

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Simone de Amorim Chermont

**Otimização do processo de obtenção do conjugado IgG-peroxidase do *kit*
diagnóstico EIE Leishmaniose Visceral Canina**

Rio de Janeiro

2020

Simone de Amorim Chermont

Otimização do processo de obtenção do conjugado IgG-peroxidase do *kit*
diagnóstico EIE Leishmaniose Visceral Canina

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadora: Dra. Isabella Fernandes Delgado.

Co-orientadora: Dra. Patrícia Barbosa Jurgilas.

Rio de Janeiro

2020

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Chermont, Simone de Amorim

Otimização do processo de obtenção do conjugado IgG-peroxidase do kit diagnóstico EIE Leishmaniose Visceral Canina . / Simone de Amorim Chermont. - Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2020.

84 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) - Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

Orientadora: Isabella Fernandes Delgado.

Co-orientadora: Dra. Patrícia Barbosa Jurgilas.

1. Leishmaniose. 2. Cães. 3. Imunoglobulina G. 4. Kit de Reagentes para Diagnóstico. I. Título.

Optimization of the process of obtaining the IgG-peroxidase conjugate of the EIE Leishmaniasis Canine Visceral Diagnostic Kit.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001."

Simone de Amorim Chermont

Otimização do processo de obtenção do conjugado IgG-peroxidase do *kit*
diagnóstico EIE Leishmaniose Visceral Canina

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira

Instituto Oswaldo Cruz – IOC / Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ RJ

Dra. Barbara Rodrigues Geraldino

Instituto Nacional de Câncer – INCA RJ

Dra. Renata Chagas Bastos

Bio-Manguinhos - FIOCRUZ RJ

ORIENTADORES

Dra. Isabella Fernandes Delgado

Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ RJ

Dra. Patrícia Barbosa Jurgilas

Bio-Manguinhos - FIOCRUZ RJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que é a razão de minha existência e por me direcionar na realização de mais uma etapa profissional;

À minha Mãe por tudo que sou hoje e por torcer sempre pelo meu sucesso;

À memória de meu Pai por me ensinar a ter coragem e nunca desistir dos desafios da vida.

Aos meus filhos Rodrigo e Patrícia que sempre me auxiliaram com paciência, ajudando neste estudo e por significarem tudo em minha vida;

Ao meu marido Tadeu por todo amor, incentivo, confiança em todos os momentos e que representa muito em minha vida;

Aos meus irmãos e irmãs que sempre ajudaram com uma palavra de força;

À minha orientadora Isabella Fernandes Delgado por ter me aceitado na orientação e por toda a ajuda e incentivo ao longo do desenvolvimento deste estudo e minha co-orientadora, amiga, que considero como irmã, Patrícia Barbosa Jurgilas, que sempre me deu coragem, apoio em toda minha trajetória profissional e todo o suporte para eu conseguir realizar e finalizar esta dissertação;

À equipe do LAMAM, em especial a memória de Hilton e a Renata que sempre me acolheram de forma carinhosa;

Ao INCQS, em especial ao Dr. Eugênio e toda equipe de Pós-Graduação por toda ajuda e receptividade de sempre;

Aos meus professores da Pós-graduação por todo aprendizado, em especial a Katia Leandro que me transmitiu segurança e carinho para eu continuar a seguir;

À minha equipe da SEICA, Aline e Márcia que me proporcionou o desenvolvimento deste trabalho. Em especial à Giselle, que sempre me incentivou e deu muita força para eu continuar;

Ao DEREED, que me concedeu a liberação para realizar esse trabalho científico;

À DIPRE em especial ao Marco Antônio e Christiane Teixeira que sempre me deram muito apoio em todos os momentos para seguir com este estudo;

À SEPRO por toda colaboração.

Aos amigos de sempre Carlos Roberto da DIBOP, Keila do LATED, Nildinha do LATEB, e à minha professora de inglês Cristina Faria que sempre torceram para eu pudesse chegar até aqui.

Toda caminhada, por mais longa que seja, começa com primeiro passo quando se tem Fé em DEUS.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) causada pelo parasito *Leishmania chagasi* é uma doença severa que se tornou um crescente problema de saúde pública em vários países, inclusive no Brasil. O diagnóstico de leishmaniose visceral canina (LVC) é muito importante no controle da doença, ao passo de evitar a eutanásia desnecessária de cães e a transmissão para os seres humanos. Atualmente o Ministério da Saúde (MS) preconiza o uso do ensaio imunoenzimático (EIE), como o teste confirmatório para leishmaniose visceral canina. Os kits EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA para o diagnóstico imunoenzimático indireto produzidos por Bio-Manguinhos utilizam imunoglobulina (Ig) de cabra anti-cão conjugada com peroxidase (HRP). Embora apresente melhor leitura e interpretação dos resultados quando comparado a outros testes sorológicos disponíveis comercialmente, este estudo visa otimizar os processos de conjugação a fim de tornar os resultados mais específicos, reprodutíveis e sensíveis, já que é produzido antes da produção do kit final. Foram produzidos quatro grupos de conjugados variando a estequiometria entre a IgG e HRP, o uso de técnica de purificação dos insumos e alteração do tempo reacional. Os conjugados produzidos foram avaliados por Cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) e por Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Os resultados mostraram uma melhor performance para os conjugados em que a imunoglobulina foi previamente purificada (forma monomérica) e utilizando a estequiometria de 0,2 moles de IgG:1 mol de HRP. Obtivemos bom resultado também diminuindo o tempo reacional, em relação ao conjugado utilizado atualmente. Conclui-se que a otimização do processo de conjugação entre a imunoglobulina e a peroxidase é essencial para melhorar a qualidade dos kits EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA de Bio-Manguinhos.

Palavras chave: Leishmaniose visceral canina. Imunoglobulina G. Kit de reagentes para diagnóstico. Controle de qualidade.

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) caused by the parasite *Leishmania chagasi* is a severe disease that has become a growing public health problem in several countries, including Brazil. The diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is very important in the control of the disease, while avoiding the unnecessary euthanasia of dogs and transmission to humans. Currently, the Ministry of Health recommends the use of immunoenzymatic assay (EIE), as the confirmatory test for (LVC). The kits EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINE of indirect immunoenzymatic diagnosis produced by Bio-Manguinhos use immunoglobulin (IgG) of goat anti-dog conjugated with peroxidase (HRP). Although it presents better reading and interpretation of the results when compared to other serological tests commercially available, this study aims to optimize the conjugation processes in order to make the results more specific, reproducible and sensitive. Four groups of conjugates were produced, varying the stoichiometry between IgG and HRP, the use of the purification technique of the inputs and changes in the reaction time. The conjugates produced were evaluated by Sieve Exclusion Chromatography (SEC) and by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results showed a better performance in the conjugates in which the immunoglobulin was previously purified (monomeric form) and using the stoichiometry of 0.2 moles of IgG:1 mole of HRP. We obtained a good result also reducing the reaction time, in relation to the conjugate currently used. It is concluded that the optimization of the conjugation process between immunoglobulin and peroxidase is essential to improve the quality of the Bio-Manguinhos EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINE kits.

Key-words: Canine visceral leishmaniasis. Immunoglobulin G. Diagnostic reagent kit. Quality control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formas da leishmaniose	15
Figura 2 - Flebotomíneo - Mosquito palha	17
Figura 3 - Ciclo da doença	19
Figura 4 - Animais com manifestações da leishmaniose visceral canina	20
Figura 5 - Kit de diagnóstico EIE LVC produzido por Bio-Manguinhos	23
Figura 6 - Formas das imunoglobulinas	27
Figura 7 - Perfil da cromatografia de troca iônica DEAE-Sephacel.....	44
Figura 8 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 1 conjugado A (45mg/mL IgG: 22,5mg/mL HRP)	46
Figura 9 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 1 conjugado B (45mg/mL IgG: 45mg/mL HRP)	47
Figura 10 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 1 conjugado C (45mg/mL IgG: 11,3mg/mL HRP)	48
Figura 11 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular com sobreposição dos conjugados do grupo 1	49
Figura 12 – Valores das médias de DO dos conjugados do grupo 1.....	50
Figura 13 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 2 conjugado estequiometria atual	51
Figura 14 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular do melhor conjugado produzido no grupo 1.....	52
Figura 15 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular estequiometria teste...	53
Figura 16 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular com sobreposição dos conjugados do grupo 2.....	54
Figura 17 - Valores das médias de DO dos conjugados do grupo 2.....	55
Figura 18 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular com sobreposição da Imunoglobulina.....	56
Figura 19 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 3 conjugado estequiometria atual.....	57
Figura 20 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular melhor conjugado do Grupo 2.....	58
Figura 21 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular teste monômero de IgG	59

Figura 22 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular com sobreposição dos conjugados do grupo 3.....	60
Figura 23 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular sobreposição do conjugado I do grupo 3 com padrões de massa molecular	61
Figura 24- Valores das médias de DO dos conjugados do grupo 3.....	62
Figura 25- Valores das médias de DO dos conjugados do grupo 4.....	64
Figura 26 - Resultado do teste Qui-quadrado	64
Figura 27 - Resultado do teste Qui-quadrado do grupo 4.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de IgG/HRP utilizadas para obtenção dos subgrupos dos conjugados	35
Tabela 2 – Relação de IgG/HRP utilizadas para obtenção dos “mini” conjugados.	44
Tabela 3 - Representação esquemática do teste ELISA.....	40
Tabela 4 - Resultado do desvio padrão referente aos conjugados do grupo 1.....	50
Tabela 5 - Resultado do desvio padrão referente aos conjugados do grupo 2.....	55
Tabela 6 - Resultado do desvio padrão referente aos conjugados do grupo 3.....	62
Tabela 7 - Resultado de DO das médias, do desvio padrão e UA referente aos “mini”conjugados.....	63
Tabela 8 - Análise de variância do “mini” conjugado j.....	65
Tabela 9 - Análise de variância do “mini” conjugado k.....	66
Tabela 10 - Análise de variância do “mini” conjugado L.....	66

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BIO-MANGUINHOS	Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos
CUT-OFF	Linha de corte (do ELISA)
DAT	Teste de Aglutinação Direta
DC	Espectropolarimetria de Dicroísmo Circular
DEAE	Dietilaminoetil
DERED	Departamento de Reativos para Diagnósticos
DP	Desvio padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
DPP	Imunocromatografia de Duplo Percurso
EIE	Ensaio Imunoenzimático
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FAB	Fração de ligação ao antígeno
FUNED	Fundação Ezequiel Dias
GE	<i>General Electrics Healthcare</i>
H2O2	Água oxigenada
HRP	Peroxidase de Raiz-forte
IDRM	Intradermorreação de Montenegro
Ig	Imunoglobulina
IgG	Imunoglobulina do tipo G
IgA	Imunoglobulina do tipo A
IgD	Imunoglobulina do tipo D
IgE	Imunoglobulina do tipo E
IgM	Imunoglobulina do tipo M
LACEN	Laboratórios Centrais de Saúde Pública
LAFIQ	Laboratório Físico-químico
LAMAM	Laboratório de Macromoléculas
LATEB	Laboratório de Tecnologia Bacteriana
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
LV	Leishmaniose Visceral

LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
MVV	Vírus da Maedi-Visna
Na IO ₄	Metaperiodato de sódio
NaBH ₄	Borohidreto de sódio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato de Sódio (Salina)
PBS-T	Tampão Fosfato de Sódio com Tween 20
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> - Reação da polimerase em cadeia
pH	Potencial Hidrogeniônico
POP	Procedimento Operacional Padrão
RIFI	Imunofluorescência Indireta
SEICA	Seção de Insumos Conjugados e Apoio
SEC	Cromatografia por exclusão de tamanho
SEPRO	Seção de Bactérias e Protozoários
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SUS	Sistema Único de Saúde
TH ₁	Linfócito T helper – tipo 1 responsável pela resposta imune celular
TH ₂	Linfócito T helper – tipo 2 responsável pela resposta imune humoral
TMB	Tetrametilbenzidina
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Leishmaniose	14
1.1.1 Epidemiologia.....	16
1.1.2 Vetor	16
1.1.3 Ciclo de transmissão	18
1.1.4 Reservatórios	19
1.2 Métodos imunológicos	21
1.3 Métodos de conjugação	24
1.3.1 Imunoglobulinas	25
1.3.2 Peroxidase raiz forte (HRP).....	27
1.3.3 Ensaio imunoenzimático LVC.....	28
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
4 METODOLOGIA	32
4.1 Obtenção da IgG para conjugação	32
4.1.1 Obtenção de soro hiperimune	32
4.1.2 Precipitação dos soros hiperimunes por sulfato de amônio.....	32
4.1.3 Diálise das proteínas	33
4.1.4 Purificação das imunoglobulinas	33
4.1.5 Quantificação de proteínas	34
4.1.6 Obtenção da IgG monomérica (Purificação da IgG)	34
4.2 Produção dos conjugados	34
4.2.1 Conjugação da IgG com HRP.....	34
4.2.2 Reação de oxidação da peroxidase	36
4.2.3 Diluição do conjugado	36
4.3 Produção dos “mini” conjugados	37
4.3.1 Preparo mini conjugados	37
4.3.2 Reação da oxidação HRP no mini conjugados.....	37
4.3.3 Diluição dos “mini” conjugados	38
4.4 Avaliação dos conjugados obtidos	38

4.4.1 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)	38
4.4.2 Ensaio de ELISA	39
4.4.2.1 <i>Titulação dos conjugados</i>	39
4.4.2.2 <i>Padronização dos conjugados</i>	41
4.4.2.3 <i>Ensaio imunoenzimático dos “mini” conjugados</i>	41
4.4.3 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	43
5.1 Soro hiperimune de cabra anti-IgG canina	43
5.2 Purificação do soro hiperimune em cromatografia DEAE-Sephacel	43
5.3 Quantificação pela determinação de absorvância	44
5.4 Análise do perfil dos conjugados por SEC	44
5.5 Análise cromatográfica dos conjugados do grupo 1	45
5.5.1 Teste de ELISA dos conjugados do grupo 1	49
5.6 Análise cromatográfica do conjugado do grupo 2	50
5.6.1 Teste de ELISA dos conjugados do grupo 2	54
5.7 Análise cromatográfica dos conjugados do grupo 3	55
5.7.1 Teste de ELISA dos conjugados do grupo 3	61
5.7.2 Teste de ELISA dos conjugados do grupo 4	62
6 DISCUSSÃO	67
7 CONCLUSÃO	74
8 PRODUTO TECNOLÓGICO	75
9 PERSPECTIVAS	75
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICE A – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO DOS CONJUGADOS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é considerada uma doença infecciosa zoonótica e protozoária transmitida por mais de 70 espécies de fêmeas do gênero flebótomo, sendo uma das doenças mais negligenciadas do mundo.

A infecção por leishmaniose é a segunda doença parasitária em prevalência no mundo seguida da malária (MOAFI et al., 2019). A história natural da manifestação desta doença mostra que é possível encontrar parasitas em diferentes tecidos que apresentam alterações imunopatológicas de acordo com a progressão das formas clínicas (GIUNCHETTI et al., 2019). A leishmaniose é uma doença transmitida por vetores e causada por protozoários obrigatórios intra macrófagos. É uma enfermidade caracterizada por sua diversidade e pela complexidade.

Quanto à diversidade, a doença consiste em quatro principais formas clínicas: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa ou muco-cutânea, leishmaniose visceral, conhecida também como Kalazar e leishmaniose dérmica pós-kala-azar (CHAPPUIS et al., 2007), conforme apresentado na figura 1.

A LV é a forma mais grave da doença de acordo com Organização Mundial da Saúde (OMS) pode ocasionar o óbito de aproximadamente vinte mil pessoas por ano no mundo (WHO, 2017). Via de regra, os casos de leishmaniose afetam comunidades pobres, seja na área rural como em áreas urbanas. Por ser tratar de doença de notificação compulsória, os casos devem ser notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) (BRASIL,2016).

Por razões ainda desconhecidas, mas que se pressupõe estarem associadas ao parasito e às respostas imunes efetivas do hospedeiro, muitas vezes a forma mais grave da doença não é observada (FIEVEZ et al., 2019). No entanto, alguns pacientes podem desenvolver a forma mais grave da doença, se não for devidamente tratada.

A LV canina que é o foco principal desta dissertação é uma doença crônica, que se tornou um crescente problema de saúde pública no país, sendo endêmica, e em franca expansão geográfica. O diagnóstico confiável de cães tem um papel fundamental no controle da doença humana, pois estes são os principais reservatórios urbanos da leishmaniose, já raposas e marsupiais são considerados importantes reservatórios silvestres (FARIA;

ANDRADE, 2012).

A LV é diferenciada pelo modo de transmissão que se dá através de duas formas: a zoonótica transmitida do animal para o vetor (flebotomíneos) e deste para humano e a forma antroponótica transmitida do humano para vetor (flebotomíneos) e deste para humano. No primeiro caso, os humanos são hospedeiros ocasionais, já os cães são os reservatórios dos parasitas. (CHAPPUIS et al., 2007).

A doença é caracterizada clinicamente por anemia, hepatoesplenomegalia, febre irregular, dentre outros sintomas, levando muitas vezes à morte, quando não tratada adequadamente. Sempre que possível se torna necessário um diagnóstico e o tratamento precoce nos pacientes e o mais breve possível a confirmação parasitológica da doença para preceder o tratamento (BRASIL, 2010).

Os testes sorológicos até o momento são a melhor opção para detectar a leishmaniose, porque são métodos menos invasivos e por representarem um bom custo-benefício, em relação a outras alternativas (COELHO et al., 2016).

Figura 1 – Formas da leishmaniose: a – mucosa ou muco cutânea; b – leishmaniose cutânea; c - leishmaniose visceral ou Kalazar e d - leishmaniose dérmica pós-kala-azar



(a)



(b)



(c)



(d)

Fonte: GOMES, 2004; LEISHMANIA Facts, 2006, acesso em: ago. 2020

1.1.1 Epidemiologia

No Brasil os dados demográficos e epidemiológicos são constatados pelo Ministério da Saúde (MS), que demonstrou que a leishmaniose é uma das sete doenças com prioridade de atuação do ministério, integrando assim o Programa de Controle de Doenças Negligenciadas no país (BRASIL, 2010).

No âmbito mundial, a OMS descreve a leishmaniose como uma importante doença tropical negligenciada, e ressalta sua gravidade e a capacidade de produzir deformidades. De fato, a doença afeta principalmente indivíduos de baixo nível socioeconômico e tem aumentado muito o número de casos em áreas endêmicas, nos últimos anos (ZANETTI et al., 2019).

Estima-se que 350 milhões de pessoas no mundo terão risco de ser acometido pela infecção e contrair a doença. A incidência anual é estimada em cerca de dois milhões de novos casos. (ZANETTI et al., 2019). A leishmaniose está presente em vários países como: Brasil, Bolívia, Peru, Irã, Índia, Síria, Afeganistão e Arábia Saudita, China, e em alguns países africanos (WHO, 2014).

Muitas novas ocorrências estão relacionadas ao crescente desmatamento de grandes zonas florestais no perímetro das grandes metrópoles; fato causado pelo crescimento urbano mal planejado, que levam o deslocamento do vetor, como também da aproximação de animais silvestres reservatórios para o entorno das cidades, colaborando assim para expansão da leishmaniose humana e canina (CORTADA et al., 2004).

1.1.2 Vetor

A transmissão da leishmaniose ocorre através das picadas das fêmeas infectadas de dípteros da família Psychodidae, sub-família Phebotominae, de gênero Phebotomus ou Lutzemia, conhecidos por flebotomíneos, conforme figura 2. (MOAFI et al., 2017). Os flebotomíneos estão distribuídos em dois gêneros de importância para a saúde: *Lutzomyia*, no Novo Mundo e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (WHO, 2014).

O aumento no processo de migração de animais e pessoas de áreas endêmicas, a grande quantidade de cães contaminados, o crescimento desordenado dos centros urbanos e o aumento do desmatamento têm sido as principais causas da urbanização das leishmanioses

(BELO et al., 2013).

A alimentação dos insetos é de suma importância para a maturação dos ovos. Os estágios larvares dos flebotomíneos desenvolvem-se em locais úmidos, ricos em matéria orgânica e com baixa densidade luminosa (BRASIL, 2003), porém, pouco se sabe sobre os criadouros naturais das formas imaturas de flebotomíneos. Segundo a literatura científica, locais domésticos tais como fendas de chão e paredes, porões de casas, construções abandonadas e peri-domésticos como tocas de animais, latrinas, debaixo de pedras e aterros podem ser considerados criadouros naturais; assim como ambientes silvestres como cavernas, formigueiros, raízes tubulares e toca de roedores. Estudos sobre os locais de criação das larvas podem facilitar o controle desses vetores (FELICIANGELI, 2004).

O período de maior atividade dos vetores, é a noite (ALEXANDER, 2000), por isso se torna necessário existir programas de prevenção e de controle permanente. Além disso, as mudanças climáticas também podem ser consideradas como importante fator facilitador da aparição do vetor e conseqüentemente a transmissão da doença (MENDES et al., 2016).

Figura 2 - Flebotomíneo- Mosquito Palha



Fonte: <https://www.infoescola.com/wp-content/uploads/2014/02/Lutzomyia-longipalpis.jpg>. Acesso: julho-2020.

1.1.3 Ciclo de transmissão

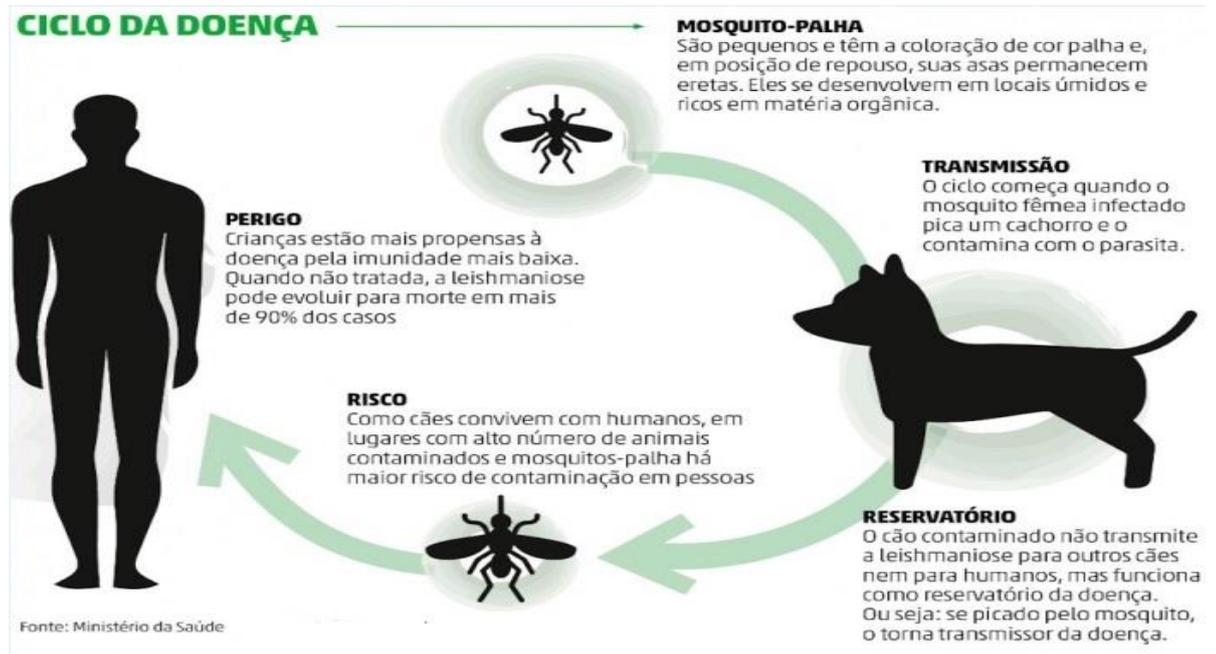
O ciclo da doença se inicia quando os flebotomíneos, conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas (forma aflagelada) do *Leishmania* durante o repasto sanguíneo, que liberadas no intestino do mosquito multiplicam-se como formas flageladas denominadas promastigotas (formas flageladas). Com isso, o hospedeiro vertebrado é infectado com a forma promastigota no momento da picada pelo vetor que contém em sua cavidade bucal os parasitas multiplicados e armazenados (CUNNINGHAM, 2002).

