

# Otimização do conjugado Anti-IGG canino no kit diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC)

## Optimization of canine Anti-IGG conjugate in Canine Visceral Leishmaniosis (CVL) diagnostic kit

### RESUMO

Simone de Amorim Chermont<sup>1,\*</sup> 

Hilton Jorge Nascimento<sup>†</sup>

Marco Antonio Lemos de Andrade<sup>III</sup> 

Christiane Teixeira Pinto<sup>III</sup> 

Renata Chagas Bastos<sup>II</sup> 

Kaique Alves Brayner Pereira<sup>II</sup> 

Patrícia Barbosa Jurgilas<sup>I</sup> 

Isabella Fernandes Delgado<sup>IV</sup> 

**Introdução:** O diagnóstico da leishmaniose visceral canina (LVC) é de grande importância no controle da leishmaniose visceral, uma das doenças mais negligenciadas no mundo e de grande importância no campo da saúde pública. O teste *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) é amplamente utilizado pela possibilidade de diagnóstico em larga escala e baixo custo. **Objetivo:** Para otimizar a estequiometria do conjugado utilizado no kit EIE/CVL, foram modificados alguns parâmetros de conjugação e monitorização através de cromatografia de exclusão molecular no melhoramento do produto final. **Método:** O conjugado produzido por Bio-Manguinhos por purificação foi otimizado utilizando a cromatografia de gel de filtração SEC e foi avaliado através do desempenho do kit EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Manguinhos (EIE-LVC). Os conjugados foram produzidos com diferentes estequiometrias (IgG X peroxidase): conjugado atual, conjugado otimizado e conjugado otimizado e purificado. **Resultados:** A homogeneidade das médias dos conjugados no teste ELISA foi avaliada através do teste qui-quadrado, evidenciando assim a normalidade e confiabilidade dos dados. Com base nos dados estatísticos, amostras positivas obtidas pelo teste ELISA apresentaram homogeneidade ao nível de significância de 0,05, ou seja, grau de confiabilidade dos dados de 95%. A otimização da produção do conjugado anti-IgG canino, componente de suma importância utilizado na composição do Kit Bio-Manguinhos EIE LVC, contribuiu para assegurar a qualidade do kit e melhor diagnóstico da doença leishmaniose visceral canina, tornando-os mais sensíveis e de baixo custo para a saúde pública. **Conclusões:** Este trabalho demonstra que é possível otimizar o conjugado Anti-IgG Peroxidase Canina (HRP) utilizado no Kit EIE CVL, tornando-o mais específico e, em última análise, mais viável economicamente.

**PALAVRAS-CHAVE:** Peroxidase; Leishmaniose Visceral Canina; Kit Diagnóstico

### ABSTRACT

**Introduction:** The diagnosis of canine visceral leishmaniasis (CVL) is of great importance in the control of visceral leishmaniasis, a disease that is neglected worldwide and represents a significant public health problem. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test is widely used because of the possibility of large-scale diagnosis and low cost. **Objective:** The objective of this study was to optimize the stoichiometry of the conjugate used in the EIE/CVL kit; for this purpose, some conjugation and monitoring parameters were modified through molecular exclusion chromatography to improve the final product. **Method:** The conjugate produced by Bio-Manguinhos was optimized by purification using SEC gel filtration chromatography and evaluated using the EIE-leishmaniasis-visceral-canine-Bio-Manguinhos kit (EIE-LVC). The conjugates were produced with different stoichiometries (IgG X peroxidase): current conjugate, optimized conjugate and optimized and purified conjugate. **Results:** The results obtained were validated using the manual Canine Visceral Leishmaniasis test. The homogeneity of the conjugate means in the ELISA test was evaluated using the chi-square test, thereby demonstrating the normality and reliability of the data. Based on statistical data, positive samples obtained by the ELISA test showed

<sup>1</sup> Seção de Insumos, Conjugados e Apoio (SEICA), Vice-Diretoria de Produção (VPROD), Instituto de Tecnologia em Imunológicos (Bio-Manguinhos), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>II</sup> Laboratório de Macromoléculas (LAMAM), Desenvolvimento Tecnológico, Instituto de Tecnologia em Imunológicos (Bio-Manguinhos), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>III</sup> Divisão de Produção de Reativos (DIPRE), Vice-Diretoria de Produção (VPROD), Instituto de Tecnologia em Imunológicos (Bio-Manguinhos), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>IV</sup> Vice-presidência de Educação, Informação e Comunicação, Coordenação Geral de Educação, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>†</sup> *in memoriam*

\* E-mail: [simone.amorim@bio.fiocruz.br](mailto:simone.amorim@bio.fiocruz.br)

Recebido: 30 jan 2023

Aprovado: 04 set 2024

**Como citar:** Chermont AS, Nascimento HJ, Andrade MAL, Pinto CT, Bastos RC, Pereira KAB, Jurgilas PB, Delgado I. Otimização do conjugado Anti-IGG canino no kit diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina (LVC). *Vigil Sanit Debate*, Rio de Janeiro, 2024, v.12: e02299. <https://doi.org/10.22239/2317-269X.02299>



homogeneity at a significance level of 0.05, i.e. a data reliability level of 95%. The optimization of the production of the canine anti-IgG conjugate, an extremely important component used in the composition of the Bio-Manguinhos EIE LVC KIT, contributed to ensuring the quality of the kit and improving the diagnosis of canine visceral leishmaniasis disease, making it more sensitive and inexpensive for public health. **Conclusions:** This work demonstrates that it is possible to optimize the anti-IgG canine peroxidase (HRP) conjugate used in the EIE CVL kit to make it more specific and ultimately more economical.

