

## EDITORIAL

## Sorologia PGL-I na hanseníase

Samira Bühner-Sékula

*Mycobacterium leprae* é o agente causal da hanseníase, uma doença que, apesar da existência de uma cura efetiva com poliquimioterapia (PQT), deixa milhões de pacientes curados com seqüelas como conseqüência de danos neurais que são a marca da hanseníase.

Muitos aspectos dificultam o diagnóstico correto e precoce da hanseníase, bem como a classificação mais apropriada para fins terapêuticos: (i) muitas vezes, exames bacteriológicos não são realizados; (ii) há uma tendência em supra-diagnosticar a hanseníase paucibacilar (PB) com lesão única; e (iii) casos iniciais da forma borderline lepromatosa freqüentemente passam despercebidos devido à ausência de perda de sensibilidade e lesões cutâneas. Aproximadamente 70% dos casos de hanseníase podem ser diagnosticados somente com base no sinal clínico de lesões de pele com perda sensitiva, mas 30% de pacientes, inclusive muitos pacientes multibacilares (MB), não têm esse sintoma<sup>16</sup>. A demora na detecção desse último grupo pode ser a causa principal da transmissão perpetuada.

A maioria das micobactérias tem glicolipídeos específicos e altamente antigênicos que podem servir como ferramentas para o sorodiagnóstico de diferentes infecções. À medida que a micobactéria entra no corpo humano, a parede celular é o primeiro ponto de encontro com o sistema imune. A parede celular do *Mycobacterium leprae* consiste principalmente de lipídeos, inclusive uma fração considerável de glicolipídeos com composição única de carboidratos.

Um dos primeiros antígenos específicos do *Mycobacterium leprae* a ser isolado e caracterizado foi o glicolipídeo fenólico-I (PGL-I)<sup>1</sup>, o principal glicolipídeo antigênico do bacilo. A molécula PGL-I é composta por um trissacarídeo único, o 3,6-di-O-metila-β-D-glicopiranosil-(1→4)-2,3-di-O-metila-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-3-O-metila-α-L-ramnopiranosil<sup>12</sup>. O principal determinante antigênico de PGL-I é a última parte di- e trissacarídeo da molécula<sup>2</sup>. Anticorpos monoclonais foram utilizados para analisar o determinante antigênico de PGL-I em mais profundidade. Foi mostrado que a remoção do resíduo de açúcar terminal resultou na perda de ligação entre a maioria de anticorpos, enquanto a remoção de ácidos graxos de cadeia longa da molécula não fez efeito na ligação de anticorpos<sup>17</sup>. Esse e outros resultados sugeriram que a síntese química do último dissacarídeo criaria um epítipo antigênico específico o suficiente para ser aplicado na sorologia da hanseníase. O açúcar do PGL-I foi sintetizado e conjugado à albumina de soro bovino (BSA) diretamente ou por meio de diferentes ligantes, especificamente radicais octil (O) ou fenol (P). Mais recentemente foi conjugado à albumina de soro humano.

Desde a identificação do PGL-I, os seguintes neoglicolipídeos foram produzidos: monossacarídeo-octil-BSA (M-O-BSA), dissacarídeo-BSA (D-BSA)<sup>10</sup>, dissacarídeo natural-octil-BSA (ND-O-BSA)<sup>7</sup>, trissacarídeo natural-fenol-BSA (NT-P-BSA)<sup>8</sup> e o dissacarídeo natural-octil-HSA (ND-O-HSA)<sup>7</sup>.

Com base no PGL-I nativo e seus derivados semi-sintéticos, vários ensaios sorológicos foram desenvolvidos para detectar a presença de anticorpos das classes de imunoglobulinas IgM, IgG e IgA. Os antígenos semi-sintéticos podiam ser produzidos em maior quantidade e aplicados mais facilmente do que o PGL-I nativo, e várias aplicações, de diagnóstico clínico a estudos epidemiológicos em escala maior, se tornaram mais viáveis.

