

SOROLOGIA IGM ANTI-DISSACARÍDEO SINTÉTICO COM OCTIL LIGADO À ALBUMINA DO SORO HUMANO

IGM SEROLOGY AGAINST OCTYL-LINKED SYNTHETIC DISACCHARIDE IN HUMAN SERUM ALBUMIN

Kaio Klaywer Sousa da Silva^I, Eriça Ribeiro Gomes Lima^{II}, Guilherme Graziany Camelo de Carvalho^{III},
Iraciane Rodrigues Nascimento Oliveira^{IV}, Karine Keila de Sousa Vieira Sampaio^V, Michelli Erica Souza Ferreira^{VI*}

Resumo. A sorologia anti-PGL-I (Glicolípido fenólico-I) é um exame laboratorial complementar ao diagnóstico de hanseníase utilizado em pesquisas e detecta a presença da imunoglobulina do tipo IgM específica para o glicolípido encontrado na superfície do *M. leprae*. Para sua aplicação é importante entender os procedimentos envolvidos no desenvolvimento da técnica. O objetivo deste trabalho foi descrever a fundamentação teórica e a prática da sorologia IgM anti ND-O-HSA, relatar a comparação de imunoensaios e os principais achados referentes ao uso do antígeno. Foi realizada uma revisão bibliográfica abrangendo artigos científicos publicados no período de 2011 a 2023. As buscas foram conduzidas nas bases de dados PubMed e Scielo, utilizando descritores em línguas portuguesa e inglesa, relacionados à Hanseníase e à sorologia anti-PGL-I. Os 22 artigos selecionados neste estudo fornecem uma visão abrangente sobre o antígeno PGL-I, sua interação com células hospedeiras e a estrutura do dissacarídeo sintético ND-O-HSA. Na discussão dos procedimentos adotados nos ensaios apresentados, foram identificadas disparidades no desenvolvimento de algumas etapas e nas soluções utilizadas. Adicionalmente, as finalidades de cada investigação, ao empregar o imunoensaio, foram delineadas, junto com as respectivas conclusões sobre o uso do antígeno sintético. Ao utilizar o antígeno ND-O-HSA, a sorologia IgM anti-PGL-I é uma ferramenta importante no diagnóstico e no monitoramento da Hanseníase, pois oferece uma alternativa sensível e específica. No entanto, há variações nos procedimentos entre os estudos revisados, indicando a necessidade de padronização e o aprofundamento das investigações nessa área.

Palavras-chave: Hanseníase; Imunoensaio; ND-O-HSA; Glicolípido fenólico-I.

Abstract. Anti-PGL-I (Phenolic Glycolipid-I) serology is a complementary laboratory test for the diagnosis of leprosy used in research. It detects the presence of IgM immunoglobulin specific for the glycolipid found on the surface of *M. leprae*. For its application, it is important to understand the procedures involved in developing the technique. The aim of this study was to describe the theoretical basis and practice of IgM anti ND-O-HSA serology; to report on the comparison of immunoassays and the main findings regarding the use of the antigen. A bibliographic review was carried out, covering scientific articles published between 2011 and 2023. The searches were conducted in the PubMed and Scielo databases, using descriptors in Portuguese and English related to leprosy and anti-PGL-I serology. The 22 articles selected in this study provide a comprehensive overview of the PGL-I antigen, its interaction with host cells and the structure of the synthetic disaccharide ND-O-HSA. In the discussion of the procedures adopted in the tests presented, disparities were identified in the development of some steps and in the solutions used. In addition, the purposes of each investigation, when using the immunoassay, were outlined, together with the respective conclusions on the use of the synthetic antigen. By using the ND-O-HSA antigen, IgM anti-PGL-I serology is an important tool in the diagnosis and monitoring of leprosy, as it offers a sensitive and specific alternative. However, there are variations in the procedures between the studies reviewed, indicating the need for standardization and further research in this area.

Keywords: Leprosy; Immunoassay; ND-O-HSA; Phenolic glycolipid-I.

^IGraduando em Medicina, Universidade Federal do Maranhão, Imperatriz, MA, Brasil, <https://orcid.org/0000-0002-7275-1896>

^{II}Doutora em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pela Universidade Federal do Pará-UFPA, Técnica do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão-UFMA Imperatriz, MA, Brasil, <https://orcid.org/0009-0006-2055-0183>,

^{III}Doutor em Farmacologia pela Universidade Federal do Ceará-UFC, Docente do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão-UFMA Imperatriz, MA, Brasil, <https://orcid.org/0000-0003-3994-9902>

^{IV}Doutorado em Doenças Tropicais pela Universidade Federal do Pará -UFPA, Técnica do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão-UFMA Imperatriz, MA, Brasil, <https://orcid.org/0000-0001-6535-5396>

^VResidência Médica em Dermatologia pela Universidade Federal do Pará-UFPA, Docente do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão-UFMA Imperatriz, MA, Brasil, <https://orcid.org/0000-0002-8041-8081>

^{VI*}Doutora em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários pela Universidade Federal do Pará-UFPA, Docente do Curso de Medicina da Universidade Federal do Maranhão-UFMA Imperatriz, MA, Brasil, michelli.ferreira@ufma.br (autor principal) <https://orcid.org/0000-0002-3073-3518>,

