

R6 Desenvolvimento de estratégias para o Aperfeiçoamento da Produção do Conjugado Anti-IgG Canina/Peroxidase Utilizado no Kit EIE/LVC

Edinéa Pastro Mendes¹, Hilton Jorge Nascimento¹, Renata Chagas Bastos¹, Priscila Muniz da Paz¹, José Godinho da Silva Junior¹, Maria Helena Simões Villas Bôas², Ana Paula Dinis Ano Bom¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

² INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: Leishmaniose é uma doença endêmica presente em mais de 80 países incluindo o Brasil. A leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose, comum ao cão e ao homem, causada pelo parasito *Leishmania chagasi*. O cão é considerado um importante reservatório do parasito e constitui o principal elo na cadeia de transmissão de LV. Dessa forma, o diagnóstico de LV canina (LVC) é um importante passo para evitar a transmissão da doença e a eutanásia desnecessária de cães.

Objetivo: Este estudo teve como objetivo estabelecer e aperfeiçoar estratégias para a produção de conjugados de anti-IgG canina com peroxidase (HRP) contidos no *Kit* de ELISA para diagnóstico da LVC (*Kit* EIE/LVC).

Metodologia: A anti-IgG canina foi obtida através de precipitação com sulfato de amônio, dessalinização por cromatografia de exclusão e peneiração molecular (SEC) e purificação por cromatografia de troca aniônica (IEX). A imunoglobulina purificada foi analisada por SDS-PAGE, IEF-PAGE e quantificada pelo método de BCA. A conjugação da IgG à HRP foi realizada pelo método de aaminação redutiva, utilizando diferentes concentrações de metaperiodato de sódio e borohidreto de sódio, gerando 4 conjugados IgG/HRP distintos (1-4). A conformação dos conjugados produzidos foi avaliada por espectrometria de fluorescência e SEC. A eficiência destes conjugados foi avaliada através do ELISA contra painéis sorológicos padronizados. A estabilidade dos conjugados foi avaliada através de curvas de desnaturação térmica e testes de estabilidade acelerada (TEA), visando testar a possibilidade de armazenamento do *kit* no intervalo de temperatura de 2-8°C. O TEA foi realizado em três condições de temperatura a 4°C, 37°C e 50°C, utilizando o estabilizante comercial Guardian™ em substituição ao estabilizante do *kit* e solução *post-coating*.

Resultados: A substituição da diálise por SEC e o uso da matriz de IEX Poros HQ em detrimento da matriz clássica de DEAE-Sepharcel outrora usados, resultaram na diminuição do tempo de obtenção da anti-IgG canina. Após as etapas de conjugação, foi realizada a análise comparativa dos conjugados. Os experimentos de SEC indicaram que

os conjugados apresentavam perfis cromatográficos semelhantes. O monitoramento da conformação dos conjugados sugere que os mesmos apresentam espectros de fluorescência semelhantes. Através do ELISA verificou-se que todos os conjugados reconheceram os soros controles positivos. Os dados de estabilidade acelerada indicaram que os conjugados se mantiveram eficientes no reconhecimento dos anticorpos, mesmo em altas temperaturas. Os conjugados apresentaram uma grande estabilidade nas análises das curvas de desnaturação térmica. Os conjugados analisados em conjunto com as placas revestidas com a solução *post-coating* e o estabilizante Guardian possuem estabilidade compatível para armazenamento do *Kit* EIE-LVC a temperatura de 2°C a 8°C.

Conclusão: A implantação das novas estratégias bem como a otimização das etapas existentes na obtenção dos conjugados visa obter maior reprodutibilidade nos aspectos de produção e o aperfeiçoamento da qualidade do *Kit* EIE-LCV.

Palavras-Chave: Diagnóstico, Leishmaniose, Conjugado IgG/HRP