As técnicas usadas para desenvolver os testes incluem o *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)<sup>3</sup>, o teste de hemaglutinação passiva (PHA)<sup>15</sup>, o teste de aglutinação com partícula de gelatina (MLPA)<sup>13</sup>, *dipstick*<sup>5</sup> e o teste de fluxo lateral<sup>6</sup>. Vários estudos publicados recentemente usaram as técnicas de ELISA, *dipsticks* e fluxo lateral. A dúvida que fica é: Qual é a técnica mais apropriada para um estudo específico? Quais são as vantagens e limitações associadas a cada técnica?

## Vantagens e limitações das técnicas

## ELISA

É uma técnica *in-house* bem estabelecida<sup>10</sup>. Apesar do fato de ser difícil padronizar, o baixo custo do ELISA e resultados quantitativos fazem com que seja um teste único. Para estudos epidemiológicos de grande escala e acompanhamento dos pacientes, o ELISA é preferível.

As vantagens de ELISA são (i) a ampla disponibilidade dos equipamentos necessários visto que a técnica é quase universalmente aplicável; (ii) a fácil separação das fases sólido e líquido, e (iii) o fato que não é preciso marcar os componentes específicos do *Mycobacterium leprae* utilizados no teste (antígeno ou anticorpo). Mesmo assim, o ELISA é uma técnica laboriosa e limitações existem devido às diferenças no preparo do antígenos, concentração do antígeno, soluções tamponadas, procedimentos de lavagem, diluição de soro e tipo de substrato usado na técnica.

O ELISA para derivados de PGL-I envolve a imobilização da proteína da molécula (BSA ou HSA) a uma superfície plástica por meio de interações passivas. A capacidade da superfície plástica de interagir com as proteínas é um aspecto essencial. Porém, a ligação não específica de outras proteínas ou biomoléculas a espaços desocupados na superfície durante a realização do

ensaio pode ser prejudicial à especificidade e sensibilidade dos resultados. Portanto, bloqueamento é essencial. O uso de poços revestidos de BSA ou HSA sem o açúcar conjugado é crucial para possibilitar a correção de qualquer ligação não específica que possa ocorrer. De forma semelhante, deve ser corrigido para ligação não específica a poços não revestidos (mas tratados com os mesmos buffers) quando usando PGL-I nativo.

A proporção de moléculas de açúcar por proteína (BSA ou HSA) vai variar no preparo de todo antígeno. Portanto, é importante relatar a razão açúcar:proteína do antígeno para facilitar a comparação entre estudos.

Para maximizar a precisão e sensibilidade do ensaio, a remoção completa de frações soltas ou não ligadas é necessária. Além disso, a variação diária no desempenho do ensaio vai influenciar os resultados e está ligada principalmente à reação enzima-substrato. Vários requisitos, tais como condições de sincronia e desenvolvimento, precisam ser otimizados para levar a um ensaio preciso, correto e replicável. Dado que as reações enzima-substrato são cinéticas, o tempo decorrido do início ao fim da reação, bem como a temperatura, poderão afetar a concentração final do produto desenvolvido. Para obter um resultado comparável, é necessário incluir um soro controle interno no ensaio e parar a reação quando o soro interno alcançar certo valor de densidade óptica (OD). Soros controle positivo e negativo também devem estar presentes para a validação dos resultados do ensaio.

### Dipstick

O ensaio 'dipstick' (MLDipstick)<sup>4</sup> é um teste imunocromatográfico composto por uma linha de antígeno PGL-I fixa a uma tira de nitrocelulose fixada em um suporte plástico. Para obter um controle interno, anticorpos anti-IgM humana são impregnados em uma linha separada na fita de nitrocelulose. O reagente de detecção é um anticorpo monoclonal anti-IgM humano conjugado ao corante coloidal vermelho palanil e liofilizado para preservação<sup>11</sup>. As diluições de soro (1:50) são feitas diretamente no reagente de detecção reconstituído em tubos para reação e os dipsticks ficam incubados durante 3 horas em temperatura ambiente.

