

Anais do 2º Seminário Anual Científico e Tecnológico

Vacinas, biofármacos, reativos para diagnósticos e outros temas

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos



Anais do 2º Seminário Anual Científico e Tecnológico

Vacinas, Biofármacos, Reativos para diagnósticos e Outros Temas

Rio de Janeiro
2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Seção de Gestão de Documentos e Arquivos / SIGDA
Bio-Manguinhos / FIOCRUZ - RJ

F981

Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em
Imunobiológicos.

Anais do 2º seminário anual científico e tecnológico :
vacinas, biofármacos, reativos para diagnósticos e outros temas
/ Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. – Rio de Janeiro,
2014.

142 p.

1. Inovação tecnológica. 2. Vacinas. 3. Biofármacos. 4.
Reativos para diagnóstico. 5. Resumos. 6. Instituto de
Tecnologia em Imunobiológicos. 7. Bio-Manguinhos. I. Título.

CDD 303.483

CRÉDITOS

Ministro da Saúde

Arthur Chioro

Presidente da Fundação Oswaldo Cruz

Paulo Ernani Gadelha Vieira

Diretor de Bio-Manguinhos

Artur Roberto Couto

Vice-diretora de Qualidade

Maria da Luz Fernandes Leal

Vice-diretor de Produção

Antonio de Pádua Barbosa

Vice-diretor de Desenvolvimento Tecnológico

Marcos da Silva Freire

Vice-diretora de Gestão e Mercado

Cristiane Frensch Pereira

Coordenação Científica e Tecnológica

Akira Homma e Reinaldo de Menezes Martins

Membros

Amilcar Tanuri | Antonio de Pádua Barbosa | Antonio Gomes Pinto | Cristina de Albuquerque Possas | Elena Cristina Caride Campos | Elezer Monte Blanco | José Antonio de Sá Ferreira | José Godinho da Silva Junior | Marco Alberto Medeiros | Marcos da Silva Freire | Maria da Luz Fernandes Leal | José Procópio Senna | Sheila Farage

Comissão Julgadora Independente

Francisco de Paula Pinheiro | Maria Notomi Sato | Paulo Lee Ho

Comissão Executiva

Cristiane Frensch Pereira (Coordenação) | Andrea Good Couto | Isabella Lira Figueiredo | Maria de Lourdes Sousa Maia | Renata Ribeiro Gómez de Sousa

Secretaria Executiva

Cássia Machado e Patricia Pedroso Porto

Assessoria de Comunicação

Renata Ribeiro Gómez de Sousa (Coordenação) | Alessandra Lopes | Bernardo Portella | Danielle dos Santos | Danielle Guedes | Denyse Oliveira | Isabela Pimentel | Lívia Maldonado | Rodrigo Pereira | Gabriela Ponte | Paulo Schueler | Talita Wodtke

Apoio

Marcelo Corrêa de Castro e Rododlpho Silva de Paula

Editoração

Carina Duim Gonçalves e Priscila do Nascimento Silva - SIGDA

Revisão Final

Cristina de Albuquerque Possas

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| APRESENTAÇÃO | 15 |
| INTRODUÇÃO | 17 |
| VACINAS | 19 |
| V1 Aprimoramento da produção do vírus da febre amarela em biorreatores de tanque agitado de 3 Litros | 21 |
| V2 Mapeamento dos epitopos B do vírus do papilloma humano: procura de biomarcadores e vacina | 23 |
| V3 Avaliação da imunogenicidade do componente caxumba da vacina tríplice viral na rotina do programa nacional de imunizações | 25 |
| V4 Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults | 27 |
| V5 Desenvolvimento e validação de método alternativo para determinação de Fósforo no Polissacarídeo Meningocócico A (PSA) e Polirribosil Ribitol Fosfato (PRRP) | 29 |
| V6 Desenvolvimento do processo " downstream" na produção de uma vacina tetravalente recombinante contra dengue | 31 |
| V7 Elaboração de material de referência in house para vacina de Haemophilus influenzae tipo B e seus produtos intermediários | 33 |
| V8 Método alternativo por Espectrometria de Infravermelho próximo para determinação da umidade residual na vacina tríplice viral liofilizada | 35 |
| V9 Thermostability Study of Meningococcal Conjugate Bulks produced for phase III clinical trials | 37 |
| V10 Cost Comparison: from pilot to large scale manufacturing of the Brazilian Meningococcal C conjugate vaccine | 39 |
| V11 Vacina febre amarela de subunidade em plataforma vegetal: imunogenicidade e proteção de camundongos contra desafio letal .. | 41 |
| V12 Host soluble factors induced by Moreau BCG, in vitro, in the initiation of monocyte apoptosis in healthy donors | 43 |

