquema terapêutico atualmente preconizado pode ser encontrado no site da OMS:³⁹

- Para pacientes multibacilíferos:
 - Rifampicina 600mg ao mês
 - Dapsona 100 mg ao dia
 - Clofazimina 300 mg início e 50 mg diárias
 - Duração de 12 meses.
- Para pacientes paucibacilíferos:
 - Rifampicina 600mg ao mês
 - Dapsona 100 mg ao dia
 - Duração de 6 meses.
- Para pacientes paucibacilíferos com lesão única:
 - Rifampicina 600mg dose única.
 - Ofloxacina 400 mg dose única.
 - Minociclina 100 mg dose única.

No Brasil, um dos principais problemas em relação à hanseníase é justamente o diagnóstico tardio, que favorece o aparecimento de seqüelas, deformidades e manutenção de liberação de bacilos viáveis para o ambiente.⁴² A eliminação da hanseníase como problema de saúde pública requer não apenas o uso adequado da terapia por multidrogas, mas também a melhora na detecção de indivíduos infectados e implementação do tratamento precoce, reduzindo o contágio e limitando as complicações neurológicas.

2 OBJETIVO

As medidas de tratamento baseado em multidrogas preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) não têm impedido o surgimento de um número ainda alarmante de novos casos e os motivos ainda são desconhecidos.^{5,46} No Brasil a eliminação da hanseníase como problema de saúde pública requer o uso contínuo e adequado da terapia por multidrogas, melhora da detecção de infectados e implementação do tratamento precoce, reduzindo o contágio, limitando as complicações neurológicas e prevenindo a incapacitação do indivíduo.⁴² A característica de diagnóstico clínico tardio, no caso da hanseníase no Brasil, justifica os estudos para desenvolver e padronizar técnicas de auxílio diagnóstico precoce que venham a permitir a detecção de novos casos e possivelmente identificação de portadores sub-clínicos, assim como a correta diferenciação entre *M. leprae* e outras micobacterias que podem estar presentes no material analisado.²¹

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) tem sido usada e reportada como uma eficiente ferramenta para a pesquisa dos seres vivos onde o seu material genético esteja direta ou indiretamente envolvido, aplicando-se com grande importância no diagnóstico de várias doenças humanas e animais, como tuberculose e hanseníase.^{1, 10, 12, 15, 17, 25, 26, 29, 31, 32}

Neste trabalho, foi padronizada uma técnica de PCR para amplificar 226 pb do gene *lsr2* de *M. leprae*, de amostras colhidas da cavidade nasal de hansenianos, seus contatos com ou sem a doença clínica e de uma população saudável e considerada não contato de hansenianos. O objetivo foi verificar a sensibilidade e especificidade deste marcador para detecção de *M. leprae* neste material de mucosa nasal, comparando com outras micobacterias isoladas da mesma região dos pacientes com hanseníase.

2.1 Justificativa

A OMS considera a hanseníase um problema de saúde pública especial, visto sua característica de incapacitar e mutilar fisicamente o paciente provocando sérias implicações sociais, como o estigma e a discriminação. Considera ainda que 2 a 3 milhões de indivíduos sofram estas conseqüências e que aproximadamente 2,5 milhões, considerando o período de 2000 a 2005, necessitam ser detectados e tratados.¹⁴

No Brasil a necessidade de medidas para diagnóstico específico e precoce para auxiliar na tomada de decisão para a implantação de tratamento em portadores assintomáticos e a necessidade de estudos que possam colaborar para o controle e extinção da hanseníase de nosso meio, justificam esforços para melhor entendimento desta importante doença e suas características regionais.

3 MATERIAL E MÉTODO

Amostras de raspado de mucosa nasal foram colhidas utilizando swab de algodão umedecido em tampão fosfato pH 7,0 conservado para transporte à temperatura de 4°C, transferidos para tubos eppendorf contendo 1000 µl de água Mili Q e armazenados a -20°C até o momento de extração do DNA.

Foram obtidas 130 amostras com as seguintes características em relação à hanseníase: 22 (~16,9%) de pacientes com hanseníase virchowiana, 17 (~13%) de pacientes com hanseníase tuberculóide, 14 (~10,7%) de pacientes com hanseníase indeterminada, 52 (40%) de contatos de pacientes com hanseníase e 25 (~19%) de indivíduos saudáveis, sem história de contato com hansenianos. Outras espécies de micobacterias isoladas de casos clínicos da mesma região dos pacientes de hanseníase, gentilmente fornecidas pela Profa. Dra. Halha Ostrensky Saridakis, (Departamento de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina), foram testadas: *M.fortuitum* (11 amostras), *M.scrofulaceum* (1 amostra), *M.tuberculosis* (29 amostras), *M.avium* (4 amostras).

O DNA extraído de cada amostra foi transferido 200 µl para tubo eppendorf 1,5 ml., centrifugado 15 minutos a 15000 rpm, o pellet submetido a 3 seqüências de aquecimento (100°C por 1 minutos) e resfriamento até congelamento em nitrogênio líquido (sem mergulhar nos primeiros 2 minutos) por 3 minutos, em seguida foi ressuspendido em 100 µl de Tris-HCl 50 mM pH 8.0, contendo lysozima 10 mg/ml e incubado a 37°C/30 min. Foi adicionado 10 µl de proteinase K 50 mg/ml e 1 µl de Triton X-100 10%, e mantido 2 horas a 55°C. A proteinase K foi inativada incubando 5 min. a 100°C. Foi adicionado igual volume de fenol:clorofórmio (24:1) centrifugado a 10.000rpm por 10 min. (2 repetições), adicionado 200µl de etanol absoluto, 10.000 rpm 5 min., reconstituído o DNA em 25 µl de água ddd e mantido em nitrogênio líquido até momento de amplificação.

A seqüência alvo para amplificação foi o gene *lsr2* ML0234 de *M.leprae*, pertence à classe: II.C.2,³⁶ com início na base de número 305.368 do genoma total e final na base número 305.707 e, portanto apresenta um total de 339 pb e peso molecular de 12.165 Da. Codifica para a proteína de superfície com 112 amino ácidos (aa), chamada *lsr2* proteína ou antígeno 15 kDa.³⁷ Apresenta a seqüência 5`- 3`: atggcgaaga aagtgaccgt caccttggtc gatgatttcg atggtgctggg cgccgccgat gaaacggctg aattcgggct tgacgggggtg acctacgaga tcgaccttac gaacaagaat gccgcgaaac tgcgtggcga tctgaggcaa tgggtgtccg ccggacggcg cgtcggcggt cggcggcgag ggcgttcaa

Condições de Amplificação: Tampão PCR (Invitrogen) 10X 2.50 µl, MgCL₂ 1.5 mM, dNTP 0.4 mM cada, primer 1µM cada, H₂O mili Q 6.25 µl, Taq. Pol. 1.25 U, DNA (amostras) 10 µl, 1µl de soro albumina bovina 1 mg/ml, total 25 µl. Amplificação : 95°C 5 min. e 5 ciclos : 95°C 1 min, 59°C 1 min, 72°C 1 min. 15 ciclos: 95°C 40 sec., 59°C 40 sec., 72°C 30 sec. 25 ciclos: 95°C 35 sec., 59°C 35 sec., 72°C 30 sec. Final com 72°C 5 min. Dez µl desta série foi submetida a uma nova série de amplificação sob as mesmas condições. Como padrão, foi utilizado 10 µl contendo 30 ng de DNA padrão de *M. leprae*, gentilmente cedido pelo Dr. Patrik Brennan da Universidade da Califórnia – EUA. Verificação do amplificado em gel de poliacrilamida 10% e em gel de agarose 1% e a visualização feita por fluorescência do brometo de etídio.