As vantagens da técnica de dipstick são: (i) não há necessidade de refrigeração ou equipamento; (ii) o protocolo fácil, e (iii) o fato que não é preciso rotular os componentes específicos do *M.leprae* utilizados no teste (antígeno ou anticorpo). Mesmo assim, a técnica dipstick inclui a diluição de soro, procedimento de lavagem e 3 horas de incubação.

Sendo que o teste não está disponível comercialmente, é improvável que um pesquisador pense em utilizar essa técnica. Porém, dipstick pode ser a técnica escolhida no planejamento de um estudo epidemiológico em escala maior no qual o desempenho de vários antígenos novos poderiam ser testados e comparados ao PGL-I em uma mesma população de estudo (Figura 1). A utilização dessa técnica teria um custo-benefício razoável mesmo considerando o desenvolvimento de tal teste.

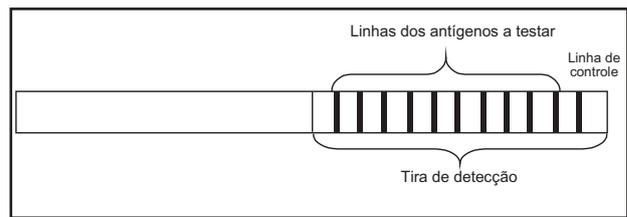


FIGURA 1

Desenho do teste dipstick para vários antígenos.

### Fluxo lateral

O teste rápido de fluxo lateral para *Mycobacterium leprae* (ML Flow)<sup>6</sup> é um teste imunocromatográfico composto por uma tira de nitrocelulose com um reagente de detecção feito de fibra de lã com anticorpo IgM anti-humano marcado com ouro coloidal seco de um lado, e uma tira de absorção no outro (Figura 2). Na linha do teste, um antígeno semi-sintético ligado ao BSA é usado como o antígeno. O anticorpo IgM humano é colocado como o segunda linha paralela à linha de antígeno para servir como o controle reagente. Realiza-se o teste adicionando 5µl de soro ou 10µl sangue total no receptáculo, seguido por 130µl da solução tampão. A leitura é feita após 10 minutos quando realizado com soro ou 5 minutos no caso de sangue total.

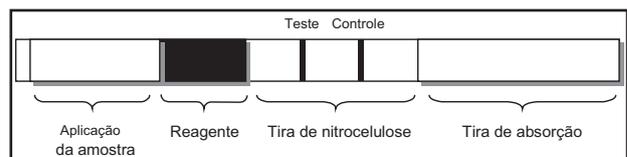


FIGURA 2

Desenho do teste de fluxo lateral.

Foi desenvolvido outro teste imunocromatográfico (ICA) (Dr. Ray Cho comunicação pessoal), produzido por *Standard Diagnostics Inc*, Suweon, Coréia do Sul, que usa dois antígenos neoglicoconjugados, ND-O-BSA e ND-O-HSA. Um dos antígenos neoglicoconjugados é conjugado com partículas de ouro e o outro é fixado na membrana. O fabricante sugere uma diluição de soro de 1:5 e a leitura dos resultados em até 10 minutos.

### Aplicabilidade da sorologia

A detecção de anticorpos IgM anti-PGL-I não pode ser utilizada como um teste de diagnóstico, mas pode ser utilizado no processo diagnóstico quando os resultados sorológicos são considerados junto com outros dados clínicos e diagnósticos. A detecção de anticorpos é particularmente útil no diagnóstico de hanseníase multibacilar; o nível de anticorpos em pacientes paucibacilares pode ser muito baixo ou indetectável.