INTRODUÇÃO

A Hanseníase é uma doença infectocontagiosa de acometimento crônico que atinge principalmente populações em situação de vulnerabilidade socioeconômica, porém, em áreas endêmicas, pode atingir vários grupos sociais. Seu agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*, com predileção por nervos periféricos e pele, que se caracteriza por apresentar evolução lenta, manifestando sinais e sintomas em até cinco anos após o contato com o doente, embora haja relatos que indiquem casos com período de incubação de até 20 anos ou mais. Dentre os sintomas mais comuns, incluem manchas avermelhadas ou esbranquiçadas, geralmente no dorso; diminuição ou ausência de sensibilidade na pele, edemas, pápulas, tubérculos e nódulos nos membros inferiores, podendo evoluir para incapacidade física e deformidades permanentes, na ausência de tratamento. Essas características fazem da infecção pelo *M. leprae* um grave problema de saúde pública.^{1,2}

O diagnóstico desta doença baseia-se na avaliação clínica e na epidemiologia, auxiliadas por exames laboratoriais, como a baciloscopia, o que, para fins de tratamento, é classificada operacionalmente como paucibacilar (PB) ou multibacilar (MB), de acordo com o número de lesões e de achado baciloscópico. Além disso, para auxiliar na identificação dos sinais e sintomas desenvolvidos pela Hanseníase e monitorar os pacientes com maior risco de reação inflamatória e neural, seguimos a seguinte classificação, de acordo com a forma clínica: Indeterminada, Tuberculóide, Dimorfa e Virchowiana. Internacionalmente, adota-se a classificação de Ridley e Jopling, a qual se baseia em aspectos histopatológicos das lesões e índice baciloscópico, permitindo a divisão mais detalhada das formas clínicas em “tuberculóide” (TT), “bordeline tuberculóide” (BT), “bordeline-bordeline” (BB), “bordeline lepromatosa (BL)” e “lepromatosa” (LL).¹

A baciloscopia direta para bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) é o método de coloração utilizado para identificação da carga bacilar em raspado intradérmico de lesões cutâneas e em sítios padronizados, como lóbulos auriculares e cotovelos, no entanto, apesar de sua especificidade, esse método apresenta baixa sensibilidade, resultando em falsos-negativos nos casos paucibacilares.¹ Para a adequada aplicação do método, se fazem necessárias as habilidades do responsável pela coleta, de quem irá executar a coloração do esfregaço, bem como do responsável pela leitura da lâmina.

Outro exame de apoio ao diagnóstico é a sorologia ou imunoenensaio enzimático (ELISA, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) anti-PGL-I (Glicolípido fenólico-I), que detecta a presença da imunoglobulina do tipo IgM específica para o antígeno PGL-I da superfície do *M. leprae*¹, esse glicolípido possui elevada imunogenicidade.³ Além do PGL-I nativo ou trissacarídeo nativo fenólico, pesquisas têm utilizado antígenos sintéticos na forma de dissacarídeo como o ND-O-HSA, ligado à albumina sérica humana através do octil, ou o ND-O-BSA, à albumina sérica bovina, ambos apresentam elevada reatividade contra a IgM produzida na Hanseníase.^{4,5,6,7}

O ELISA ou também chamado de ensaio de imunoabsorção enzimática é um método que envolve várias etapas, incluindo sensibilização, lavagens, bloqueio, adição de conjugado e substrato, parada de reação e leitura da amostra. Para o desenvolvimento dessa, são preparadas diferentes soluções.^{4,6,8}

Portanto, compreender a importância do antígeno usado na sorologia, sua função e a aplicação de cada reagente no imunoenensaio são informações cruciais para o desenvolvimento adequado do método proposto. Neste contexto, o objetivo desta revisão é fornecer uma descrição teórica e prática da sorologia IgM anti-PGL-I usando o ND-O-HSA, ao comparar diferentes imunoenseaios e relatando achados relacionados ao uso desse antígeno, com o intuito de estimular mais pesquisas na área da sorologia aplicada ao conhecimento da ação do *M. leprae* no organismo humano.

METODOLOGIA

Trata-se de uma revisão narrativa, fundamentada no uso de referências científicas para embasar teoricamente o tema proposto. Com a finalidade de obter referências nacionais e internacionais, realizamos buscas

de artigos nas bases de dados Scielo e PubMed, dos anos de 2011 a 2024, através dos seguintes descritores na língua portuguesa: “PGL-I hanseníase”, “ND-O-HSA hanseníase”, “anticorpo anti-PGL-I”, “PGL-I patogênese”, e em língua inglesa: “PGL-I leprosy”, “ND-O-HSA leprosy”, “antibody anti-PGL-I”, “PGL-I pathogenesis”.

Foram incluídos os artigos que descreveram as etapas sorologia anti-PGL-I, utilizando o antígeno ND-O-HSA, bem como aqueles com relevância científica e contribuições para melhor fundamentação do imunoenensaio enzimático, do antígeno nativo ou sintético, e para compreensão da interação celular do antígeno com o alvo celular. Artigos que não relataram os procedimentos metodológicos e apenas citaram a referência do imunoenensaio foram excluídos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 564 artigos encontrados, foram selecionados 22 artigos com base nos critérios supracitados. A seguir apresentamos os achados e discussões em tópicos para o melhor entendimento do referido imunoenensaio.

