

ALTERACIÓN DE LA INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS FRENTE A **MYCOBACTERIUM LEPRÆ Y MYCOBACTERIUM MARINUM** EN PACIENTES HANSENIANOS

Enrique L. FLIESS *
Maria C. ORTIZ **
Juan CORN ***

RESUMEN — Se estudió la inmunidad mediada por células (IMC) frente a derivados proteicos purificados de **Mycobacterium leprae**, **Mycobacterium tuberculosis**, **Mycobacterium avium** y **Mycobacterium marinum**. Se efectuaron tests cutíneos de hipersensibilidad retardada e inhibición de la migración de leucocitos *in vitro* en 44 pacientes hansenianos (20 virchowianos quiescentes, 13 virchowianos reaccionales y 11 tuberculoides) y en 15 testigos sanos. Se observó una alteración de la inhibición de la migración de leucocitos y de la hipersensibilidad cutánea frente a **M. leprae** y **M. marinum** en los pacientes virchowianos, quiescentes y reaccionales. La respuesta de la IMC frente a todos los antígenos micobacterianos se encontró aumentada en los pacientes tuberculoides, y se observó una respuesta débil frente a **M. leprae** y **M. marinum** en los controles sanos. Los resultados obtenidos muestran una estrecha correlación entre la IMC frente a **M. leprae** y **M. marinum** en todos los casos, la cual podría expresar reactividad cruzada entre ambos antígenos.

Palabras clave: Inmunidad mediada por células. **Mycobacterium leprae**. **Mycobacterium marinum**.

1 INTRODUCCIÓN

La existencia de alteraciones de la inmunidad mediada por células (IMC) en la hanseniasis, las que son particularmente notables en los pacientes virchowianos (VV) y borderline-virchowianos (BV) viene siendo planteada desde las especulaciones iniciales de Fernández¹⁰ y Rotberg³² y ha sido confirmada por los más recientes estudios *in vitro* referidos a la IMC^{14, 15, 19, 20}

La naturaleza de este defecto ha recibido distintas interpretaciones. En un principio se postuló que se trataba de una depresión inespecífica y generalizada de la IMC^{1, 9, 31}.

Posteriormente, diversos estudios efectuados permitieron sostener que la alteración inmunológica básica en la hanseniasis virchowiana (y en las formas cercanas a ese polo) es específica para el *M. leprae*^{7, 11, 27, 30}, y que el grado de depresión inespecífica de la IMC observado en estos pacientes puede deberse

(*) Doctor en Ciencias Médicas. Jefe de Departamento de laboratorio, Sanatorio Nacional "Baldomero Sommer", General Rodríguez, Argentina. Coordinador Científico, CEFYC. Correspondencia: Dorronzoro 141, 6700 Luján (B) — República Argentina.

(**) Médica. Jefa de Departamento de Medicina, Sanatorio Nacional "Baldomero Sommer", General Rodríguez, Argentina.

(***) Médico. Sanatorio Nacional "Baldomero Sommer", General Rodríguez, Argentina.

a efectos secundarios de la enfermedad, pudiendo inclusive tener relación con la terapéutica suministrada^{3, 17}.

La existencia de similitudes antigénicas entre el *M. leprae* y otras micobacterias^{18, 22}, así como la dificultosa inoculación del *M. leprae* a animales de experimentación^{2, 23, 28} y la imposibilidad de cultivar el bacilo in vitro hasta el presente llevaron a diversos autores a experimentar con otras especies micobacterianas. Entre otras, han sido utilizadas para evaluar la respuesta inmune en pacientes hansenianos y animales de laboratorio, *M. vaccae*, *M. phlei*, *M. gordonae*, *M. delhii*, *M. kan-sasii*, *M. microti*, *M. ulcerans*, *M. marinum* y *M. avium*, investigándose sus características antigénicas, su comportamiento in vitro frente a inmunoglobulinas séricas de pacientes hansenianos y, por último la respuesta inmune mediada por células que provocan^{20, 21, 20, 32}.

Se acepta en general que *M. marinum* es entre las micobacterias capaces de producir patología en el hombre la que más afinidad presenta con *M. leprae*. Se trata de una micobacteria fotocromógena, cuya temperatura óptima de desarrollo esta entre 31 y 33° C, que al ser inoculada en animales produce lesiones en las regiones de menor temperatura corporal, principalmente en almohadilla plantar las cuales semejan las lesiones hansenianas típicas^{16, 36}.