**KEYWORDS:** Peroxidase; Canine Visceral Leishmaniasis; Diagnostic Kit

## INTRODUÇÃO

A leishmaniose é considerada uma doença infecciosa zoonótica e protozoária transmitida por mais de 70 espécies de fêmeas do gênero flebotomíneo, sendo uma das doenças mais negligenciadas no mundo. É a segunda doença parasitária em prevalência no mundo, seguida pela malária<sup>1</sup>. 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<sup>2</sup>. Quanto à diversidade, a doença consiste em quatro formas clínicas principais: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa ou mucocutânea, leishmaniose visceral, também conhecida como Kalazar, e leishmaniose dérmica pós-calazar<sup>3</sup>. A leishmaniose visceral (LV) é a forma mais grave da doença segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e pode causar a morte de aproximadamente 20 mil pessoas por ano em todo o mundo<sup>4</sup>. Geralmente, os casos de leishmaniose afetam comunidades pobres, seja em áreas rurais ou urbanas. Por razões ainda desconhecidas, mas que se supõe estarem associadas ao parasita e às respostas imunes eficazes do hospedeiro, muitas vezes a forma mais grave da doença não é observada<sup>5</sup>. A maioria dos cães soropositivos são aparentemente saudáveis, mas com alta carga infecciosa permite uma fácil infecção vetorial, sendo assim o cão é considerado um reservatório melhor que o humano, mesmo em fase inicial da infecção, pois infectam flebotomíneos na fase assintomática como em sintomático<sup>6</sup>. Até o momento, os testes sorológicos são a melhor opção para detectar leishmaniose, por serem métodos menos invasivos e por representarem uma boa relação custo-benefício em comparação com outras alternativas<sup>7</sup>. O teste considerado confirmatório para leishmaniose visceral canina (LVC) é o ensaio imunoenzimático (ELISA), de fácil leitura e utilizado em programas de controle e epidemiológicos<sup>8</sup>. Os reagentes de diagnóstico desempenham papéis importantes na saúde pública e na vigilância epidemiológica, identificando e monitorando doenças, além de avaliar a qualidade do sangue nos Serviços de Hemoterapia<sup>9</sup>. O kit ELISA, utilizado em todos os Laboratórios da Rede Pública do país, é produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), controlado pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED) e regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O conjugado anti-IgG canino é um componente essencial do kit de ensaio imunoenzimático (EIA) da LVC e é um insumo de extrema importância para a resposta da reação deste kit. O estudo visou otimizar o processo de conjugação utilizando as formas monoméricas da imunoglobulina, modificando alguns parâmetros de conjugação e monitoramento através de cromatografia de exclusão molecular. Foi obtida uma melhor especificidade da ligação da IgG com a peroxidase, que

contribuiu para uma melhor estabilidade do conjugado anti-IgG canino/peroxidase e otimização na qualidade do conjugado antes de chegar ao kit final.

## MÉTODO

Foram produzidos inicialmente nove conjugados na Seção de Insumos Conjugados e Apoio do Instituto Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Foram utilizadas diferentes estequiometrias pelo método de conjugação da IgG de cabra anticão com a enzima Peroxidase de Raiz-forte (HRP): Grupo 1: concentração (p/v) conjugado A: com estequiometria atualmente utilizada no kit diagnóstico (estequiometria atual) 45 mg/mL de IgG conjugada com 22,5 mg/mL de HRP; grupo teste B: 45 mg/mL de IgG conjugado com 45 mg/mL; grupo teste C: 45 mg/mL de IgG conjugada com 11,3 mg/mL. Através do ensaio de ELISA, elegemos o melhor conjugado do grupo 1 para iniciar outros testes. No grupo 2, a conjugação foi baseada na razão molar - Conjugado D: estequiometria atual - 0,3  $\mu$ M IgG: 0,5  $\mu$ M HRP; E: conjugado C produzido do grupo 1 - 0,3  $\mu$ M IgG: 1  $\mu$ M HRP e F: estequiometria teste, diminuindo a razão entre IgG e HRP - 0,2  $\mu$ M IgG: 1  $\mu$ M HRP. Após teste de ELISA, foram produzidos novos conjugados, grupo 3: G: conjugado com estequiometria atual - 0,3  $\mu$ M IgG: 0,5  $\mu$ M HRP; H: conjugado F produzido no grupo 2 - 0,2  $\mu$ M IgG: 1  $\mu$ M e I: conjugado com estequiometria grupo F, utilizando apenas o monômero da imunoglobulina após a purificação - 0,2  $\mu$ M IgG purificada: 1  $\mu$ M HRP, destacados na Tabela 1.