4 RESULTADOS

A análise da seqüência de bases no programa BLAST,³⁵ demonstra a existência de cópia única do gene *lsr2* no genoma deste microrganismo, o que permite uma alta especificidade para a região do DNA que se quer estudar com PCR. Para compensar a baixa sensibilidade esperada, optou-se por uma re-amplificação da reação de PCR (next PCR). As análises dos iniciadores (primers) feitas pelo BLAST indicaram boa especificidade para o gene *lsr2* do *M. leprae* quando confrontado com demais genomas nos bancos de dados (anexos II e III).

Obtivemos um limite de detecção de 30 fg utilizando DNA padrão de *M. leprae*. A tabela 5 mostra os resultados do produto de amplificação por PCR de 130 amostras de raspado de mucosa nasal de pacientes com hanseníase, contatos domiciliares e pessoas sem história de contato com hansenianos. As amostras com resultado de PCR negativo foram testadas para a presença de inibidores da reação adicionando DNA padrão. Em nenhuma amplificação por PCR apresentou presença de inibidores. Dos pacientes virchowianos (n=22) três (~13,6%) haviam recebido alta do tratamento com multidroga e tiveram resultado de PCR negativo, dos pacientes tuberculóides (n=17) dois (~11,7%) haviam recebido alta da medicação e tiveram PCR negativo.

Tabela 6 - Resultado de PCR de amostras de raspado nasal de pacientes com hanseníase, contatos domiciliares e pessoas sem história de contato com hansenianos.

| Forma clínica | Resultado do PCR | | |
|---------------------------|------------------|------------|------------|
| | Positivo | Negativo | Total |
| Virchowiana ¹ | 19 (86.4%) | 03 (13.6%) | 22 |
| Tuberculoide ² | 07 (41.2%) | 10 (58.8%) | 17 |
| Indeterminada | 01 (7.2%) | 13 (92.8%) | 14 |
| Contato | 12 (23.1%) | 40 (76.9%) | 52 |
| Não contato | 0 (0%) | 25 (100%) | 25 |
| Total | 39 | 91 | 130 |

¹ Três (~13,2%) dos 22 pacientes virchowianos haviam completado tratamento.

² Duas (~11,7) dos 17 pacientes tuberculóide haviam completado tratamento.

No teste com outras espécies de micobacterias, observamos (tabela 6), que 100% de resultados negativos, indicando que a seqüência de primers usados não se liga ao genoma destes microrganismos, nas condições padronizadas.

Tabela 7 - Especificidade do PCR com primers para região lrs2 de *M. leprae* frente a outras micobacterias.

| Isolado | Resultado do PCR | | |
|--------------------------|------------------|-----------|-----------|
| | Positivo | Negativo | Total |
| * <i>M. avium</i> | 0 (0%) | 04 (100%) | 04 |
| * <i>M. fortuitum</i> | 0 (0%) | 11 (100%) | 11 |
| * <i>M. scrofulaceum</i> | 0 (0%) | 01 (100%) | 01 |
| * <i>M. tuberculosis</i> | 0 (0%) | 29 (100%) | 29 |
| Total | 0 | 45 | 45 |

* Isoladas da mesma região dos pacientes com hanseníase.

5 DISCUSSÃO

No Brasil, não obstante as ações desenvolvidas pelo Ministério da Saúde para tratar e controlar a hanseníase, o número de novos casos mantém-se preocupantemente elevado e o índice de prevalência de 4,6 por 10.000 habitantes está longe dos menos de 1 por 10.000 habitantes, considerado como meta pela WHO, para conter a hanseníase sob controle. A padronização de novas técnicas que permitam o diagnóstico precoce desta enfermidade mostra-se como fator preponderante nesta luta, bem como para permitir maior compreensão das complexas relações entre o *M. leprae* e seu hospedeiro. A técnica de PCR clássica¹ tem demonstrado ser uma ferramenta promissora no combate e estudo da hanseníase.^{10, 12, 13, 17, 25, 26, 29, 31, 32}

As características do gene *lsr2* ML0234 de *M.leprae*, tem início na base de número 305.368 do genoma total e final na base número 305.706, codifica para uma proteína de superfície com 112 aa, chamada proteína *lsr2* ou antígeno 15 kDa.

Após tradução o antígeno de superfície 15 kDa terá a seguinte seqüência de amino ácidos:

```

      10          20          30          40          50          60
      |          |          |          |          |          |
MAKKVTVTLV DDFDGAAGAD ETVEFGLDGV TYEIDLTKN AAKLRGDLRQ WVSAGRRVGG

      70          80          90          100         110
      |          |          |          |          |
RRRGRSNSGR GRGAIDREQS AAIREWARRN GHNVSTRGRI PADVIDAFHA AT (anexo V) .

```

Este antígeno de 15 kDa codificado pelo gene *lsr2* de *M. leprae* estimula a proliferação de células T em pacientes com hanseníase.^{24,30} A análise pelo programa BLAST,³⁵ (anexo VI) mostra que este gene apresenta cópia única no genoma do *M. leprae* e está presente similarmente em outras espécies de micobacterias, mesmo assim, a técnica padronizada neste trabalho apresentou alta sensibilidade mesmo tendo como alvo esta seqüência de copia única no genoma de *M. leprae*, permitindo a detecção da presença deste microrganismo em 23,1% dos contatos estudados, sendo que nenhum deles apresentava qualquer sinal ou sintoma da doença e, associando os resultados dos não contatos, 100% negativos, abre-se uma perspectiva de detecção precoce da hanseníase. Por outro lado, em apenas 7,2% dos pacientes já diagnosticados como portadores de hanseníase indeterminada foi

detectada a presença da seqüência pesquisada com 92,3% de resultado negativo. Portanto, são necessários mais estudos para melhor compreender estes dados, considerando as possibilidades: ou número de BAAR na mucosa nasal dos pacientes com hanseníase indeterminada é muito pequena, devido ao tratamento, ou o material genético está deteriorado dificultando a detecção, ou por algum motivo desconhecido não se encontra BAAR na mucosa destes pacientes classificados como paucibacilares. O mesmo ocorre com os portadores de hanseníase tuberculóide, também classificada como paucibacilar, com 41,2% positivos e 58,8% negativos. Com relação à especificidade, tanto as análises realizadas com o programa BLAST (anexos II e III) como os resultados obtidos das análises com outras espécies de micobacterias (tabela 6) confirmam a possibilidade de uso deste marcador para pesquisa e detecção de *M. leprae* em amostras biológicas.