En base a estos antecedentes se encaró el presente estudio, orientado a comparar la respuesta inmune mediada por células de pacientes hansenianos frente a derivados proteicos purificados de *M. leprae* y *M. marinum* tomando como referencia la respuesta frente a micobacterias de menor semejanza antigenica con el *M. leprae* como son *M. avium* y *M. tuberculosis*.

2 MATERIAL Y METODOS

Fueron estudiados 44 pacientes hansenianos en tratamiento en el Sanatorio Nacional "Baldomero Sommer" de General Rodríguez, República Argentina, clasificados clínica, inmunológica e histopatológicamente en 20 virchowianos quiescentes, 13 virchowianos en estado reaccional en el momento del estudio y 11 pacientes tuberculoideos. Como testigos fueron estudiados 15 individuos sanos no contactantes con pacientes hansenianos, sin antecedentes de infecciones micobacterianas. A los mismos se les efectuaron intradermorreacciones y el test in vitro de inhibición de la migración de leucocitos (IML).

2.1 Antígenos:

Se utilizaron derivados proteicos purificados (PPD) de *M. marinum*, *M. avium*. y *M. tuberculosis*, con una titulación de 5 UT, que fueron suministrados por el Centro Panamericano de Zoonosis (CEPANZO) y de *M. leprae* provenientes de higados de armadillos infectados, elaborado según la técnica de Dharmendra⁸. La suspensión de *M. leprae* utilizada provino del Center for Diseases Control (CDC) Atlanta, Georgia, USA.

2.2 Intradermorreacciones:

Se efectuaron aplicando 0.1 ml de cada antígeno en la cara ventral de ambos antebrazos, procediéndose a su lectura a las 72 hs. midiendo los diámetros mayor y menor de las reacciones y efectuando un promedio de los mismos.

2.3 Test de inhibición de la migración de leucocitos (IML):

Se utilizó la técnica directa de Bendixen & Sobvirg 4 modificada por Braun et al. 6. Se extrajeron 20 ml de sangre periférica por venopuntura y se dejaron sedimentar duran-

te 45 minutos a temperatura ambiente. El plasma rico en células fué centrifugado y lavado tres veces usando solución salina balanceada de Hanks (Difco Lab.) centrifugada a 800 rpm durante 10 minutos. Los leucocitos fueron re-suspendidos en medio de cultivo TC 199 (Difco Lab.) y cargados en capilares heparinados, que se colocaron en cámaras de Incite. Estas fueron llenadas con TC 199 conteniendo antibióticos (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 ng/ml). En cada caso se utilizaron dos cámaras de control sin adición de antígenos y dos cámaras para cada uno de los antígenos estudiados, que se agregaron en una proporción de 0.05 ml por cada cámara.

2.4 Índice de migración (IM):

Todas las cámaras fueron incubadas por 24 horas a 37° C. Las Areas de migración fueron medidas proyectándolas sobre papel y calculando su superficie por planimetría. El índice de migración fué calculado según la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Area media de migración con antígeno} \times 100}{\text{Area media de migración sin antígeno}} = \text{IM}$$

Indices de migración menores de 75% se consideraron positivos.

El análisis estadístico de los datos se efectuó aplicando el test de la varianza y calculando el coeficiente de correlación y regresión.

3 RESULTADOS

Los resultados se expresan en las tablas 1, 2, 3 y 4 y en la figura. El análisis de los mismos permite serialar la existencia de respuestas similares de los pacientes virchowianos quiescentes y reaccionales frente a *M. leprae* y *M. marinum* ($p > 0.3$) en las pruebas cutáneas, en tanto que hay diferencias algo más significativas comparando la respuesta cutánea al *M. leprae* con *M. tuberculosis* y *M. avium*

en ambos grupos de pacientes ($p = 0.02$). Es destacable la marcada diferencia existente entre los pacientes tuberculoideos y ambos grupos de virchowianos tanto frente al *M. leprae* como al *M. marinum* ($p < 0.001$) no observándose diferencias significativas frente a *M. tuberculosis* y *M. avium* ($p > 0.02$).

Si bien algunos estudios en modelos animales que intentaron producir inmunización frente a *M. leprae* administrando *M. marinum* por vías inmunogenicas no arrojaron resultados satisfactorios ³⁴, la profundización de investigaciones como la aquí descrita puede arrojar luz sobre los mecanismos inmunológicos involucrados en las infecciones micobacteriales.