Foram selecionados os melhores conjugados dos grupos 2 e 3 para produção dos grupos seguintes que nomeamos de “mini”, pois utilizávamos menor quantidade de insumos, grupo 4: - J: conjugado H produzido do grupo 3 com seguinte estequiometria 0,2  $\mu$ M IgG: 1  $\mu$ M HRP; K: conjugado I, produzido no grupo 3, utilizando uma IgG purificada (apenas a forma monomérica), com seguinte estequiometria - 0,2  $\mu$ M IgG: 1  $\mu$ M e conjugado L: conjugado I, com alteração no tempo de reação (incubação mais curta na etapa do borohidreto), demonstrados na Tabela 2. Todos os conjugados foram analisados quanto à sua homogeneidade e peso molecular por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) e os dados obtidos foram validados pelo teste do manual EIE de LVC. A homogeneidade das médias dos conjugados no teste ELISA foi avaliada pelo teste qui-quadrado, evidenciando assim a normalidade e credibilidade dos dados com grau de confiabilidade dos dados de 95%.

A funcionalidade foi analisada por teste ELISA indireto, controles positivos e negativos de amostras de soro canino foram

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

	IgG	HRP
<b>Conjugados grupo 1</b>		
A (Estequiometria atual)	45 mg/mL	22,5 mg/mL
B (Estequiometria teste)	45 mg/mL	45 mg/mL
C (Estequiometria teste)	45 mg/mL	11,3 mg/mL
<b>Conjugados grupo 2</b>		
D (Estequiometria atual)	0,3 µM	0,5 µM
E (Conjugado C grupo 1)	0,3 µM	1 µM
F (Estequiometria teste)	0,2 µM	1 µM
<b>Conjugados grupo 3</b>		
G (Estequiometria atual)	0,3 µM	0,5 µM
H (Conjugado F do grupo 2)	0,2 µM	1 µM
I (Estequiometria do conjugado F do grupo 2 - monômero de IgG)	0,2 µM	1 µM

Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

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

Mini conjugados grupo 4	IgG	HRP
J (conjugado H do grupo 3)	0,2 µM	1 µM
K (conjugado I do grupo 3)	0,2 µM	1 µM
L (conjugado K alteração no tempo de conjugação)	0,2 µM	1 µM

Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

utilizados na diluição 1:100 e anticorpo secundário marcado com enzima peroxidase de raiz-forte (HRP) a 1/60000, que é baseado em antígenos solúveis de formas promastigotas de *Leishmania major*-like. O kit é produzido por Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, e todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante.

A imunoglobulina utilizada foi obtida após purificação utilizando cromatografia de troca iônica e submetida à cromatografia preparativa de exclusão molecular em coluna Superdex 200 HR 30/10, realizada em estação de trabalho G&E Heathcare. A coluna foi equilibrada com uma solução provisória de fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,4, a uma vazão de 0,5 mL/min com o limite de pressão do sistema ajustado em 1,5 MPa. Foi aplicado um volume de 100 µL da amostra. A detecção das frações proteicas foi realizada por leituras de absorbância em 220 nm e 280 nm no equipamento (GE Ealthcare).

A medição de ligação de afinidade por termoforese em microescala (MST) foi realizada em um aparelho NanoTemper Monolith NT.115 (Nano Temper Technologies). Resumidamente, o antígeno *Leishmania major*-like foi marcado usando um kit de rotulagem de proteína Monolith RED-NHS 2ª Geração. Os dados foram obtidos com o software MO.Control V2.1.1 (NanoTemper Technologies, Munique, Alemanha) e os dados registrados foram