Mycobacterium leprae: localização, estrutura do glicolípido fenólico I (GLP-I) e características do antígeno sintético ND-O-HSA

Mycobacterium leprae apresenta-se sob a forma de bacilo reto ou levemente encurvado, com extremidades arredondadas, medindo aproximadamente de 1 a 8 microns de comprimento e 0,2 a 0,5 microns de diâmetro. É diferente de outras micobactérias em termos de arranjo, pois está disposto em cadeias paralelas unidas entre si, formando aglomerados ou globais.⁹ Uma das características marcantes do bacilo é a de não se reproduzir em meios de cultura artificiais ou celulares e sua multiplicação tem se limitado a inoculações em alguns modelos animais como tatu e camundongos imunocompetentes ou imunodeficientes.¹⁰

A micobactéria se cora em rósea-avermelhado ao ser submetida ao método de Ziehl-Neelsen. Essa coloração é característica das bactérias gram-negativa, pois possuem parede celular com uma fina camada de peptidoglicano, tornando-as incapazes de reter o corante violeta após tratamento com álcool, solução etanol-acetona e safranina como contracorante.¹¹

A parede celular do *M. leprae* possui cerca de 20 nm de espessura e como em outras espécies de micobactérias é composta por duas membranas: uma mais externa elétron-transparente também chamada de cápsula e outra mais interna elétron-densa.^{9,12}

Externamente contém uma cápsula de lipídios associados aos seguintes componentes: ftiocerol dimicocerosil (PDMI), quimicamente distinto daqueles encontrados em outras espécies de micobactérias e dos glicolípídios fenólicos (PGLs), sendo o subtipo I (PGL-I) predominante, além de pequenas quantidades de monomicolato de trealose (TMM) e ácidos micocerosídicos.^{12,13}

O PGL-I contém um grupo fenólico glicosilado com um trissacarídeo característico e específico para o *M. leprae*. Além disso, a sua porção terminal (3,6-di-O-metil glucose) ainda não foi detectada em nenhuma outra molécula natural, constituindo-se na chave para a alta especificidade da resposta humoral durante o processo de infecção.^{13,14,15}

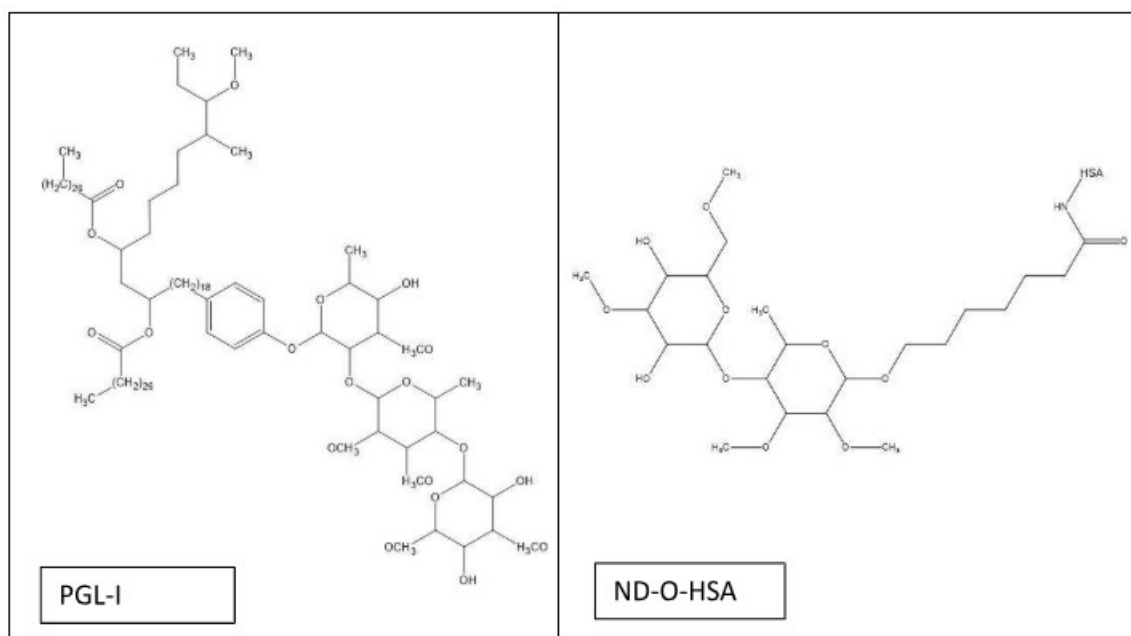
Em seguida, apresenta-se uma membrana interna, rígida e elétron-densa, constituída de peptidoglicanos (PGN) entrelaçados e ligados covalentemente as cadeias polissacarídeas de arabinogalactano (AG), que servem de suporte para os ácidos micólicos. A membrana plasmática é formada por uma bicamada de fosfolipídios associada ao lipomanano (LM), ao lipopolissacarídeo lipoarabinomanano (LAM), ftiocerol contendo lipídios (por exemplo, PDIM) e dimicolil trealose. Essa complexa estrutura confere ao *M. leprae* maior virulência e resistência aos medicamentos em relação às bactérias gram-positivas.¹²