| | |
|--|----|
| V13 Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de ácido siálico no polissacarídeo meningocócico C por cromatografia iônica | 45 |
| V14 Development and validation of multiplex test for measurement of antibodies against heptavalent vaccine componentes | 47 |
| BIOFÁRMACOS | 49 |
| B1 Clonagem, expressão e purificação de proteína imunogênica de <i>Acinetobacter baumannii</i> | 51 |
| B2 Avaliação da homogeneidade da eritropoetina humana recombinante através de métodos farmacopeicos | 53 |
| B3 Análise da marcação do anticorpo monoclonal anti-PBP2a com ^{99m} Tc para diagnóstico de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) | 55 |
| B4 Computational characterization of the CDR regions of two distinct mabs targeting the interaction with HBSAG | 57 |
| B5 Eficiência da purificação, concentração e formulação dos soros hiperimunes do Instituto Vital Brazil, segundo a dinâmica dos níveis de imunoglobulinas | 59 |
| B6 Análise do rendimento do complexo produtivo dos soros hiperimunes do Instituto Vital Brazil (IVB) | 61 |
| B7 Avaliação de alternativas de meio de cultivo para a produção da eritropoetina humana recombinante expressa em células CHO em suspensão | 63 |
| B8 Production of monoclonal antibodies in suspension culture of D1-4G2-4-15 hybridoma using spinner flasks system | 65 |
| B9 Estudo de diferentes suplementos de meios de cultivo para otimizar cultivos de células CHO para produção de eritropoetina humana recombinante | 67 |
| B10 Complementarity determining regions (CDR) identification in monoclonal antibodies gene sequences | 69 |
| B11 Clonagem e expressão de anticorpo monoclonal anti-CD20 recombinante: primeiros passos para desenvolvimento de novos anticorpos terapêuticos contra o câncer | 71 |

| | |
|--|----|
| B12 Clonagem e Expressão de hormônio do crescimento humano recombinante (hGH) em Escherichia coli | 73 |
| B13 Rapid and efficient immunization method using popliteal lymph nodes to generate monoclonal antibodies | 75 |
| B14 Comparação de metodologias de quantificação celular para monitoramento de cultivos de células animais em suspensão | 77 |
| B15 Determinação de eritropoetina humana recombinante em amostras do produto final Alfaepoetina humana recombinante por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência | 79 |
| B16 Investigação dos mecanismos moleculares pelos quais o PCA3 modula a sobrevivência de células de câncer de próstata | 81 |
| B17 Determinação de aminoácidos usados como excipientes no biofármaco alfaepoetina humana recombinante por eletroforese capilar com detecção por UV sem derivatização | 83 |
| B18 High-throughput cloning and expression of human ABC transporters in Baculovirus/Insect Cell system customized for X-ray crystallography studies | 85 |
| B19 Avaliação da expressão gênica de citocinas e polimorfismo da IL-28B em voluntários sadios após administração de IFNa peguilhado . | 87 |
| REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO | 89 |
| R1 O papel de Bio-Manguinhos na prestação de serviços ao produto NAT HIV/HCV: Assessoria Científica e suporte técnico à base instalada | 91 |
| R2 Shistosoma mansoni antigens recognized by serological-proteomic approach as potentially able to distinguish the clinical status of endemic area residentes | 93 |
| R3 Teste de quantificação de CV HCV desenvolvido em Bio-Manguinhos: avaliação desempenho frente a amostras de pacientes em tratamento com Alfapeg-Interferona | 95 |
| R4 Incorporação do alvo HBV no Kit NAT Brasileiro produzido por Bio-Manguinhos | 97 |
| R5 Plataforma alternativa e flexível para o KIT NAT Brasileiro | 99 |