La prueba in vitro de la IML arroja respuestas similares frente a las cuatro micobacterias estudiadas en los pacientes virchowianos quiescentes comparados con los reaccionales ($p > 0.2$), observándose en ambos grupos una alteración de la IML frente a *M. leprae* y *M. marinum* y respuestas más normales ante *M. tuberculosis* y *M. avium*. Existe una marcada diferencia entre VV y TT usando como antígeno *M. leprae* 6 *M. marinum* ($p < 0.001$) siendo escasamente significativa la diferencia entre estos grupos de pacientes frente a *M. tuberculosis* y *M. avium* ($p > 0.05$). Por último, tomando todos los casos como una población y estableciendo la curva de regresión en las respuestas frente a los distintos antígenos, se observa una estrecha correlación entre *M. leprae* y *M. marinum* ($r \pm 0.8$), no existiendo correlaciones apreciables de *M. leprae* con *M. tuberculosis* ($r -E 0.3$) 6 *M. avium* ($r = + 0.4$).

4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las experiencias discutidas sugieren una alte-

ración de la IMC en los pacientes VV, tanto quiescentes como reaccionales frente a *M. leprae* y *M. marinum*. Esta descripción este de acuerdo con lo descripto en la literatura acerca de las semejanzas existentes entre ambas micobacterias³⁶ y circunscribiría desde el punto de vista antigénico³⁶ el defecto inmunitario de estos pacientes, ya que frente a otras micobacterias la IMC parece ser adecuada. Esto coincide con lo referido anteriormente por uno de nosotros¹³ así como por otros autores^{5,20} El origen de este fenómeno es motivo de discusión. Se ha postu-

lado la existencia de un déficit en la capacidad de los macrófagos para procesar los determinantes antigénicos del *M. leprae*, que impediría su reconocimiento por los linfocitos T¹² Podería especularse que la similitud antigénica del *M. marinum* con el *M. leprae* determinaría una incapacidad macrofágica similar, pero tampoco debe descartarse una alteración de la función T supresora^{24, 28, 35} otros mecanismos tolerígenos²⁵ capaces de bloquear el reconocimiento de los antígenos de *M. marinum* y *M. leprae* por parte de los linfocitos T efectores.

TABLA 1 — Pruebas con *Mycobacterium leprae*

GRUPO	I.M.L.	INTRADERMORREACCIÓN
Virchowianos quiescentes n = 20	\bar{X} = 93% XM = 125% Xm = 84% ES = 0.99	\bar{X} = 0.74 mm XM = 4.26 mm Xm = 0.00 mm ES = 0.20
Virchowianos reaccionales n = 13	\bar{X} = 93% XM = 110% Xm = 78% ES = 2.60	\bar{X} = 0.52 mm XM = 3.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 0.24
Tuberculoides n = 11	\bar{X} = 52% XM = 63% Xm = 42% ES = 2.29	\bar{X} = 14.00 mm XM = 16.00 mm Xm = 11.00 mm ES = 0.48
Testigos sanos n = 15	\bar{X} = 83% XM = 115% Xm = 49% ES = 5.70	\bar{X} = 3.00 mm XM = 11.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.00

I.M.L. = Inhibición de la migración de leucocitos (expresada como índice de migración)

\bar{X} = Valor medio

XM = Valor máximo

Xm = Valor mínimo

ES = Error standard de la media

n = Número de casos

TABLA 2 — Pruebas con *Mycobacterium tuberculosis*

GRUPO	I.M.L.	INTRADERMORREACCIÓN
Virchowianos quiescentes n = 20	\bar{X} = 75% XM = 93% Xm = 45% ES = 0.99	\bar{X} = 4.26 mm XM = 17.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.27
Virchowianos reaccionales n = 13	\bar{X} = 69% XM = 95% Xm = 33% ES = 5.60	\bar{X} = 0.52 mm XM = 13.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.25
Tuberculoides n = 11	\bar{X} = 58% XM = 88% Xm = 45% ES = 3.36	\bar{X} = 11.00 mm XM = 20.00 mm Xm = 3.00 mm ES = 1.49
Testigos sanos n = 15	\bar{X} = 68% XM = 115% Xm = 49% ES = 5.40	\bar{X} = 6.00 mm XM = 11.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.20

I.M.L. = Inhibición de la migración de leucocitos (expresada como índice de migración)