6 CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos, até o momento, acreditamos que a padronização desta técnica possibilite precocemente diagnosticar hanseníase, principalmente nos portadores de *M.leprae* assintomáticos contatos da forma virchowiana da hanseníase, auxiliando a decisão de terapia preventiva nestes casos.

Este teste poderá também ser usado como ferramenta para estudos epidemiológicos, principalmente em tatus, já que este animal é rotineiramente caçado e consumido como alimento pela população rural e mesmo urbano no Brasil. Estes dados, no entanto, não têm sido correlacionados com a ocorrência de hanseníase em animais ou no ser humano, em nosso país.

REFERÊNCIAS

Bell, J. THE POLYMERASE CHAIN REACTION. **Immun. Today** 10 351-355 1989

Brennan, P.J.; Vissa, V.D. GENOMIC EVIDENCE FOR THE RETENTION OF THE ESSENTIAL MYCOBACTERIAL CELL WALL IN THE OTHERWISE DEFECTIVE *Mycobacterium leprae* **Lepr Rev** v.72 p 415-428 2001

Cole, S. T.; Eiglmeier, K.; Parkhill, J.; James, K. D.; Thomson, N. R.; Wheeler, P. R.; Honoré, N.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Mungall, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R. M.; Devlin, K.; Duthoy, S.; Feltwell, T.; Fraser, A.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Lacroix, C.; Maclean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Quail, M. A.; RAJANDREAM, M.-A.; Rutherford, K. M.; Rutter, S.; Seeger, K.; Simon, S.; Simmonds, M.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Stevens, K.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Woodward, J. R.; Barrell, B. G. MASSIVE GENE DECAY IN THE LEPROSY BACILLUS **Nature** v.409 p 1007 - 1011 2001

Cole, S.T. COMPARATIVE MYCOBACTERIAL GENOMICS. **Curr. Op. Microbiol.** 1 567-571 1998

Colston, M.J. *Mycobacterium leprae* GENOME SEQUENCE A LANDMARK; ARCHIEVEMENT **Lepr. Rev.** v.72 p 385-386 2001

Curtiss III, R.; Blower, S.; Cooper, K.; Russell, D.; Silverstein, S.; Young, L. LEPROSY RESEARCH IN THE POST-GENOME ERA **Lep. Rev.** 72 8-22 2001

Dawes, S.S.; Mizrahi, V. DNA METABOLISM IN *Mycobacterium leprae* **Lepr. Rev.** 72 408-414 2001

Eiglmeier, K.; Parkhill, J.; Honoré, N.; Granier, T.; Tekaiia, F.; Telenti, A.; Klaster, P.; James, K.D.; Thonson, N.R.; Wheeler, P.R.; Churcher, C.; Harris, D.; Mungall, K.; Barrel, B.G.; Cole, S.T. THE DECAING GENOME OF *Mycobacterium leprae* **Lepr Rev** v.72 p 387-398 2001

Eiglmeier, K.; Simon, S.; Garnier, T.; Cole, S.T. THE INTEGRATED GENOME MAP OF *Mycobacterium leprae* **Lepr. Rev.** v.72 p 462-469 2001

Gorodezky, C.; Alaez, C.; Munguía, A.; Cruz, R.; Vazquez, A.; Camacho, A.; Flores, O.; Rodriguez, M.; Rodriguez, O. MOLECULAR MECHANISMS OF MHC LINKED SUSCEPTIBILITY IN LEPROSY: TOWARDS THE DEVELOPMENT OF SYNTHETIC VACCINES. In Press **Corrected Proof** Available online 30 Oct 2003

Grosset, J.H.; Cole, S.T. GENOMICS AND THE CHEMOTHERAPY OF LEPROSY **Lepr. Rev.** 72 429-440 2001

Guerrero, M.I.; Arias, M.T.; Garcés, M.T.; León, C.I. DESARROLLO Y APLICACIÓN DE UNA PRUEBA DE RCP PARA DETECTAR LA INFECCIÓN SUBCLÍNICA POR *Mycobacterium leprae* **Rev Panam Salud Publica** v.11 n.4 p 1-13 2002

<http://hanseniasis.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?hans/hansw.def> (2005)

<http://w3.whosea.org/leprosy/introduction.htm> (2005)

Hughes, M.S.; James, G.; Taylor, M.J.; McCarroll, S.; Neill, D.; Chen, S.C.A.; Mitchell, D.H.; Love, D. N.; Malik, R. PCR STUDIES OF FELINE LEPROSY CASES **J Feline Med Surg** In Press Available online 23 October 2003

Imai, T.; Ohta, K.; Kigawa, H.; Kanoh, H.; Taniguchi, T.; Tobari, J. PREPARATION OF HIGH-MOLECULAR-WEIGHT DNA: APPLICATION TO MYCOBACTERIAL CELLS **Analytical Biochem.** v.222 p 479-482 1994

Jadhav, R.S.; Macdonald, M.; Bjune, G.; Oskam, L. SIMPLIFIED PCR DETECTION METHOD FOR NASAL *Mycobacterium leprae*. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 69 v.4 p 299-307 2001

Kirchheimer, WF; Storrs, EE. ATTEMPTS TO ESTABLISH THE ARMADILLO (*DASYPUS NOVENCINCTUS* LINN) AS A MODEL FOR THE STUDY OF LEPROSY. I. REPORT OF LEPROMATOID LEPROSY IN AN EXPERIMENTALLY INFECTED ARMADILLO. **Int J Lepr Other Mycobact Dis** 39 693-702 1971

Lawrence, J.G.; Hendrix, R.W.; Casjens, S. WHERE ARE THE PSEUDOGENES IN BACTERIAL GENOMES? **TRENDS in Microbiology** v.9 p 535-540 Nov. 2001

Marques, M.A.M.; Mahapatra, S.; Sarno, E.N.; Santos, S.; Spencer, J.S.; Brennan, P.J.; Pessolani, M.C.V. FURTHER BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF *Mycobacterium leprae* LAMININ-BINDING PROTEINS. **Brz J Med Res** 34 463-470 2001

Moudgil, K. D.; Williams, D. L.; Gillis, T. P. DNA HYBRIDIZATION ANALYSIS OF MYCOBACTERIAL DNA USING THE 18-KDA PROTEIN GENE OF *Mycobacterium leprae* **FEMS Microbiology Letters** v.89 Issue 3 p 165-174 Feb 1992

Nurse, P. SYSTEMS BIOLOGY: UNDERSTANDING CELLS **Nature** v.424 p 883 Aug 2003

Rambukkana, A.; Salzer, J.L.; Yurchenco, P.D.; Tuomanen, E.I. NEURAL TARGETING OF *Mycobacterium leprae* MEDIATED BY DOMAIN OF LAMINI-ALFA 2 CHAIN **Cell** v.88 p 811-821 1997

Rambukkana, A.; Zanazzi, G.; Tapinos, N.; Salzer, J.L. CONTACT-DEPENDENT DEMYELINATION BY *Mycobacterium leprae* IN THE ABSENCE OF IMMUNE CELLS **Science** v.296 p 927-931 2002