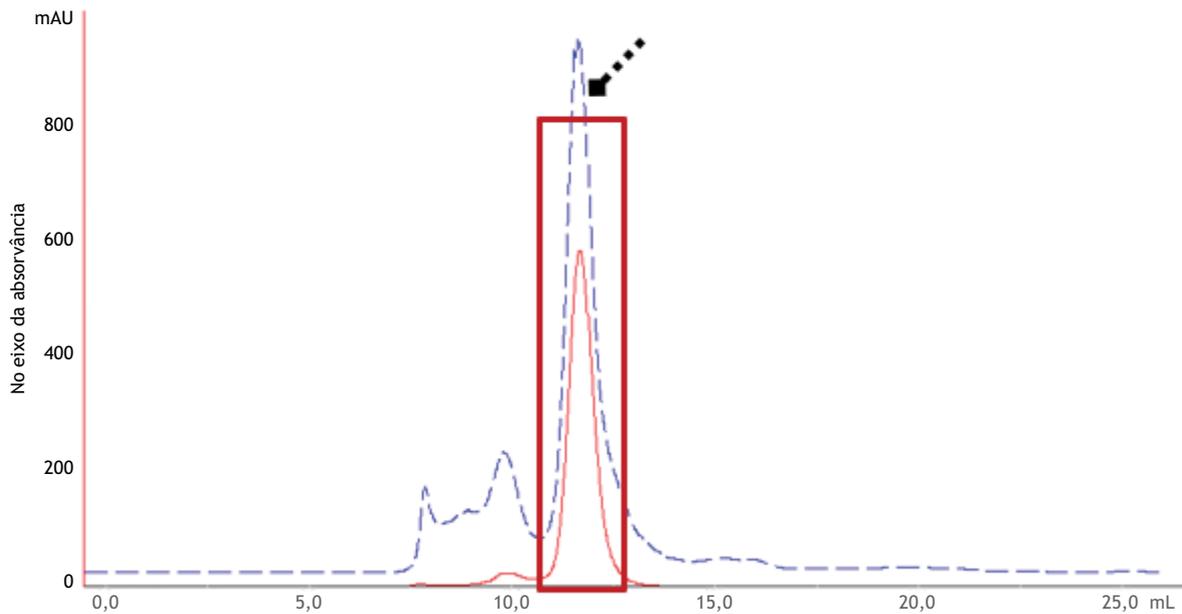
analisados com o software MO.Affinity Analysis V3.0.4 (NanoTemper Technologies, Munique, Alemanha).

Os dados foram compilados no programa Microsoft Excel 2013. As estatísticas do conjugado J (“mini” sem purificação), conjugado K (“mini” monômero) e do conjugado L (“mini” monômero em menor tempo), foram avaliadas por média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação dos resultados positivos. Foi analisado um estudo estatístico de cada grupo de conjugado, demonstrado pelo teste qui-quadrado com grau de confiabilidade dos dados de 95%.

## RESULTADOS

O melhor resultado obtido entre os conjugados produzidos com diferentes estequiometrias foi a razão molar IgG:HRP µM, que demonstrou menos IgG e a HRP livres visualizado por SEC, resultado este corroborado pelo teste de ELISA, porém, o pico proteico referente ao conjugado apresentou peso molecular elevado (acima de 300 kDa). Conjugados produzidos estrategicamente considerando o peso molecular de IgG e razão molar HRP µM demonstraram por cromatografia por exclusão de tamanho um único pico proteico, apesar do alto peso molecular (acima de 300 kDa). A razão molar IgG:HRP µM conjugada produzida usando a IgG purificada (somente a forma monomérica) apresentou um único pico proteico por cromatografia por exclusão de tamanho com 190 kDa (Figura 1), que mostrou a melhor relação segundo o procedimento ELISA, além disto demonstrou também ser 8% mais sensível do que o padrão de kit aprovado. Após a produção dos “minis” conjugados, devido ao volume reduzido que apresentavam, estes foram analisados apenas nos ensaios ELISA indireto n = 9 para soro positivo, negativo e sem soro (SS). O conjugado K mostrou o melhor resultado de acordo com a maior curva de D.O. para o controle positivo, a menor D.O. para o controle negativo e (SS), conforme exibido na Figura 2. As médias dos “minis” conjugados (Figura 3) foram mostradas pelo teste qui-quadrado a um grau de confiabilidade dos dados de 95%. Os resultados desses valores expuseram 95% de probabilidade de ocorrência (número de repetições do experimento). A avaliação da funcionalidade dos conjugados produzidos contra o antígeno *Leishmania major*-like foi comparada pela análise termoforese em microescala que verificou a variação da concentração do antígeno *Leishmania major*-like que causou aumento na resposta em concentrações mais elevadas, o que indica a presença de interação intermolecular entre todos os conjugados testados, observou-se que o conjugado atual possui EC50 entre 235,1-333,3 pM, o conjugado purificado apresentou 182,1-664,1 pM e, por último, o conjugado otimizado, 77,45-2,258.1 pM. Por isso, pode-se inferir que as amostras apresentaram resultados semelhantes quanto à dose efetiva para a qual metade da molécula alvo se encontra no estado ligado (Figura 4).