As promastigotas penetram nos macrófagos circulantes e multiplicam-se como amastigotas, em seguida os macrófagos rompem liberando os amastigotas, infectando outros macrófagos no organismo e dando continuidade ao ciclo da doença conforme figura 3 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A transmissão da leishmaniose em mamíferos se dá por mais de 70 espécies das fêmeas de dípteros infectadas (MOAFI et al., 2017). A *Leishmania infantum* é o principal agente causador da infecção humana e de cães no Brasil. Em geral os cães domésticos (*Canis familiaris*) são os principais hospedeiros dos reservatórios de LV.

No Brasil, assim como em outros países com regiões endêmicas como Irã, a detecção da LVC é mais difícil em cães assintomáticos (SHOKRI et al., 2017), por muitas vezes os testes resultam tanto em falsos positivos como falso negativos, podendo levar à eutanásia desnecessária de cães não infectados (GOMES, 2008).

Figura 3 - Ciclo da doença



Fonte: <https://jarinu.sp.gov.br/semana-estadual-de-prevencao-e-controle-da-leishmaniose-visceral-de-5-a-10-de-agosto-de-2019/>

1.1.4 Reservatórios

O diagnóstico confiável de cães desempenha um papel fundamental no controle da leishmanose, pois estes são os principais reservatórios da doença urbana, como mostrado na figura 4 (FARIA; ANDRADE, 2012). A Leishmaniose visceral é diferenciada pelo modo de transmissão através de duas características a zoonótica transmitida do animal para o vetor e deste para humano e a característica antroponótica transmitida do humano para vetor e deste para humano.

Normalmente, os humanos são hospedeiros ocasionais, já os cães são os reservatórios dos parasitas, mas além destes, outros mamíferos como: cotias, pacas, roedores de pequeno porte podem ser reservatórios de infecção (WHO, 2014). Os principais reservatórios silvestres são as raposas e os marsupiais que mantem esse ciclo silvestre, já os cães são os principais reservatórios domésticos nos ciclos domiciliares e peridomiciliares da LV e, comumente, são responsáveis por manter o agente endêmico em determinada região.

Esse papel é explicado não só pelo fato da prevalência da doença em cães ser mais alta quando comparada à humana, mas, também, pelo elevado número de caninos assintomáticos, podendo representar 80% dos animais infectados (SOLANO-GALLEGO et al., 2009), esses

cães infectados podem ou não desenvolver quadro clínico da doença, caracterizado por febre prolongada, nódulos ou ulcerações, diarreia, hemorragias intestinais, sinais de emagrecimento, eriçamento e queda dos pelos, paralisia dos membros posteriores, lesões oculares podendo causar cegueira e caquexia e nos casos mais graves levam ao óbito (SHOKRI et al., 2017).

Assim, muitas pesquisas buscam sistemas diagnósticos capazes de detectar leishmaniose entre os cães e com isso auxiliar no seu controle (ROSATI et al., 2003). A maioria dos cães soropositivos é aparentemente sadia, mas com a carga infecciosa alta, permite uma fácil infecção do vetor, com isso o cão é considerado melhor reservatório que os humanos, mesmo em fase precoce da infecção, já que infectam os flebotomíneos na fase assintomática como na sintomática (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Figura 4 - Animais com manifestações da leishmaniose visceral canina. (A) Linfonodo aumentado, (B) Estado nutricional magro, evidenciando costelas sob a pele, (C) Palidez nas mucosas orais e (D) Atrofia da musculatura temporal



1.2 Métodos imunológicos

No Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) a área de reativos para diagnóstico tem como objetivo e missão a produção de reagentes para diagnóstico para o fornecimento ao MS, oferecendo suporte na área de controle e diagnóstico de doenças infecto-contagiosas e melhorando assim, as ações do Sistema Único de Saúde (SUS) dedicados à população brasileira.

Os diagnósticos laboratoriais disponíveis a leishmaniose canina são os parasitológicos, molecular e sorológicos como a reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ensaio imunoenzimático (ELISA), imunocromatografia de duplo percurso (DPP), fixação do complemento e aglutinação direta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O teste de intradermoreação de Montenegro (IDRM) é teste diagnóstico complementar que utiliza extrato solúvel de parasitos mortos na face interna do antebraço e procede da avaliação da hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania sp* mediada por células T após 48 a 72 horas (MEDEIROS et al., 2005; KROLEWIECKI et al., 2017).

Muitos testes sorológicos utilizam antígenos de promastigotas obtidos de culturas e não purificados, o que pode comprometer a especificidade do teste por causa de reações cruzadas com outras espécies (DESJEUX, 2004). No entanto, hoje em dia, já se utiliza alguns testes com antígenos recombinantes para obtenção de um melhor resultado. O teste de aglutinação direta (DAT), foi desenvolvido, inicialmente para o diagnóstico da LV humana, esse teste é simples, porém requer um longo período de incubação (18 horas), o que pode ser fator limitante para seu uso (KAR, 1995).

A técnica Western blot é considerada a mais sensível e específica para detecção da LVC, que detecta anticorpos por meio de sua reação com determinados antígenos, esta técnica pode ser usada para diagnóstico da infecção e do parasitismo. (TALMI et al., 2006).

No Brasil utiliza-se como técnica de triagem para diagnóstico da *Leishmania* visceral a imunofluorescência indireta, que consiste em antígenos promastigotas de espécies do gênero *Leishmania* fixadas em lâminas e no qual são aceitos como resposta positivas as diluições dos soros partir de 1:80 (BRASIL, 2003). O teste considerado como confirmatório para a leishmaniose visceral canina é o ensaio imunoenzimático (ELISA) sendo um teste de fácil execução de leitura, que vem sendo utilizado em programas de controles e epidemiológicos (BRASIL, 2003).

Nos laboratórios centrais de saúde pública (LACENS), os dois testes citados Imunofluorescência indireta - Biomanguinhos (RIFI®) e ELISA® – (Kit EIE Leishmaniose Visceral Canina – Biomanguinhos são mais utilizados. Atualmente o MS, está indicando também o teste imunocromatográfico TR DPP® Leishmaniose Visceral Canina de Bio-Manguinhos como triagem e o ELISA® continua como teste confirmatório (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O teste rápido apresenta elevada sensibilidade nos cães sintomáticos (98%), já nos cães assintomáticos é mais baixa (47%) (GRIMALDI et al., 2012).

A partir de 1980 técnicas moleculares como a reação em cadeia polimerase (PCR), também passaram a ser utilizadas para diagnóstico da doença, isolando e identificando parasitos do gênero *Leishmania*, porém a sensibilidade do teste varia de acordo com a amostra testada. Embora a técnica seja menos invasiva, quando se utiliza amostras de sangue total a sensibilidade do teste é menor (LACHAUD et al., 2002).

Muitas vezes o tratamento da leishmaniose se dá com drogas antimonias, porém muito tóxicas para o paciente e algumas vezes causam resistências antimicrobiana. Além disso, é comum o paciente não cumprir o tratamento até o final, por causa do custo elevado dos medicamentos disponíveis, por isso seria muito importante além dos diagnósticos, o desenvolvimento de vacina para prevenção da leishmaniose.

A tentativa de obter uma vacina para humanos começou com a primeira geração de vacinas, em meados de 1940 que era composta de três subgrupos de parasitas mortos, antígeno de *Leishmania* fracionado e com patógenos atenuados vivos. A segunda geração de vacina inclui proteínas recombinantes, atingiu apenas a fase dois dos ensaios clínicos e a terceira geração representada por uma vacina de Ácido desoxirribonucleico (DNA) encontra-se hoje na fase dois do estudo clínico (MOAFI, 2019).

Nos dias atuais apenas as vacinas de uso veterinário contra LVC são utilizadas como medidas de controle e profilaxia, mesmo sendo uma tarefa desafiadora. Até o momento só existem três vacinas aprovadas para uso veterinário, uma no Brasil e duas na Europa, a do Brasil Leish-Tec®, baseada em proteína recombinante e as duas da Europa CaniLeish® secretada do antígeno de *L. infantum* e LetiFend®, composta por fusão de proteínas. Em relação a proteção e eficácia as três são semelhantes (MORENO, 2019).

Os conjuntos de insumos dos kits diagnósticos utilizam reações químicas, bioquímicas, imunológicas ou biológicas “*in vitro*”, para obter resultados de apoio às avaliações clínicas em pacientes. Essas reações são obtidas através de interações entre antígenos e anticorpos. Os antígenos são obtidos a partir de vírus, bactérias, fungos ou células.

Os reagentes para diagnóstico desempenham funções importantes para a saúde pública e na vigilância epidemiológica, por meio de identificação e monitoramento de doenças, e na avaliação da qualidade de sangue em Serviços de Hemoterapia (MEDEIROS, 2004). Os diagnósticos sorológicos baseiam-se na identificação de anticorpos, proteínas que reconhecem um antígeno de forma específica e com alta afinidade.

A especificidade de ligação ao antígeno é definida pela porção variável (Fab) da molécula, constituída pela união das regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve que constituem a imunoglobulina. As propriedades características da classe dependem da porção constante da cadeia pesada (CATELAN et al, 2008).

Atualmente o Ministério da Saúde (MS) preconiza o uso do ELISA, como o teste confirmatório para a doença leishmaniose (FUNED, 2015). O kit de ELISA utilizado para diagnóstico de leishmaniose visceral canina a todos Laboratórios de Rede Pública do país é produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos). Este Kit é controlado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e regulamentado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). O ensaio de ELISA baseia-se na capacidade de ligação do anticorpo a uma molécula específica, chamada de antígeno.

Como a interação antígeno-anticorpo nem sempre é evidenciada por um fenômeno visível, torna-se necessário a marcação dos anticorpos com compostos químicos definidos e detectáveis e que possam ser mensurados (VAZ, 2012). Este processo é chamado de conjugação. O conjugado anti-IgG canina é um dos componentes utilizados no kit de Ensaio Imunoenzimático (EIE) LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA (LVC), sendo um insumo de suma importância para resposta da reação neste kit (Figura 5).

Figura 5 - Kit de diagnóstico EIE LVC produzido por Bio-Manguinhos



Fonte: (Bio-Manguinhos, 2018).

O conjugado Peroxidase-IgG se liga ao anticorpo primário, que por sua vez está ligado à proteína-alvo (antígeno adsorvido a placa de ELISA ou presente em membrana de *western-blot* ou de *dot blot*). A detecção do complexo formado ocorre quando a peroxidase de raiz-forte (HRP) catalisa a reação de oxidação do substrato cromogênico 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina (TMB), após ser ativada pela água oxigenada, provocando uma mudança de cor (SCHUTZ et al., 1997).

O processo de conjugação da HRP com IgG pode ser realizado por reação HRP com glutaraldeído, por oxidação com metaperiodato de sódio, por formação de pontes dissulfeto ou por meio de quaisquer agentes ligantes para grupos amino ou tiol. Os conjugados com HRP formados nestes processos são mais estáveis e menores do que os conjugados com fosfatase alcalina ou com β -galactosidase em função do alto teor de glicosilação da HRP, que garante uma maior estabilidade da enzima (HERMANSON, 1996).

Esta metodologia de ligação produz um conjugado muito estável, desde que todos os grupos aldeídos gerados a partir da reação com metaperiodato de sódio, sejam completamente eliminados do conjugado pela reação de redução com borohidreto de sódio (NAKANE; KAWAOI, 1974).

1.3 Métodos de conjugação

Os conjugados podem ser obtidos a partir de anticorpos e enzimas, compostos fluorescentes como a fluoresceína ou ouro coloidal. A bioconjugação é um processo que gera uma ligação covalentemente estável entre duas ou mais moléculas que apresentam um alto grau de especificidade *in vitro* ou *in vivo* (HERMANSON, 1996).

Os processos químicos de conjugação envolvem a reação entre grupos funcionais (HERMANSON, 1996). O método de aminação redutiva foi empregado pela primeira vez para a obtenção de glicoconjugados, obtidos a partir da ligação da albumina sérica bovina (BSA) e o toxóide tetânico aos polissacarídeos meningocócicos (JENNINGS, 1981).

Uma das vantagens citadas para este método, está a de ser um meio direto de ligação entre oligossacarídeos e os grupamentos amino de proteínas. As enzimas são amplamente utilizadas para obtenção de bioconjugados químicos, pois permitem a detecção de componentes. A enzima conjugada com anticorpo pode ser usada para visualizar presença de antígeno. A opção pelo tipo de conjugação depende da estrutura química e da disponibilidade de grupos funcionais presentes nos oligossacarídeos e nas proteínas dependendo do conjugado

que se deseja obter.

Existem dois tipos de conjugação, a direta e a indireta. A única diferença entre elas é que na conjugação direta, o polímero é introduzido diretamente na estrutura da proteína, enquanto na conjugação indireta um espaçador hetero bifuncional é ligado primeiro à proteína para criar um intermediário reativo que posteriormente será conjugado com a segunda molécula (HERMANSON, 1996).

Os grupamentos aldeído e cetona são alvos importantes nas reações de conjugação, porém, como nem sempre estão presentes na estrutura de biomoléculas, podem ser gerados por reações específicas, o método mais simples de gerar grupamentos reativos em uma molécula polissacarídica é a reação de oxirredução com metaperiodato de sódio, um composto que cliva as ligações entre átomos de carbonos das unidades monossacarídicas que contenham hidroxilas vicinais, gerando aldeídos reativos.

Os aldeídos podem reagir com aminas primárias e secundárias, através da reação de desidratação formando base de schiff, podendo ser hidrolisada em meio aquoso, embora possui sua formação favorecida em condições alcalinas, a estabilidade no produto final não é garantida, portanto se torna necessário colocar essa base schiff quimicamente estabilizada através do método de aminaçãõ redutiva, em que se utiliza agentes redutores tais como cianoborohidreto e o borohidreto de sódio, este último é capaz de reduzir não somente os grupamentos aldeídos regenerando a hidroxila, como também a base schiff formando uma amina secundária. A necessidade dessas etapas está relacionada com a falta de grupamentos reativos na cadeia polissacarídica, por exemplo, que devem ser gerados, a fim de permitir o acoplamento com outras moléculas, tais como as imunoglobulinas (HERMANSON, 2008).

1.3.1 Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são formadas por um grupo de proteínas de origem animal – gama globulinas ou imunoglobulinas, produzidas por linfócitos B que se diferenciam em plasmócitos, capazes de agir como anticorpos específicos, sendo responsáveis pela imunidade humoral contra uma série de patologias. São chamadas de imunoglobulinas as proteínas que têm atividade de anticorpos e as que com elas têm relação antigênica (HERMANSON, 1996). As cinco classes de imunoglobulinas conforme mostrado na figura 6, estão divididas em:

- IgA, representa de 15 a 20% do total imunoglobulinas do soro; é dividida em subclasses, IgA 1 (90%) uma cadeia pesada tipo α que está presente no soro, enquanto a outra

parte IgA 2 (10%) predominam em secreções nasais, salivares e no leite.

- IgD, representa 1% do total das imunoglobulinas no soro, composta de cadeia pesada do tipo δ e está presente em grande quantidade nos linfócitos maduros.

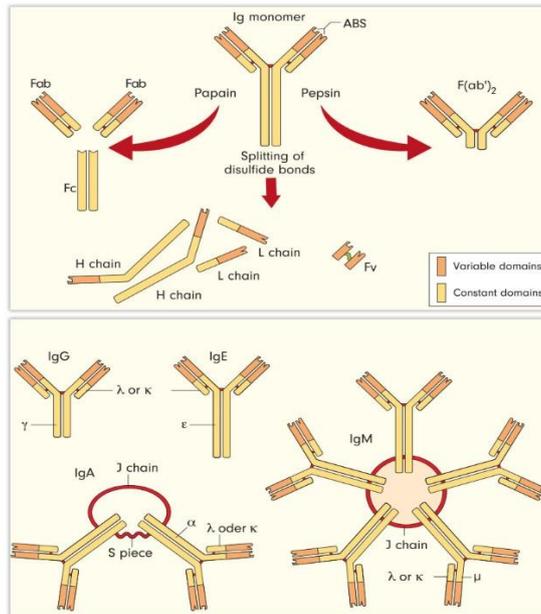
- IgE, representa menos de 1% do total das imunoglobulinas do soro, composta de cadeia do tipo ϵ , está presente em grande quantidade na membrana de mastócitos e basófilos.

- IgM, representa aproximadamente 10% do total das imunoglobulinas, composta de cadeia do tipo μ e é a imunoglobulina inicial das respostas imunes; atravessa a barreira placentária conferindo imunidade passiva ao feto.

- IgG é a principal imunoglobulina do soro, representando 70 a 75% do total das imunoglobulinas do soro, composta de cadeia pesada do tipo γ , e é a mais importante das respostas imunes secundárias sendo a única da classe antitóxica, e também atravessa a barreira placentária conferindo imunidade passiva ao feto (HARLOW, 1988). Embora as imunoglobulinas sejam estruturalmente homogêneas, ocorre algum grau de heterogeneidade molecular desses anticorpos, uma vez que são produzidos por múltiplos clones de células B. Esse processo de produção interfere na sequência dos aminoácidos das imunoglobulinas, e dependendo da resposta a ser desencadeada pode ocorrer resposta limitada, isto é reação cruzada, devido a múltipla especificidade dos diferentes epítomos antigênicos (HARLOW, 1988). Foi proposto que segmentos hipervariáveis também chamados de regiões determinantes de complementariedade (CDRs), formem o local de ligação do antígeno, que a especificidade do anticorpo seja determinada pela natureza de seus aminoácidos e que essas regiões é que determinam a especificidade do anticorpo (KABAT, 1970).

Dessas cinco classes o principal anticorpo utilizado para diagnóstico é a Imunoglobulina do tipo (IgG), que possui massa molecular igual a 150kDa, que estão envolvidas na resposta imune secundária, na qual seu aumento é mostrado nas respostas crônicas de doenças. Desta forma o conjugado anti-IgG marcado com a enzima peroxidase é utilizado em testes imunoenzimáticos de diagnósticos, devido à especificidade desses insumos às imunoglobulinas séricas aumentadas em determinadas patologias e como ferramentas na conjugação para os Kits de EIE anti-cão.

Figura 6 - Formas das Imunoglobulinas



Fonte: UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ, 2020.

1.3.2 Peroxidase raiz forte (HRP)

A enzima peroxidase é uma glicoproteína obtida da planta raiz forte *Azadirachta indica* cultivada em regiões temperadas e possui alto valor culinário (VEITCH, 2004). A massa molecular da HRP é aproximadamente 44 kDa, suas isoenzimas apresentam ponto isoelétrico de 3,0 a 9,0. A HRP é a enzima mais utilizada na conjugação com anticorpos secundários para a técnica de ELISA, esta técnica foi desenvolvida por ENGVALL et al., 1971.

As principais vantagens do uso da HRP em relação a outras enzimas são: grande variedade de substratos cromogênicos, substratos de baixo custo, maior estabilidade, e a possibilidade de ser conjugada com outras proteínas por diferentes formas de conjugação e produz conjugado estável (SCHUTZ et al., 1997).

A peroxidase se liga ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o complexo resultante [HRP H_2O_2] pode oxidar uma grande variedade de cromógenos doadores de hidrogênio. O pH ótimo da HRP dependerá do substrato utilizado, e pode variar entre 5,0 e 6,5, sendo que em pH 7,5 sua atividade máxima corresponde a 84%. A estabilidade das isoenzimas está na faixa de pH entre 5,0 a 9,0 (SCHUTZ et al., 1997). A peroxidase é utilizada para aumentar a detectabilidade de uma molécula alvo como uma proteína, com isso ela é utilizada nos ensaios imunoenzimáticos para a detecção de muitas doenças.

1.3.3 Ensaio imunoenzimático LVC

Os ensaios imunoenzimáticos são amplamente empregados para pesquisa de anticorpos e diagnósticos de muitas doenças, tais como a leishmaniose visceral e a leishmaniose visceral canina. O método EIE LVC se baseia na detecção de anticorpos contra *leishmania* em soro ou plasma de cães.

Os antígenos solúveis são extraídos da forma promastigota da *leishmania* previamente adsorvidos nas cavidades de microplacas de 96 poços, em seguida adicionam-se, os soros controles e amostras a serem analisadas que, possuindo anticorpos específicos se fixam aos antígenos. Logo após, ao adicionar uma anti-imunoglobulina canina marcada com HRP ocorre a ligação entre essa Ig conjugada e os anticorpos, caso estejam presentes.

Para detectar a reação, a enzima peroxidase liga-se ao peróxido de hidrogênio para oxidar os seus substratos e na presença de uma solução cromógena desenvolvem uma cor azul. Por último é adicionado o ácido sulfúrico que bloqueia a reação que adquire a coloração amarelada, em caso positivo (reagente). Após todas essas etapas, a leitura do ensaio é realizada em espectrofotômetro para microplacas equipado com um filtro de 450 nm. O teste de ELISA é amplamente utilizado devido à possibilidade de diagnóstico em larga escala e baixo custo (MENDES, 2013).

Existem outros testes de diagnósticos como os que utilizam punções esplênicas e de medula óssea que são invasivos e exigem ambientes apropriados para a coleta, não sendo viável para os diagnósticos individuais (SOARES, 2005; BOARINO *et al.*, 2005), e, portanto, não sendo um procedimento para estudos epidemiológicos. Os testes rápidos servem apenas para a triagem dos pacientes e o teste molecular tem alto custo financeiro. Por isso atualmente uma estratégia vem sendo desenvolvida para melhorar a produção do conjugado canino anti-IgG peroxidase (HRP) usado no Kit EIE/CVL produzido em Bio-Manguinhos, resultando em um kit mais específico e economicamente viável, já que é um kit utilizado em programas de controle epidemiológicos (BRASIL, 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Os reagentes para diagnóstico desempenham funções importantes para a saúde pública e na vigilância epidemiológica, por meio de identificação e monitoramento de doenças. (MEDEIROS, 2005). Nos kits baseados nos ensaios de ELISA, o conjugado representa um componente fundamental para a especificidade do teste.

Apesar das metodologias que culminam na produção dos conjugados de HRP com imunoglobulinas de cabra anti-IgG canina estarem bem definidas em Bio-Manguinhos, alguns controles de processo e de insumos, antes de chegar ao produto final não estão bem implementados e precisam ser revistos. Dentre os componentes a serem avaliados, o anticorpo e a peroxidase utilizada na produção de conjugados, representam um alvo primordial que precisam de um controle mais efetivo.