Um dos componentes da parede celular do *M. leprae* tem chamado a atenção desde os anos 80, o glicolípido fenólico I (PGL-I). Essa molécula, que representa 3% do bacilo da Hanseníase, tem a capacidade de estimular a produção da imunoglobulina M (IgM) em pacientes com a doença.¹⁶ O PGL-I possui a seguinte

estrutura (Figura 1): 29-{4-[O-(3,6-di-O-metil-β-D-glicopirosil)-(1→4)-O-(2,3-di-O-metil-α-L-ramnopirosil)-(1→2)-3-O-metil-α-L-ramnopiranosiloxilfenil}-3-metoxi-4-metil-9,11-não-acosandiol 9,11-dimetilcerosato. Trata-se de um trissacarídeo fenólico que serviu como base para o desenvolvimento do atual teste imunocromatográfico de detecção rápida de fluxo lateral (ML Flow) e para o teste sorológico usando a sua forma nativa ou sintética como o dissacarídeo natural com octil ligado a albumina sérica bovina (ND-O-BSA) ou dissacarídeo natural com octil ligado à albumina sérica humana (ND-O-HSA).^{1,16}

O imunocromatográfico, disponibilizado pelo Ministério da Saúde, é considerado uma importante ferramenta para detecção de anticorpos IgM contra o antígeno PGL-I do *M. leprae*. No entanto, o teste sorológico, além de possibilitar a detecção mencionada, também é capaz de quantificar e auxiliar na classificação operacional, devido à sua elevada sensibilidade para casos multibacilares, virchowianos ou lepramatosos. Ambos os tipos de teste não devem ser usados isoladamente no diagnóstico da hanseníase; a avaliação dermatológica e neurológica minuciosa, por profissional experiente, é essencial na definição diagnóstica da doença.^{1,11,16}

Diante da disponibilidade limitada do antígeno PGL-1 nativo e devido à incapacidade natural do patógeno de crescer *in vitro*, estudos buscaram alternativas usando antígenos sintéticos, como ND-O-HSA (dissacarídeo natural com ligação octila à albumina sérica humana) e NT-P-HSA (trissacarídeo natural com ligação do anel fenólico à HSA). O epítipo dissacarídeo usado para a produção do ND-O-HSA é o 3,6-di-O-metil- β -D-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 4)2,3-di-O-metilramnose-piranosídeo (Figura 1). Esse componente foi acoplado à albumina sérica humana com a finalidade de facilitar o transporte e solubilidade do epítipo em água, possibilitando seu uso em ensaios como o ELISA.^{5,16}

**FIGURA 1: PGL-I e ND-O-HSA**

PGL-I e interação celular

O *Mycobacterium leprae*, por meio da PGL-I, tem a capacidade de se ligar à região c-terminal da proteína alfa-2 da laminina (LAMMA-2), presente na lâmina basal da célula de Schwann, sugerindo que esse antígeno desempenha um importante papel na interação entre o bacilo e o nervo periférico.^{16,17} Além disso, o trissacarídeo nativo fenólico também desempenha um papel na ligação do bacilo ao macrófago, mas essa interação ocorre por meio do receptor de complemento 3 (CR3), resultando na redução da produção de óxido nítrico sintase induzível

(NOSi) e estimulando a migração de células dendríticas e neutrófilos.^{18,19} O CR3 também parece ser utilizado para a invasão dos neutrófilos polimorfonucleados e células dendríticas, ativando a via Syk tirosina quinase e o fator de transcrição NF- κ B, o que remodela a resposta via citocina para favorecer o crescimento do *M. leprae*.¹⁸

A interação do PGL-I com a célula hospedeira resulta na ruptura da homeostase lipídica da célula invadida, resultando em formação de corpos lipídicos (CL), organelas citoplasmáticas que parecem favorecer a sobrevivência do bacilo e aparecimento de “macrófagos esponjosos”. Estudos demonstram que os CL podem aumentar os níveis de prostaglandina E2 (PGE2), reduzir a resposta mediada por células T helper do tipo 1 (Th1), a ação bactericida e os níveis de interleucina 10 (IL-10), além de diminuir a quantidade de IL-12 e óxido nítrico.¹⁶

Há indícios de que o colesterol acumulado nos CL sirva como substrato para produção lipídios da parede celular bacteriana, como o dimicocerosato de fitocsterol (PDIM) e PGL-I dentro da célula de Schwann, por meio do catabolismo oxidativo via 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD).²⁰

Como observado, as alterações anteriormente citadas contribuem para um ambiente corpóreo com baixa capacidade de proteção e combate contra o microrganismo, além de favorável a reprodução da bactéria.¹⁶

Fundamentação teórica e procedimentos envolvidos na sorologia IgM anti-PGL-I usando o ND-O-HSA

O imunoensaio enzimático aplicado é do tipo heterogêneo, devido à finalidade de monitorar a atividade enzimática da reação entre antígeno-anticorpo; ou seja, ND-O-HSA e IgM anti-PGL-I, com necessidade de etapas de lavagem para retirada de componentes não ligados à fase sólida (Poço da placa), permitindo assim a ligação do reagente marcado (Conjugado) e ação sobre o substrato. Outra característica é que esse ensaio é indireto; ou seja, há imobilização do antígeno na fase sólida e utilização de um anticorpo secundário marcado com uma enzima. Este anticorpo secundário irá se ligar à IgM anti-PGL-I da amostra, e a porção enzimática atua sobre o substrato (Figura 2), que emitirá uma coloração monitorada por meio de espectrofotometria.^{7,21}