Santos, A. R.; Goes Filho, J. T.; Nery, J. A. C.; Duppre, N. C.; Gallo, M. E. N.; Suffys, P. N.; Degrave, W. M. EVALUATION OF PCR MEDIATED DNA AMPLIFICATION IN NON-INVASIVE BIOLOGICAL SPECIMENS FOR SUBCLINICAL DETECTION OF MYCOBACTERIUM LEPRAE **FEMS Immunology and Medical Microbiology** v.11 Issue 2 p 113-120 Apr 1995

Santos, A.R.; Balassiano, V.; Oliveira, M.L.W.; Pereira, M.A.S.; Santos, P.B.; Degrave, W.M.; Suffys, P.N. DETECTION OF *Mycobacterium leprae* DNS BY POLYMERASE CHAIN REACTION IN THE BLOOD OF INDIVIDUALS, EIGHT YEARS AFTER COMPLETION OF ANTI-LEPROSY THERAPY **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** v.96 n.8 p 1129-1133 Rio de Janeiro 2001

Scollard, D.M.; McCormick, G.; Allen, J.L. LOCALIZATION OF *Mycobacterium leprae* TO ENDOTHELIAL CELLS OF EPINEURIAL AND PERINEURIAL BLOOD VESSELS AND LYMPHATICS. **Amer Jour of Path** v 154 1999

Stephenson, J. GENETIC SUSCEPTIBILITY TO LEPROSY INFECTION. **JAMA** 289 1243 2003

Torres, P.; Camarena, JJ; Gomez, J.R.; Nogueira, J.M.; Gimeno, V.; Navarro, J.C.; Olmos, A. COMPARISON OF PCR MEDIATED AMPLIFICATION OF DNA AND THE CLASSICAL METHODS FOR DETECTION OF *Mycobacterium leprae* IN DIFFERENT TYPES OF CLINICAL SAMPLES IN LEPROSY PATIENTS AND CONTACTS. **Lepr. Rev.** 74 18-30 2003

Wheeler, P. R. THE MICROBIAL PHYSIOLOGIST'S GUIDE TO THE LEPROSY GENOME **Lepr Rev** v.72 p 399-407 2001

Williams, D. L.; Scollard, D. M.; Gillis, T. P. PCR-BASED DIAGNOSIS OF LEPROSY IN THE UNITED STATES **Clinical Microbiology Newsletter** v.25 Issue 8 p 57-61 15 Apr 2003

Woods, S. A.; Cole, S. T. A RAPID METHOD FOR THE DETECTION OF POTENTIALLY VIABLE *Mycobacterium leprae* IN HUMAN BIOPSIES: A NOVEL APPLICATION OF PCR **FEMS Microbiology Letters** v.65, Issue 3, p 305-309, Dec 1989

www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3 (2003)

www.nature.com/nature/journal/v409/n6823/fig_tab/4091007a0_F3.html (2005)

www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST (2003)

www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/functional_classes/II.C.2.shtml (2003)

www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/Ml_gene_list_hierarchical.shtml (2003)

www.who.int/lep/

www.who.int/lep/disease/disease.htm (2005)

www.who.int/lep/disease/Microbiology/micro.htm (2004)

www.who.int/lep/L3.HTM

www.who.int/lep/Reports/s20042.pdf (2005)

www.who.int/lep/stat2002/Americas02.htm (2005)

www.who.int/lep/stat2002/global02.htm (2005)

www.who.int/lep/stat2002/global03.htm (2005)

Young, D. LEPROSY AND THE GENOME – NOT YET A BURNT-OUT CASE **The Lancet** v.357 p 1639-1640 2001

Young, D.B. LEPROSY LIPID PROVIDES THE KEY TO SCHWANN CELL ENTRY **Trends in Microbiology** v.9 Issue 2 p 52-54 Feb 2001

ANEXOS

ANEXO I

PUBLICAÇÃO

DETECTION OF *Mycobacterium leprae* IN SMEARS OF NASAL MUCUS BY NEXT-PCR

Custodio, L.A.^{a*}; Padovesi, E.J.^{**}, Brennan, P.^{***}; Spencer, J.S.^{***}; Jankevicius, J.V.^{*}; Gaziri, L.C.J.^{*}; Jankevicius, S.I.^{*}

*Centro de Ciências Biológicas – Departamento Microbiologia Universidade Estadual de Londrina – Paraná – Brasil

** Sociedade Filantrópica Humanitas – São Jerônimo da Serra – Pr – Brasil

*** Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Science, Colorado – USA

^a e-mail: lcustodio@sercomtel.com.br

Summary Leprosy, a debilitating and deforming disease with a high social impact, still is a very serious public health problem in Brazil and in other countries of the world. The complexity of the interactions between its causative agent *Mycobacterium leprae* and its host has defied research for tens of years, but now the modern techniques of molecular biology might allow a better understanding and control of this longstanding disease. We applied next PCR to amplify one sequence of the *lsr2* gene of *M. leprae*, obtaining 100% of specificity for *M. leprae*, with a limit of detection of about 30fg of standardized DNA. With this technique, we detected the presence of *M. leprae* in the nasal mucus of 41.2% of patients with tuberculoid leprosy, 7.2% of patients with indeterminate leprosy, and 23.1% of contacts.

INTRODUCTION

Although some 132 years have elapsed since the discovery of *Mycobacterium leprae* by Gerhard Armauer Hansen,⁶ our understanding of the biology of this microorganism is still very incomplete. For instance, *M. leprae* is one of a very few microorganisms for which “*in vitro*” cultivation techniques have not yet succeeded. Several recent studies presented interesting data about the relationship between *M. leprae* and its host,^{12, 16, 23} but many important questions about it remain unanswered.^{1, 19}

Leprosy continues being an important public health problem in several countries, mainly in India and Brazil, At the beginning of 2004, the number of leprosy patients under treatment in the world was around 460,000. About 515,000 new cases were detected during 2003,¹¹ but it is also a problem in countries which received a great number of immigrants coming from endemic areas.^{4, 20} Multidrug treatment contributed to control this disease, but new cases have been increasing, showing that the development of early detection methods is imperative. Knowledge of the genomic sequence of *M. leprae*⁵ is an important step for understanding this bacteria and its interactions with its host,^{3, 14, 15, 17, 25} as well as for developing detection tests such as those based on PCR¹³ or helicase-dependent amplification (HDA).²² Several PCR-based methods for detection and evaluation of leprosy were reported.^{7, 18, 21, 24}

OBJECTIVES

This work aimed at testing the adequacy of PCR (next-PCR) standardized to the *lsr2* gene (339 bp) of *M. leprae* for its detection; this gene codifies a protein (112 aa) of 15 KDa which has the capability of stimulating T lymphocytes (http://www.sanger.ac.uk/Projects/M_leprae/CDS/ML0234.shtml). The target sequence, in *lsr2* gene, will be amplified, and will have 226 bp, recognized by one pair of primers (5' - 3') TTG ACG GGG TGA CCT ACG AGA with 21 bp (5' - 3') GGCC GGA ATA CGA CCA CGA GT with 20 bp, with starts in base numbers 80 and 305 of *lsr2 M. leprae* gene, respectively.