A produção dos conjugados de HRP com imunoglobulinas de cabra anti-IgG canina apresenta muitas variações lote a lote por não haver um melhoramento e controle desses lotes de conjugados internamente, o que afeta a especificidade, a reprodutibilidade e a qualidade do produto final. Portanto, a presente dissertação visa otimizar o processo de conjugação por meio da implantação de controle de processos da conjugação do anticorpo e da peroxidase, uma vez que as atividades biológicas e enzimáticas afetam diretamente na qualidade do conjugado, e por sua vez, o kit produzido.

A otimização na produção de conjugados trará altos níveis de especificidade, sensibilidade e estabilidade, além de garantir qualidade do produto e menor custo, inclusive evitará perdas no processo. Esta dissertação tem como proposta melhorar as respostas dos conjugados que são componentes primordiais no kit de EIE-LVC produzidos em Bio-Manguinhos.

O kit EIE LVC representa uma ótima alternativa no diagnóstico da leishmaniose visceral canina, devido a possibilidade de diagnóstico em grande escala, melhor leitura e interpretação dos resultados e por ser um teste confirmatório para o diagnóstico da LVC (INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS, 2019). A falta de controle mais rigoroso da Leishmaniose, resulta na eutanásia de cães sororreagentes. Assim, se faz necessário a busca por testes sorológicos que apresentem resultados acurados e válidos para o diagnóstico da LVC.

Além disso, a otimização desse procedimento traria uma importante contribuição para a diminuição dos gastos em Bio-Manguinhos, já que muitas vezes se gasta volume maior do conjugado do que seria de fato necessário. É importante ressaltar que hoje em dia é realizado

o controle de processo interno em Bio-Manguinhos, e um controle externo pela FUNED, mas apenas para o kit final.

Portanto esta dissertação visa a otimização no processo de conjugação para privilegiar as formas monoméricas da proteína, modificando alguns parâmetros de conjugação e monitoramento através da cromatografia de exclusão molecular e contribuirá para que se obtenha uma melhor especificidade da ligação da IgG com a peroxidase, contribuindo para melhor estabilidade do conjugado anti-IgG canina/peroxidase e uma otimização na qualidade do conjugado antes de chegar ao kit final.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Otimizar o processo de conjugação química entre a IgG de cabra anti-cão e a enzima peroxidase, componentes do *kit* diagnóstico EIE Leishmaniose Visceral Canina (LVC) visando a melhoria do produto final.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a estequiometria da reação de conjugação entre a imunoglobulina de cabra anti-cão e a enzima peroxidase;
2. Avaliar a influência do tempo de reação com borohidreto de sódio na formação do conjugado;
3. Utilizar a técnica de cromatografia de exclusão molecular para avaliação dos conjugados obtidos;
4. Utilizar ensaio imunoenzimático (ELISA) para caracterização imunológica dos conjugados obtidos.

4 METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Macromoléculas (LAMAM), na Seção de Insumos Conjugados e Apoio (SEICA) e Seção de Bactérias e Protozoários (SEPRO) do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos da Fiocruz.

4.1 Obtenção da IgG para conjugação

4.1.1 Obtenção de soro hiperimune

A partir de 2 animais previamente imunizados, o soro hiperimune foi obtido conforme diretrizes da produção de insumos do Departamento de Reativos de Bio-Manguinhos. Resumidamente, utilizou-se IgG canina comercial Rockland™ na diluição de 4mg/mL em solução salina 0,85% contendo adjuvante completo de Freud, inoculadas em animais de médio porte (caprinos).

As etapas seguintes da imunização desses animais foram realizadas com adjuvante incompleto de Freud. O esquema de imunização utilizado foi de três inoculações quinzenais e um reforço sete dias após a última inoculação. Após as imunizações foi realizada 50 mL de sangria teste para avaliação e titulação destes soros pelo método de imunodifusão radial simples, (OUCHTERLONY, 1958).

Os soros foram considerados satisfatório a partir do título de 1:32 (v/v), de acordo com documentos aprovados pela garantia da qualidade de Bio-Manguinhos e utilizados rotineiramente na área. Para realizar imunodifusão radial simples foram aplicados 3,5mL de gel de agarose (agarose 0,9% em solução tampão Prince, pH 7,6) em lâmina de vidro, após polimerização do gel, foram realizadas perfurações com auxílio de uma roseta de metal que apresenta um orifício central e seis orifícios formando um círculo ao redor. No orifício central foi aplicada a IgG comercial (4mg/ml), a mesma concentração utilizada para a inoculação dos animais nos demais orifícios foram aplicados o soro hiperimune puro sem diluição e nas diluições: 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 com PBS, após 24 horas foi realizada a leitura visual. Os soros aprovados foram estocados a -20°C até utilização.

4.1.2 Precipitação dos soros hiperimunes por sulfato de amônio

A precipitação é uma metodologia muito usada para processo de purificação de proteínas, em que ocorre alteração no meio que pode levar ao aumento da atração entre as moléculas do soluto que irão aglomerar de forma mais intensa e gerar agregados (PESSOA, 2005). O soro hiperimune foi inicialmente precipitado com sulfato de amônio, misturando o soro ao mesmo volume de sulfato de amônio 60% p/v. O sulfato foi adicionado por gotejamento lento e dentro do soro em banho de gelo e sob agitação. Após o gotejamento o soro processado é mantido em agitação e banho de gelo por mais 4 horas. Ao término da incubação, o material foi centrifugado a 1560 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* foi ressuscitado em água purificada para o volume inicial.

Na etapa seguinte foi realizada a segunda precipitação, porém a solução de sulfato de amônio utilizada foi de 90% p/v. O sulfato foi adicionado por gotejamento lento e dentro do soro em banho de gelo e sob agitação. Após o gotejamento o soro processado é mantido em agitação e banho de gelo por mais 4 horas. Ao término da incubação, o material foi centrifugado novamente, só que desta vez, com o *pellet* ressuscitado em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, em seguida foi realizada a quantificação de proteína do material obtido pelo método de absorção ultravioleta. O material foi acondicionado em freezer (-20°C).

4.1.3 Diálise das proteínas

Após descongelamento, as proteínas que foram parcialmente purificadas pela precipitação por sulfato de amônio, foram submetidas ao processo de diálise a fim de remover o excesso de íons sulfato. O volume de 1L foi adicionado em um sistema Amicon® (Merck, EUA) contendo uma membrana de celulose Millipore com corte de 100 kDa, conectado a um cilindro de nitrogênio, em banho de gelo.

A diálise foi realizada em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0, sendo monitorado a quantidade de saída de sal através de alíquotas 0,5 mL de material testada com a mesma quantidade de cloreto de bário 0,1M. Após toda etapa da diálise e sem a presença de sal, porções filtradas e retidas pelo sistema de ultrafiltração foram recolhidas para dosagem proteica e purificação.

4.1.4 Purificação das imunoglobulinas

O material proteico dialisado foi centrifugado a 3000g por 30 min a 4° C, submetido à cromatografia de troca iônica em uma coluna DEAE Sephacel XK50/60 cm (GE Healthcare-

XK50) com volume total de 900mL com limite de pressão do sistema, equilibrada com tampão de eluição A (Tris HCl 50 mM, pH 8,0), em um fluxo de 4 mL/min com limite estabelecido em 0,3MPa. A proteína de interesse foi deslocada em tampão de eluição B (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,18 M, pH 8,0), conforme GE HEALTHCARE, 2002; SILVA, 2004. A detecção das frações proteicas foi feita pelas leituras das absorvâncias a 220 nm e 280 nm (GE HEALTHCARE, 2002). Esta etapa cromatográfica foi efetuada em um sistema cromatográfico Pharmacia Biotech (HPLC/FPLC), em seguida o volume 1300mL do pool das frações obtidas de acordo com perfil cromatográfico, foram dialisados e concentrados no próprio sistema Amicon®

4.1.5 Quantificação de proteínas

A quantificação do pool de amostras obtidas após a eluição da coluna foi realizada pelo método de absorção ultravioleta, onde a DO obtida foi dividida pelo coeficiente de extinção da IgG 1,4 (PRESENTINI; TERRAN, 1995) e o valor encontrado foi multiplicado pelo fator de diluição 1:100, obtendo a concentração de proteínas existente por cada 1 mL do pool obtido. Nesta quantificação as leituras das frações reunidas foram realizadas utilizando DO a 280 nm.

4.1.6 Obtenção da IgG monomérica (Purificação da IgG)

O material proteico obtido por troca iônica, foi submetido à cromatografia de exclusão molecular preparativa, em uma coluna de Superdex 200 HR 30/10, foi efetuada em uma estação de trabalho da G&E Heathcare. A coluna foi equilibrada com solução tampão fosfato (PBS) 0,01M, pH 7,4, em um fluxo de 0,5mL/min com limite de pressão do sistema estabelecido em 1,5 MPa. Foi aplicado o volume de 100 µL da amostra. A detecção das frações proteicas foi feita pelas leituras das absorvâncias a 220 nm e 280 nm (GE HEALTHCARE, 2002).

4.2 Produção dos conjugados

4.2.1 Conjugação da IgG com HRP

Após a IgG anti-cão ter sido purificada, dialisada, concentrada e quantificada, foi realizada a produção de três grupos de conjugados designados como 1, 2 e 3, que foram subdivididos, como mostra a tabela 1. No grupo 1 a conjugação foi baseada na massa (p/v) – A: conjugado com estequiometria atual 45mg/mL de IgG conjugada com 22,5 mg/mL de HRP; B: 45mg/mL de IgG conjugada com 45mg/mL C: 45mg/mL de IgG conjugada com 11,3mg/mL. No grupo 2 a conjugação foi baseada na razão molar – D: conjugado com estequiometria atual - 0,3 μ M IgG: 0,5 μ M HRP; E: conjugado produzido do grupo 1, considerando a massa molecular das moléculas envolvidas - 0,3 μ M IgG:1 μ M HRP e F: estequiometria teste, diminuindo a razão entre IgG e HRP - 0,2 μ M IgG:1 μ M HRP. Grupo 3: baseada na estequiometria ajustada - G: conjugado com estequiometria atual 0,3 μ M IgG: 0,5 μ M HRP; H: conjugado produzido do grupo 2 - 0,2 μ M IgG:1 μ M e I: Teste monômero de IgG - 0,2 μ M IgG purificada: 1 μ M (tabela 1).

Tabela 1 – Relação de IgG/HRP utilizadas para obtenção dos subgrupos de conjugados

CONJUGADOS GRUPO 1	IgG	HRP
A (Com estequiometria atual)	45mg/mL	22,5mg/mL
B (Estequiometria teste)	45mg/mL	45mg/mL
C (Estequiometria teste)	45mg/mL	11,3mg/mL
CONJUGADOS GRUPO 2		
D (Com estequiometria atual)	0,3 μ M	0,5 μ M
E (conjugado grupo 1)	0,3 μ M	1 μ M
F (Estequiometria teste)	0,2 μ M	1 μ M
CONJUGADOS GRUPO 3		
G (Com estequiometria atual)	0,3 μ M	0,5 μ M
H (conjugado do grupo 2)	0,2 μ M	1 μ M
I (Teste monômero de IgG)	0,2 μ M	1 μ M

Fonte: A autora, 2020.

4.2.2 Reação de oxidação da peroxidase

A primeira etapa do processo de produção dos conjugados é o preparo de uma solução de metaperiodato de sódio (NaIO_4) (Sigma Aldrich) 0,1 M diluído em água purificada no volume final desejado, que foi suficiente para atender a relação de $25\mu\text{L}/\text{mg}$ de proteína. O metaperiodato foi adicionado à peroxidase comercial (Tipo VI, Sigma Aldrich) que já havia sido diluída em 1 mL de água purificada e em seguida esses dois insumos foram incubados por 20 minutos em temperatura ambiente e sem agitação, para que ocorresse reação de ativação. Após essa incubação o volume de solução utilizada para cada conjugado foi submetido a cromatografia SephadexTM G-25 (Colunas PD-10, GE Healthcare), foram previamente preparadas 3 colunas equilibradas por gravidade com 30 mL da solução acetato de sódio 1mM pH 4,4, em seguida o volume inicial de 3 mL foi desprezado e o volume de 2,5 material de interesse foi eluído de cada coluna, coletado e protegido da luminosidade.

Em seguida foi verificado o pH da solução e ajustado para pH entre 9,0-9,5 utilizando a solução carbonato/bicarbonato 1M (NAKANE; KAWAOI, 1974). Alíquotas de 1mL IgG foram descongeladas, preparada a concentração ideal para cada conjugado e adicionadas à solução (peroxidase ativada com metaperiodato), que já estava em pH básico, em seguida colocada em agitação lenta no agitador orbital por duas horas em temperatura ambiente. Após o tempo de reação, foi adicionado em cada conjugado 0,1M de borohidreto de sódio (NaBH_4) (Sigma Aldrich) diluído em água purificada no volume final desejado, que foi suficiente para atender a relação de $12,5\mu\text{L}/\text{mg}$ de proteína. Foi realizada mais 2 horas de incubação, desta vez sem agitação numa faixa de temperatura entre 4 a 8 °C.

Ao término da reação os conjugados foram aplicados em outras seis colunas PD 10 (utilizadas 2 para cada conjugado), desta vez equilibradas por gravidade, com a solução fosfato de sódio salina (PBS 0,01M), pH 7,2 para remoção dos compostos de baixo peso molecular. O volume de cada conjugado anti-IgG de cão obtido foi calculada de acordo com o coeficiente de extinção molar de 1,40 e o da peroxidase de 2,5 (PRESENTINI; TERRAN, 1995).

4.2.3 Diluição do conjugado

Cada 5 mL de conjugado foi diluído 1:5 em de PBS/Glicerol 70%, que foi preparado anteriormente e avaliado pelo controle de qualidade de Bio-Manguinhos. O controle de qualidade avaliou a densidade na faixa entre 1,00g/mL a 1,20g/mL e pH na faixa

de 7,0 a 7,9, após a aprovação dentro destas faixas e liberação do laudo seguimos para etapas posteriores. Os conjugados foram incubados, sob agitação em PBS/glicerol 70% por no mínimo 18 horas, em temperatura de 4°C. Após esse período foi armazenado em freezer -20°C, para análises posteriores.

4.3 Produção dos “mini” conjugados

4.3.1 Preparo “mini” conjugados

Em virtude da escassez do insumo peroxidase para utilizar no processo de conjugação, optamos por produzir conjugados com quantitativos menores, mantendo a relação previamente escolhida. Onde Grupo 4: mini conjugados J: conjugado obtido do grupo 2 com 0,2µM IgG :1µM HRP; K: conjugado obtido do grupo 3 com 0,2µM IgG purificada (monômero):1µM HRP e L teste tempo de conjugação com 0,2µM IgG purificada (monômero):1µM HRP utilizando menor tempo de reação (tabela 2).

Tabela 2 – Relação de IgG/HRP utilizadas para obtenção dos “mini” conjugados

MINI CONJUGADOS GRUPO 4	IgG	HRP
J (conjugado do grupo 2)	0,2µM	1 µM
K (conjugado do grupo 3)	0,2µM	1 µM
L (Teste tempo de conjugação)	0,2µM	1 µM

Fonte: A autora, 2020.

4.3.2 Reação da oxidação HRP no “mini” conjugado

Esta etapa foi preparada conforme item 4.2.2 com algumas modificações. O 100uL de metaperiodato foi adicionado à peroxidase que já havia sido diluída em 0,5 mL de água purificada e em seguida esses dois insumos foram incubados por 20 minutos em temperatura ambiente e sem agitação, para que ocorresse reação de ativação. Após essa incubação a solução foi submetida a cromatografia em SephadexTM G-25 (PD-10, GE Healthcare), previamente 3 colunas foram equilibradas por gravidade, com 30mL da solução acetato de sódio 1mM pH 4,4, em seguida o volume inicial de 3,0 mL foi desprezado e o volume de 2 mL de material de interesse foi eluído de cada coluna, coletado e protegido da luminosidade.

Em seguida foi verificado o pH da solução e ajustado para pH entre 9,0-9,5 utilizando a solução carbonato/bicarbonato 1M. Após o tempo de reação, foi adicionado em cada conjugado borohidreto de sódio na concentração de 0,1M diluído em água purificada no volume final desejado, que foi suficiente para atender a relação de 12,5 μ L/mg de proteína, por mais duas horas de incubação, desta vez sem agitação numa faixa de temperatura entre 4 a 8 °C, todo esse processo utilizado apenas para os conjugados do Grupo 4 (J e K), já para o “mini” conjugado (L) tempo menor, realizamos a incubação com o (50 μ L) borohidreto de sódio em apenas 1 hora. Ao término da reação, os conjugados foram aplicados em outras 3 colunas PD 10 (utilizadas 1 para cada conjugado), desta vez equilibradas previamente com a solução fosfato de sódio salina (PBS 0,01M), pH 7,2 para remoção dos compostos de baixo peso molecular.

4.3.2 Diluição dos “mini” conjugados

Cada conjugado foi diluído em 1/6 em PBS/Glicerol 70%, e incubado sob agitação, por 18 horas em temperatura 4°C, de acordo com item 4.2.3. Após esse período foi armazenado em freezer -20°C.

4.4 Avaliação dos conjugados obtidos

4.4.1 Cromatografia de exclusão molecular (SEC)

A cromatografia de exclusão molecular separa macromoléculas em função das dimensões moleculares. A coluna cromatográfica (fase estacionária) é constituída por uma matriz com poros de determinado diâmetro. Durante o processo cromatográfico, as moléculas de menor tamanho são capazes de entrar nos poros da matriz fazendo um percurso maior do que as moléculas de maior tamanho (SILVA JR, 2004).

Os conjugados obtidos de todos os grupos (com exceção dos “mini” conjugados) foram submetidos à cromatografia de exclusão e peneiração molecular preparativa, em uma coluna de Superdex 200 HR 30/10, foi efetuada em uma estação de trabalho da G&E Heathcare. A coluna foi equilibrada em tampão PBS, a uma velocidade de fluxo de 0,5 mL/min com a pressão limite estabelecida de 1,5 Mpa. Foi aplicado o volume de 100 μ L para as amostras. A detecção das frações proteicas foi feita pelas leituras das absorvâncias a 220,

280 e 403 nm (GE HEALTHCARE, 1993). Em virtude da concentração dos “mini” conjugados produzidos, estes só foram avaliados em testes imunológicos.

Nesta mesma coluna foi feita a estimativa de massa molecular da proteína na forma nativa a partir do emprego de um conjunto de padrões protéicos de peso molecular conhecido (GE HEALTHCARE, 1999). Uma solução de Blue Dextran (PM 2.000.000) foi também submetida à cromatografia em condição igual às usadas para os conjugados e as proteínas padrões. No caso, além da determinação de V_e/V_0 (volume de eluição/volume de exclusão), efetuou-se o cálculo de K_{av} (coeficiente médio de distribuição) cujo valor é expresso pela relação $(V_e - V_0) / (V_t - V_0)$, onde V_t é o volume total da coluna (*bed*). A detecção das frações protéicas foi feita pelas leituras das absorvâncias a 220 nm dos efluentes da coluna de exclusão molecular (GE HEALTHCARE, 1993).

4.4.2 Ensaio de ELISA

4.4.2.1 Titulação dos conjugados

O modelo utilizado foi o ELISA indireto com $n = 9$ para cada conjugado e o mesmo número de repetições para cada diluição. Cada 150 μ L da mistura de antígenos obtida da fração do citosol do parasito *Leishmania major like* foi adsorvido em microplacas de ELISA pertencentes a SEPRO frente a painéis sorológicos interno já padronizados em Bio-Manguinhos.

Foram realizados 7 testes de ELISA para a escolha da melhor diluição dos conjugados anti-cão marcados com HRP obtidos. Nos testes foram utilizadas as diluições 1:40.000, 1:60.000 e 1:80.000 dos conjugados testados frente ao antígeno alvo e contra os soros controles positivos e negativos para leishmaniose visceral canina, previamente testados e aprovados pelo controle de qualidade de Bio-Manguinhos e caracterizados por exames clínico, epidemiológico, parasitológico e sorológico para LVC.

Cada diluição foi realizada da seguinte forma: foi preparado alíquotas dos soros caninos positivo, negativo e sem soro ao qual serve para bloqueio e em cada poço da placa e colocados em estufa à 37°C por 30 minutos. Após essa incubação foi realizada 6x a lavagem com a solução tampão de lavagem (cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico e monobásico, tween 20 pH 7,0) na lavadora de placa da marca Bio Tek Elx405™ para retirada do material não adsorvido.

Após essas lavagens foi preparado alíquota de cada conjugado com sem soro (SS) que é diluente da amostra/conjugado numa diluição 1:1000 e da estequiometria atual (conjugado comercializado no kit de Bio-Manguinhos). Em seguida desta solução foi retirada uma alíquota dos conjugados que queríamos ajustar, para que no final cada um ficasse na concentração 1:40.000, 1: 60.000 e 1: 80.000. Foram aplicados 100 µL dos conjugados anti-cão marcados com HRP em cada poço da placa e procedeu-se uma outra incubação à 37°C por 30 minutos. Uma nova lavagem foi feita na lavadora de placa Bio Tek ELx 405™ para retirada dos anticorpos livres.

Após essa etapa, foi aplicado 100 µL do peróxido de hidrogênio (H₂O₂ a 10%) e do cromógeno Tetrametilbenzidina (TMB a 1%) incubado por 30 minutos com ausência de luminosidade e em temperatura ambiente, reação foi interrompida com 50µL com ácido sulfúrico 2M. As densidades ópticas foram determinadas a 450 nm em um leitor de microplacas Magelan™ da marca Tecan.

Para a validação do ELISA buscou-se a melhor concentração de análise dos resultados dos conjugados utilizados, com base nas especificações descritas na bula/manual do kit comercial, que preconiza, para aceitação do ensaio, os valores de DO $\geq 0,500$, para soro controle positivo e valores no intervalo $\geq 0,050$ DO $\leq 0,120$ para o soro controle negativo.

Além disso levou-se em consideração a especificação que descreve as condições para aceitação dos controles do teste: a DO obtida nos poços da placa onde foi adicionado o sem soro (SS), não poderia ser superior a 1,5 x DO obtida nos poços onde foi adicionado o soro controle negativo. Abaixo representação esquemática do teste de ELISA (tabela 3).

Tabela 3 - Representação esquemática do um teste de ELISA para a titulação dos conjugados. Foram realizados em triplicata onde: coluna 1 refere-se a diluição do conjugado 1:40.000, coluna 2 a diluição do conjugado 1:60.0000 e coluna 3 a diluição do conjugado 1:80.0000. CP – controle positivo, CN – controle negativo e SS – reação sem soro

	1			2			3		
	40.000	40.000	40.000	60.000	60.000	60.000	80.000	80.000	80.000
A	CP								
B	CP								
C	CP								
D	SS								
E	SS								
F	CN								
G	CN								
H	CN								

Fonte: A autora, 2020.

4.4.2.2 Padronização dos conjugados

A eficiência dos conjugados referente aos grupos 1, 2 e 3, foi avaliada após a padronização da diluição. Os conjugados foram padronizados através do ensaio do ELISA indireto, $n = 9$ com três repetições em triplicata dos soros positivos e negativos de cada conjugado.