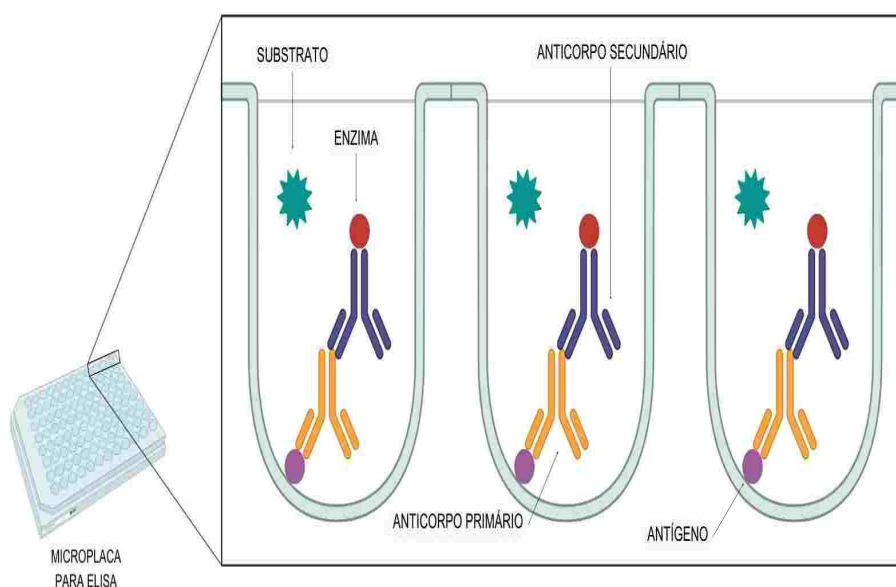


FIGURA 2: ELISA indireto.

Essa metodologia envolve frequentemente as etapas de sensibilização, incubação (com amostra

ou conjugado) e lavagem das placas. Estas são compostas de 96 poços, possibilitando múltiplas análises e, geralmente, feitas de poliestireno, pois esse material possibilita a ligação de moléculas apolares hidrofóbicas e polares hidrofílicas, sem alterar a conformação da molécula imobilizada no poço.^{7,21}

A composição do dissacarídeo aderido ao HSA é proposital para o seu transporte em água, já que de forma isolada, é apolar, e com o referido acoplamento, ele fica menos apolar, permitindo o manuseio em soluções polares e ensaios como o ELISA.¹⁶

Com base no estudo de Lima et al.⁶ e colaboradores que apresentou sua metodologia descrita em detalhes, será apresentado o material e etapas envolvidas no ELISA IgM anti-PGL-I. O seguinte material foi citado na metodologia: bicarbonato de sódio (NaHCO_3), carbonato de sódio (Na_2CO_3), solução salina tamponada com fosfato a 0,05% de Tween-20 (PBST), PBS com Albumina de Soro Bovino (BSA) 0,5 % (PBS-BSA 5%), PBST 1X, tampão citrato, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido sulfúrico (H_2SO_4 2 N), anticorpo secundário anti-IgM humano conjugado com a peroxidase (Anti-IgM + peroxidase = conjugado ou anticorpo secundário), ND-O-HSA e O-fenilenodiamina dihidrocloridrato (OPD = Substrato cromogênico).

Inicialmente, foi realizada a sensibilização da placa com o antígeno ND-O-HSA (0,05 μg) diluído em tampão bicarbonato/carbonato pH=9,6 (Solução sensibilizante), que deve ser mantida por uma noite em câmara escura (4° C).⁶ Nessa etapa ocorre a ligação do ND-O-HSA no poço, tornando o antígeno imobilizado na placa.²¹ Em seguida, é realizada uma lavagem dos poços com 200 μL de PBST 1X (Solução de lavagem).⁶ Esse processo é feito para retirada das moléculas não aderidas aos poços.²¹

Posteriormente, os poços são bloqueados com PBS-BSA 5% (Solução de bloqueio) durante 1h a 37°C. Nesse passo, os sítios insaturados dos poços são aderidos ao BSA contido na solução.²¹

A amostra utilizada foi soro de pacientes com diagnóstico de hanseníase e pessoas que não foram acometidas pela doença, porém possuem contato com o paciente, denominadas apenas de “contatos”. O soro foi diluído (1:100) e analisado em triplicata. As placas foram incubadas por 1h (37° C). O diluente e a quantidade de amostra colocada no poço não foram citadas. Nessa fase, o anticorpo anti-PGL-I do soro ficou imobilizado na placa devido à sua ligação ao antígeno.⁶

Após três lavagens com PBST 1X, houve a adição de 50 μL do anti-IgM (1:5000) ou anti-IgG (1:5000) humanos acoplados à peroxidase e incubação por 1h a 37° C.⁶ Nesse momento, ocorre a ligação entre o anticorpo secundário e os da amostra.

Novamente, foi realizada a lavagem com PBST 1X, processo repetido três vezes antes da aplicação de 50 μL , em cada poço, da solução contendo substrato OPD (2mg), tampão citrato (5000 mL) e H_2O_2 (2 mL), deixando a reação conjugado-substrato agir por 5 min.⁶ A ação da enzima peroxidase sobre o OPD promove a formação de produto com cor amarelada, quantificada de acordo com a densidade óptica (OD) da solução produzida.²¹

Com a finalidade de parar a referida reação, utilizou-se 20 μL do ácido sulfúrico 2 N (solução de parada). Assim, a leitura das amostras contidas na microplaca pode ser realizada a 492 nm.⁶

A titulação do anticorpo foi determinada com base no Índice do ELISA (EI) e seguinte fórmula: $\text{EI} = \text{OD}_{\text{amostra}}/\text{OD}_{\text{cut-off}}$, onde $\text{OD}_{\text{amostra}}$ é a absorbância média da amostra e $\text{OD}_{\text{cut-off}}$ determinado pela média do controle negativo multiplicado três vezes pelo seu desvio padrão. Valores de EI maior que 1 são considerados positivos.^{6,22}