\bar{X} = Valor medio

XM = Valor máximo

Xm = Valor mínimo

ES = Error standard de la media

n = Número de casos

TABLA 3 — Pruebas con *Mycobacterium avium*

GRUPO	I.M.L.	INTRADERMORREACCIÓN
Virchowianos quiescentes n = 20	\bar{X} = 67% XM = 101% Xm = 46% ES = 3.84	\bar{X} = 5.00 mm XM = 16.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.34
Virchowianos reaccionales n = 13	\bar{X} = 70% XM = 98% Xm = 34% ES = 6.50	\bar{X} = 6.69 mm XM = 16.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 0.99
Tuberculoides n = 11	\bar{X} = 60% XM = 99% Xm = 46% ES = 5.23	\bar{X} = 9.00 mm XM = 14.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.37
Testigos sanos n = 15	\bar{X} = 76% XM = 96% Xm = 51% ES = 4.00	\bar{X} = 5.00 mm XM = 10.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.10

I.M.L. = Inhibición de la migración de leucocitos (expresada como índice de migración)

\bar{X} = Valor medio

XM = Valor máximo

Xm = Valor mínimo

ES = Error standard de la media

n = Número de casos

TABLA 4 — Pruebas con *Mycobacterium marinum*

GRUPO	I.M.L.	INTRADERMORREACCIÓN
Virchowianos quiescentes n = 20	\bar{X} = 82% XM = 109% Xm = 60% ES = 3.28	\bar{X} = 3.00 mm XM = 13.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 0.90
Virchowianos reaccionales n = 13	\bar{X} = 80% XM = 101% Xm = 54% ES = 5.00	\bar{X} = 4.00 mm XM = 15.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.02
Tuberculoides n = 11	\bar{X} = 54% XM = 83% Xm = 41% ES = 3.64	\bar{X} = 13.00 mm XM = 16.00 mm Xm = 7.00 mm ES = 0.97
Testigos sanos n = 15	\bar{X} = 82% XM = 101% Xm = 51% ES = 6.10	\bar{X} = 3.00 mm XM = 11.00 mm Xm = 0.00 mm ES = 1.10

I.M.L. = Inhibición de la migración de leucocitos (expresada como índice de migración)

\bar{X} = Valor medio

XM = Valor máximo

Xm = Valor mínimo

ES = Error standard de la media

n = Número de casos

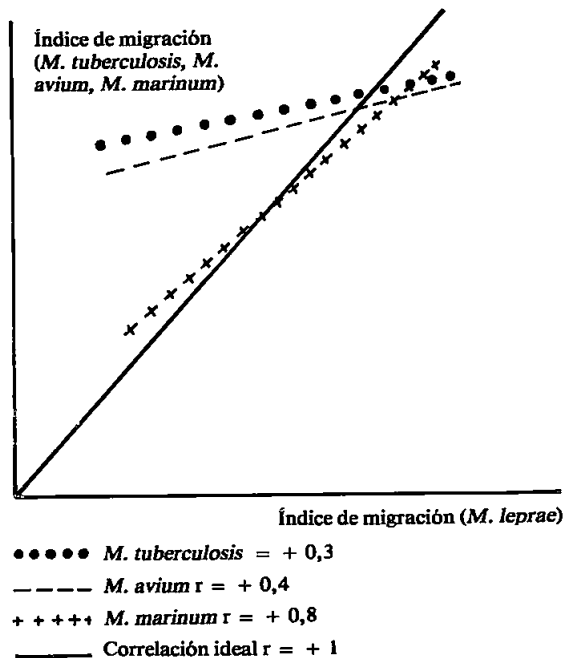


FIGURA — Correlación de la I.M.L. frente a *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium marinum*.

ABSTRACT — The cell mediated immunity (CMI) to protein purified derivatives of **Mycobacterium leprae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium and Mycobacterium marinum** was studied. **Leukocyte Migration Inhibition (LMI)** and Delayed Hypersensitivity skin reactions to these antigens were examined in 44 hanseniasis patients (20 quiescent Virchowians, 13 reactional Virchowians and 11 tuberculoid patients) and 15 healthy subjects. An impairment in **LMI and Delayed** Hypersensitivity tests to **M. leprae and M. maximum** was observed in Virchowians patients both quiescent and reactional. The CMI response to all mycobacterial antigens was increased in tuberculoid patients and was observed a poor response to **M. leprae and M. marinum** in healthy controls. Our results show a high correlation between the CMI response to **M. leprae** and to **M. marinum** ($r = + 0,8$). This close relationship between both antigens may express cross-reactivity.