Esta eficiência foi identificada frente a 150 μL da mistura de antígenos obtida da fração do citosol do parasito da *Leishmania major like*, contra soros positivos e negativos pertencentes a SEPRO frente a painéis sorológicos interno já padronizados em Bio-Manguinhos. Em nossos ensaios as microplacas foram sensibilizadas anteriormente com misturas de antígenos e estocadas em temperatura -20°C até o momento do uso. A avaliação imunológica através do teste de ELISA indireto com os 3 grupos de conjugados, foi realizada segundo a mesma metodologia do item 4.4.2.1.

4.4.2.3 Ensaio imunoenzimático dos “mini” conjugados

A eficiência dos “mini” conjugados referentes ao grupo 4, foram padronizados através do ensaio do ELISA indireto, $n = 9$ com três repetições em triplicata dos soros positivos e negativos de cada conjugado. Cada mistura de antígenos do parasito da *Leishmania major like* foi anteriormente sensibilizada. Nesta etapa os “mini” conjugados foram avaliados segundo a mesma metodologia do item 4.4.2.1.

4.4.3 Análise estatística

Foi analisado um estudo estatístico de cada conjugado obtido do ELISA indireto. Foi verificado a homogeneidade das médias das amostras positivas. Os resultados dos testes foram avaliados através do método estatístico qui-quadrado que é um teste de hipótese que se destina encontrar um valor de dispersão, que verifica se existe diferença entre o valor observado e o valor esperado. Esse teste verifica se a frequência com que um determinado acontecimento observado em uma amostra se desvia significativamente ou não da frequência com que é esperado.

Os dados foram compilados no programa Microsoft Excel 2013. A estatística do conjugado J (“mini” sem purificar), do conjugado K (“mini” monômero) e do conjugado L

(“mini” monômero menor tempo), foram avaliados pela média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação dos resultados positivos. Os resultados foram expressos em unidade arbitrária (UA= média do soro positivo/ponto de corte do método; ponto de corte= média do soro negativo + 2 x desvio padrão) (SANTOS, 2012).

5 RESULTADOS

5.1 Soro hiperimune de cabra anti-IgG canina

O título do soro hiperimune obtido anteriormente a partir da imunização de caprinos com IgG canina comercial, foi determinado pelo método de imunodifusão radial simples. Por leitura visual, foi evidenciado linhas de precipitação entre o complexo antígeno x anticorpo utilizando título 1:32 (OUCHTERLONY, 1958).

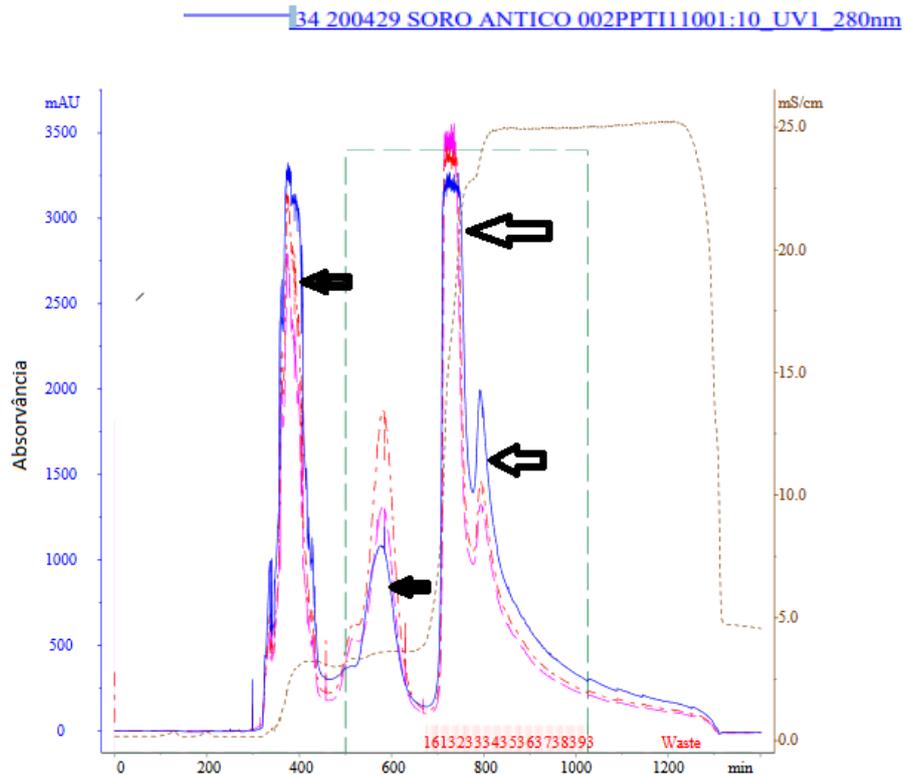
5.2 Purificação do soro hiperimune em cromatografia DEAE-Sephacel

Foi aplicado 200 mL de soro hiperimune em coluna empacotada com resina DEAE Sephacel previamente equilibrada. Foram obtidos 4 picos proteicos. Apenas um deles corresponde ao material que não interagiu com a coluna cromatográfica (pico não ligado). Os 3 outros picos obtidos foram eluídos no gradiente salino. Os 2 últimos foram reunidos, a partir de observações anteriores da presença de imunoglobulina (volume total de 14mL).

Para realizar o fracionamento das proteínas anti-IgG canina foi utilizado o tampão de eluição, sendo coletados 14mL de frações por tubo. As frações obtidas contendo anti-IgG canina foram reunidas em uma única fração, dialisadas e concentradas para posterior quantificação, conforme Figura 7.

Figura 7 - Perfil da cromatografia de Troca iônica (900mL), a 280nm, em solução Tris 0,05M pH 8,0. As setas pretas correspondem aos dois picos não ligados e as setas brancas os dois picos ligados na coluna

Perfil da cromatografia de troca iônica DEAE-Sephacel



Fonte: A autora, 2020.

5.3 Quantificação pela determinação de absorvância

A estimativa da dosagem proteica correspondente à da imunoglobulina foi obtida pelo método de absorção no ultravioleta, após etapa de purificação. Nesta quantificação as leituras são realizadas o seguinte cálculo: concentração da IgG: $(0,630(DO) / 1,40) \times 100$ (fator de diluição) com a concentração final estimada foi de 45mg/mL com volume de 50mL.

5.4 Análise do perfil dos conjugados por SEC

Foram analisados os perfis cromatográficos dos conjugados como também da imunoglobulina (IgG), da HRP e padrões moleculares para comparação nos perfis dos cromatogramas. Após esses resultados verificamos que a massa molecular encontrada para os picos iniciais de cada conjugado estava saindo no volume morto da coluna. A massa

molecular encontrada para o primeiro conjugado mostrou pico proteico fora da faixa de separação de massa molecular da coluna, de acordo com a solução de Blue Dextran (PM 2.000.000) submetida à cromatografia em condição igual às usadas para os conjugados e as proteínas padrões, isto leva a entender que o conjugado estava com muito agregado e, portanto, o tempo de retenção da IgG e do conjugado na coluna se tornou bem mais rápido.

Na SEC observamos conforme esperado, que o conjugado foi eluído primeiro, em seguida imunoglobulina e logo após a peroxidase. A imunoglobulina e a peroxidase apresentam massa molecular de 150kDa e 44kDa respectivamente. A massa do conjugado apresentou 190 kDa após a IgG purificada de acordo com os valores dos padrões de peso molecular da coluna, já a massa da imunoglobulina foi compatível com padrão Aldolase (MM= 158kDa) e a massa da peroxidase ficou entre os padrões de conalbumina (MM= 75kDa) e ribonuclease (MM= 13,7kDa) de acordo com ($R^2 = 0,9857$). Devido a SEC ser uma técnica não desnaturante, foi evidenciado pico proteico da imunoglobulina na sua forma nativa, na qual deve apresentar-se em sua forma multimérica, sendo comum em muitas proteínas, ela apresenta em sua forma nativa contendo quatro subunidades protéicas ou cadeias polipeptídicas.

5.5 Análise cromatográfica dos conjugados do grupo 1

A figura 8 mostra o conjugado A: estequiometria atual (condição original de conjugação), sobreposto ao perfil da imunoglobulina. Foi verificado a presença de um pico majoritário com volume de eluição similar ao agregado da imunoglobulina (<669 kDa), de acordo com padrão de massa molecular previamente utilizado para calibrar a coluna Superdex 200 HR 30/10.

Foi observado ainda, a presença de dois picos minoritários, com massa molecular de 300 kDa (dímero da IgG) e 150 kDa (monômero da IgG), o que pode representar a presença da imunoglobulina livre no conjugado (figura 8). Utilizando massa (mg) igual de imunoglobulina e HRP (conjugado B), a seguir observa-se o perfil cromatográfico com a presença de um pico único de proteína, porém ainda com alto peso molecular, e sem apresentar a forma monomérica da molécula de IgG.

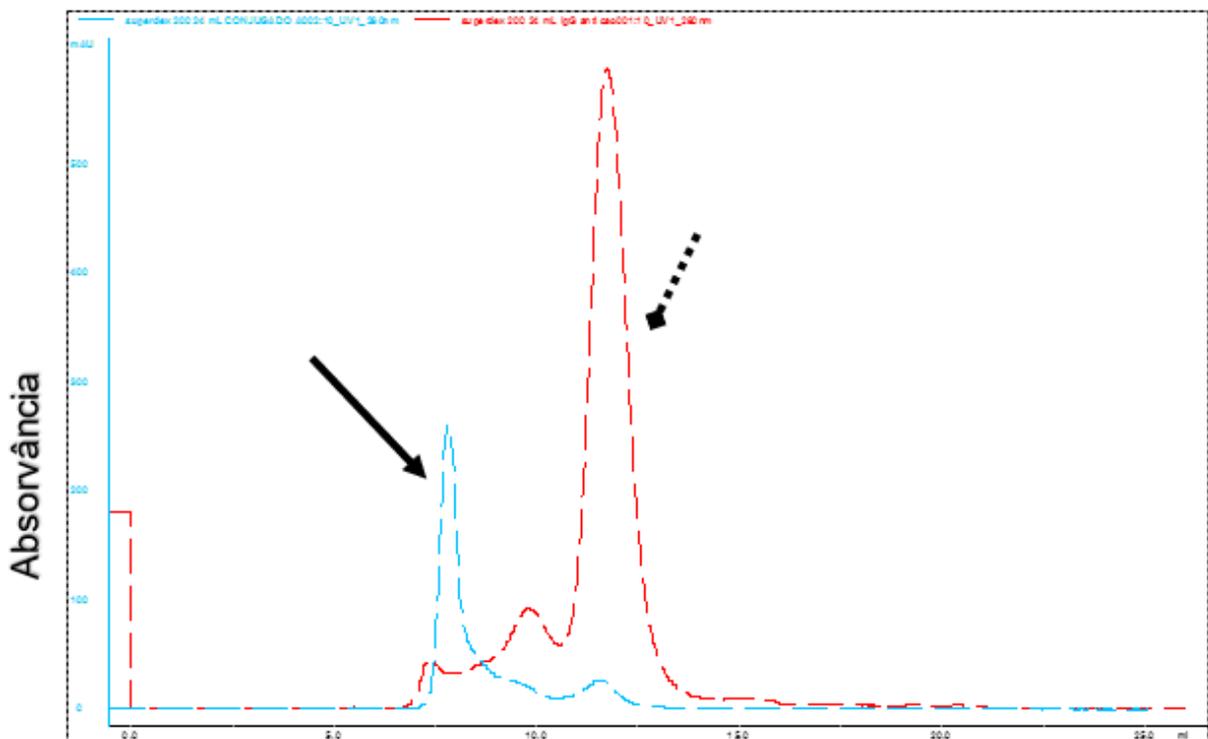
Apesar de ter sido verificado menos sobras de HRP e de IgG livres (figura 9), o perfil referente ao conjugado C, mostrou sobra de IgG livre, conforme mostrada na figura 10. Na figura 11 foi observado os perfis dos controles da IgG (150 kDa) e HRP (44 kDa) sobrepostos

aos conjugados do grupo 1.

Comparado com os conjugados do grupo 1, o conjugado B apresentou perfil cromatográfico que pode representar um conjugado mais eficiente, uma vez que mostra uma menor sobra de insumos livres, apesar de mostrar um conjugado com alta massa molecular, o que indica necessidade da busca de uma estequiometria mais eficiente entre imunoglobulina e HRP.

Figura 8 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao conjugado A (estequiometria atual) e seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL

Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 1 conjugado A (45mg/mL IgG: 22,5mg/mL HRP)

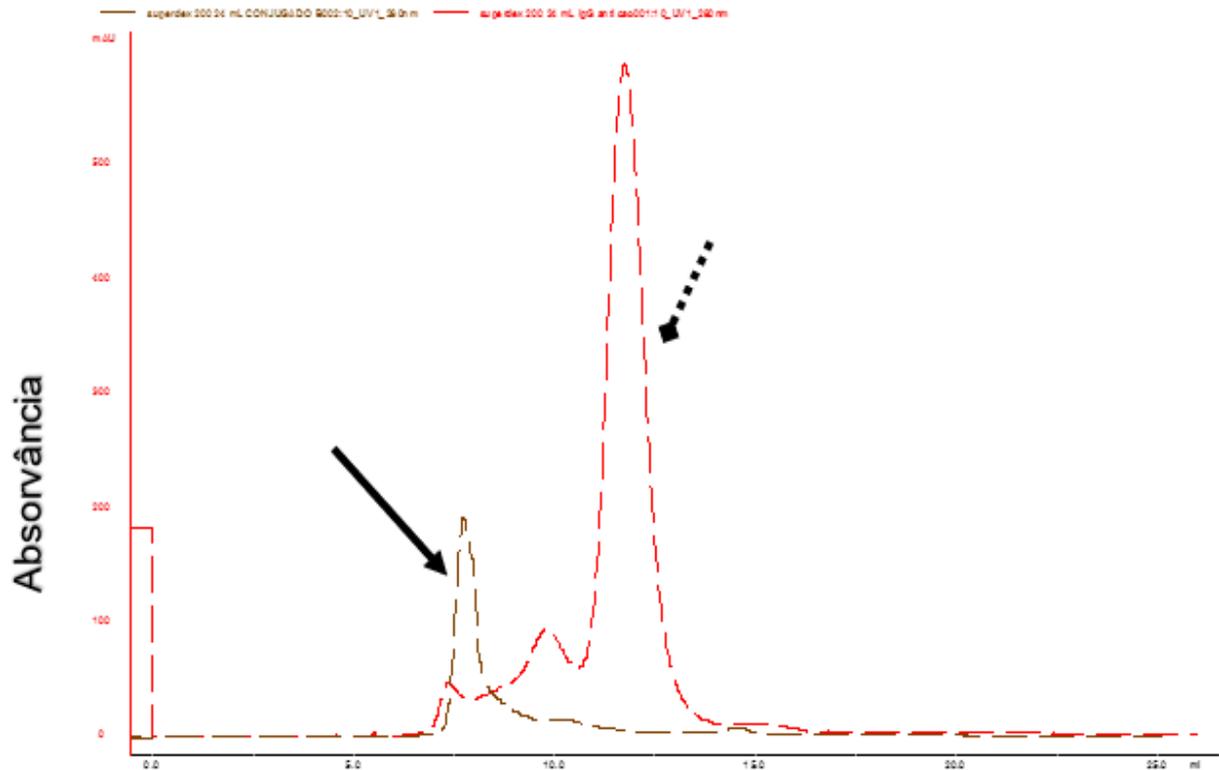


Fonte: A autora, 2020.

Figura 9 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao

conjugado B (estequiometria teste) e seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL

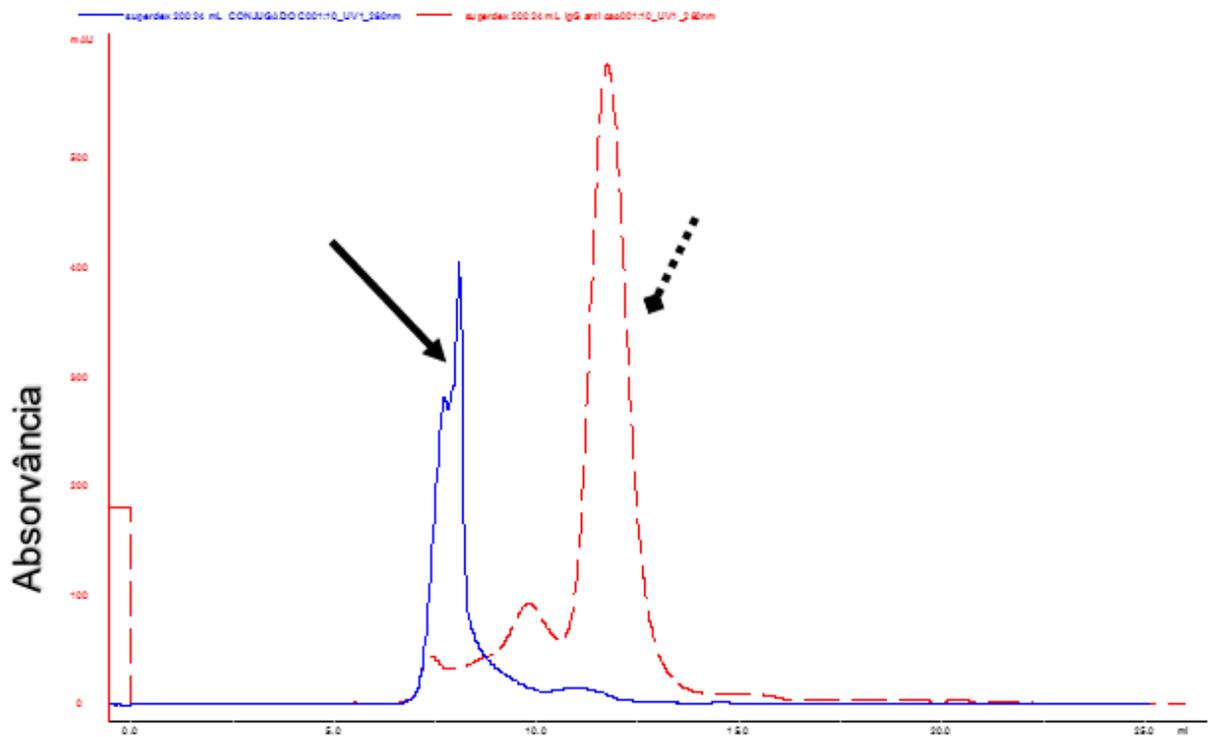
Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 1 conjugado B (45mg/mL IgG: 45mg/mL HRP)



Fonte: A autora, 2020.

Figura 10 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao conjugado C (estequiometria teste) e seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL

Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 1 conjugado C (45mg/mL IgG:
11,3mg/mL HRP)

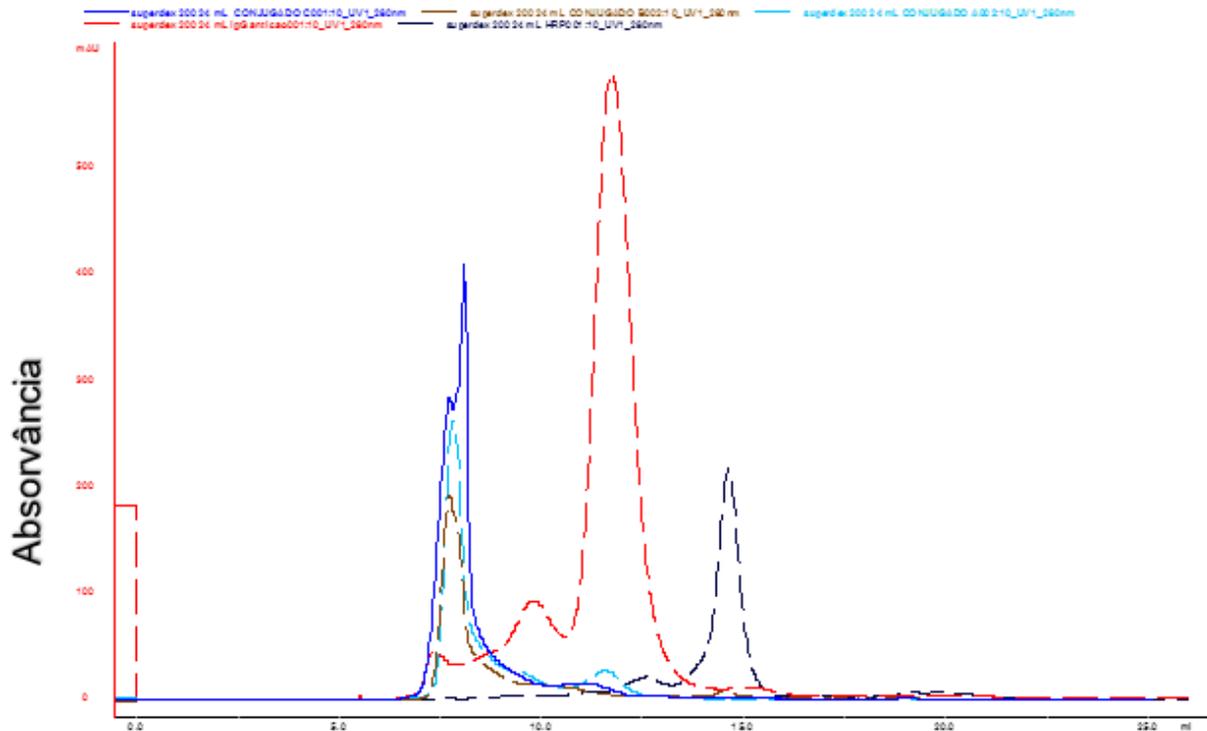


Fonte: A autora, 2020.

Figura 11 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. Linha cor vermelha IgG; Linha cor azul claro conjugado A;

Linha cor marrom conjugado B e Linha cor azul escuro conjugado C; linha preta HRP.
Volume de aplicação 100uL

Perfil da cromatografia de exclusão molecular com sobreposição dos conjugados do grupo 1



Fonte: A autora, 2020.

5.5.1 Teste de ELISA dos conjugados do grupo 1

No ensaio de ELISA indireto foi utilizado um $n = 9$ para soro positivo, soro negativo e sem soro (SS) de cada conjugado. De acordo com o preconizado no manual de instruções que acompanha o *kit* EIE-LVC comercial, as absorvâncias estavam de acordo para aceitação do ensaio, com os valores de $DO \geq 0,500$ para controle positivo e valores no intervalo $0,050 \leq$ $0,120$ para o controle negativo.

E de acordo com os valores obtidos, o conjugado B apresentou os melhores resultados conforme demonstrado na tabela 4, o que corrobora com os dados obtidos pela cromatografia, e os valores de DO da tabela as médias revelaram que o conjugado B apresentou maior DO para o controle positivo, menor DO para o controle negativo e (SS), conforme figura 12.