MATERIAL AND METHODS

Sequences of DNA *M. leprae* were submitted to analysis by BLAST¹⁰ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) and the rate of repetition in the genome was checked searching for a unique sequence copy, as well as for similarity with genome of other microorganisms. *lsr2* gene was analysed in the PRIMER3 program⁹ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) to draw one pair of primers and these were analysed by BLAST program, checking its specificity to *M. leprae*. Swab samples of nasal mucus were collected using cotton swabs wet in phosphate buffer pH 7.0, sterilized, maintained at 4°C until the moment of transfer to Eppendorf tubes containing 1000 µl of mili Q water and stored at -20°C until the moment of DNA extraction. A total of 130 samples was used, which were allocated into the following classes: 22 samples (~16,9%) classified as virchowians, 17 samples (~13 %) classified as tuberculoids, 14 samples (~10,7%) classified as indeterminate, 52 (%) samples from contacts, and 25 samples (19 %) classified as people without history of contact with leprosy. Other species of mycobacteria were isolated in the same region where samples from leprosy patients were obtained, and were used in PCR control. The following mycobacteria were isolated: *Mycobacterium fortuitum* (11 isolates), *Mycobacterium scrofulaceum* (1 isolate), *Mycobacterium tuberculosis* (29 isolates), *Mycobacterium avium* (4 isolates), which were kindly provided by Dra. Halha Ostrensky Saridakis, (Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Microbiologia – Universidade Estadual de Londrina – Brasil). DNA extraction : Transfer 200µl of stored sample at -20°C to Eppendorf tube 1.5 ml, centrifugate 15 minutes at 15000 rpm, pellet submitted to warming sequence, 100°C for 1 minute, cooling until freezing in liquid nitrogen (not float in 2 first minutes), for 3 minutes. Resuspending in 100 µl of Tris-HCl 50 mM pH 8.0, containing lysozyme 10 mg/ml, incubating at 37°C /30 minutes, add 10 µl of K proteinase 50 mg/ml and 1 µl of Triton X-100 (10%), two hours at 55°C, inactivate K proteinase incubating for 5 minutes at 100°C, add equal volume of absolut ethanol spin at 10.000 rpm/5 minutes and rebuilding DNA in 25 µl of mili Q water; keep in nitrogen until amplification. Amplification conditions: Buffer 10X 2.50 µl, MgCl₂ 1.5 mM, dNTP 0.4 mM each, Primer 1µM each, H₂O 6.25 µl, Taq. Pol. 1.25 U, DNA (sample) 10 µl, add 1µl of bovine serum albumine 1 mg/ml, total 25 µl. Amplification : 95°C 5 min. and 5 cycles : 95°C 1 min, 59°C 1 min, 72°C 1 min. 15 cycles: 95°C 40 sec., 59°C 40 sec., 72°C 30 sec. 25 cycles: 95°C 35 sec., 59°C 35 sec., 72°C 30 sec. end of cycle 72°C 5 min, 10 µl were submitted to a new series of amplification under the same conditions. 5 µl of *M. leprae* DNA control was kindly provided by Dr. Patric Brennan, (Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine and Biomedical

Science, Colorado – USA), were used as positive control in each series of amplification. Visualizing the amplification in polyacrylamide gel (10%) and in agarose gel (1%), was obtained through fluorescence using ethidium bromide 0.5 µg/ml.

RESULTS

Analysing base sequences of the 1sr2 *M.leprae* gene, by BLAST demonstrates the existence of a unique copy in this microorganism genome, thus allowing high specificity in PCR. To compensate for the expected low sensitivity, reamplification of PCR (next PCR) was employed and was obtained a limit of detection of about 30 fg of standardized *M.leprae* DNA.

Table 1 shows the results of the products of amplifications by PCR from 130 swab samples of nasal mucus of leprosy patients, house contacts and people without contact history. Samples with PCR results negative were tested concerning the presence of inhibitors in reaction, adding standardized DNA to the extracted sample.

Table 1. PCR results of swab samples of nasal mucus according to class

| Class | PCR-probing | | |
|--------------------------|-------------|------------|-------|
| | Positive | Negative | Total |
| Virchowian ¹ | 19 (86.4%) | 03 (13.6%) | 22 |
| Tuberculoid ² | 07 (41.2%) | 10 (58.8%) | 17 |
| Indetermined | 01 (7.2%) | 13 (92.8%) | 14 |
| Contact | 12 (23.1%) | 40 (76.9%) | 52 |
| No contact | 0 (0%) | 25 (100%) | 25 |
| Total | 39 | 91 | 130 |

¹ Three (~13.2%) out of 22 virchowian patients.

² Two (~11.7) out of 17 tuberculoid patients were discharged from treatment and presented negative PCR test.

Table 2. Specificity of PCR-probing with primers for *M.leprae* rls 2 region.

| Species | PCR-probing | | |
|--------------------------|-------------|-----------|-------|
| | Positive | Negative | Total |
| * <i>M. avium</i> | 0 (0%) | 04 (100%) | 04 |
| * <i>M. fortuitum</i> | 0 (0%) | 11 (100%) | 11 |
| * <i>M. scrofulaceum</i> | 0 (0%) | 01 (100%) | 01 |
| * <i>M. tuberculosis</i> | 0 (0%) | 29 (100%) | 29 |
| Total | 0 | 45 | 45 |

* Isolated in the same region were samples from leprosy patients were obtained

DISCUSSION

In Brazil, despite actions of the government to treat and control leprosy, the number of new cases is threatening high, and when we consider the existence of infected and undiagnosed people as a truly reservoir of *M. leprae* and their contacts² as infection sources,

the development of methods for early diagnosis become imperative. PCR is a useful tool for diagnosis and evaluation of leprosy,^{2, 7, 18, 21, 24} and its recent developments such as helicase dependent amplification point to the possibility of developing methods of detection with greater sensitivity and specificity, and low price.

In this work we standardized a PCR technique to amplify the single copy gene *lsr2* of *M. leprae*. By means of reamplification of PCR products (next PCR) we obtained greater sensitivity. This technique presented 100% of specificity for *M. leprae* relative to other mycobacteria, in agreement with previous report^{2, 7, 18, 21, 24}. It therefore seems possible to use this gene as a target for large scale screening of human reservoirs of *M. leprae*, and in this way eradicate this historical human plague.