Comparação entre as metodologias aplicadas à sorologia anti PGL-I usando ND-O-HSA e conclusões referentes ao imunoensaio

Na comparação entre as metodologias aplicadas à sorologia anti-PGL-I utilizando o ND-O-HSA, foram identificados pontos divergentes em quatro estudos^{19,22,23,24} em relação à metodologia de referência descrita anteriormente por Lima et al.⁶

No estudo conduzido por Lobato et al.²², o antígeno foi diluído em PBS (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e não foram especificados o tempo de sensibilização e a temperatura. O soro foi preparado em PBS-BSA 1% (1:300) e incubado por 1 h a 37° C. O bloqueio da placa parece ter sido realizado junto com a adição da amostra e sem lavagem intermediária. A lavagem foi realizada antes da adição do conjugado anti-IgM peroxidase (1:200) e a composição da solução de lavagem não foi mencionada. A quantidade de substrato OPD e seu diluente não foram apresentados no artigo. A reação enzima-substrato foi realizada em temperatura ambiente (TA) por 5 min e local escuro. A reação

foi interrompida com uma solução de ácido sulfúrico mais concentrada (4N). A titulação foi realizada da mesma forma que Lima et al.⁶

No estudo de Bobosha et al.²³, a característica da placa foi mencionada (fundo plano) e o antígeno foi adicionado em cada poço (500 ng ou 0,5 µg em 50 µL de diluente), em uma concentração 10 vezes mais elevada do que a utilizada por Lima et al.⁶ Não foi mencionada a lavagem, nem o bloqueio da placa antes da adição de soro (50 µL) diluído (1:800). A incubação ocorreu em TA durante 2 h. Após a lavagem, foi adicionado 50 µL de conjugado e posterior incubação nas condições mencionadas na sensibilização. Após nova lavagem, a reação do conjugado foi realizada com 50 µL de solução de 5,5'-tetrametil-benzidina (TMB), com uma incubação de 15 minutos (TA). A solução de parada também teve concentração diferente (H2SO4 0,5 N). A titulação foi baseada na densidade ótica a 450 nm (DO), e considerada positiva as superiores a 0,149. Ambos os parâmetros são diferentes da metodologia descrita anteriormente por Lobato et al.²²

Van Dijk et al.¹⁹ utilizaram a mesma quantidade de antígeno que Lobato et al.²², diluído em tampão semelhante ao de Lima et al.⁶, mas em concentração de 1 M. O bloqueio foi realizado com PBS/BSA 1%/ Tween-80 0,05 %. A presença da proteína e tensoativo na mesma solução sugere ação de bloqueio e lavagem na mesma etapa e a incubação foi realizada por 1h. Em cada poço, foi adicionado 50 µL de soro diluído (1:400) e incubado por 2 h (TA). O mesmo tipo de conjugado, mas em diluição diferente (1:8000), em PBS/Tween-20 0,05 %. O TMB foi usado como substrato sem mencionar o tempo de reação. O ácido relatado em todas as referências abordadas nesse estudo também foi utilizado para interromper a reação por 10-15 min, mas não especificaram a concentração. O comprimento de onda de leitura da placa foi menor, 450 nm, e o cálculo da titulação não foi apresentado.

Na pesquisa mais recente sobre a sorologia anti-PGL-I usando o dissacarídeo objetivo de estudo²⁴, foi citado também o uso de placas com fundo plano, a sensibilização e diluição do soro foram semelhantes às realizadas por Bobosha et al.²³ Antes e após a adição do conjugado, foram realizadas lavagens com uma solução não descrita. O tempo de incubação (2 horas, TA) com conjugado foi maior que o de Lima et al.⁶ Após a lavagem, o TMB foi adicionado para reação durante 15 minutos (TA) e no escuro, e, em seguida, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico menos concentrado (0,5 N) que a metodologia principal.

Geralmente, a titulação é expressa através do Índice ELISA (EI) ou Densidade Óptica (OD). Em ambas, a soropositividade é determinada com base na análise de participantes sem o diagnóstico da doença, denominados controles, além dos pacientes com hanseníase. Observou-se que a quantificação foi realizada de forma independente^{19,24} ou de acordo com a forma clínica^{22,23} apresentada ou para análise da ligação do anti-PGLI-M3 com o ND-O-HSA⁶, conforme ilustrado na tabela 1 abaixo.

TABELA 1: Formas de apresentação dos títulos, aplicação, média e soropositividade.

Autores	Apresentação do título	Aplicação	Média	Soropositividade
Lima et al.6	Índice ELISA (EI)	Titulação da interação do anti-PGLI-M3 (sintetizado por bactéria) com o ND-O-H-SA e o PGLI-M3	1,2 (Abs)	EI < 1.1*
Lobato et al.22	Índice ELISA (EI)	Titulação do anticorpo em pacientes com hanseníase TT BT BB BL LL	1,11 1,33 1,89 5,87 7,62	EI < 1.1
Bobosha et al.23	Densidade Óptica (OD)	Titulação do anticorpo em pacientes com hanseníase BL LL	≈ 290 para ambas	OD > 0,149
Van Dijk et al.19	Densidade Óptica (OD)	Titulação do anticorpo em pacientes com hanseníase NC	Ausente	Ausente
Lema et al.24	Densidade Óptica (OD)	Titulação do anticorpo em pacientes com hanseníase NC	Ausente	OD > 0,149

TT: tuberculoide, BT: borderline tuberculoide, BB: borderline-bordeline, BL: borderline lepromatosa, LL: lepromatosa, NC: Não Classificada. *O ND-O-HSA foi usado apenas no teste da referida interação, o restante das análises de Lima et al.6 foi realizada em comparação ao PGL-I.