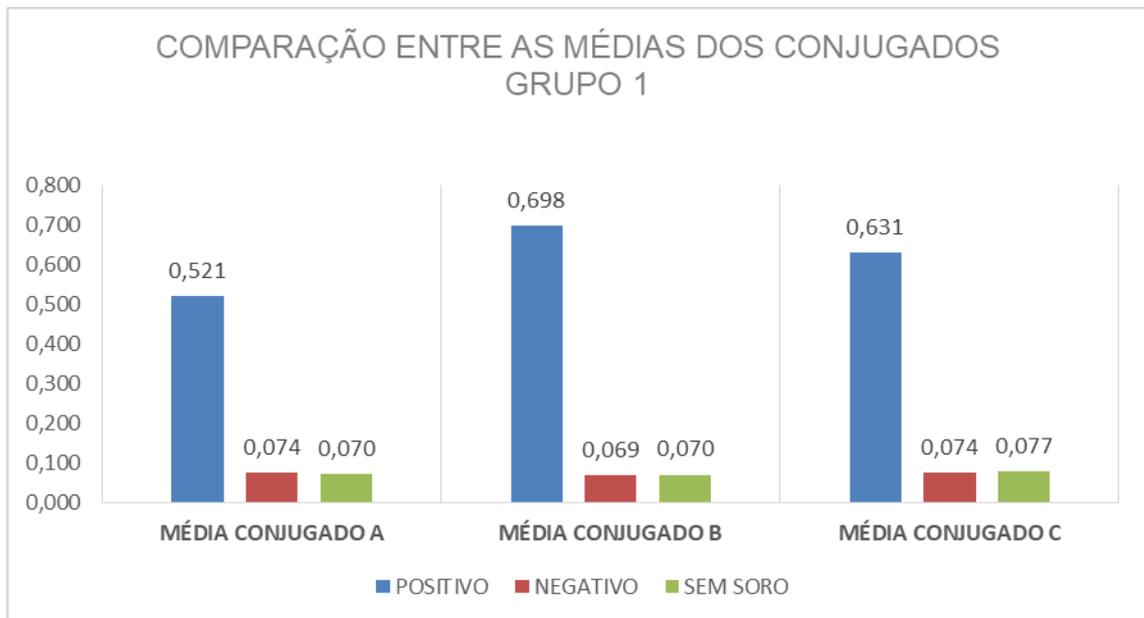
Tabela 4 – Resultado do desvio padrão referente aos conjugados do grupo 1

CONTROLES	CONJUGADO A - DP	CONJUGADO B - DP	CONJUGADO C - DP
POSITIVO	0,130	0,186	0,183
NEGATIVO	0,003	0,001	0,010
SS	0,007	0,006	0,016

Legenda: Conjugado A (estequiometria atual): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão; conjugado B (estequiometria teste): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão e conjugado C (estequiometria teste): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 12 – Valores das médias de DO dos conjugados do grupo 1



Conjugado A (estequiometria atual): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS); conjugado B (estequiometria teste): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS) e conjugado C (estequiometria teste): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS). Leitura de absorvância determinada a 450 nm.

Fonte: A autora, 2020.

5.6 Análise cromatográfica do conjugado do grupo 2

Após análise do resultado anterior, conforme figura 8, seguimos para os experimentos de conjugação, baseados na razão molar. Considerando a massa molecular da imunoglobulina de 150 kDa e de HRP 44kDa, o conjugado D foi preparado na relação 0,3 μM de IgG para 0,5 μM HRP, que é atual relação utilizada.

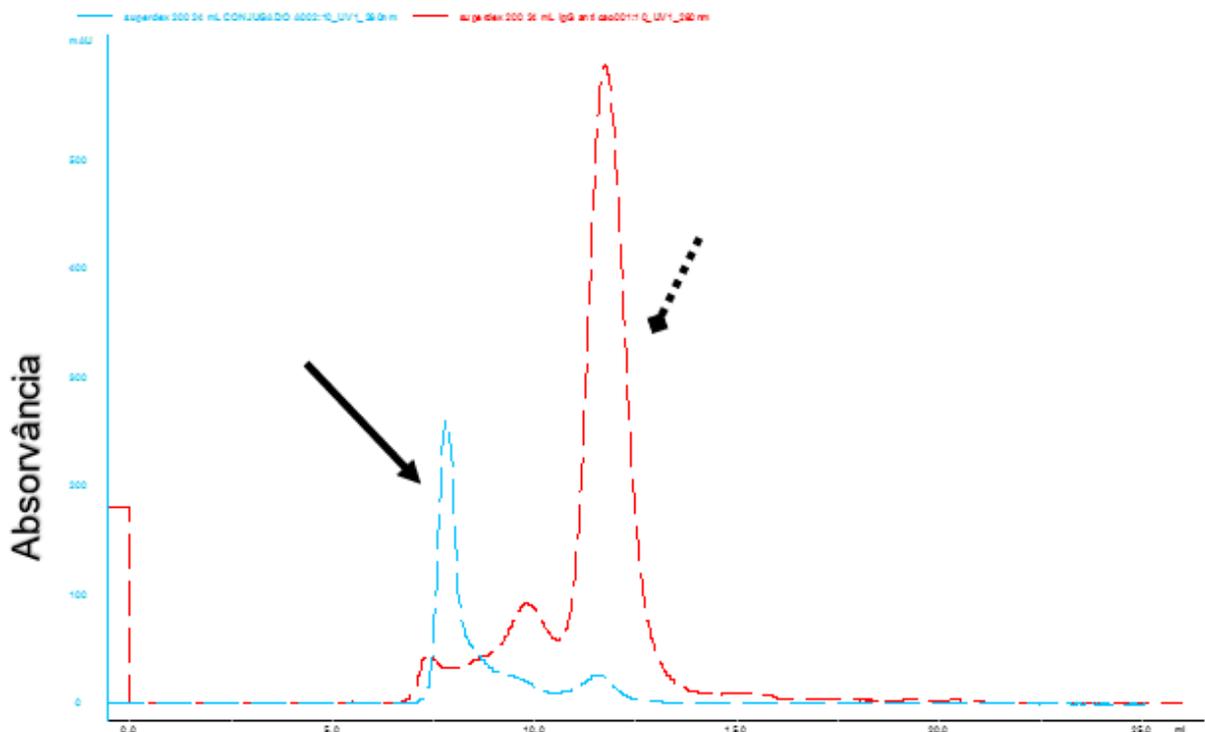
No conjugado E utilizamos o dobro da quantidade de HRP, portanto 0,3 μM de IgG para 1,0 μM HRP e no conjugado F diminuimos mais ainda a relação de IgG/HRP (0,2 μM de

IgG para 1,0 μ M HRP. A análise cromatográfica mostra claramente que no conjugado D há uma sobra de IgG livre, além de apresentar conjugado de alto peso molecular (figura 13). O conjugado E apesar de ainda apresentar um conjugado de alto peso molecular, verifica-se uma diminuição de IgG livre (figura 14).

Foi possível observar no conjugado F a presença de um único pico proteico, referente ao conjugado, com massa molecular de aproximadamente 300kDa de acordo com a curva de calibração que demonstrou ($R^2= 0,9857$), o que representa uma estequiometria mais ajustada ao processo, onde não há presença de IgG nem HRP livres na figura 15. A figura 16 mostra os 3 conjugados do grupo 2 sobrepostos e comparados aos perfis de IgG e HRP padrão.

Figura 13 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao conjugado D (estequiometria atual) e seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL.

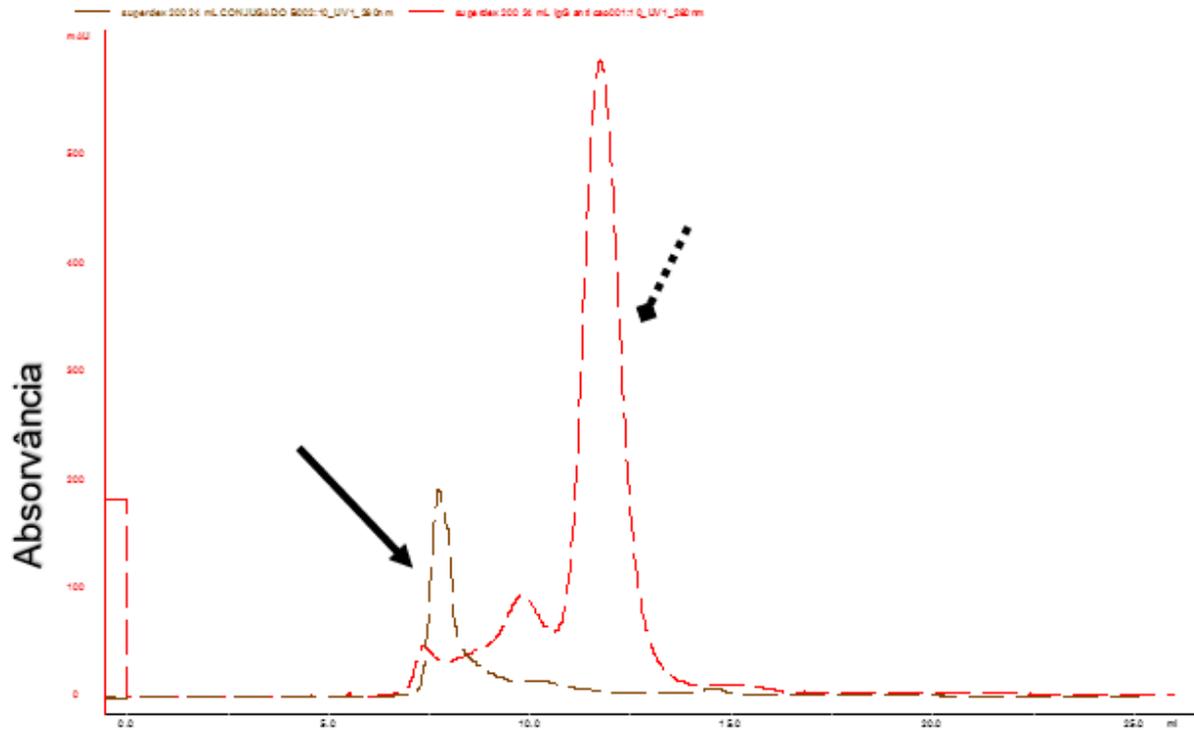
Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 2 conjugado estequiometria atual



Fonte: A autora, 2020.

Figura 14 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao conjugado E e a seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL

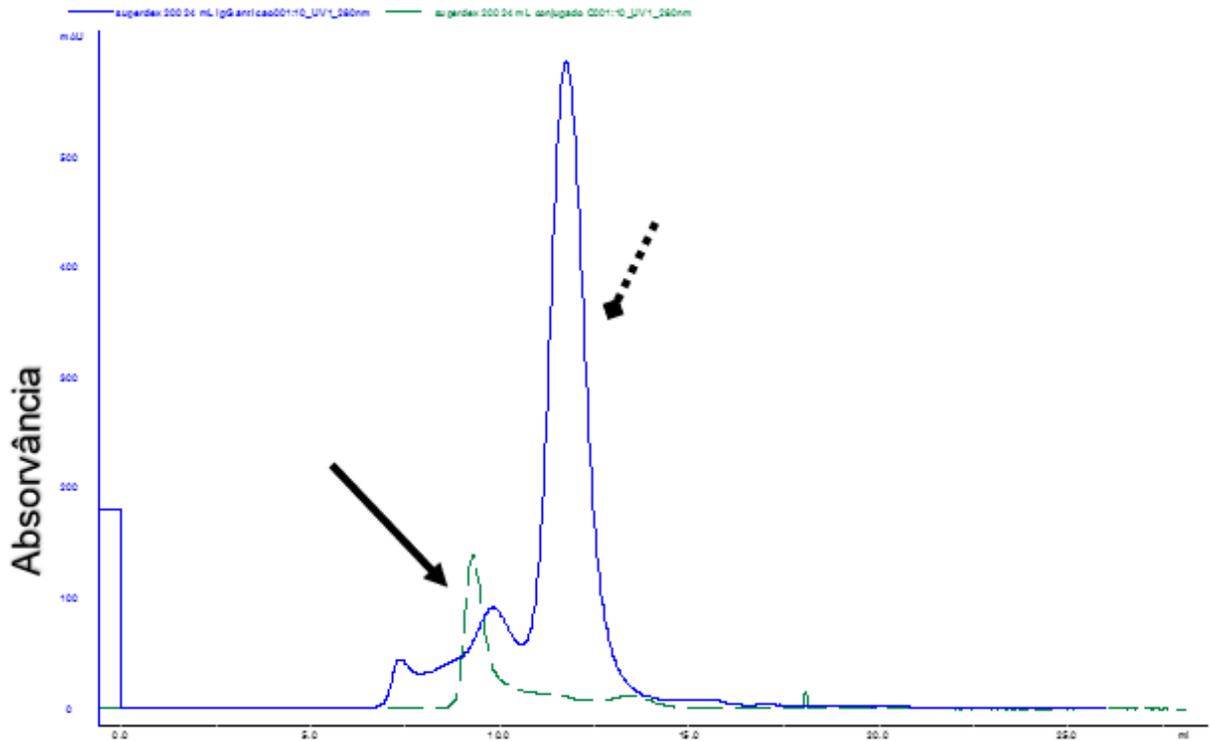
Perfil da cromatografia de exclusão molecular do melhor conjugado produzido no grupo 1



Fonte: A autora, 2020.

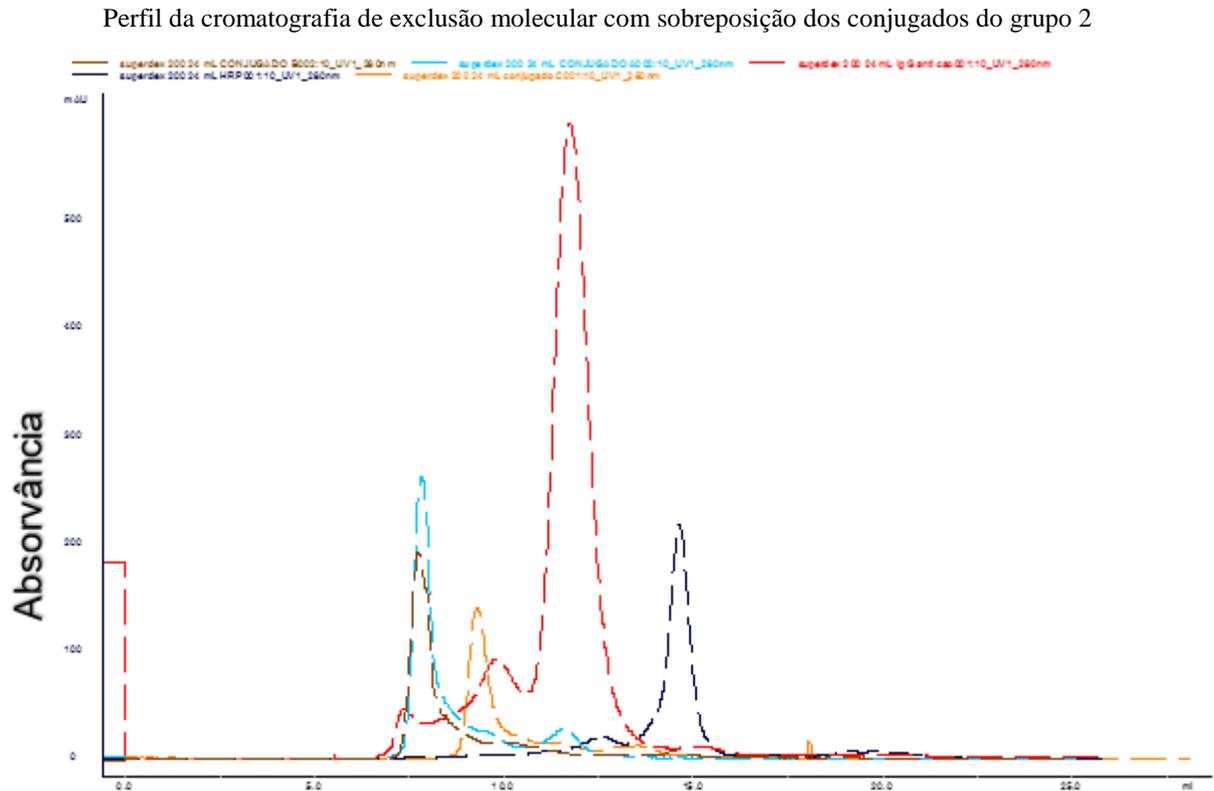
Figura 15 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao conjugado F (estequiometria teste) e seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL

Perfil da cromatografia de exclusão molecular estequiometria teste



Fonte: A autora, 2020.

Figura 16 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. Linha cor vermelha IgG; Linha azul escuro HRP; Linha cor azul claro conjugado D; Linha cor marrom conjugado E e na Linha cor laranja conjugado F. Volume de aplicação 100uL



5.6.1 Teste de ELISA dos conjugados do grupo 2

No ensaio de ELISA indireto foi utilizado um $n = 9$ para soro positivo, soro negativo e (SS) de cada conjugado. A tabela 5 mostra os valores de obtidos de desvio padrão dos conjugados. Os valores de DO das médias revelaram que o conjugado F apresentou maior DO para o controle positivo e menor DO para controle negativo e (SS), conforme figura 17, corroborando aos resultados obtidos por cromatografia superdex 200.

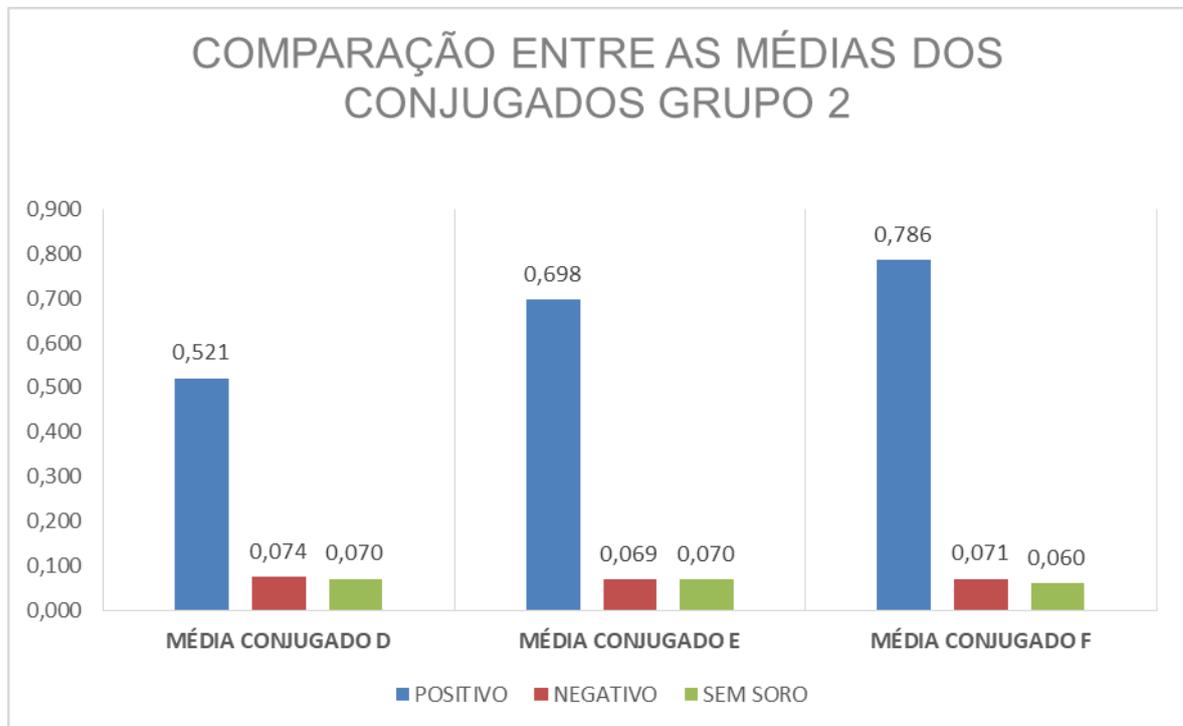
Tabela 5 – Resultado do desvio padrão referente aos conjugados do grupo 2

CONTROLES	CONJUGADO D - DP	CONJUGADO E - DP	CONJUGADO F - DP
POSITIVO	0,130	0,186	0,139
NEGATIVO	0,003	0,001	0,007
SS	0,007	0,006	0,010

Legenda: Conjugado D (estequiometria atual): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão; conjugado E (melhor conjugado obtido do grupo 1): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão e conjugado F (estequiometria teste): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 17 – Valores das médias de DO dos conjugados do grupo 2



Conjugado D (estequiometria atual): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS); conjugado E (melhor conjugado produzido grupo 1): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS) e conjugado F (estequiometria teste): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS). Leitura de absorvância determinada a 450 nm.

Fonte: A autora, 2020.

5.7 Análise cromatográfica dos conjugados do grupo 3

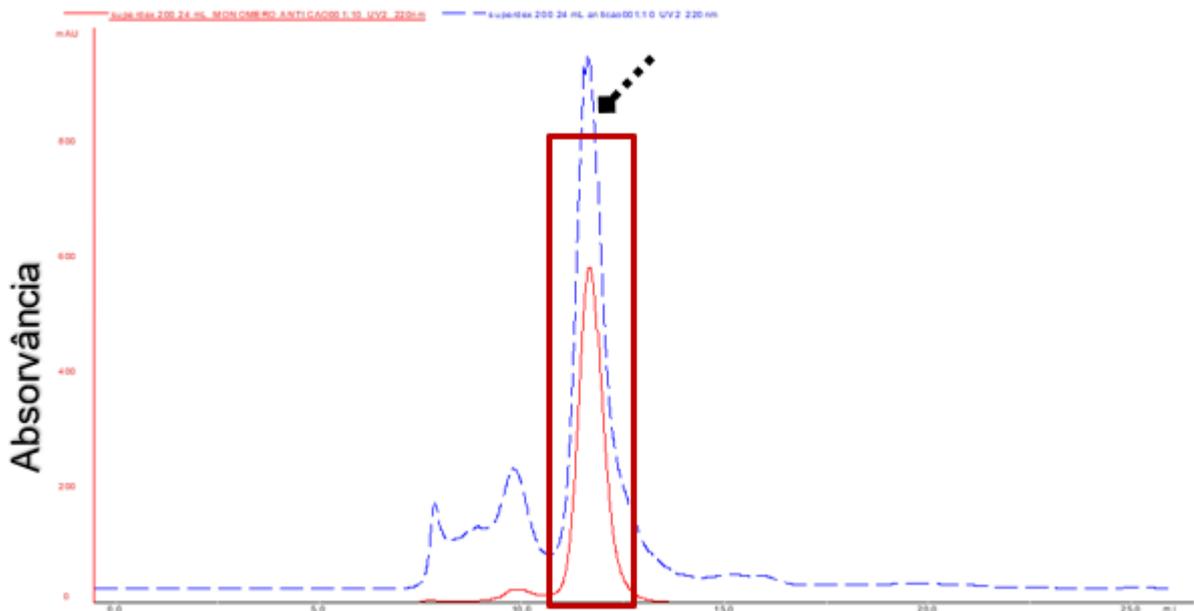
Os conjugados do grupo 3 foram estrategicamente desenhados e baseados na condição original de conjugação (conjugado G), melhor estequiometria encontrada no grupo anterior

(conjugado H) e utilizando a imunoglobulina previamente purificada (figura 18), na melhor estequiometria encontrada (conjugado I).

Este conjugado notadamente demonstrou o melhor perfil cromatográfico (figura 21), quando comparado aos demais de seu grupo (figura 19, 20 e 22). Observou-se que o conjugado I demonstrou a presença de um único pico proteico de aproximadamente 190kDa (figura 23), que corresponde a forma monomérica da IgG (150kDa) conjugada a HRP (44kDa). Não foi observado a sobra de insumos livres.