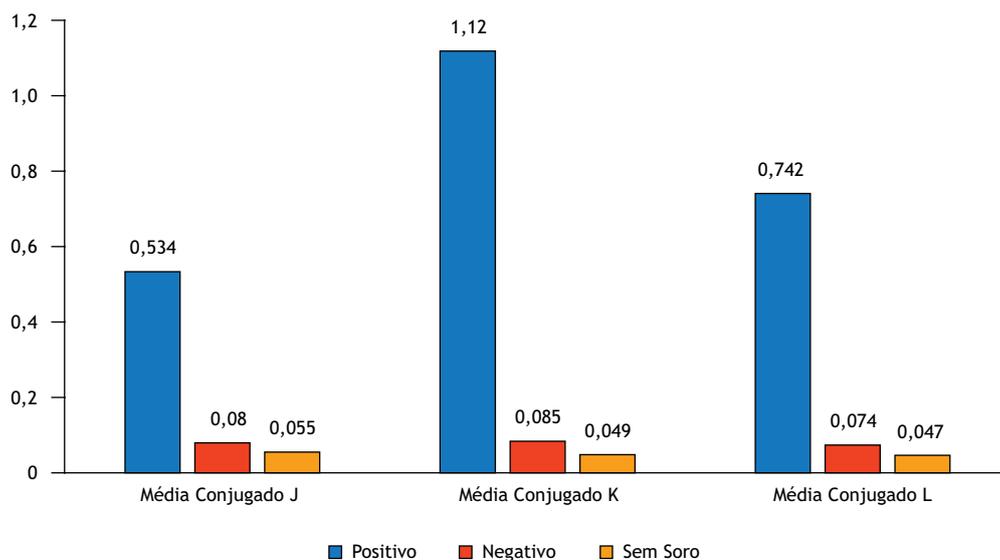
Como não houve saturação completa da curva, devido a títulos insuficientes, a constante de dissociação (Kd) não pôde ser calculada.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

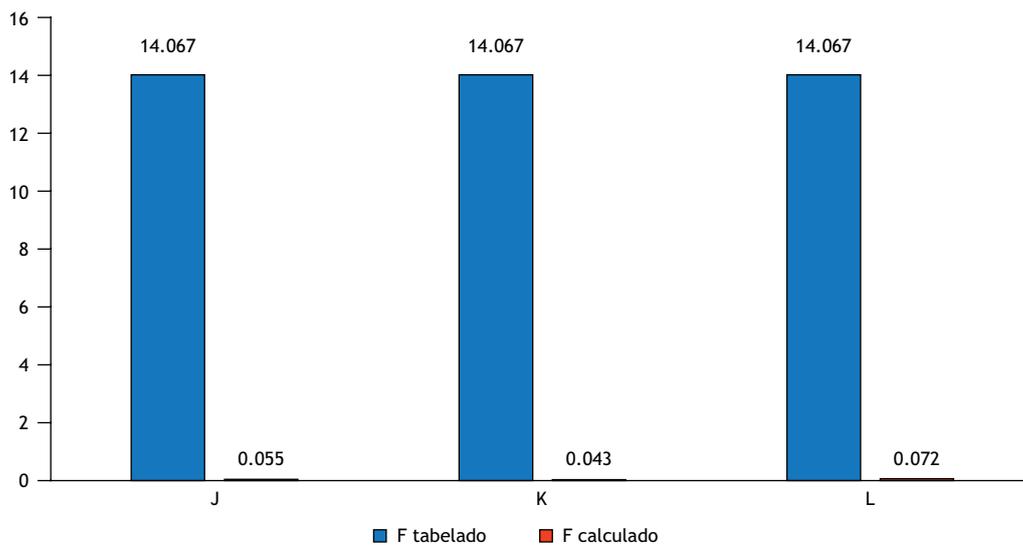
Figura 1. Perfil cromatográfico da purificação de imunoglobulina por Superdex 200 (24 mL) a 280 nm, em solução PBS 0,01 M pH 7,2. O retângulo indica a sobreposição do monômero da IgG, após a purificação (linha inteira) sob o perfil cromatográfico da imunoglobulina original (linha tracejada). Volume de aplicação 100 µL.

CONTROLES	CONJUGADO J (D.O)	DESVIO PADRÃO	CONJUGADO K (D.O)	DESVIO PADRÃO	CONJUGADO L (D.O)	DESVIO PADRÃO
POSITIVO	0,534	0,06	1,12	0,077	0,742	0,081
NEGATIVO	0,08	0,01	0,085	0,007	0,074	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



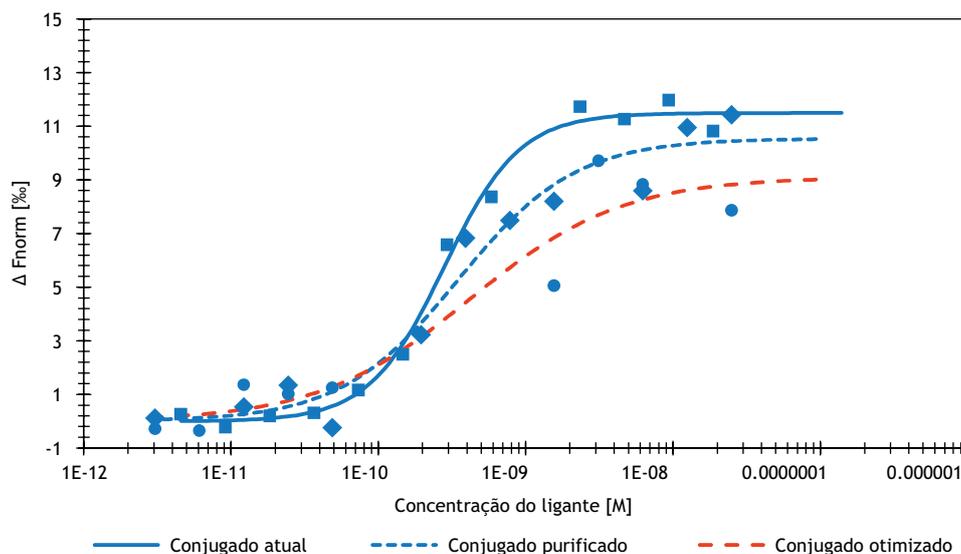
Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