Key words: Cell mediated immunity. Mycobacterium leprae. Mycobacterium marinum.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Isabel N. de Kantor por la provisión de PPD de **M. tuberculosis**,

M. marinum y **M. avium** y al Dr. Miguel de Herrera quién suministró la suspensión de **M. leprae (a)**.

REFERENCIAS

- 1 BALIA, L.M.; FLIESS, E.L.; BACH- MANN, A.E.; CARDAMA, J.E.; GATTI, J.C. Similar alterations of lymphoblastic differentiation in lepromatous leprosy patients and their healthy lepromin-negative consanguineous offspring. *Int. J. Lepr.*, 41(1): 7-13, 1973.
- 2 BALIA, L.M.; VALDEZ, R.P.; BIAN- CHI, O.; MENDIETA, S.; DIAZ, P.; GARCIA, N. Estudios y adaptación de *D. hybridus* y *Ch. villosus*. *Leprologia*, 21(2):14-17, 1979.
- 3 BEIGUELMAN, B. & PISANI, R.C.B. Effect of DDS on phytohemagglutinin-induced lymphocyte transforma- tion. *Int. J. Lepr.*, 42(4) :412-415, 1974.
- 4 BENDIXEN, G. & SOBORG, M. Com- ments on the leukocyte migration technique as in vitro method for de- monstrating cellular hypersensitivity in man. *J. Immunol.*, 104 (6):1551- -1552, 1970.
- 5 BJUNE, G. In vitro lymphocyte stimulation in leprosy; simultaneous stimulations with *Mycobacterium leprae* antigens and phytohemagglutinin. *Clin. Exp. Immunol.*, 37:479-487, 1979.
- 6 BRAUN, M.; SEN, L.; BACHMAN, A.E.; PAVLOVSKY, A. Cell migration inhibition in human lymphomas using lymph nodes and cell line antigens. *Blood*, 39:368-376, 1972.
- 7 CONVIT, J.; ARANZAZU, N.; PINAR- DI, M.; ULRICH, M. Immunological changes observed in indeterminate and lepromatous leprosy patients and Mitsuda negative contacts after the inoculation of a mixture of *Mycobacterium leprae* and BCG. *Clin. Exp. Immunol.*, 36(2) :214-220, 1979.
- 8 DHARMENDRA Immunological skin tests in leprosy; isolation of protein antigen of *Mycobacterium leprae*. *Indian J. Med. Res.*, 30:1-7, 1942.
- 9 DIERKS, R.E. & SHEPARD, C.C. Effect of phytohemagglutinin and various mycobacterial antigens on lymphocyte cultures from leprosy patients. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 127(2):391-395, 1968.
- 10 FERNANDEZ, J.M.M. The early reac- tion induced by lepromin. *Int. J. Lepr.*, 8(1):1-14, 1940.
- 11 FLIESS, EL. Inmunopatología de la lepra. *Tem. Lepr.*, 20(59):3-32, 1976.
- 12 FLIESS, E.L. Posible origen de la inmu- nodeficiencia en la hanseniasis vircho-