Figura 18 - Purificação da imunoglobulina por superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. O retângulo indica a sobreposição do monômero após purificação e seta pontilhada a imunoglobulina. Volume de aplicação 100uL

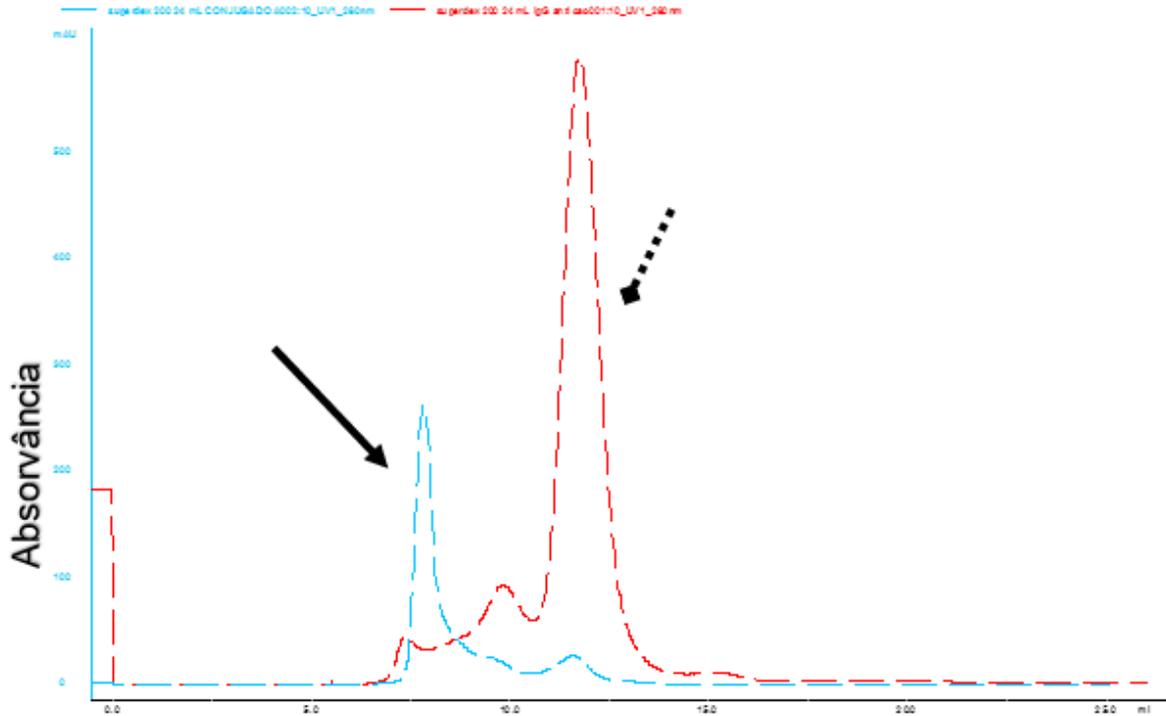
Perfil da cromatografia de exclusão molecular com sobreposição da imunoglobulina



Fonte: A autora, 2020.

Figura 19 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao conjugado G (estequiometria atual) e seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL

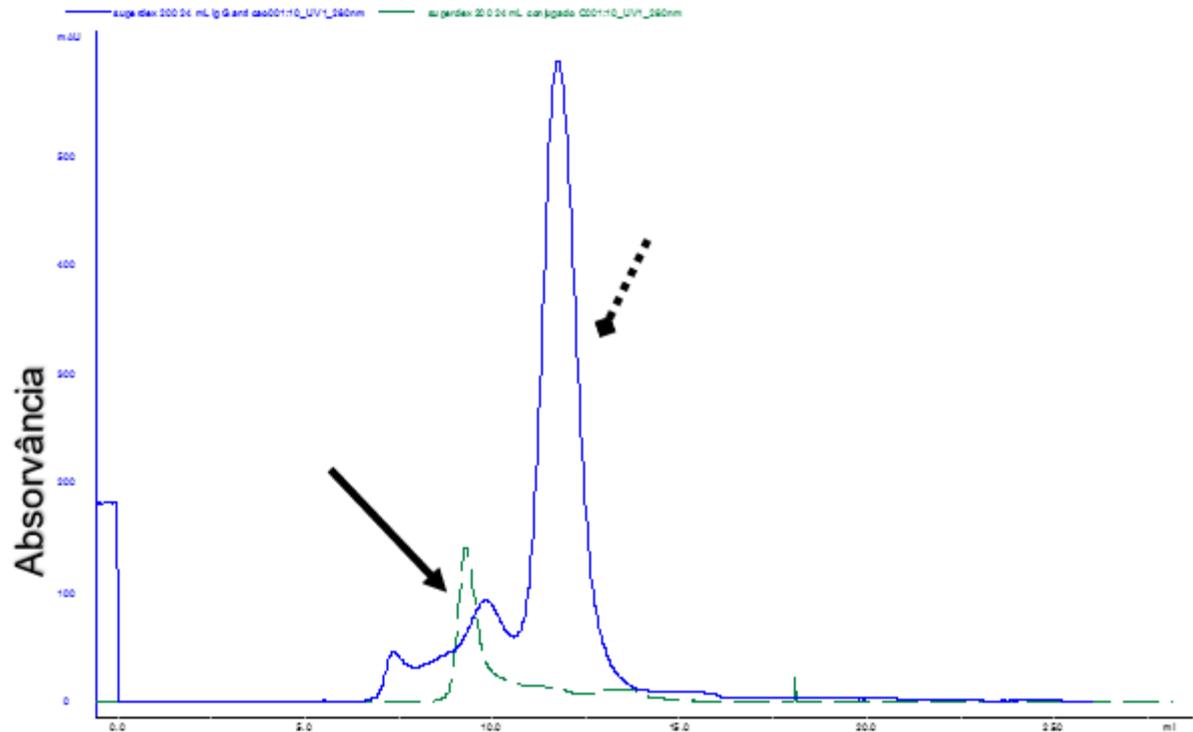
Perfil da cromatografia de exclusão molecular do grupo 3 conjugado estequiometria atual



Fonte: A autora, 2020.

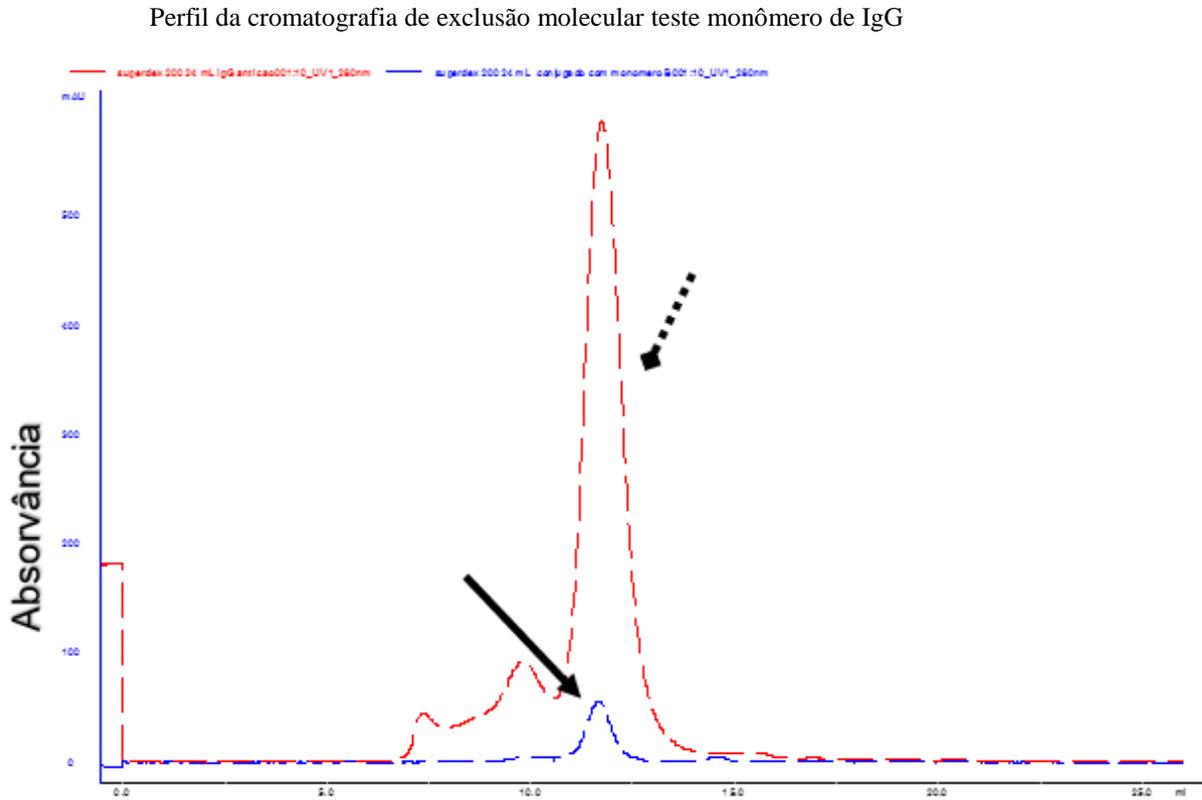
Figura 20 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao conjugado H e seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL

Perfil da cromatografia de exclusão molecular melhor conjugado Grupo 2



Fonte: A autora, 2020.

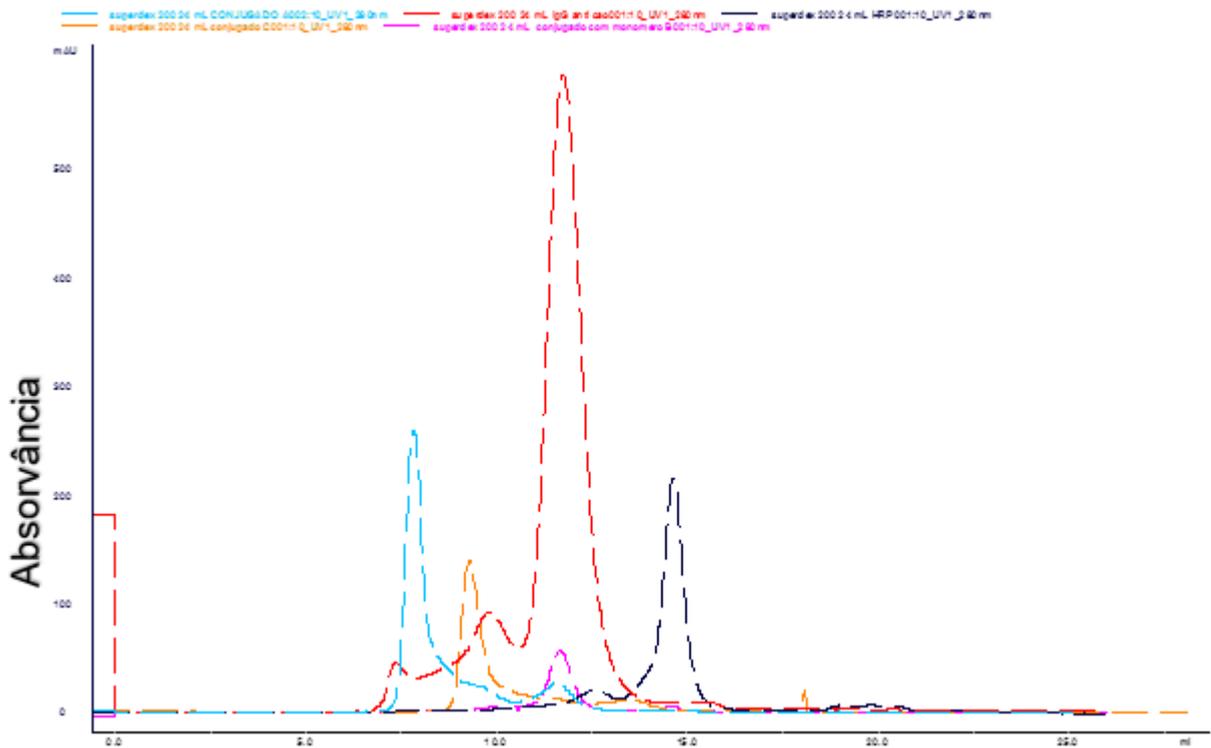
Figura 21 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200(24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. A seta de cor preta indica o pico correspondente ao conjugado monômero (I) e seta pontilhada indica IgG. Volume de aplicação 100uL



Fonte: A autora, 2020.

Figura 22 Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. Sobreposição dos conjugados indicados: Linha cor vermelha IgG; Linha cor preto HRP; Linha cor azul claro conjugado G; Linha cor laranja conjugado H; Linha cor rosa conjugado I. Volume de aplicação 100uL

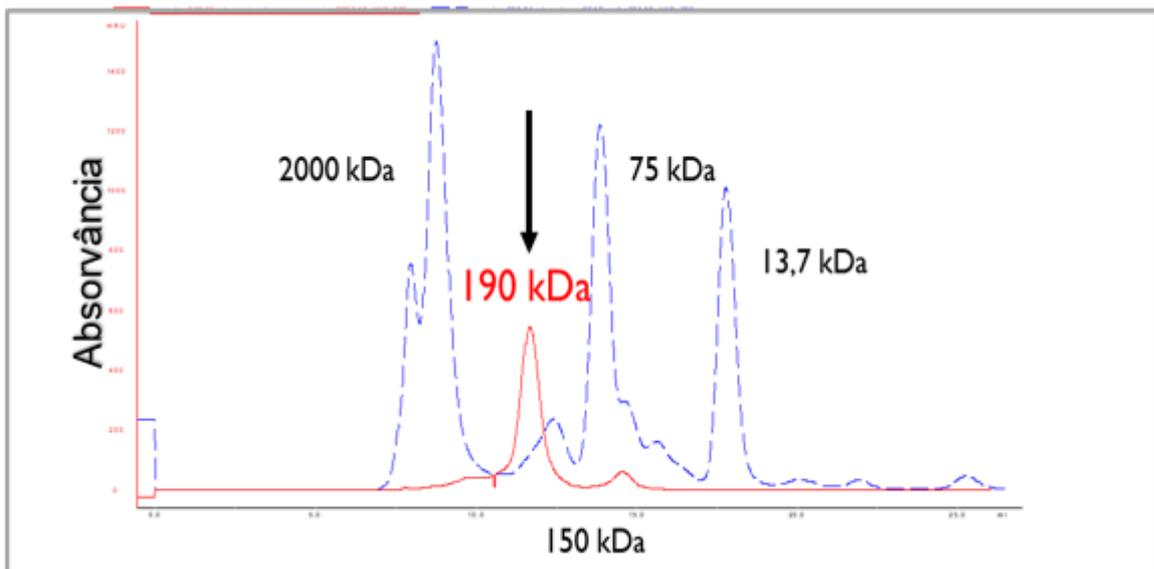
Perfil da cromatografia de exclusão molecular com sobreposição dos conjugados do grupo 3



Fonte: A autora, 2020.

Figura 23 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular em Superdex 200 (24mL) a 280nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. Linha pontilhada Padrões de massa molecular: blue-dextran (200kDa), aldolase (150kDa), conalbumina (75kDa) e ribonuclease (13,7kDa) com+ ($R^2 = 0,9857$); a seta preta conjugado I. Volume de aplicação 100uL

Perfil da cromatografia de exclusão molecular sobreposição do conjugado I do grupo 3 com padrões de massa molecular



Fonte: A autora, 2020.

5.7.1 Teste de ELISA dos conjugados do grupo 3

Foi realizado o teste de ELISA indireto com os conjugados G, H e I, com $n = 9$ para soro positivo, soro negativo e (SS) de cada conjugado. Foi mostrado desvio padrão para o controle positivo, controle negativo e sem soro (SS), de cada conjugado, dispostos na tabela 6. A maior DO das médias referente ao conjugado I para controle positivo e menor DO para controle negativo e (SS) está demonstrado na figura 24. Estes resultados confirmam com os obtidos por cromatografia, onde foi visualizado que o conjugado I apresentou resultados superiores em 107,1% e 212,5 % aos conjugados G e H, respectivamente. A homogeneidade das médias dos conjugados 1,2 e 3, foi mostrada pelo teste qui-quadrado a um grau de confiabilidade dos dados de 95%, conforme figura 26.

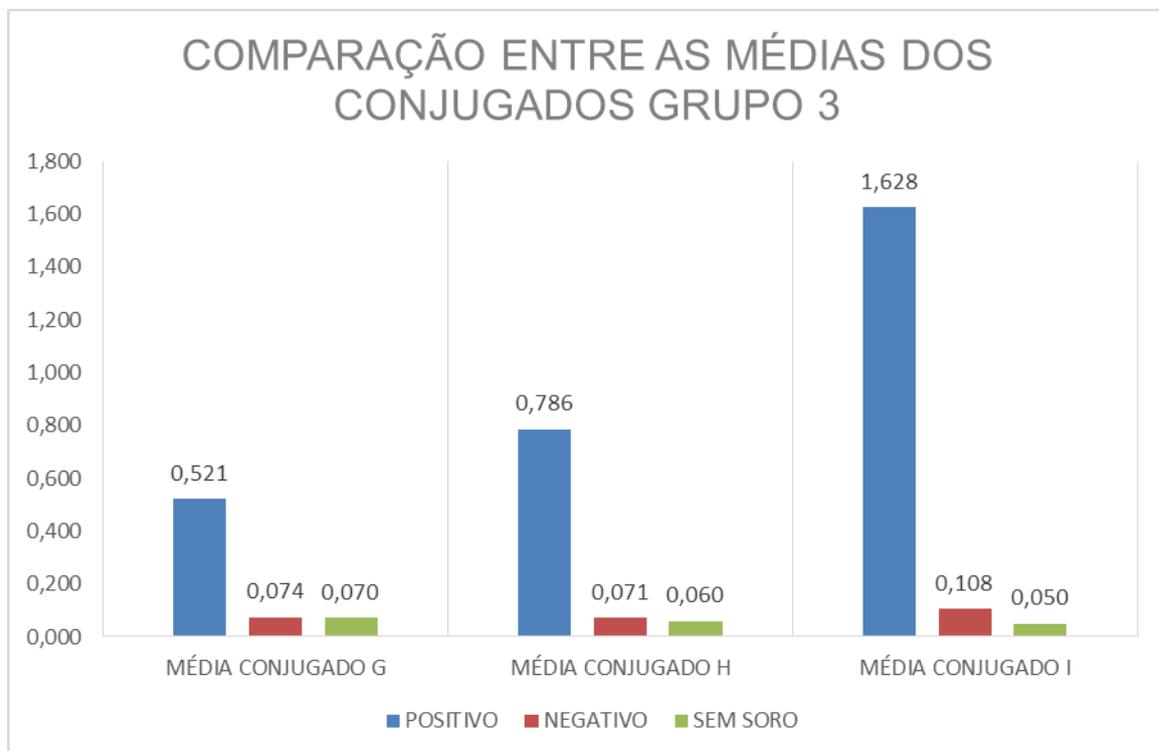
Tabela 6 – Resultado do desvio padrão referente aos conjugados do grupo 3.

CONTROLES	CONJUGADO G - DP	CONJUGADO H - DP	CONJUGADO I - DP
POSITIVO	0,130	0,139	0,120
NEGATIVO	0,003	0,007	0,033
SS	0,007	0,010	0,006

Legenda: Conjugado G (estequiometria atual): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão; conjugado H (melhor conjugado obtido do grupo 2): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão e conjugado I (teste monômero de IgG): controles (positivo, negativo, SS) e DP: Desvio Padrão.

Fonte: A autora, 2020.

Figura 24 – Valores das médias de DO dos conjugados do grupo 3



Conjugado G (estequiometria atual): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS); conjugado H (melhor conjugado produzido grupo 2): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS) e conjugado I (teste monômero de IgG): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS). Leitura de absorvância determinada a 450 nm.

Fonte: A autora, 2020.

5.7.2 Teste de ELISA dos conjugados do grupo 4

Após a produção dos “mini” conjugados, em função do volume reduzido que apresentavam, estes só foram analisados nos ensaios de ELISA indireto $n = 9$ para soro positivo, negativo e (SS). O conjugado K apresentou melhor resultado de acordo com a maior

DO obtida para o controle positivo, menor DO para o controle negativo e (SS), conforme mostrados na tabela 7. Os valores de UA dos “mini” conjugados estão mostrados conforme tabela 7. Na figura 25 está demonstrada a comparação entre as médias dos conjugados frente aos soros positivos, negativos e (SS). A homogeneidade dos valores de DO das médias obtidas nos ensaios de ELISA dos conjugados, foi mostrada pelo teste qui-quadrado a um grau de confiabilidade dos dados de 95%, conforme figura 26

A homogeneidade das médias das DOs obtidas nos ensaios de ELISA dos “mini” conjugados foi comparada utilizando o teste qui-quadrado conforme mostrado nas tabelas 8, 9, 10. A homogeneidade das médias dos “mini” conjugados foi mostrada pelo teste qui-quadrado a um grau de confiabilidade dos dados de 95%, conforme mostrado na figura 27.

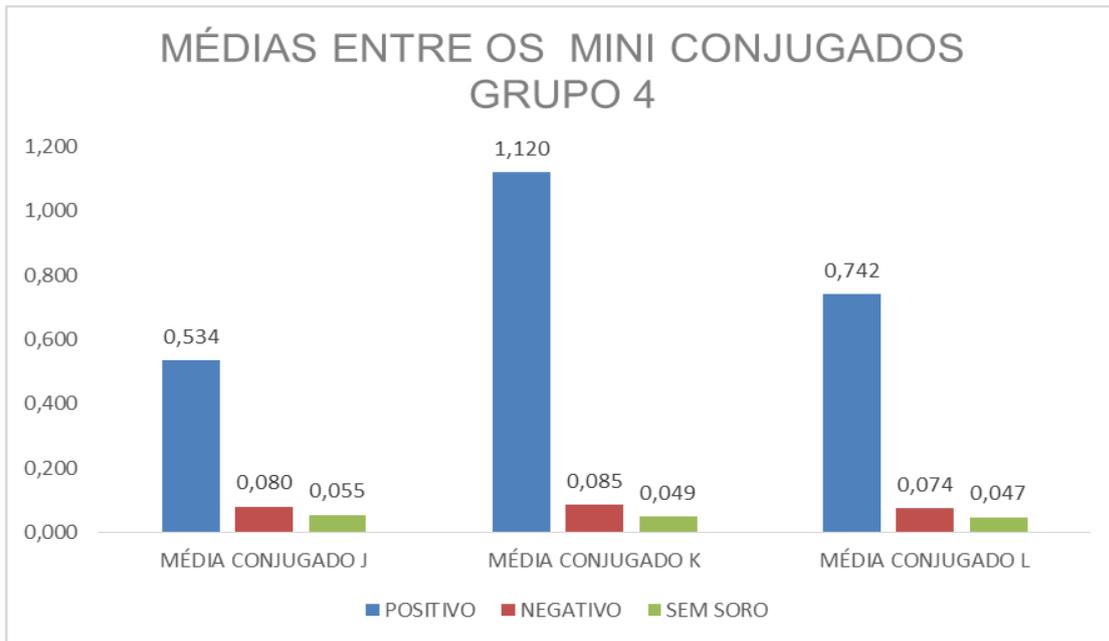
Tabela 7 – Resultado de DO das médias, do desvio padrão e UA referente aos “mini”conjugados

CONTROLES	CONJUGADO J - DO	DESVIO PADRÃO	CONJUGADO K - DO	DESVIO PADRÃO	CONJUGADO L - DO	DESVIO PADRÃO
POSITIVO	0,534	0,060	1,120	0,077	0,742	0,081
NEGATIVO	0,08	0,010	0,085	0,007	0,742	0,002
SS	0,055	0,018	0,049	0,009	0,047	0,006
UA	5,339	N/A	11,267	N/A	9,399	N/A

Legenda: Conjugado J (Melhor conjugado produzido no grupo 2, sem purificar a IgG): DO: Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS), Desvio Padrão e UA: Unidade arbitrária; conjugado K (Melhor conjugado produzido no grupo 3): controles (positivo, negativo, SS), Desvio Padrão e UA: Unidade arbitrária e conjugado L (Teste tempo de conjugação) controles (positivo, negativo, SS), Desvio Padrão e UA: Unidade arbitrária.