Durante o tratamento de pacientes MB, a repetição do teste de ELISA pode ser uma ferramenta adicional para medir a eficácia do tratamento. Ainda não há clareza se a sorologia poderá ser usada para diagnosticar ou prever as reações hanseníacas<sup>14</sup>. Mesmo porque, os níveis ascendentes de anticorpos podem indicar um caso de recidiva. Portanto, os resultados sorológicos devem ser interpretados sempre em conjunto com outras informações diagnósticas.

Claramente, os anticorpos contra o PGL-I refletem a carga bacilar do indivíduo, mostrando infecção subclínica ou doença. Triagem sorológica e seguimento de contatos domiciliares de pacientes de hanseníase são instrumentos úteis para a detecção precoce de casos novos. Além disso, talvez a sorologia possa ser de benefício na mensuração do tamanho da epidemia hanseniana em uma dada população, mas este papel não está ainda bem definido.

Nesta edição são apresentados resultados de estudos realizados no Brasil. O primeiro, uma revisão sistemática de Moura *cols* analisa e relaciona as publicações que apresentaram evidências de como a sorologia da hanseníase pode ser utilizada. Na seqüência Castorina-Silva *cols* confirmam os resultados de especificidade do antígeno PGL-I. A correlação entre sorologia e baciloscopia é estudada por Lyon *cols*.

São vários os estudos que discutem a utilização da sorologia como ferramenta para auxiliar no diagnóstico e classificação dos pacientes e como esta utilização pode beneficiar os serviços de controle da hanseníase. Oliveira *cols* através da apresentação de casos MB de difícil diagnóstico ensina como podemos utilizar os resultados da sorologia PGL-I como ferramenta auxiliar no diagnóstico, mostrando que não devemos utilizar a sorologia como um teste de diagnóstico *per se*. Grossi *cols* apresentam evidências sobre a influência do uso do teste ML Flow na queda do número de casos MB no estado de Minas Gerais e em outro artigo comprova que o número de nervos acometidos não é importante na classificação de pacientes como MB. Barreto *cols* discute casos dimorfos que apresentam até cinco lesões cutâneas, portanto classificados como PB, mas que apresentam biópsia com presença de bacilos e sorologia positiva.

Teixeira *cols* apresentam um completo estudo de concordância entre exames clínicos e laboratoriais para o diagnóstico de hanseníase sugerindo que a sorologia deva ser incluída na classificação dos pacientes para tratamento a fim de minimizar o risco de incapacidades.

A aplicação da sorologia na reação hanseniana é explorada por Brito *cols*. Os resultados deste estudo pareado demonstram ser importante o seguimento pós alta dos pacientes que apresentaram reações durante o tratamento e que permanecem com a sorologia positiva na alta.

Os estudos de contatos mostram a importância da continuidade destes estudos. Andrade *cols* apresentam resultados da soroprevalência em contatos de pacientes de hanseníase e Alves Ferreira *cols* discutem os fatores associados à soroprevalência em pacientes e contatos abaixo de 18 anos de idade.

Deps *cols* estuda a soropositividade em tatus selvagens do Brasil.

Os dois estudos de população apresentados foram realizados com escolares. Ferreira *cols* apresentam um estudo de busca ativa de casos de hanseníase apresentando a situação epidemiológica, incluindo a taxa de soropositividade nos 68 casos diagnosticados entre os 16.623 escolares examinados. O estudo realizado por Bührer *cols* incluiu 7073 crianças e mostra que existe uma diferença significativa na soropositividade entre escolas particulares e escolas públicas comprovando que as condições sócio-econômicas são fatores determinantes para a infecção subclínica, fato já observado na transmissão da hanseníase onde

se observa que a maioria dos casos ocorre em famílias de classes sociais menos favorecidas.