References:

1. Beiguelman, B. Genética e Hanseníase. Ciênc. Saúde Coletiva v.7 (1) São Paulo 2002
2. Braber, K.L. An Evaluation of GAEL, the Global Alliance for the Elimination of Leprosy. Lepr. Rev. v.75 208-213 2004
3. Britton, W.J. and Lockwood, D.N.J. Leprosy: Changing Approaches to an Ancient Disease. Lancet v.363 1209-1219 2004
4. Chae, G.T.; Lee, S.B.; Kang, T.J.; Shin, H.K.; Kim, J.P.; Ko, Y.H.; Kim, S.H.; Kim, N.H. Typing of Clinical Isolates of *Mycobacterium leprae* and their Distribution in Korea. Lepr. Rev. v.73 41-46 2002
5. Cole, S. T.; Eiglmeier, K.; Parkhill, J.; James, K. D.; Thomson, N. R.; Wheeler, P. R.; Honoré, N.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Mungall, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R. M.; Devlin, K.; Duthoy, S.; Feltwell, T.; Fraser, A.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Lacroix, C.; Maclean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Quail, M. A.; RAJANDREAM, M.-A.; Rutherford, K. M.; Rutter, S.; Seeger, K.; Simon, S.; Simmonds, M.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Stevens, K.; Taylor, K.; Whitehead, S.; Woodward, J. R.; Barrell, B. G. Massive Gene Decay in the Leprosy Bacillus. Nature v.409 1007 - 1011 2001
6. De Zubiria, R.; Rodriguez, G. Historia de la Lepra: Ayer, Hoy y Mañana. Medicina v25 (61) 33-46 Bogotá 2003
7. Guerrero, M.I.; Arias, M.T.; Garcés, M.T. y León, C.I. Desarrollo y Aplicación de una Prueba de RCP para Detectar la Infección Subclínica por *Mycobacterium leprae*. Rev. Panam. Salud Publica v.11 (4) Washington 2002
8. GUILLEMIN, I.; CAMBAU, E. and JARLIER, V Sequences of Conserved Region in the A Subunit of DNA Gyrase from Nine Species of the Genus *Mycobacterium*: Phylogenetic Analysis and Implication for Intrinsic Susceptibility to Quinolones. Antimicrobial Agents and Chemotherapy v. 39 (9) 2145-2149 1995
9. http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi 2004
10. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 2004
11. <http://www.who.int/lep> 2005
12. Jianping, S.; Wenzhong, L.; Meiwen, Y.; Jun, Y.; Longchao, Z.; Rongmao, W.; Lufang, H.; Hongjiang, M.; Fuchang, Y.; Xinguo, H. and Liangde, P. Analysis on the Detection of new Leprosy Cases Before, During and After the Year of Leprosy Elimination Campaigns. Lepr. Rev. v.75 157-163 2004
13. Meima, A.; Smith, W.C.S.; Oortmarssen G.J.V.; Richardus J.H. and Habbema J.D.F The Future Incidence of Leprosy: A Scenario Analysis. Bulletin of the World Health Organization 82 (5) 373-386 2004
14. Mira, M T; Alcais, A; Pietrantonio, T; Thuc, N V; Phuong, M.C; Abel, L. and Schurr, E. Segregation of HLATNF region is linked to leprosy clinical spectrum in families displaying mixed leprosy subtypes. Nature v 4 (1) 67-73 2003
15. Mira, M.T.; Alcais, A.; Thuc, N.V.; Thai, V.H.; Huong, N.T.; Ba, N.N.; Verner, A.; Hudson, T.J.; Abel, L. and Schurr, E. Chromosome 6q25 is linked to susceptibility to leprosy in a Vietnamese population. Nature v. 33 (3) 412 – 415 2003
16. Nurse, P.; Systems Biology: Understanding Cells. Nature 424 883 2003
17. Rambukkana, A.; Salzer, J.L.; Yurchenco, P.D. and Tuomanen, E.I. Neural Targeting of *Mycobacterium leprae* Mediated by the G Domain of the Laminin- α 2 Chain. Cell v 88 811–821 1997
18. Santos, A.R.; Balassiano, V.; Oliveira, M.L.W.; Pereira, M.A.S.; Santos, P.B.; Degraeve, W.M.; Suffys, P.N. Detection of *Mycobacterium leprae* DNA by Polymerase Chain Reaction in the Blood of Individuals, Eight Years after Completion of Anti-leprosy Therapy. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz v.96 (8) 1129-1133 2001

19. Siddiqui, M.R.; Meisner, S.; Tosh, K.; Balakrishnan, K.; Ghei, S.; Fisher, S.E.; Golding, M.; Narayan, N.P.S.; Sitaraman, T.; Sengupta, U.; Pitchappan, R. and Hill, A.V.S A Major Susceptibility Locus for Leprosy in India Maps to Chromosome 10p13. *Nature* v. 27 n. 4 439–441 2001
20. Taylor, R.; King, K.; Vodicka, P.; Hall, J. and Evans, D. Screening for Leprosy in Immigrants – a Decision Analysis Model. *Lepr. Rev.* v.74 240-248 2003
21. Torres, P.; Camarena, J.J.; Gomez, J.R; Nogueira, J.M.; Gimeno, V.; Navarro, J.C. and Olmos, A. Comparison of PCR Mediated Amplification of DNA and the Classical Methods for Detection of *Mycobacterium leprae* in Different Types of Clinical Samples in Leprosy Patients and Contacts. *Lepr. Rev* v.74 18-30 2003
22. Vincent, M.; Xu, Y. and Kong, H. Helicase-Dependent Isothermal DNA Amplification. *EMBO reports* 5, 795–800 2004
23. Vincent, Ng; Zanazzi, G; Timpl, R.; Talts, J.F.; Salzer, J.L.; Brennan, P.B. and Rambukkana, A. Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*, v.103 511–524, 2000
24. Willams, D.L.; Scollard, D.M.; Gillis, T.P. PCR-Based Diagnosis of Leprosy in the United States. *Cli. Microbiol. Newsletter* v.25 (8) 57-61 2003
25. Young, D. Leprosy and Genome – not yet a Burntout Case. *The Lancet* 357 1639-1640 2001

ANEXO II

Primer 1

*results of* **BLAST**

BLASTN 2.2.10 [Oct-19-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer,
Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),
"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1109625573-3292-103546051172.BLASTQ2