Fonte: A autora, 2020.

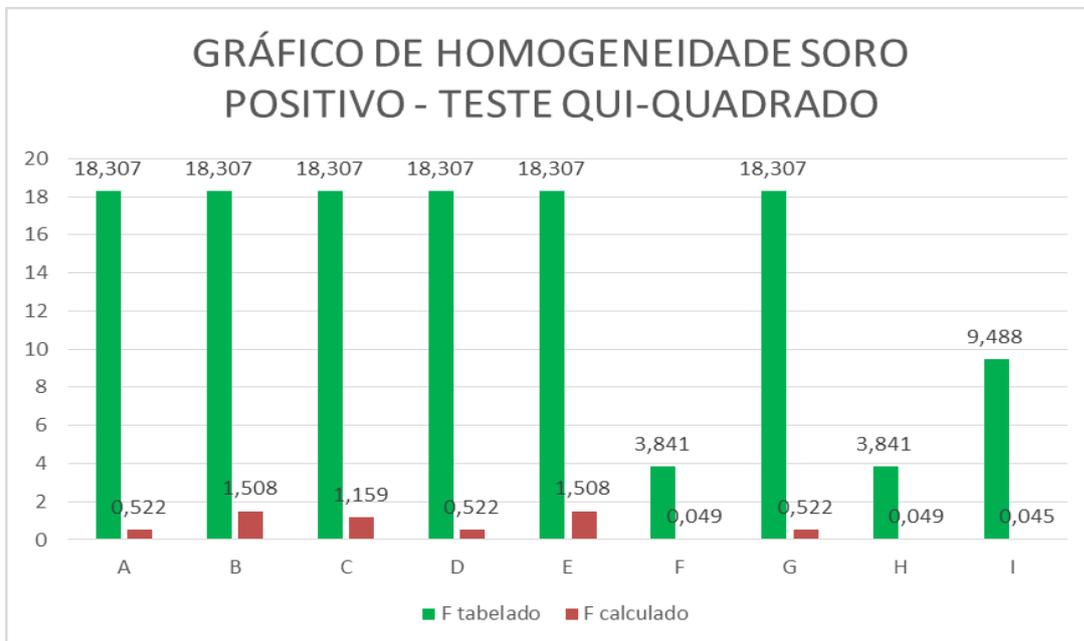
Figura 25 – Valores das médias de DO dos conjugados grupo 4



Conjugado J (melhor conjugado produzido grupo 2, sem purificar IgG): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS; conjugado K (melhor conjugado produzido grupo 3): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS e conjugado L (teste tempo de conjugação): Densidade óptica das médias dos controles (positivo, negativo, SS. Leitura de absorvância determinada a 450 nm.

Fonte: A autora, 2020.

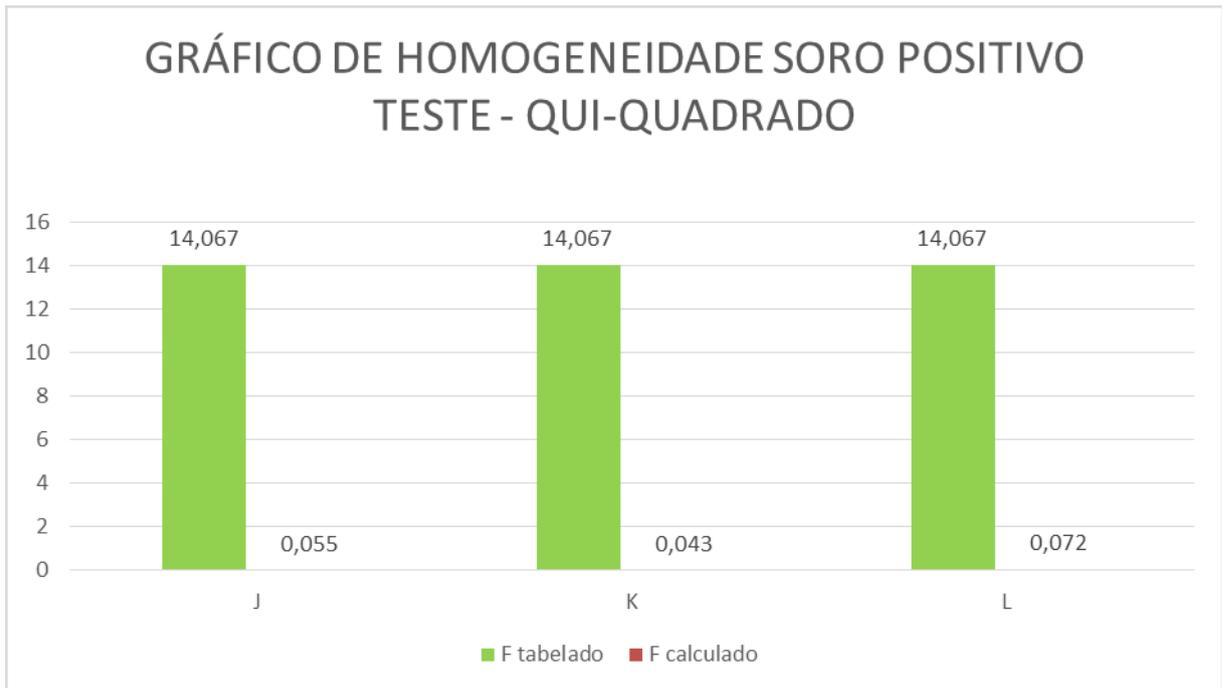
Figura 26 – Resultado do teste Qui-quadrado



Teste qui-quadrado (X^2) dos conjugados A B e C onde X^2 calculado = 0,522, 1,508 e 1,159 - X^2 tabelado = 18,307. Para os conjugados D, E e F mostra X^2 calculado = 0,522, 1,508 e 0,049 - X^2 tabelado = 18,307, 18,307 e 3,841 e os demais conjugados G, H e I demonstra X^2 calculado = 0,522, 0,049 e 0,045 - X^2 tabelado = 18,307, 3,841 e 9,488. As tabelas riscadas representam F tabelado e as tabelas sem riscos representam F calculado. Valores de F calculado menor que F tabelado tem 95% de probabilidade de ocorrência (número de repetições do experimento).

Fonte: A autora, 2020.

Figura 27 – Resultado do teste Qui-quadrado do grupo 4



Teste qui-quadrado (X^2) dos conjugados J, K e L onde X^2 calculado = 0,055, 0,043 e 0,072 - X^2 tabelado = 14,067 para os três conjugados. As tabelas riscadas representam F tabelado e as tabelas sem riscas representam F calculado.

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 8 – Análise de variância do “mini” conjugado J

Resultados obtidos mini conjugado sem purificar	
0,527	
0,587	
0,575	
0,552	
0,391	
0,515	
0,587	
0,56	
0,516	
Média	0,5344
Desvio padrão	0,06
Coefficiente de variação (%)	11,36

Conjugado J (melhor conjugado produzido grupo 2, sem purificar IgG): Coeficiente de variação: resultados obtidos do soro controle positivo.

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 9 – Análise de variância do “mini” conjugado K

Resultados obtidos mini conjugados monômero	
1,058	
0,988	
1,124	
1,233	
1,205	
1,137	
1,173	
1,067	
1,099	
Média	1,120444444
Desvio padrão	0,08
Coefficiente de variação (%)	6,89

Conjugado k (melhor conjugado produzido grupo 3: Coeficiente de variação: resultados obtidos do soro controle positivo.

Fonte: A autora, 2020.

Tabela 10 – Análise de variância do “mini” conjugado L

Resultados obtidos mini conjugado monômero menor tempo	
0,811	
0,767	
0,798	
0,795	
0,807	
0,745	
0,747	
0,597	
0,613	
Média	0,742222222
Desvio padrão	0,08
Coefficiente de variação (%)	10,99

Conjugado L (teste tempo de conjugação) Coeficiente de variação: resultados obtidos do soro controle positivo.

Fonte: A autora, 2020.

6 DISCUSSÃO

A LVC tornou-se uma doença urbana, que necessita continuamente ser investigada por ser fatal em pacientes não tratados. Os reativos para diagnóstico auxiliam no monitoramento de diversas doenças, pois geram resultados rápidos, precisos e eficazes que são fundamentais para a detecção precoce.

Por volta de 1980, iniciou-se o estudo em métodos diagnósticos baseados na biologia molecular para identificação do gênero *Leishmania*. Estes métodos utilizam hibridização por meio de sondas específicas e técnicas de amplificação de ácidos nucleicos, incluindo a reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa (RT PCR) para detecção de RNA e PCR para detecção de DNA.

Apesar de ser um método sensível para a detecção de *Leishmania* em uma variedade de materiais clínicos de humanos e cães, para utilização em larga escala, a PCR necessita de ajustes e custos operacionais mais baixos (GONTIJO; MELO, 2004). Em geral muitos testes sorológicos podem ser utilizados como marcadores de doenças infecciosas, porém nenhum deles confere 100% de sensibilidade e especificidade (DOURADO et al., 2007).

Em 2011, o MS notificou a substituição do protocolo de diagnóstico da LVC onde era usado o exame ELISA como método de triagem e RIFI como confirmatório (NOTA TÉCNICA N° 01/2011).

Com intuito de melhorar a técnica, o MS encomendou um estudo a Fiocruz, que determinou a substituição do teste de RIFI pelo teste imunocromatográfico (TR-DPP®), sendo de triagem e o ELISA utilizado como teste confirmatório (HERENIO et al., 2014).

O método de ELISA, se fundamenta na ligação de um anticorpo a um único antígeno detectáveis através de reações enzimáticas. Esse teste tem como característica a rapidez, e, portanto, a possibilidade da realização de uma quantidade maior de amostras, a obtenção de resultados automatizados, que excluem a subjetividade da leitura e sua elevada especificidade (HERENIO et al., 2014; FORSSSTRÖM et al., 2015; SCALONE et al., 2002).

Dentre outras vantagens do ELISA estão a estabilidade em relação à soro aglutinação microscópica, o pequeno volume de reagentes requeridos e obtenção de resultados de natureza quantitativa, o que possibilita rápida execução diagnóstica e por apresentar baixo nível de risco biológico. Esta técnica é também usada para estudos epidemiológicos oferece simplicidade de execução e possui baixo custo (TIZARD, 1998; MACEDO et al., 2019).

Existem vários modelos de ELISA, o primeiro deles o ELISA direto, ocorre quando o antígeno adsorvido na placa, reage diretamente com um anticorpo e é quimicamente marcado por uma enzima que é colocada sobre o antígeno/alvo. A sensibilidade deste tipo de ELISA é a mais baixa e quase não é usado (ENGVALL; PERLMANN, 1971); um outro teste é o de competição que foi desenvolvido como um método quantitativo tanto para antígenos quanto para anticorpos. Para a detecção de anticorpos, o antígeno contido na amostra é previamente incubado com concentrações conhecidas do antígeno e, ao ser transferido para a placa não ocorrerá ligação entre anticorpo e o antígeno fixado na microplaca, ocasionando uma proporção inversa entre a concentração do analito e a intensidade de coloração resultante, caso não haja antígeno na solução, os anticorpos se ligarão ao fixado (AYDIN, 2015). O modelo do teste mais comum é o ELISA sanduíche que possui um anticorpo de captura imobilizado numa microplaca. As proteínas específicas da amostra são capturadas pelo primeiro anticorpo, esta reação é em seguida detectada por um segundo anticorpo específico da proteína, marcado com enzima e um substrato, que se liga ao analito, formando uma sanduíche produzindo em seguida uma coloração. A absorção medida é diretamente proporcional à concentração do analito (MOREIRA, 2010; MONACI et al., 2011).

Em nosso estudo utilizamos o ensaio de ELISA indireto, amplamente utilizado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro. Vários métodos de ELISA indiretos usam vírus inteiro ou recombinante Vírus da Maedi-Visna (MVV) (REYBURN et al., 1992; CAREY et al., 1971).

Sendo o conjugado um dos componentes de suma importância na produção de kits diagnósticos, faz-se necessária a otimização dos processos de conjugação a fim de obter resultados mais específicos.

A especificidade desse teste é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (MADRUGA, et al., 2001), na qual é utilizado uma IgG para reconhecer o antígeno e outra (anti-IgG) produzida em diferentes espécies de animal que reconhece a primeira IgG, com a qual se ligará a segunda IgG (ALMEIDA & LIMA, 2001), marcada com uma enzima (peroxidase) dirigida contra o primeiro anticorpo presente no soro positivo.

Neste caso a ação da oxidoredutase, sobre o substrato água oxigenada adicionado, gera oxigênio que por sua vez oxida um segundo composto presente no meio reacional (TMB) conduzindo-o do estado incolor para o estado colorido (azul) para evidenciar a ligação do anticorpo específico, que, finalmente, em meio ácido forte é finalizada a reação com pH apropriado para adquirir a coloração amarela.

Os anticorpos utilizados nos testes de ELISA são glicoproteínas produzidas pelos plasmócitos que se desenvolveram a partir dos linfócitos B precursores, após contato prévio entre estes linfócitos e o antígeno estranho. A molécula de imunoglobulina bifuncional na qual uma região age na ligação do antígeno e outra age na ligação de várias células do sistema imune.

Diferentemente, a região constante não apresenta tal variabilidade, mas possui cinco classes principais que definem os isotipos IgM, IgG, IgA, IgD e IgE, cada uma especializada na ativação de mecanismos efetores distintos (SCHROEDER; CAVACINI, 2010).

Embora o arranjo estrutural da imunoglobulina confere estabilidade para a molécula alguns fatores como condições externas (pH, temperatura e força iônica) ou propriedades intrínsecas, como sequências primária e estrutura terciária podem desencadear uma ruptura em sua termoestabilidade estrutural podendo gerar agregação, devido a mudanças conformacionais na proteína (LI et al., 2016).

O mecanismo de agregação ainda não foi completamente esclarecido, porém já é conhecido que este processo ocorre em vários estágios intermediários dos aminoácidos que passam por aglutinação e separação, até atingir o estágio de transição final para o estado nativo. (VERMEER; NORD, 2000; NADALETTI, 2014), a agregação em anticorpos pode ocorrer devido condições ambientais como temperatura, concentração, pH, oxigênio e força iônica causando assim estresse na molécula. Anticorpos podem agregar inicialmente como dímeros ou fragmentos e formar estruturas maiores. Quando a região hidrofóbica fica exposta promove interação intermolecular levando a agregação ou fenômeno de precipitação(VÁZQUEZ-REY;LANG 2011).

Como estratégia para amplificação de sinal no reconhecimento antígeno-anticorpo são conjugadas enzimas ou marcadores (YOSHITAKE et al., 1982; SIMONS et al., 2006). Enzimas são macromoléculas de natureza proteica, com função biológica de alto poder catalítico de reações químicas e elevada especificidade ao substrato correspondente. As mais utilizadas nestes testes são a fosfatase alcalina e a peroxidase (HRP).

Está última possui quantidades de carboidratos em suas cadeias, que com a oxidação de seus resíduos de açúcares associados ao metaperiodato de sódio gera grupos reativos de aldeídos que se acoplam aos grupamentos amina do anticorpo, e borohidreto age como agente redutor na reação. (NAKANE, 1974).

Em geral, há um elevado grau de especificidade nas reações antígeno-anticorpo, no entanto podem acontecer ligações inespecíficas que podem ser minimizadas com utilização de

soluções de bloqueio, pelos usos detergentes ou outras proteínas (VENKATESAN EWAKELIN, 1993; CAVALCANTE, 2019).

Os anticorpos podem distinguir pequenas diferenças na estrutura química de um antígeno e a reatividade cruzada se refere à habilidade de uma população de moléculas de anticorpos de reagir com mais de um antígeno, quando este compartilha um mesmo epítopo com o antígeno imunizador ou porque ele tem um epítopo que é estruturalmente semelhante ao epítopo no antígeno imunizante (multiespecificidade) (LI et al., 2016; ZHAO et al., 2018).

A afinidade se refere à força de ligação entre um único determinante antigênico e um sítio de combinação de um anticorpo particular e quanto maior a afinidade mais estável a interação entre as moléculas, enquanto que avidéz se refere à força total de ligação entre anticorpo e antígeno, ou seja, leva em consideração que a dobradiça da região dos anticorpos fornece a eles flexibilidade, permitindo-o que um único anticorpo seja capaz de se ligar a antígenos multivalentes por mais de um local de ligação, esta avidéz do anticorpo amadurece durante a resposta imunológica (MITSUKA-BREGANÓ et al., 2010).

No entanto podem ocorrer ligações fracas que unem o antígeno ao sítio de ligação do anticorpo, todas não-covalentes e de natureza reversíveis. Elas incluem pontes de hidrogênio, ligações eletrostáticas, forças de Van der Waals e hidrofóbicas. Muitas ligações múltiplas entre o antígeno e o anticorpo garantem que o antígeno seja ligado fortemente ao anticorpo (ABBAS, LICHTMAN & PILLAI, 2012).

Estudos anteriores foram realizados buscando otimização da conjugação através de alterações nas concentrações de metaperiodato e de borohidreto, a fim de verificar se haveria a formação de conjugados mais homogêneos e se estes seriam mais eficientes e estáveis (MENDES, 2013).

No entanto, estes estudos não contemplaram a otimização da estequiometria da reação entre a HRP e a IgG. A estequiometria ideal para que não haja diminuição da resposta imunológica ou da atividade enzimática, de acordo com NAKANE (1974) seria de 1 molécula de imunoglobulina para 1 molécula de HRP.

Apesar disto, o autor cita a possibilidade da ligação de mais de 1 molécula de HRP (5-6) à uma molécula de IgG, o que ocasiona a formação de um conjugado muito grande, gerando um decréscimo na taxa de penetração nos tecidos, no caso de ensaios imunohistoquímicos, contudo se o conjugado for utilizado unicamente para detecção de antígenos, como por exemplo para microscopia, o tamanho do conjugado não afeta no ensaio (NAKANE, 1974).

No caso do ensaio de ELISA a presença de fluorescência inespecífica pode gerar adsorção de moléculas de anticorpo à superfície celular sem haver reação antígeno-anticorpo, o que pode evidenciar um falso evento. Para evitar a interferência de falsa positividade nos resultados é preciso quantificar e eliminar a fluorescência inespecífica (GOLIM et al., 2007).

Além disso, a presença de agregados de imunoglobulinas no conjugado poderia afetar atividade biológica, causando diminuição da especificidade assim como da reprodutibilidade do ensaio (VÁZQUEZ; LANG, 2011).

De acordo com dados atuais, a estequiometria preconiza para a produção dos conjugados de imunoglobulinas com peroxidase varia entre 1:1-1:4 (IgG:HRP), sempre considerando a possibilidade da purificação pós-conjugação para a separação das formas livres (Protocolos Roche Diagnostics GmbH, Interchim, Sinapse, Sigma-Aldrich, GE Life Science, Thermofisher).

Baseado nestas informações referentes a produção de conjugados e na necessidade de otimização do kit de detecção da Leishmaniose visceral canina, estrategicamente desenhamos nossos experimentos produzindo 4 grupos de conjugados, onde estudamos a estequiometria ideal e condições de aperfeiçoamento.

Os conjugados do grupo 1 foram produzidos a partir da variação na concentração de massa entre HRP e do anticorpo. A análise por SEC demonstrou que todos os conjugados deste grupo apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, mostrando sobras de IgG e HRP não conjugadas, além de formas agregadas do anticorpo.

Deste grupo, o conjugado B (formado com mesma massa de HRP e IgG) foi o que apresentou menos sobras de HRP e de IgG livres, porém o pico cromatográfico referente ao conjugado possuía alto peso molecular, não apresentando a forma monomérica da molécula de IgG, o que indicou a necessidade de ajuste na estequiometria entre a HRP e IgG.

A análise destes conjugados por teste de ELISA foi realizada para verificar se os conjugados obtidos apresentariam habilidade para reconhecer a presença do antígeno, e evitar um resultado falso positivo ou falso negativo, o que afetaria os parâmetros de sensibilidade e especificidade do teste.

Foi observado, nos testes de ELISA que os diferentes conjugados do grupo 1 foram capazes de reconhecer o anticorpo presente no soro gerando resultados esperados ao utilizar controles positivos e negativos.

Os resultados dos testes de ELISA para este grupo apresentaram dados compatíveis com os obtidos por SEC, onde o conjugado B apresentou a melhor resposta de reatividade do

controle positivo de acordo com manual de EIE de Bio-manguinhos, o que corrobora a estratégia de otimizar a estequiometria do conjugado produzido.

O grupo 2 foi desenhado estrategicamente baseado na razão molar dos insumos, considerando a massa molecular da IgG (150 kDa) é 6,6 vezes maior que a massa molecular da HRP (44 kDa).

Verificou-se por SEC, que o conjugado F (0,2 μ M de IgG para 1,0 μ M HRP), apresentou melhor perfil, com único pico proteico, com poucas sobras de IgG e de HRP, evidenciando que quanto mais equilibrada a estequiometria da reação melhor condição de ligação entre IgG e HRP no processo de conjugação.

Apesar da identificação da melhor proporção estequiométrica para reação entre estes 2 insumos, verificou-se que o conjugado ainda apresentava alto peso molecular, muito possivelmente pela presença de formas agregadas na imunoglobulina.

No ensaio de ELISA indireto os resultados das médias de DO do conjugado F com a estequiometria ajustada frente os soros positivos, negativos e (SS) confirmaram que este conjugado mostrou a melhor resposta de reatividade do soro positivo.

Os experimentos de SEC do grupo 3 evidenciaram que a purificação prévia da imunoglobulina (conjugado I) demonstrou um perfil que apresentava um único pico de massa molecular próxima a esperada para a conjugação entre IgG:HRP. Este conjugado também foi o que apresentou melhor resposta de reatividade do soro positivo nos testes de ELISA, demonstrando que a otimização da estequiometria e a purificação do anticorpo levam a um conjugado de melhor performance.

Após estabelecermos as melhores condições de produção do conjugado, ainda pretendíamos verificar a possibilidade de uma redução no tempo desta conjugação.

Devido ao volume dos “mini” conjugados produzidos no grupo 4 só foram avaliados pelos testes de ELISA indireto. Mais uma vez, obteve-se o melhor resultado para o conjugado K onde foi utilizado o anticorpo purificado em tempo normal de incubação com NaBH₄. A redução no tempo de incubação (conjugado L) apresentou melhor performance do que a obtida para o conjugado J, produzido com anticorpo sem purificação, embora em estequiometria ideal previamente estabelecida. Novos experimentos serão realizados na tentativa da diminuição do tempo de produção dos conjugados, uma vez que a estequiometria já foi estabelecida.

Baseado na literatura foi obtido os seguintes dados comprovando a melhor média das leituras da reatividade dos conjugados, em unidades arbitrárias (UA) em que o conjugado K monômero tempo normal com valor obtido de 11,267 conjugado L monômero tempo reduzido

= 9,399 e o conjugado J produzido sem IgG purificada com a mesma estequiometria utilizada para os monômeros = 5,339118607.