Figura 2. Resultado das médias de D.O., desvio padrão e UA referentes aos “mini” conjugados. Conjugado J (Melhor conjugado produzido no grupo 3, sem purificar a IgG): D.O.: Densidade óptica dos meios de controles (positivo, negativo, SS), desvio padrão e unidade arbitrária (UA); Conjugado K (melhor conjugado produzido no grupo 3): controles (positivo, negativo, SS), desvio padrão e UA: unidade arbitrária e conjugado L, melhor conjugado a partir do grupo 3 (menor tempo de conjugação): (positivo, negativo, SS), desvio padrão e unidade arbitrária.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

Figura 3. Análise da positividade dos “mini” conjugados J, K e L pelo teste qui-quadrado. Teste qui-quadrado ( $X^2$ ) dos conjugados J, K e L onde calculado  $X^2 = 0,055$ ,  $0,043$  e  $0,072$  -  $X^2$  tabulado =  $14,067$  para os três “mini” conjugados. As barras tachadas representam F tabulado e as barras não divididas representam F calculado.



Fonte: Elaborada pelos autores, 2020.

Figura 4. Avaliação da afinidade de ligação utilizando a técnica de Termoforese em microescala (MST): gráfico da curva dose-resposta  $\Delta F_{norm}$  em função das diferentes concentrações dos conjugados.

## DISCUSSÃO

A LVC tornou-se uma doença urbana que precisa ser continuamente 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, essenciais para a detecção precoce. Em 2011, o Ministério da Saúde notificou a substituição do protocolo de diagnóstico LVC

no qual eram utilizados o teste ELISA, como método de triagem, e o teste de imunofluorescência indireta (RIFI), como teste confirmatório (Nota Técnica nº 01/2011).

Os ensaios sorológicos convencionais para diagnóstico de LVC (imunofluorescência indireta, teste de aglutinação direta e ELISA) são utilizados tanto para diagnóstico individual como em estudos epidemiológicos.



Em geral, muitos testes sorológicos podem ser utilizados como marcadores de doenças infecciosas, mas nenhum deles apresenta 100% de sensibilidade e especificidade<sup>11</sup>.

O teste ELISA baseia-se na ligação de um anticorpo a um único antígeno detectável através de reações enzimáticas. Este teste caracteriza-se pela rapidez e, portanto, pela possibilidade de realizar um maior número de amostras, obtendo resultados automatizados, que excluem a subjetividade da leitura e sua alta especificidade<sup>12,13,14</sup>. Entre outras vantagens do ELISA estão a estabilidade em relação ao soro de aglutinação microscópica, o pequeno volume de reagentes necessários e a obtenção de resultados de natureza quantitativa, o que permite rápida execução diagnóstica e apresenta baixo nível de risco biológico. Essa técnica também é utilizada para estudos epidemiológicos, oferece simplicidade de execução e baixo custo<sup>15,16</sup>.

Em nosso estudo utilizamos o teste de ELISA indireto, amplamente utilizado para detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro. Vários métodos indiretos de ELISA utilizam vírus inteiros ou vírus Maedi-Visna recombinante (MVV)<sup>17,18</sup>. Como o conjugado é importante por ter sido produzido da ligação de anticorpo e do antígeno em questão, utilizando o conjugado k ("mini" monômero), com uma IgG purificada (apenas a forma monomérica), faz-se necessária a otimização dos processos de conjugação, a fim de obter resultados mais específicos. Apesar disso<sup>19</sup>, cita a possibilidade de ligação de mais de uma molécula de HRP (5-6) a uma molécula de IgG, o que provoca a formação de um conjugado muito grande, gerando diminuição na taxa de penetração tecidual, no caso dos ensaios imuno-histoquímicos, não sendo verificada, se o conjugado for usado apenas para detecção de antígeno, como na microscopia, o tamanho do conjugado não afeta o ensaio<sup>19</sup>. No caso do ensaio ELISA, a presença de fluorescência inespecífica pode gerar adsorção de moléculas de anticorpos à superfície celular sem reação antígeno-anticorpo, o que pode mostrar um falso evento. Para evitar a interferência de falsa positividade nos resultados, é necessário quantificar e eliminar a fluorescência inespecífica<sup>20</sup>. Além disso, a presença de agregados de imunoglobulinas no conjugado poderia afetar a atividade biológica, causando diminuição da especificidade bem como a reprodutibilidade do ensaio<sup>21</sup>.