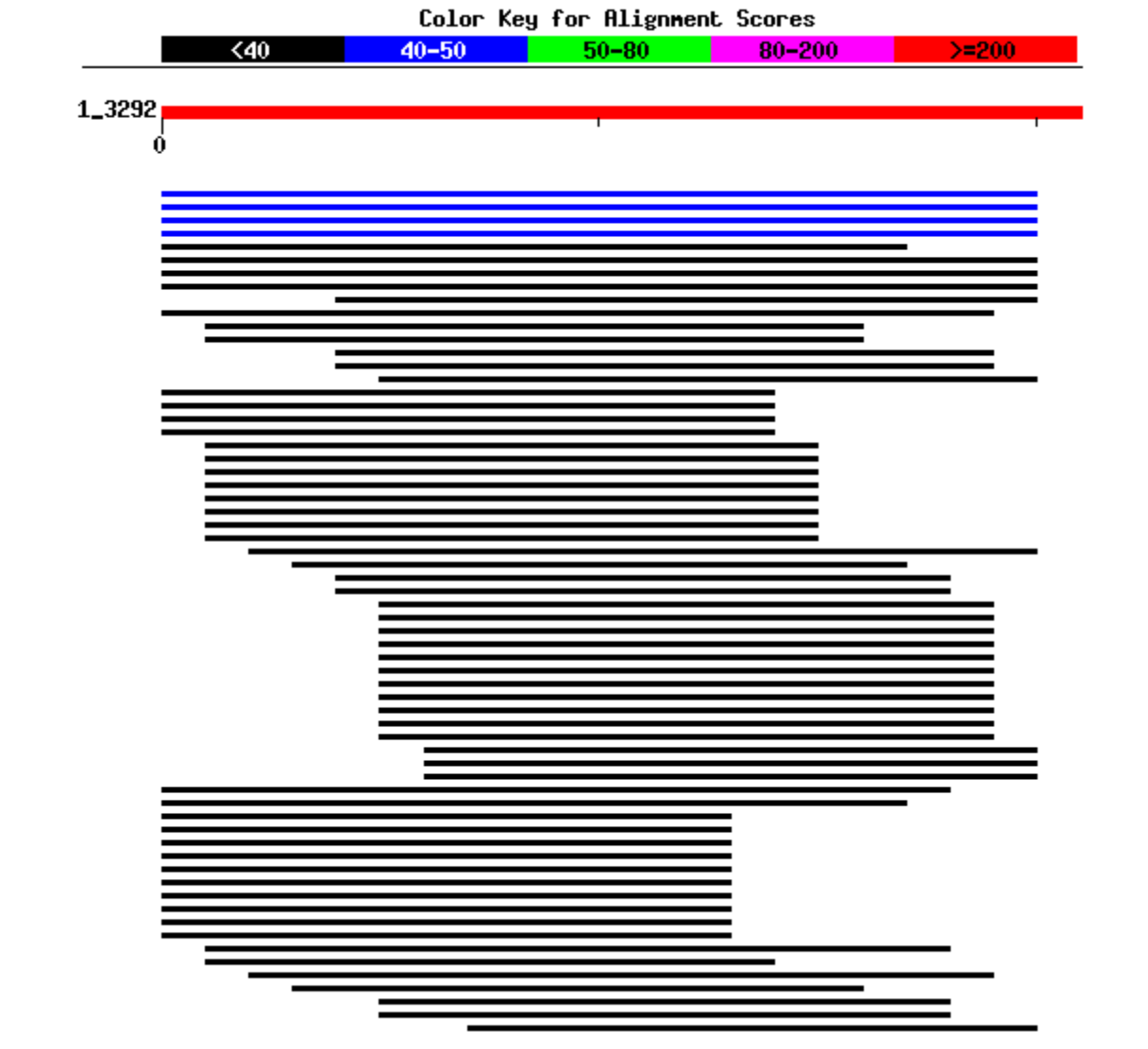
Query= (21 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS,
GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

2,911,202 sequences; 13,373,181,452 total letters

please refer to

| |
|---|
| Mouse-over to show defline and scores. Click to show alignments |
|---|



| Sequences producing significant alignments: | Score (bits) | E Value |
|--|--------------------|------------|
| gi 44410 emb X53487.1 MLLSR2 Mycobacterium leprae LSR2 gene | 42 | 0.008 |
| gi 13092412 emb AL583917.1 MLEPRTN1 Mycobacterium leprae st... | 42 | 0.008 |
| gi 41394729 gb AE017228.1 Mycobacterium avium subsp. parat... | 42 | 0.008 |
| gi 149915 gb M67510.1 MSGA15AGA M.leprae antigen 15 kDa gen... | 42 | 0.008 |
| gi 712794 gb S74280.1 S74280 env 2 {clone MM II-2, hypervar... | 36 | 0.52 |
| gi 50952454 gb AE000516.2 Mycobacterium tuberculosis CDC15... | 34 | 2.0 |
| gi 13123309 gb AC012543.4 AC012543 Homo sapiens, clone RP11... | 34 | 2.0 |
| gi 41352785 emb BX842583.1 Mycobacterium tuberculosis H37R... | 34 | 2.0 |
| gi 31620160 emb BX248346.1 Mycobacterium bovis subsp. bovi... | 34 | 2.0 |

Alignments

- [>gj|44410|emb|X53487.1|MLLSR2](#) Mycobacterium leprae LSR2 gene
Length = 300
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.008
Identities = 21/21 (100%)
Strand = Plus / Plus
- [>gj|13092412|emb|AL583917.1|MLEPRTN1](#) Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 1/10
Length = 344050
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.008
Identities = 21/21 (100%)
Strand = Plus / Plus
- [>gj|41394729|gb|AE017228.1|](#) Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis str. k10, section 2 of 16 of the complete genome
Length = 300327
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.008
Identities = 21/21 (100%)
Strand = Plus / Plus
- [>gj|149915|gb|M67510.1|MSG15AGA](#) M.leprae antigen 15 kDa gene, complete cds
Length = 1212
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.008
Identities = 21/21 (100%)
Strand = Plus / Plus

ANEXO III

PRIMER 2

*results of* **BLAST****BLASTN 2.2.10 [Oct-19-2004]****Reference:**

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer,
Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997),
"Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search
programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 1109625755-16650-54463606872.BLASTQ2

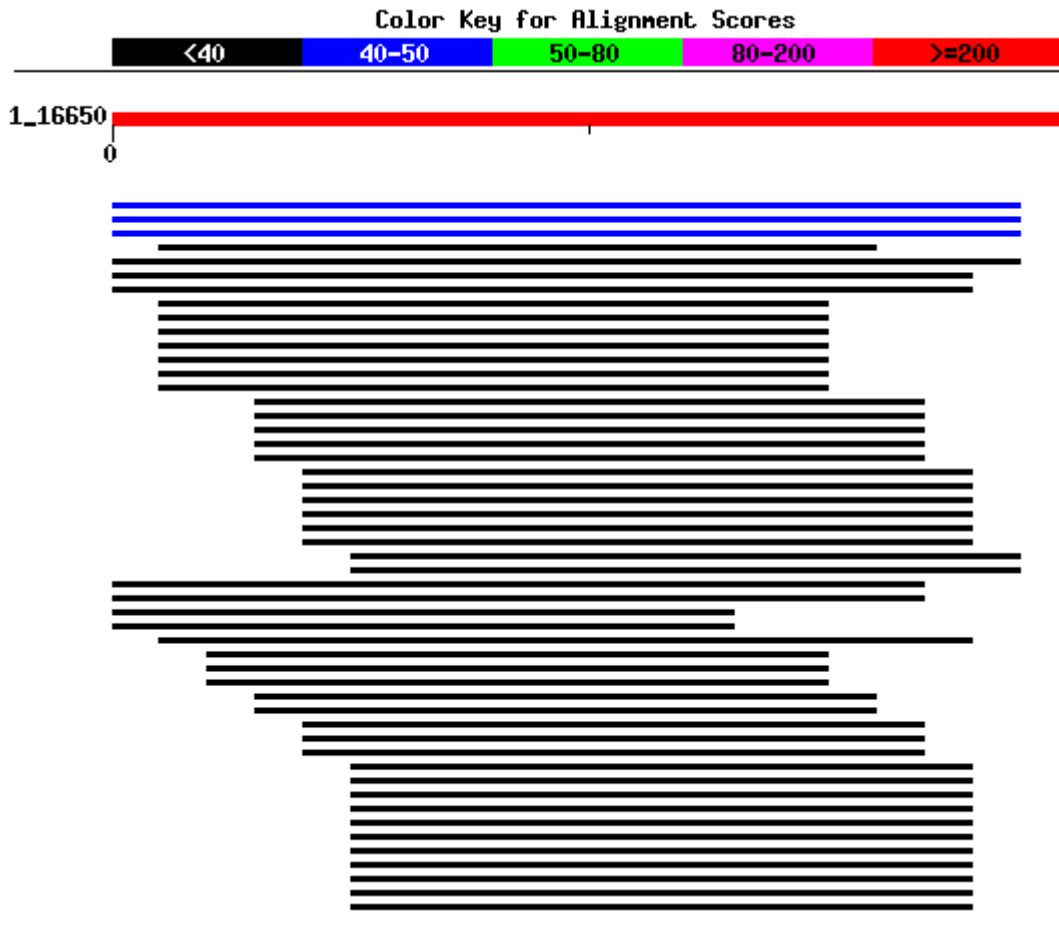
Query= (20 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS,
GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