Pode-se observar o maior valor de UA obtido foi referente ao conjugado K, que foi produzido com a forma monomérica da imunoglobulina, em estequiometria já estabelecida (grupos 2 e 3). Também foi possível verificar que o conjugado L teve desempenho melhor que o conjugado J, indicando que embora tivessem a mesma estequiometria, o fato de utilizar a forma monomérica da imunoglobulina ao invés da proteína sem purificação otimizou o processo de conjugação, mesmo utilizando menor tempo de reação de redução com o NaBH₄. Foi escolhida como a melhor titulação aquela que apresentou os maiores resultados de UA, com baixos valores de leitura no branco e amostras negativas e as altas leituras das amostras positivas (SANTOS, 2012).

O parâmetro de variação expressa a precisão e repetitividade de um ensaio, e foi verificado que o conjugado K produzido com anticorpo purificado (forma monomérica) apresenta menor coeficiente de variação comparado com conjugado J produzido com anticorpo sem purificar, o que indica a maior precisão dos dados, garantindo maior reprodutibilidade e homogeneidade dos dados do ensaio realizado.

O conjugado L produzido utilizando a forma monomérica da IgG em menor tempo de incubação também apresentou menor coeficiente de variação comparado ao conjugado J produzido sem purificar o anticorpo.

Estes dados sugerem que a otimização na estequiometria é de suma importância na produção do conjugado, porém a purificação do anticorpo utilizado nesta reação é primordial para garantir a reprodutibilidade e precisão dos dados obtidos.

Todos os resultados obtidos foram validados pelo teste do manual do EIE Leishmaniose visceral canina. A homogeneidade das médias dos “mini” conjugados no teste de ELISA foi avaliada através do teste de qui-quadrado, evidenciando assim a normalidade e confiabilidade dos dados. Com base em nosso estudo estatístico mostramos que as amostras positivas obtidas pelo teste de ELISA demonstraram homogeneidade a um nível de significância de 0,05 ou seja num grau de confiabilidade dos dados de 95% (DORIA, 1999).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo reportou a otimização da produção do conjugado anti-IgG de cão, componente de suma importância utilizado para compor o KIT EIE LVC de BIO-MANGUINHOS, contribuindo assim para o diagnóstico da doença Leishmaniose visceral canina, diante das recomendações do Ministério da Saúde para uso deste kit como técnica confirmatória para monitoramento da doença.

8 PRODUTO TECNOLÓGICO

O presente trabalho teve como produto tecnológico o processo de otimização do conjugado, que poderá fazer parte da produção e controle de qualidade do kit EIE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA produzido por BIO-MANGUINHOS de uso veterinário, que são controlados pela vigilância sanitária nacional (FUNED e MAPA).

O processo de otimização será reportado por meio de relatório técnico aos gestores de BIO-MANGUINHOS.

A otimização deste processo poderá ser implementada para produtos de imunofluorescência indireta produzidos por BIO-MANGUINHOS.

9 PERSPECTIVAS

Uma vez determinados os parâmetros ideais para a produção dos conjugados, poderemos estudar uma cinética de incubação, a fim de estabelecer a diminuição no tempo, para que em última análise haja redução no custo do teste oferecido para o Ministério da Saúde.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K; LICHTMAN, A. J.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 7. ed. p. 536, 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). **Resolução RDC nº 16, de 28 de março de 2013**. Aprova o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação de Produtos Médicos e Produtos para Diagnóstico de Uso *In Vitro* e dá outras providências. Brasília: ANVISA, 2013.

ALEXANDER, B. Sampling methods for phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford. v. 14, n. 2, p. 109-122, 2000.

ALMEIDA, A. M. R.; LIMA, J. A. A. **Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia**. Brasília: SBF, 2001. p. 186.

ALVAR, J. *et al.* Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow up after chemotherapy. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 88, n. 4, 1994, p. 371-378.

AYDIN, U. *et al.* The optimal treatment of hydatid cyst of the liver: radical surgery with a significant reduced risk of recurrence. **Turk J Gastroenterol**, v. 19, p. 33-9, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto Nº 5.053, de 22 de abril de 2004**. Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem ou Comerciem, e dá outras providências Rio de Janeiro: MAPA, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 13, de 06 de outubro de 2003**. Regulamento de boas práticas de fabricação de produtos de uso veterinário. Rio de Janeiro: MAPA, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 4, de 19 de fevereiro de 2008**. Aprova as normas técnicas para a fiscalização da produção, controle, comercialização, modo de utilização de produtos de uso veterinário destinados a diagnosticar doenças dos animais, bem como o Glossário constante do Anexo. Rio de Janeiro: MAPA, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis/Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública. **Nota Técnica Conjunta nº 01/2011-CGDT-CGLAB/DEVIT/SVS/MS**. Esclarecimentos sobre substituição do protocolo diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC). Brasília: MS, 29 dez. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância e controle de leishmaniose visceral**. Brasília: MS, 2014. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf. Acesso em: 05 jul. 2020.

BRASIL Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Sistema de informação de agravos de notificação e base populacional do IBGE. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: MS, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2. ed. atual. Brasília: MS, 2010. Série de Manuais A.

Brasil. **Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016**. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências.

BELO, V.S. *et al.* Factors Associated with Visceral Leishmaniasis in the Americas: A Systematic Review and Meta-Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, 2013. p. 10.1371.

MOREIRA, C.S. *et al.* Biosensores: tecnologia e aplicações. CONGRESSO NORTE NORTE-NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO, 5., 2010. Maceió. [Anais CONNEPI]. Maceió: CONNEPI, 2010.

BOARINO, A. *et al.* Development of recombinant chimeric antigen expressing immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 12, n. 5, p. 647–653, 2005.

CAREY, D.E. *et al.* Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. **Indian J Med Res**, v. 59 p. 1758-1760, 1971.

CATELAN, T.T.T. *et al.* Linfócitos B: da Imunoglobulina aos imunobiológicos. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, v. 2, p. 35-37, 2008.

CAVALCANTE, E.O. *et al.* Reação imunoenzimática (ELISA) quantitativa para detecção de anticorpos IgG anti-DNA de dupla hélice. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 55, n. 2, 2019. <http://orcid.org/0000-0001-7268-3515>.

CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev**, v. 5, p. 873-882, 2007.

COELHO, E.A.F. *et al.* Evaluation of two recombinant *Leishmania* proteins identified by an immunoproteomic approach as tools for the serodiagnosis of canine visceral and human tegumentary leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, 215, p. 63–71. 2016.

CORTADA, V.M. *et al.* Canine visceral leishmaniasis in Anastacio, Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Vet Res Commun**, v. 28, n. 5, p. 365-374, 2004.

CUNNINGHAM A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. Experimental and Molecular. **Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current Situation and New Perspectives. Comparative Immunology. **Microbiology & Infectious Diseases**, v. 27, p. 305-318, 2004.

DORIA FILHO, U. **Introdução à bioestatística**: para simples mortais. São Paulo: Elsevier, 1999.

DOURADO, Z.F. *et al.* Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (rK39). **Rev Patol Trop**, v. 36, n. 3, p. 205-14, 2007.

ENGVALL, E.; PERLMAN, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, v 8, n. 9, p. 871-874, 1971.

ENGVALL, E. *et al.* Elisa. II Quantitative assay of protein antigen, immunological G by means of enzyme labelled antigen and antibody coated tubes. **Biochim. Biophys. Acta** 251, 427-434, 1971.

FARIA, A. R.; ANDRADE, H. M. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. **Revista Pan-Amaz Saude**, v. 3, n. 2, p. 47-57, 2012.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of Phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 18, p. 7061-1067, 2004.

FIEVEZ, A.M.C. *et al.* Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. **PLoS One**, v. 14, n. 3. e. e0214413, 2019.

FORSSTRÖM, B. *et al.* Dissecting Antibodies with Regards to Linear and conformational Epitopes. **PLoS One**, v. 10, p.1-11, 2015.

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. **Manual do Programa de Avaliação da Qualidade Imunodiagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina**. Belo Horizonte: FUNED, 2016. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2019/02/Manual-PAQ-Leishmaniose-Visceral-Canina.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2018.

GE HEALTHCARE. **Ion exchange chromatography**: principles and methods handbook. USA: GE, 2002.

GE HEALTHCARE. **Protein purification handbook**. USA: GE, 1999.

GE HEALTHCARE. **Hydrophobic interaction chromatography**: principles and methods. USA: GE, 1993.

GIUNCHETTI, C. R. *et al.* Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. **Veterinary Parasitology**, v. 271, p. 87-97, 2019.

GRAÇA, Y. R. *et al.* Quebrando a cabeça com Lavoisier: uma proposta de aprendizagem de cálculos estequiométricos. **Scientia Amazonia**, v. 5, p. 64-68, 2016.

GRIMALDI, G.JR. *et al.* Evaluation of a novel chromatographic immunoassay based on Dual-Path Platform technology (DPP® CVL rapid test) for the serodiagnosis of canine

visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, p. 54–59, 2012.

GRIMALDI, G.JR.; TESH, R.B. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 230-250, 1993.

GOLIM, M. A. *et al.* Conjugação e validação de controle isotópico IgG₁-FITC para uso em citometria de fluxo. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** [online], v.29, n.4, p. 361-368, 2007.

GOMES Y.M. *et al.* Diagnóstico de Leishmaniose Visceral Canina: avanços biotecnológicos. **O Jornal de Veterinária**, v.175, p.45–52, 2008.

GOMES, A.C.A. *et al.* Leishmaniose muco-cutânea: relato de caso clínico. **Revista de cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial**, v.4, n.4, p. 223 - 228, 2004. Disponível em: <http://revistacirurgiabmf.com/2004/v4n4/pdf/v4n4.3.pdf>. Acesso em: 05 jul. 2020.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies a laboratory manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. p. 346–348.

HERENIO, E. M. *et al.* Prevalência da Leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 32, n. 2, p. 126-129, 2014.

HERMANSON, G. T. Tags and Probes. In: **Bioconjugate Techniques**. 2. ed. San Diego: Academic press, p. 1202, 2008.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate Techniques**. Massachusetts: Academic Press, 1996. Chap. 8. p. 297-364.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. **PBP0672_001MAN**: conjugação de proteínas à peroxidase. rev.01. Rio de janeiro, 2019.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. **PBP0968_000MAN**: cromatografia de troca iônica aplicada a purificação de soros hiperimunes. rev.00. Rio de janeiro, 2017.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. **PBP0523_001MAN**: dosagem de proteína pelo método de absorção no ultravioleta. rev.01. Rio de janeiro, 2020.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. **PBP0564_001MAN**: recebimento, titulação e estocagem de soros hiperimunes. rev.01. Rio de Janeiro, 2018.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. **PBP0526_001MAN**: preparo de inóculo para produção de soro hiperimune. rev.01. Rio de Janeiro, 2018.

INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM IMUNOBIOLOGICOS. Produtos. **Portfólio**. Disponível em: <https://www.bio.fiocruz.br/index.php/br/41-produtos/portifolio>. Acesso em: 29 nov. 2019.

JENNINGS, H.J.; LUGOWSKI, C. Immunochemistry of groups A, B, and C meningococcal polysaccharide-tetanus toxoid conjugates. **J Immunol**, v. 127, n. 3, p. 1011–1018, 1981.

KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Crit Rev Microbiol**, v. 21, p. 123-152, 1995.

KABAT, E. A. Heterogeneity and structure of antibody-combining sites. **Ann. N. Y. Acad. Sci**, v. 169, p. 43, 1970.

LACHAUD, L. *et al.* Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 210-215, 2002.

LIRA, R. A. *et al.* Canine visceral leishmaniosis: A comparative analysis of the EIE leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos and the IFI-leishmaniose visceral canina Bio-Manguinhos kits. **Vet Parasitol**, v. 137, n. 1-2, p. 11 16, 2006.

LI, W. *et al.* Antibody Aggregation: Insights from Sequence and Structure. **Antibodies** v. 23, p. 1-23, 2016.

MACEDO, H.W. *et al.* Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 38, n. 2, 2002.
https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1676-24442002000200005.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Brasília: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 360.

MEDEIROS, I.M. *et al.* Leishmaniose (Visceral e Tegumentar). *In*: HINRICHSEN, Sylvia Lemos. **DIP: Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MEDEIROS, M.Z. **Reagentes para Diagnóstico: estratégias para a produção e desenvolvimento em Bio-Manguinhos**. Mestrado Profissional (Dissertação em Gestão de C&T em Saúde) – Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.

MENDES, P.E. **Desenvolvimento de controles de processo para a produção de conjugado de anticorpo anti-igg canina com peroxidase de raiz forte utilizado no kit para detecção de leishmaniose canina**. 107 f. Dissertação. (Mestrado Profissional em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.

MENDES, S.C. *et al.* Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. **Ciênc. saúde colet.**, v. 21, n. 1, 2016.

MITSUKA-BREGANÓ, R. *et al.* **Toxoplasmose adquirida na gestação e congênita: vigilância em saúde, diagnóstico, tratamento e condutas**. Londrina: EDUEL, 2010. p. 15-24. ISBN 978-85-7216-676-8.

MOAFI, M. *et al.* Leishmania Vaccines Entered in Clinical Trials: a review of literature. **Int J Prev Med.**, v. 7, n. 10, p. 95, 2019. DOI: 10.4103/ijpvm.IJPVM_116_18.

MOAFI, M. *et al.* Evaluation of IL-12RB1, IL-12B, and CXCR-3 and IL-17a expression in cases affected by a non-healing form of cutaneous leishmaniasis: An observational study design. *BMJ Open*, v. 7, e 013006, 2017.

MONACI, L. *et al.* Influence of baking time and matrix effects on the detection of milk allergens in cookie model food system by ELISA. *Food Chemistry*, v. 127, n. 2, p. 379-892, 2011.

MORENO, J. Assessment of vaccine-induced immunity against canine visceral leishmaniasis. *Front Vet Sci*, v. 6, n. 168, 2019. DOI: 10.3389/fvets. 2019.00168.

NADALETTI, L.P. **O problema do envelhecimento de proteínas sob diferentes perspectivas: evolução diferencial, redes complexas e sincronismo.** 99 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Engenharia Civil, Rio de Janeiro, 2014.

NAKANE, P.K.; KAWAOI, A. Peroxidase-labeled antibody: a new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*, v. 22, p. 1084–91, 1974.

OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog Allergy*, v. 5, p. 1-2, 1958.

PESSOA, A.R.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de produtos biotecnológicos.** Barueri, São Paulo, Manole, 2005. p. 444.

PRESENTINI, R.; TERRANA, B. Influence of the antibody-peroxidase coupling methods on the conjugate stability and on the methodologies for the preservation of the activity in time. *Journal of Immunoassay*, v. 16, n. 3, p. 309-324, 1995.

PROTOSCOLOS Roche Diagnostics GmbH, Interchim, Sinapse, Sigma-Aldrich, GE Life Science, Thermofisher. Alemanha: MERCK.

Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/roche/roche-protein-stabilization>. Acesso em: 10 ago. 2018.

REYBURN, T.H. *et al.* Characteristics of the T cell-mediated immune response to Maedi-Visna virus. *Virology*, v. 141, p. 1009-1012, 1992.

ROSATI, S. *et al.* Prokaryotic Expression and Antigenic Characterization of Three Recombinant *Leishmania* Antigens for Serological Diagnosis of Canine Leishmaniasis. *Clinical and diagnostic laboratory Immunology*, v. 10, n. 6, p. 1153, 2003.

ROSSI, C.N. Tecnologia recombinante a serviço da saúde animal. Vacina recombinante contra leishmaniose visceral canina. *Manual Técnico*, 1-19.

SANTOS, F.N. **Implementação da tecnologia de IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina.** 2012. 98 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2012.

SCALONE, A. *et al.* Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked Immunosorbent assay. **Veterinary parasitology**, v. 104, p. 275-285, 2002.

SILVA, J. L. *et al.* Ensino-aprendizagem do conceito de quantidade de matéria. II. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENSINO DE QUÍMICA, 2., Curitiba. **Anais**. Curitiba: UFPR, 2008.

SILVA JR, J. G. "Cromatografia de proteínas: guia teórico e prático." **Interciência**, v. 1, p. 111, 2004.

SIMONS, B. *et al.* Novel cross-linked enzyme antibody conjugates for Western blot and ELISA. **J Immunol Methods**, v. 31, n. 315, p. 88-98, 2006.

SHOKRI, A; FAKHAR, M; TESHNIZI, S.H. Canine visceral leishmaniasis in Iran: A systematic review and meta-analysis. **Elsevier**, v. 165, p. 76-78, 2017.

SOARES, D.F. Aspectos **Celulares e Imunológicos das manifestações clínicas na co-infecção por leishmania/HIV-1**. Graduação (Trabalho de Conclusão de Curso) - Universidade Veiga de Almeida, Rio de Janeiro, 2005.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. **Veterinary Parasitology**, v. 165 p. 1–18, 2009.

SCHROEDER, H. W.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **Journal of Allergy in Clinical Immunology**, 2010.

SHUTZ, A.J. *et al.* Stabilization of Horseradish Peroxidase (HRP) for the Use in Immunochemical Sensors. **SPIE: Intl Soc Opt Eng.**, v. 3105, p. 332-40, 1997.

TALMI-FRANK, *et al.* Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western blot analysis and antigen-specific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis. **Clinical Vaccine Immunology**, v.13, n.2, p.271-276, 2006.

TIZARD, I. **Introdução à imunologia veterinária**. 2. ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 545.

TSANG, V.C.W. *et al.* Optimization of the covalent conjugating procedure (NaIO₄) of horseradish peroxidase to antibodies for use in Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. **J Immunoassay**, v. 16, n. 4, p. 395-418, 1995.

UNIVERSIDADE ESTÁCIO DE SÁ. **Mecanismos efetores da imunidade celular e humoral**. Rio de Janeiro: Universidade Estácio de Sá, [2020]. Disponível em: <http://estacio.webaula.com.br/cursos/go0070/aula9.html>. Acesso em: 05 ago. 2020.

VAZ, A.J. **Imunoensaios: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

VÁZQUEZ-REY, María; LANG, Dietmar A. Aggregates in Monoclonal Antibody Manufacturing Processes. **Biotechnology and Bioengineering**, v 108, p. 1494-1508, 2011.

VERMEER A.W.P; NORDE W. The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein. **Biophys J**, v. 78, n. 1, p. 394–404, 2000.

VENKATESAN, P.; WAKELIN, D. Elisas for parasitologists: or lies, dammed lies and Elisas. **Parasitol.Today**, v. 9, n. 6, p.228-232, 1993.

VEITCH, N. J. *et al.* Transketolase from *Leishmania Mexicana* has a dual subcellular localization. **The Biochemical journal**, v. 382, n. pt 2, p. 759-767, 2004.

WHO Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Wkly Epidemiol Rec**, v. 91: 287-96, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the leishmaniases**. Ser: 2017.

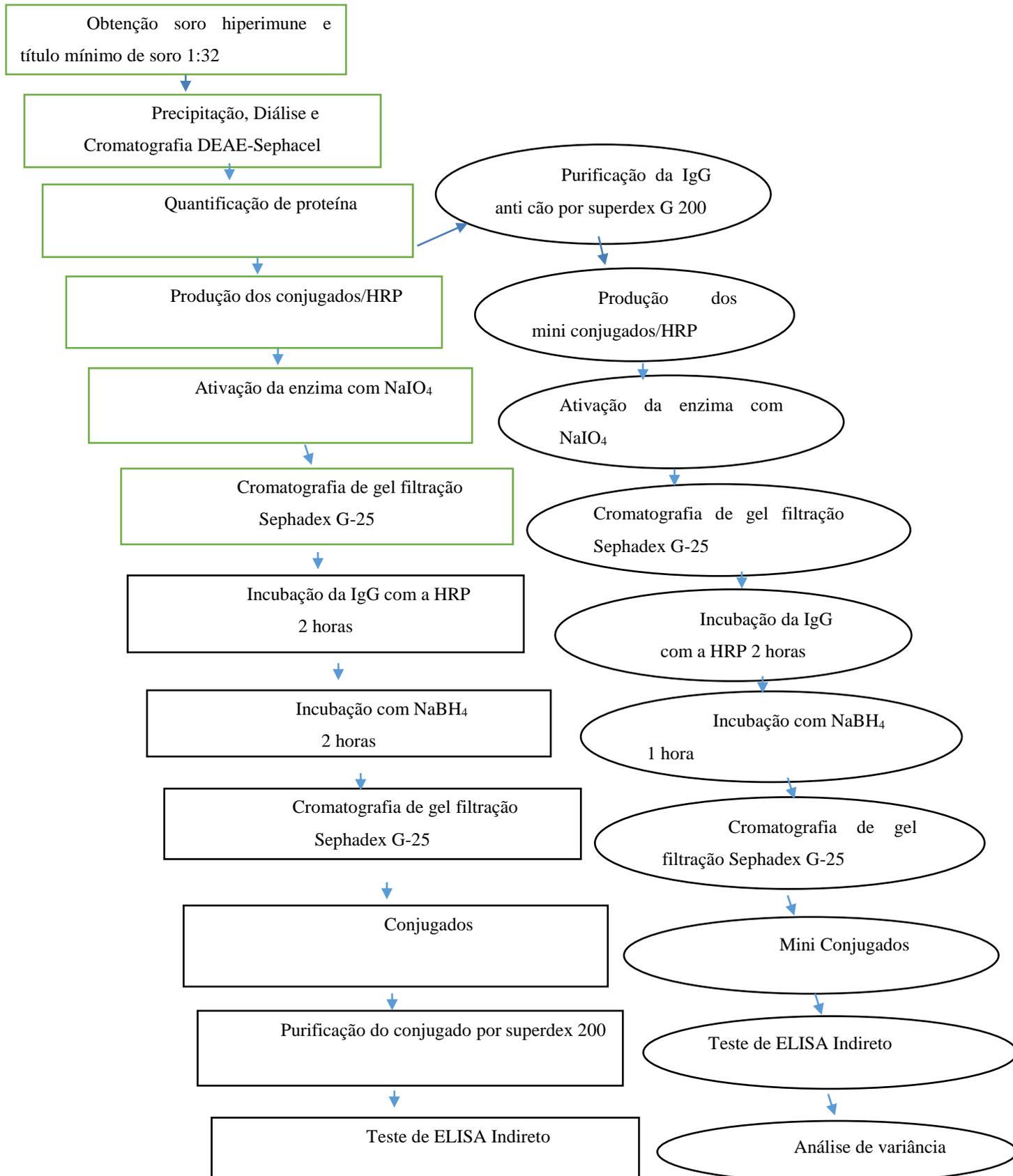
YOSHITAKE, S. *et al.* Mild and Efficient Conjugation of Rabbit Fab•L and Horseradish Peroxidase Using a Maleimide Compound and Its Use for Enzyme Immunoassay. **J. Biochem**, v. 92, p. 1413-1424, 1982.

ZHAO, J. *et al.* In Silico Methods in Antibody Design. **Antibodies**, v.7, p. 22, 2018.

ZANNETI, A.S. *et al.* Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-*Leishmania* antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systematic review. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.61, p. 42, 2019.

ZANNETI, A.S. *et al.* Serological cross-reactivity of *Trypanosoma cruzi*, *Ehrlichia canis*, *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Babesia canis* to *Leishmania infantum chagasi* tests in dogs. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 47, n.1, 2019.

APÊNDICE A – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PRODUÇÃO DOS CONJUGADOS



Fonte: A autora, 2020.