A funcionalidade dos conjugados produzidos foi avaliada contra o antígeno Lsh através da utilização da análise de MST<sup>22</sup>. Ressalta-se que a checagem de medição demonstrou baixo sinal-ruído em ambos os conjugados, indicando a presença de interação intermolecular detectável na concentração avaliada. O ensaio de afinidade de ligação forneceu os dados da curva de dose-resposta demonstrados na Figura 4, cuja variação da concentração dos conjugados Lsh resultou num aumento da  $\Delta F_{norm}$  nas concentrações mais elevadas. O intervalo de confiança (IC95%) para o EC50 determinado pelo *software* não indicou diferença estatisticamente significativa entre as amostras. Por exemplo, observou-se que o conjugado atual possui EC50 entre 235,1-333,3 pM, o conjugado purificado apresentou 182,1-664,1 pM e, por último, o conjugado otimizado, 77,45-2,258,1 pM. Por isso, pode-se inferir que as amostras apresentaram resultados semelhantes quanto a

dose efetiva para a qual metade da molécula-alvo se encontra no estado ligado.

De acordo com dados atuais, a estequiometria preconiza a produção de conjugados de imunoglobulinas com faixas de peroxidase de 1:1-1:4 (IgG:HRP), sempre considerando a possibilidade de purificação pós-conjugação para separação de formas livres (Protocolos Roche Diagnostics GmbH, Interchim, Synapse, Sigma-Aldrich, GE Life Science, Thermofisher). Com base nestas informações sobre a produção de conjugados e a necessidade de otimizar o kit detecção de LVC, projetamos estrategicamente nossos experimentos produzindo quatro grupos de conjugados, em que estudamos a estequiometria ideal e condições de melhoria. Com base na literatura foram obtidos os seguintes dados comprovando a melhor média das leituras da reatividade dos conjugados, em unidades arbitrárias (UA), em que o tempo normal do conjugado com monômero resultou no valor de 11,267, conjugado com monômero em tempo reduzido L = 9,399 e o conjugado produzido com IgG não purificada e mesma estequiometria utilizada para os monômeros = 5,339. Observa-se que o maior valor de UA obtido foi relacionado ao conjugado, que foi produzido com a forma monomérica da imunoglobulina, na estequiometria estabelecida. Também foi possível verificar que os conjugados com monômeros tiveram melhor desempenho que o outro conjugado, indicando que apesar de possuírem 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 redução reação com NaBH<sub>4</sub>. A melhor titulação escolhida foi aquela que apresentou os maiores resultados de UA, com baixos valores de leituras no branco e nas amostras negativas e leituras altas nas amostras positivas, como mostrado anteriormente<sup>23</sup>. O parâmetro de variação expressa a precisão e repetibilidade de um ensaio, e constatou-se que o conjugado produzido com anticorpo purificado (forma monomérica) apresenta menor coeficiente de variação quando comparado ao conjugado produzido com anticorpo sem purificação, indicando maior precisão dos dados e garantindo maior reprodutibilidade e homogeneidade dos dados dos testes realizados. O conjugado produzido utilizando a forma monomérica de IgG em um tempo de incubação mais curto também mostrou um coeficiente de variação menor em comparação ao conjugado produzido sem purificação do anticorpo.

Estes dados sugerem que a otimização da estequiometria é importante na produção do conjugado, mas a purificação do anticorpo utilizado nesta reação é essencial para garantir a reprodutibilidade e precisão dos dados obtidos. Com base em nosso estudo estatístico, demonstramos que as amostras positivas obtidas pelo teste ELISA apresentam homogeneidade ao nível de significância de 0,05, ou seja, nível de confiabilidade dos dados de 95%<sup>24</sup>.

## CONCLUSÕES

O presente estudo relatou a otimização da produção do conjugado anti-IgG canino, como um insumo essencial utilizado na



composição do Kit Bio-Manguinhos EIE LVC, contribuindo para o diagnóstico da doença LVC, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde pela utilização deste kit como técnica confirmatória para monitoramento de doenças.

A otimização da estequiometria do conjugado produzido, bem como a utilização da forma monomérica da imunoglobulina, é essencial para melhorar a qualidade dos kits diagnósticos, tornando-os mais sensíveis, específicos e reduzindo custo.