2,911,202 sequences; 13,373,181,452 total letters

[Distribution of 108 Blast Hits on the Query Sequence](#)

| |
|---|
| Mouse-over to show defline and scores. Click to show alignments |
|---|



| Sequences producing significant alignments: | Score (bits) | E Value |
|--|--------------------|--|
| gi 44410 emb X53487.1 MLLSR2 Mycobacterium leprae LSR2 gene | 40 | 0.022 |
| gi 13092412 emb AL583917.1 MLEPRTN1 Mycobacterium leprae st... | 40 | 0.022 |
| gi 149915 gb M67510.1 MSGA15AGA M.leprae antigen 15 kDa gen... | 40 | 0.022 |
| gi 10584378 gb AE005164.1 AE005164 Halobacterium sp. NRC-1 ... | 32 | 5.4 G |
| gi 56178122 gb AE017340.1 Idiomarina loihiensis L2TR, comp... | 30 | 21 |
| gi 33148481 gb AE017154.1 Haemophilus ducreyi strain 35000... | 30 | 21 |
| gi 51973633 gb CP000001.1 Bacillus cereus ZK, complete genome | 30 | 21 |
| gi 6562339 emb Z77652.2 CEC06B3 Caenorhabditis elegans cosm... | 30 | 21 |

Alignments

> [gi|44410|emb|X53487.1|MLLSR2](#) Mycobacterium leprae LSR2 gene
 Length = 300
 Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.022

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Minus

[>gj|13092412|emb|AL583917.1|MLEPRTN1](#)  Mycobacterium leprae strain TN complete genome; segment 1/10

Length = 344050

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.022

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Minus

[>gj|149915|gb|M67510.1|MSG15AGA](#) M.leprae antigen 15 kDa gene, complete cds

Length = 1212

Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.022

Identities = 20/20 (100%)

Strand = Plus / Minus

ANEXO IV

BLAST LSR2



BLASTN 2.2.10 [Oct-19-2004]

RID: 1109626187-25227-141652391349.BLASTQ2

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS,
GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)

2,911,202 sequences; 13,373,181,452 total letters

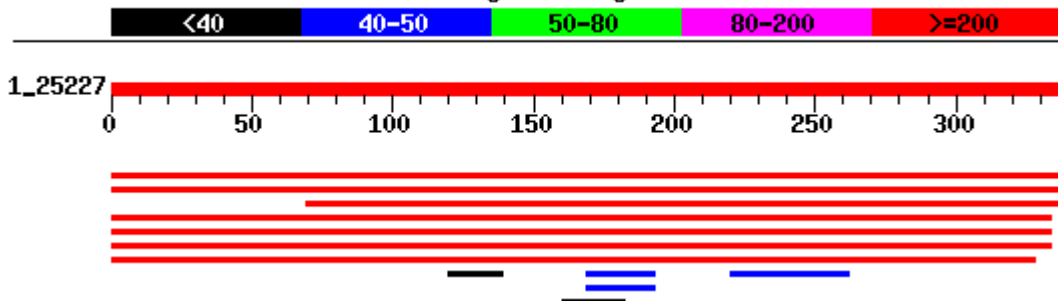
If you have any problems or questions with the results of this search
please refer to the [BLAST FAQs](#)

Query= (339 letters)

[Distribution of 12 Blast Hits on the Query Sequence](#)

Mouse-over to show defline and scores. Click to show alignments

Color Key for Alignment Scores



| Sequences producing significant alignments: | Score (bits) | E Value |
|--|---------------------|------------------------|
| gi 13092412 emb AL583917.1 MLEPRTN1 Mycobacterium leprae st... | 652 | 0.0 |
| gi 149915 gb M67510.1 MSGA15AGA M.leprae antigen 15 kDa gen... | 652 | 0.0 |
| gi 44410 emb X53487.1 MLLSR2 Mycobacterium leprae LSR2 gene | 519 | e-144 |
| gi 50952454 gb AE000516.2 Mycobacterium tuberculosis CDC15... | 390 | e-106 |
| gi 41352785 emb BX842583.1 Mycobacterium tuberculosis H37R... | 390 | e-106 |
| gi 31620160 emb BX248346.1 Mycobacterium bovis subsp. bovi... | 390 | e-106 |
| gi 41394729 gb AE017228.1 Mycobacterium avium subsp. parat... | 350 | 1e-93 |
| gi 54013472 dbj AP006618.1 Nocardia farcinica IFM 10152 DN... | 49 | 0.009 |
| gi 32978649 dbj AK068632.1 Oryza sativa (japonica cultivar... | 43 | 0.48 U |

| | | |
|--|--------------------|------|
| gi 18390201 gb AC079874.21 Oryza sativa chromosome 10 BAC ... | 43 | 0.48 |
| gi 26108223 gb AE016761.1 Escherichia coli CFT073 section ... | 39 | 6.9 |
| gi 15718426 dbj AP003279.2 Oryza sativa (japonica cultivar... | 39 | 6.9 |

ANEXO V
Tabela de Amino Ácidos

| Acid Name | A b r e v. | A b r e v. | Structure of R group (red) |
|-------------------------------|------------------------|------------------------|--|
| Alanine | ala | A | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ |
| Arginine | arg | R | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ (\text{CH}_2)_3-\text{N}^+-\text{C}-\text{NH}_2 \end{array}$ |
| Asparagine | asn | N | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2 \end{array}$ |
| Aspartic Acid | asp | D | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \end{array}$ |
| Cysteine | cys | C | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{SH} \end{array}$ |
| Glutamic Acid | glu | E | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH} \end{array}$ |
| Glutamine | gln | Q | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2 \end{array}$ |
| Glycine | gly | G | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{H} \end{array}$ |
| Histidine | his | H | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2^+ \end{array}$ |

| | | | |
|-------------------------------------|------------|---|--|
| Isoleucine | ile | I | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CHCH}_2\text{CH}_3 \end{array}$ |
| Leucine | leu | L | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ |
| Lysine | lys | K | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2 \end{array}$ |
| Methionine | met | M | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$ |
| Phenyl- alanine | phe | F | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$ |
| Proline | pro | P | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{HC}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{H}_2\text{N}^+ \end{array}$ |
| Serine | ser | S | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{OH} \end{array}$ |
| Threonine | thr | T | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{HO}-\text{CHCH}_3 \end{array}$ |
| Trypto- phan | trp | W | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}_8\text{H}_6\text{N}_2 \end{array}$ |
| Tyrosine | tyr | Y | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \end{array}$ |
| Valine | Val | V | $\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{H}_3\text{N}^+-\text{C}-\text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{CHCH}_3 \end{array}$ |