As conclusões obtidas com o emprego do imunoensaio nas referências descritas anteriormente são diversas e abrangentes, revelando *insights* importantes sobre o diagnóstico e o entendimento da hanseníase. Destacam-se os seguintes pontos:

Especificidade do Anticorpo e Mimetização Estrutural: no estudo conduzido por Lima et al.⁶, a análise do antígeno PGLI-M3 sintetizado apresentou sensibilidade de 89,1% e especificidade de 100%, capaz de diferenciar as formas clínicas em teste de ressonância plasmônica de superfície. Esse novo antígeno parece mimetizar a estrutura do PGL-I do *M. leprae*, indicando uma possível aplicação promissora para o diagnóstico da hanseníase. Além disso, a positividade para IgM anti-PGL-I foi duas vezes maior tanto em contatos domiciliares quanto em pacientes com formas paucibacilares em regiões hiperendêmicas do que em regiões endêmicas. Esse achado mostra a importância do teste sorológico no monitoramento de infecção subclínica nos contatos.

Avaliação de Imunotestes na Hanseníase: O estudo realizado por Lobato et al.²² analisou três imunotestes, revelando que o ELISA, com o uso do dissacarídeo sintético, apresentou sensibilidade e especificidade consideráveis. No entanto, a análise não discriminou a classificação operacional e a soropositividade dos contatos foi menor em comparação com o uso do antígeno nativo.

Biomarcadores do Perfil da Hanseníase: Bobosha et al.²³ sugeriram a utilização da detecção sorológica de anticorpo contra PGL-I em combinação com citocinas inflamatórias como biomarcadores do perfil da hanseníase, oferecendo uma abordagem complementar para a compreensão da doença.

Correlação entre Antígenos Sintéticos e ND-O-HSA: Pesquisadores de Leiden, Holanda conduziram uma avaliação do trissacarídeo fenólico natural (NPT1-H-BSA) sintetizado em relação ao ND-O-HSA, constatando uma elevada correlação entre o antígeno sintético e o ND-O-HSA. Essa pesquisa destacou a importância do local de metilação no antígeno a ser sintetizado, evidenciando sua influência na ligação antígeno-anticorpo.¹⁹

Deteção Precoce e Impacto do Tratamento: Em estudo clínico realizado por Lema et al.²⁴, foi identificada uma diminuição dos anticorpos anti PGL-I após o tratamento completo dos pacientes diagnosticados com hanseníase. Além disso, a titulação dos contatos também apresentou comportamento semelhante após o uso dos fármacos pelo paciente, sugerindo um potencial para a detecção precoce e o monitoramento do risco de desenvolvimento da doença.