## REFERÊNCIAS

- Brennan PJ, Barrow WW. Evidence for species-specific lipid antigens in *Mycobacterium leprae*. International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases 48: 382-387, 1980.
- Brett SJ, Payne SN, Draper P, Gigg R. Analysis of the major antigenic determinants of the characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. Clinical and Experimental Immunology 56: 89-96, 1984.
- Brett SJ, Payne SN, Gigg J, Burgess P, Gigg R. Use of synthetic glycoconjugates containing the *Mycobacterium leprae* specific and immunodominant epitope of phenolic glycolipid I in the serology of leprosy. Clinical and Experimental Immunology 64: 476-483, 1986.
- Bührer SS, Smits HL, Gussenhoven GC, van Ingen CW, Klatser PR. A simple dipstick assay for the detection of antibodies to phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 58: 133-136, 1998.
- Bührer-Sekula S, Hamerlinck FF, Out TA, Bordewijk LG, Klatser PR. Simple dipstick assay for semi-quantitative detection of neopterin in sera. Journal of Immunological Methods 238: 55-58, 2000.
- Bührer-Sekula S, Smits HL, Gussenhoven GC, van Leeuwen J, Amador S, Fujiwara T, Klatser PR, Oskam L. Simple and fast lateral flow test for classification of leprosy patients and identification of contacts with high risk of developing leprosy. Journal Clinical of Microbiology 41: 1991-1995, 2003.
- Chatterjee D, Cho SN, Brennan PJ, Aspinall GO. Chemical synthesis and seroreactivity of O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----9)-oxynonanoyl-bovine serum albumin--the leprosy-specific, natural disaccharide-octyl-neoglycoprotein. Carbohydrate Research 156 39-56, 1986.
- Fujiwara T, Aspinall GO, Hunter SW, Brennan PJ. Chemical synthesis of the trisaccharide unit of the species-specific phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae*. Carbohydrate Research 163: 41-52, 1987.
- Fujiwara T, Hunter SW, Cho SN, Aspinall GO, Brennan PJ. Chemical synthesis and serology of disaccharides and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from the leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. Infection and Immunity 43: 245-252, 1984.
- Gigg, J, Gigg R, Payne S, Conant R. The allyl group for protection in carbohydrate chemistry. 17. Synthesis of propyl O-(3,6-di-O-methyl-beta-D-glucopyranosyl)-(1----4)-O-(2,3-di-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranosyl)-(1----2)-3-O-methyl-alpha-L-rhamnopyranoside: the oligosaccharide portion of the major serologically active glycolipid from *Mycobacterium leprae*. Chemistry and Physics of Lipids 38: 299-307, 1985.
- Gussenhoven GC, van der Hoorn MA, Goris MG, Terpstra WJ, Hartskeerl RA, Mol BW, van Ingen CW, Smits HL. LEPTO dipstick, a dipstick assay for detection of Leptospira-specific immunoglobulin M antibodies in human sera. Journal Clinical of Microbiology 35: 92-97, 1997.
- Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. Journal of Biological Chemistry 257: 15072-15078, 1982.
- Izumi S, Fujiwara T, Ikeda M, Nishimura Y, Sugiyama K, Kawatsu K. Novel gelatin particle agglutination test for serodiagnosis of leprosy in the field. Journal Clinical of Microbiology 28: 525-529, 1990.
- Oskam L, Slim E, Bührer-Sekula S. Serology: recent developments, strengths, limitations and prospects: a state of the art overview. Leprosy Review 74:196-205, 2003.
- Petchclai B, Khupulsup K, Hiranras S, Sampatavanich S, Sampoonachot P, Leelarusamee A. A passive hemagglutination test for leprosy using a synthetic disaccharide antigen. International Journal of Leprosy and Other Mycobacteriology Diseases 56: 255-258, 1988.
- Saunderson P, Groenen G. Which physical signs help most in the diagnosis of leprosy? A proposal based on experience in the AMFES project, ALERT, Ethiopia. Leprosy Review 71: 34-42, 2000.
- Young DB, Dissanayake S, Miller RA, Khanolkar SR, Buchanan TM. Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species-specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. Journal of Infectious Diseases 149: 870-873, 1984.