## REFERÊNCIAS

1. Moafi M, Rezvan H, Sherkat R, Taleban R, Asilian A, Zarkesh Esfahani SH 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*. 2017;7(1):1-9. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2016-013006>
2. Giunchetti RC, Silveira P, Resende LA, Leite JC, Melo-Junior OAO, Rodrigues-Alves ML et al. Canine visceral leishmaniasis biomarkers and their employment in vaccines. *Vet Parasitol*. 2019;271(97):87-97. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.05.006>
3. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(11):873-82. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
4. World Health Organization - WHO. Control of the leishmaniasis. Geneva: World Health Organization; 2017
5. Fievez AMC, Silva-Freitas ML, Sousa AQ, Santos-Oliveira JR, Da-Cruz AM. Lower levels of leptin are associated with severity parameters in visceral leishmaniasis patients. *PLoS ONE*. 2019;14(3):1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214413>
6. Ministério da Saúde (BR). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.
7. Coelho EA, Costa LE, Lage DP, Martins VT, Garde E, Pereira NCJ 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. *Vet Parasitol*. 2016;215:63-71. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.006>
8. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BR). Instrução normativa Nº 13, de 6 de outubro de 2003. Aprova o regulamento de boas práticas de fabricação de produtos de uso veterinário. Diário Oficial União. 7 out 2003.
9. Medeiros MZ. Reagentes para diagnóstico: estratégias para a produção e desenvolvimento em Bio-Manguinhos [mestrado]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2004.
10. Fundação Ezequiel Dias - Funed. Manual do programa de avaliação da qualidade imunodiagnóstico da leishmaniose visceral canina. Belo Horizonte: Fundação Ezequiel Dias; 2016[acesso 23 jul 2024]. Disponível em: <http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2019/02/Manual-PAQ-Leishmaniose-Visceral-Canina.pdf>
11. Dourado ZF, Silva HD, Silveira Lacerda EP, García Zapata MTA. Panorama histórico do diagnóstico laboratorial da leishmaniose visceral até o surgimento dos testes imunocromatográficos (RK39). *Rev Patol Trop*. 2008;36(3):205-14 <https://doi.org/10.5216/rpt.v36i3.3172>
12. Herenio EM, Fortes RC, Rincon G. Prevalência da leishmaniose visceral em cães do Distrito Federal, segundo dados do centro de zoonoses de Brasília. *J Health Sci Inst*. 2014;32:126-29
13. Forsström B, Axnäs BB, Rockberg J, Danieisson H, Bohlin A, Uhlen M. Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*. 2015;10(3):1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121673>
14. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi LSG, Vesco G, Mignone W 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. *Vet Parasitol*. 2002;104(4):275-85. [https://doi.org/10.1016/s0304-4017\(01\)00643-4](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(01)00643-4)
15. Tizard I, Ni Y. Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. *J Am Vet Med Assoc*. 1998;213(1):54-60
16. Macedo HW, Peralta RHS, Cipriano A, Sarmiento MR, Vaz AJ, Peralta JM et al. Avaliação de testes imunológicos para o diagnóstico da neurocisticercose. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;(38):1-11. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442002000200005>
17. Reyburn HT, Roy DJ, Blacklaws BA, Sargan DR, Watt NJ, McConnell I. Characteristics of the T cell-mediated immune response to maedi-visna virus. *Virology*. 1992;191(2):1009-12. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90282-t](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90282-t)
18. Carey DE, Reuben R, Panicker KN, Shope RE, Myers RM. Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res*. 1971;59(11):1758-60
19. Nakane, PK, Akira K. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J Histochem Cytochem*. 1974;22(12):1084-91. <https://doi.org/10.1177/22.12.1084>
20. Golim MA, Deffune, E, Rossi Ferreira R, Oliveira APE, Padovani CR, Machado PEA. Conjugação e validação de controle isotípico IgG1-FITC para uso em citometria de fluxo. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(4):361-8. <https://doi.org/10.1590/S1516-84842007000400008>
21. Vázquez Rey, M, Lang, Dietmar AL. Aggregates in monoclonal antibody manufacturing processes. *Biotechnol Bioeng*. 2011;108(7):1494-508. <https://doi.org/10.1002/bit.23155>
22. Asmari M, Waqas M, Ibrahim AE, Halim SA, Khan A, Al Harrasi A et al. Microscale thermophoresis and molecular modelling to explore the chelating drug transportation in the milk to infant. *Molecules*. 2022;27(14):1-18. <https://doi.org/10.3390/molecules27144604>



23. Santos FN. Implementação da tecnologia de IgY para o diagnóstico da leishmaniose visceral canina [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2012.

24. Doria Filho U. Introdução à bioestatística para simples mortais. São Paulo: Elsevier; 1999

---

#### Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e foi financiado por meio de bolsa por Bio-Manguinhos/Fiocruz. Os dados são parte da dissertação de Mestrado Profissional de S.A.C. no Programa de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

#### Contribuição dos Autores

Chermont SA - Concepção, planejamento (desenho do estudo), aquisição, análise, interpretação dos dados e redação do trabalho. Nascimento HJ<sup>†</sup> - Interpretação dos dados. Andrade MAL - Concepção. Pinto CT - Redação do trabalho. Bastos RC - Interpretação dos dados. Pereira KAB - Análise e redação do artigo. Jurgilas PB - Interpretação dos dados. Delgado I - Interpretação dos dados, análise e revisão do artigo. Todos os autores aprovaram a versão final do trabalho.

#### Conflito de Interesse

Os autores informam não haver qualquer potencial conflito de interesse com pares e instituições, políticos ou financeiros deste estudo.



Licença CC BY. Com essa licença os artigos são de acesso aberto que permite o uso irrestrito, a distribuição e reprodução em qualquer meio desde que o artigo original seja devidamente citado.