| | |
|--|-----|
| R6 Desenvolvimento de estratégias para o aperfeiçoamento da produção do conjugado Anti-IgG Canina/Peroxidase utilizado no Kit EIE/LVC | 101 |
| R7 Comparative study of physico-chemical and immunological properties of the monoclonal anti-CD4 produced by bioreactor and murine sources | 103 |
| R8 Padronização da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real na detecção do DNA de Leishmania | 105 |
| R9 Padronização de uma metodologia de ensaio na plataforma de microarranjos líquidos utilizando sífilis como modelo | 107 |
| R10 Technological innovation: adaptation of a latex agglutination test for anti-Rotavirus-A IgY employment | 109 |
| R11 Avaliação de novos insumos e reagentes para viabilizar a conservação do Kit EIE Leishmaniose Canina entre 2 e 8° C | 110 |
| OUTROS TEMAS | 113 |
| OTR1 Management of the database System Cells -Development and Implementation | 115 |
| OTR2 Bioform: o CRF eletrônico de Bio-Manguinhos | 117 |
| OTR3 Notificações de eventos adversos e queixas técnicas: interface entre divisão de atendimento ao cliente e assessoria clínica de Bio-Manguinhos | 119 |
| OTR4 Determinação e comparação dos pontos de corte ideais de duas metodologias para o micro PRNT de sarampo | 121 |
| OTR5 Constelação gênica dos genótipos: Wa-like/DS-1-like/AU-1-like, de rotavírus A antes e após a introdução da vacina monovalente (G1P[8]) no Brasil | 123 |
| OTR6 Epidemiology of group A rotavirus diarrhea in the context of universal monovalent (G1P[8]) vaccination in Brazil | 125 |
| OTR7 Gestão orientada para resultados e apuração dos custos da pesquisa clínica associada à assistência: uma avaliação da experiência do Ipec/Fiocruz | 127 |
| OTR8 Optimized production of monoclonal antibody used in Flavivirus immunoassays for different projects of vaccine development | 129 |

| | |
|--|-----|
| OTR9 Effect of zinc on the structural stability of pneumococcal surface Antigen A (PsaA) | 131 |
| OTR10 Proposta de um sistema integrado de identificação e investigação de micro-organismos no controle de qualidade em indústrias farmacêuticas | 133 |
| OTR11 Aplicação de modelo de efeitos aleatórios na quantificação das fontes de variabilidade dos parâmetros de qualidade de imunobiológicos | 135 |
| OTR12 Concepção de indicadores de desempenho por processos do departamento de controle de qualidade em aderência aos objetivos estratégicos de Bio-Manguinhos | 137 |
| OTR13 Anticorpos monoclonais para o tratamento do câncer: um estudo exploratório a partir das agências reguladoras e dos estudos clínicos | 139 |
| OTR14 Pesquisa e desenvolvimento de formulações para proteção de protoxinas de Bacillus e outras bactérias esporuladas entomopatogênicas | 141 |

APRESENTAÇÃO

Prezados participantes,

É com grande satisfação que o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) realiza o seu II Seminário Anual Científico e Tecnológico no ano de comemoração de seus 38 anos de atividade, que deverá contar com a participação de especialistas, estudiosos e pesquisadores na área de imunobiológicos do país.

Este seminário visa apresentar o panorama nacional do desenvolvimento de vacinas, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos, com um duplo objetivo: estimular a produção científica e tecnológica em Bio-Manguinhos e contribuir para a identificação de prioridades e de lacunas a serem superadas na atuação das instituições de pesquisa e dos produtores nacionais.