A detecção e o tratamento de indivíduos assintomáticos infectados por *Mycobacterium leprae* emergem como pontos críticos para interromper a transmissão e potencialmente controlar a endemicidade da hanseníase em diversas regiões do mundo.²⁵ Neste contexto, os testes sorológicos desempenham um papel essencial no monitoramento da eficácia da poliquimioterapia, uma vez que os títulos de anticorpos direcionados contra o fenol-glicolípido I (PGL-I) do *M. leprae* diminuem conforme a carga bacteriana é reduzida e o tratamento é bem-sucedido.^{24,26} Destaca-se, portanto, a importância do desenvolvimento e da aplicação de métodos sorológicos como ferramentas valiosas para diagnóstico, tratamento, monitoramento e compreensão da Hanseníase, contribuindo significativamente para o avanço no combate a essa enfermidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do que foi exposto, fica evidente a relevância do PGL-I para a interação do *M. leprae* com a célula hospedeira, bem como seu papel crucial na sorologia anti-PGL-I, que busca detectar imunoglobulinas específicas e outros antígenos sintéticos, como o ND-O-HSA, teste que tem sido usado no auxílio de pesquisas envolvidas em esclarecer o desenvolvimento da Hanseníase. Ao longo das pesquisas revisadas, fica claro que o teste sorológico é amplamente explorado: seja na avaliação de diferentes antígenos sintéticos, seja no apoio ao diagnóstico clínico da Hanseníase. Apesar das variações e da falta de detalhamento em algumas metodologias, é notável que todos os ensaios compartilham características similares, sendo do tipo ELISA, heterogêneos e indiretos. Os resultados promissores derivados da aplicação diversa do imunoensaio demonstram que esta é uma ferramenta essencial na detecção da infecção pelo bacilo de Hansen, destacando seu potencial na melhoria dos métodos de diagnóstico e, consequentemente, no controle mais eficaz da Hanseníase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde; 2022.
2. Romero CP, Castro R, do Brasil PEA, Pereira DR, Pinheiro RO, Toscano CM, et al. Accuracy of rapid point-of-care serological tests for leprosy diagnosis: a systematic review and meta-analysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117:e220317.
3. Röltgen K, Pluschke G, Spencer JS, Brennan PJ, Avanzi C. The immunology of other mycobacteria: *M. ulcerans*, *M. leprae*. *Seminars in Immunopathology*. 2020; 42:333–353.
4. Barreto JG, Guimarães LS, Leão MR, Ferreira DV, Lima RA, Salgado CG. Anti-PGL-I seroepidemiology in leprosy cases: household contacts and school children from a hyperendemic municipality of the Brazilian Amazon. *Lepr Rev*. 2011;82(4):358-70.
5. Richardus RA, van der Zwet K, van Hooij A, Wilson L, Oskam L, Faber R, et al. Longitudinal assessment of anti-PGL-I serology in contacts of leprosy patients in Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(12):e0006083.
6. Lima MIS, Capparelli FE, Dias Oliveira JDD, Fujimura PT, Moraes ECDS, Araujo ECB, et al. Biotechnological and Immunological Platforms Based on PGL-I Carbohydrate-Like Peptide of *Mycobacterium leprae* for Antibodies Detection Among Leprosy Clinical Forms. *Front Microbiol*. 2020; 17: 11:429.
7. da Silva MB, Li W, Bouth RC, Gobbo AR, Messias ACC, Moraes TMP, et al. Latent leprosy infection identified by dual RLEP and anti-PGL-I positivity: Implications for new control strategies. *PLoS One*. 2021;16(5):e0251631.
8. da Silva Prata RB, Mendes MA, Soares VC, França-Costa J, Sales AM, Duppré NC, et al. Arginase 1 is a marker of protection against illness in contacts of leprosy patients. *Sci Rep*. 2022;12(1):7850.
9. Rees RJW, Young DB. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC, editor *Leprosy*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.49-83.
10. Levy L, Ji B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Lepr. Rev*. 2006; 77 5–24.
11. BRASIL. Ministério da Saúde, Técnica de Coloração de Gram. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, 2001. 63 p.: il. (Série TELELAB) I. Gram I. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS, (Brasil). II. Série TELELAB. Disponível via URL em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/115_03gram.pdf. Acesso em: 21 Set. 2023.
12. Sugawara-Mikami M, Tanigawa K, Kawashima A, Kiriya M, Nakamura Y, Fujiwara Y, et al. Pathogenicity and virulence of *Mycobacterium leprae*. *Virulence*. 2022;13(1):1985-2011.
13. Chavarro-Portillo B, Soto CY, Guerrero MI. *Mycobacterium leprae*'s Infective Capacity Is Associated with Activation of Genes Involved in PGL-I Biosynthesis in a Schwann Cells Infection Model. *Int J Mol Sci*. 2023;24(10):8727.

14. Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;103(3):511-24.
15. Hunter SW, Brennan PJ. Further specific extracellular phenolic glycolipid antigens and a related diacyphthiocerol from *Mycobacterium leprae*. *J biol chem*. 1983; 258: 7556-7562.
16. Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev*. 2011;82(4):344-57.
17. Arenas NE, Pieffet G, Rocha-Roa C, Guerrero MI. Design of a specific peptide against phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* and its implications in leprosy bacilli entry. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117:e220025.
18. Doz-Deblauwe É, Carreras F, Arbues A, Remot A, Epardaud M, Malaga W, et al. CR3 Engaged by PGL-I Triggers Syk-Calcineurin-NFATc to Rewire the Innate Immune Response in Leprosy. *Front Immunol*. 2019;10:2913.
19. van Dijk JHM, van Hooij A, Groot LM, Geboers J, Moretti R, Verhard-Seymonsbergen E, et al. Synthetic Phenolic Glycolipids for Application in Diagnostic Tests for Leprosy. *Chembiochem*. 2021;22(8):1487-1493.
20. Rosa TLSA, Marques MAM, DeBoard Z, Hutchins K, Silva CAA, Montague CR, et al. Reductive Power Generated by *Mycobacterium leprae* Through Cholesterol Oxidation Contributes to Lipid and ATP Synthesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:765326.
21. Vaz AD, Takei K, Bueno EC. *Imunoensaios: fundamentos e aplicações*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
22. Lobato J, Costa MP, Reis Ede M, Gonçalves MA, Spencer JS, Brennan PJ, et al. Comparison of three immunological tests for leprosy diagnosis and detection of subclinical infection. *Lepr Rev*. 2011;82(4):389-401.
23. Bobosha K, Tjon Kon Fat EM, van den Eeden SJ, Bekele Y, van der Ploeg-van Schip JJ, et al. Field-evaluation of a new lateral flow assay for detection of cellular and humoral immunity against *Mycobacterium leprae*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5):e2845.
24. Lema T, Bobosha K, Kasang C, Tarekegne A, Lambert S, Mengiste A, et al. Reaching those at risk: Active case detection of leprosy and contact tracing at Kokosa, a hot spot district in Ethiopia. *PLoS One*. 2023;18(6):e0264100.
25. Medley GF, Blok DJ, Crump RE, Hollingsworth TD, Galvani AP, Ndeffo-Mbah ML, et al. Policy Lessons From Quantitative Modeling of Leprosy. *Clin Infect Dis*. 2018;66(suppl_4):S281-S285.
26. Hungria EM, Bühner-Sékula S, Oliveira RM, Aderaldo LC, Pontes MAA, Cruz R, et al. *Mycobacterium leprae*-Specific Antibodies in Multibacillary Leprosy Patients Decrease During and After Treatment With Either the Regular 12 Doses Multidrug Therapy (MDT) or the Uniform 6 Doses MDT. *Front Immunol*. 2018;9:915.