- 16 ELLESS, E.L. et al. Alteración de la inmunidad mediada por células frente a *Mycobacterium leprae* *Mycobacterium marium* en pacientes hansenianos wiana. *Hansen. Int.*, 3(2):141-150, 1978.
- 13 FLIESS, E.L. & BACHMANN, A.E. Alteración de la inmunidad mediada por células en enfermos de lepra. *Rev. Asoc. Argent. Microbiol.* 9(1):28-36, 1977.
- 14 FLIESS, E.L.; BACHMANN, A.E.; CA-ROSELLA, E.D. Exploración de la inmunidad mediada por células en pacientes de lepra. *Tem Lepr.*, 20 (60) :3-53, 1977.
- 15 FLIESS, E.L.; RUIBAL-ARES, B.; BRAUN, M. Serum factors affecting the cell migration inhibition response to lepromin. *Int. J. Lepr.*, 43(4): 320-326, 1975.
- 16 GARCIA SABATER, J.F.; AMADOR YSCLA, A.; PERALES OBENICH, J.A. Clasificación e identificación del género *Mycobacterium*. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 19(1):7-15, 1977.
- 17 GEEI, S.K.; SENGUPTA, U.; DESI-KAN, K.V. In vitro effect of DDS on phytohemagglutinin (PHA) — induced lymphocyte transformation. *Hansen. Int.*, 5(2): 112-118, 1980.
- 18 GOIHMAN-YAHR, M.; RAFFEL, S.; FERRARESI, R.W. Cross reactivities on lepromin. *ht. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 36:450-454, 1969.
- 19 GODAL, T. Immunological aspects of leprosy. Present status. *Prog. Allergy*, 25:211-242, 1978.
- 20 GODAL, T.; MYRVANG, B.; STAN-FORD, J.L.; SAMUEL, D.R. Recent advances in the immunology of leprosy with special reference to new approaches in immunoprophylaxis. *Bull. Inst. Pasteur*, 72(3) :273-310, 1974.
- 21 GOVIL, D.C. & BHUTANI, L.K. Delayed hypersensitivity skin reactions to lepromin and antigens prepared from four other mycobacteria. *Lepr.* 50(4):550-554, 1978.
- 22 HANKS, J.H. & FERNANDEZ, J.M.M. Enhancement of resistance to murine leprosy by BCG plus specific antigen. *Int. J. Lepr.*, 24(1) :65-73, 1956.
- 23 KIRCHHEIMER, W.F. & STORRS, E.E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr.*, 39(3) :693-702, 1971.
- 24 MEHRA, V.; MASON, L.H.; ROTHMAN, W.; REINHERZ, E.; SCHLOSSMAN, S.F.; BLOOM, B.R. Delineation of a human T cell subset responsible for lepromin-induced suppression in leprosy patients. *J. Immunol.*, 125(3) :1183-1188, 1980.
- 25 MORINI, J.C. & CORONA, C. Lepra y tolerancia inmunológica. *Leprologia*, 21(2) :71-75, 1979.
- 26 MUSTAFA, A.S. & TALWAR, G.P. Five cultivable mycobacterial strains giving transformation and leukocyte migration inhibition of leukocytes analogous to *Mycobacterium leprae*. *Lepr. India.*, 50(4) :498-508, 1978.
- 27 MYRVANG, B.; GODAL, T.; RIDLEY, D.S.; FROLAND, S.S.; SONG, Y.K. Immune responsiveness to *Mycobacterium leprae* and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 14:541-553, 1973.
- 28 NATH, I. & SINGE, R. The suppressive effect of *M. leprae* on the in vitro proliferative responses of lymphocytes from patients with leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 41:406-414, 1980.
- 29 OPROMOLLA, D.V.A.; ARRUDA, O.S.; FLEURY, R.N. Manutenção de tatus em cativeiro e resultados de inoculação do *Mycobacterium leprae*. *Hansen. Int.*, 5(1):28-36, 1980.
- 30 REA, T.H. & LEVAN, N.E. Current concepts in the immunology of leprosy. *Arch. Dom.*, 113(3) :345-352, 1977.
- 31 RODRIGUEZ PARADISI, E.; BONAPARTE, Y.P.; MORGENFELD, M.G. Cultivo de linfocitos en enfermos con lepra lepromatosa. *Leprologia*, 12(2):61-63, 1967.
- 32 ROTBERG, A. Some aspects of immunity in leprosy and their importance in epidemiology, pathogenesis and classification of forms of the disease. Based on 1529 lepromin-tested cases. *Rev. Bras. Leprol.*, 5(n. esp.) :45-97, 1937.
- 33 SHARMA, R.C. & SINGE, R. Comparative study of skin reactions in leprosy patients to *M. leprae* - lepromin and to

- antigens from cultivable saprophytic mycobacteria. *Lepr. India*, 50 (4): 572-578, 1978.
- 34 SHEPARD, C.C.; VAN LANDINGHAM, R.; WALKER, L.L. Immunity to *Mycobacterium leprae* infections in mice stimulated by *M. leprae*, BCG, and graft-versus-host reactions. *Infect. Immun.*, 14(4):919-928, 1976.
- 35 STONER, G.L.; TOUW, J.; ATLAW, T.; BELEHU, A. Antigen-specific suppressor cells in subclinical leprosy infection. *Lancet*, 2(8260/61):1372- -1377, 1981.
- 36 WOLINSKY, E. Non-tuberculous mycobacteria and associated diseases. *Amer. Rev. Resp. Dig.*, 119 (1) : 107-159, 1979.