Foi também concebido de forma a criar um ambiente descontraído e favorável ao debate, propiciando a troca de idéias e experiências e estimulando novas colaborações científicas em redes colaborativas de pesquisa e em parcerias público-privadas voltadas ao desenvolvimento de novos processos e produtos.

Ele foi concebido também para contemplar temáticas correlatas e cruciais para o processo de desenvolvimento tecnológico e produção, como a apresentação de estudos diversos voltados à gestão, logística, controle de qualidade e avaliação de serviços, que constituem a retaguarda necessária ao desenvolvimento de novos processos e produtos.

Este Seminário se reveste finalmente de um significado muito especial para nós, a homenagem que estamos fazendo ao Dr. Ciro de Quadros, excepcional sanitarista brasileiro, internacionalmente reconhecido e premiado pela sua importante liderança na área de imunizações nas Américas e pela sua atuação como um dos líderes das campanhas mundiais pela erradicação da varíola, já obtida, e agora da poliomielite, que esperamos possa ocorrer brevemente.

Desejamos que aproveitem ao máximo o Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos, concebendo novos projetos e estabelecendo novas parcerias, tão necessárias ao nosso país!

Cordialmente,

Artur Roberto Couto

Diretor

INTRODUÇÃO

O II Seminário Anual Científico e Tecnológico do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), que ocorre no ano de comemoração de seus 38 anos de atividade, conta com a participação de destacados pesquisadores, tecnologistas e outros profissionais de campos diversos, com atuação na área de imunobiológicos em nosso país e no exterior.

Ele se reveste também de um caráter muito especial para Bio-Manguinhos, pela nossa homenagem ao Dr. Ciro de Quadros, nosso grande parceiro, internacionalmente reconhecido pela sua importante liderança estratégica e operacional na área de imunizações nas Américas e no mundo.

O Seminário foi concebido de modo a abranger um amplo e diverso espectro temático, tratando de questões cruciais para a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e produção relacionadas a vacinas, biofármacos e reativos para diagnóstico laboratorial. Contempla também questões correlatas, relacionadas à gestão tecnológica, controle e garantia da qualidade e avaliação de serviços, essenciais ao desenvolvimento de novos processos e produtos.

O Seminário propiciará um espaço aberto e fértil para que todos os participantes de Bio-Manguinhos e de outras instituições parceiras tenham a oportunidade de apresentar os seus estudos e pesquisas e compartilhar os resultados alcançados, com amplo compartilhamento de conhecimentos, experiências e ideias. Desta forma será possível promover a necessária sinergia entre os participantes que atuam na pesquisa, no desenvolvimento tecnológico e na produção de imunobiológicos, possibilitando o fortalecimento desta área no cenário nacional. Este Seminário foi concebido também como um espaço para a integração dos colaboradores de Bio-Manguinhos em torno das atividades relacionadas à operação institucional.

Com o objetivo de assegurar o necessário aprofundamento das discussões, a Comissão Científica do evento decidiu realizar neste II Seminário uma mudança na sua estrutura, com apenas uma conferência diária e em tema mais abrangente, assegurando com isto um maior tempo para discussão e para apresentação dos resumos. Contamos com a ativa participação de todos nos debates, essencial para o sucesso do evento.

Constatamos com satisfação que foi muito positiva a resposta a este Seminário, com aproximadamente 400 inscritos e 58 pôsteres aprovados, o que permitiu, pela abrangência temática dos resumos submetidos, contemplar a diversidade de tópicos necessária ao sucesso deste evento.

Quanto à premiação, esta foi ampliada pela Comissão Científica, contemplando mais jovens talentos. Desta forma, com o intuito de estimular os pesquisadores e tecnólogos envolvidos com a temática deste Seminário, os melhores trabalhos serão selecionados

por uma Comissão Científica e Tecnológica Externa e agraciados com premiações, a saber:

1º lugar, prêmio Oswaldo Cruz, com diploma e premiação de R\$ 7000,00 (sete mil reais).

2º lugar, prêmio Carlos Chagas, com diploma e premiação de R\$ 5000,00 (cinco mil reais).

3º lugar, prêmio Alcides Godoy, com diploma e premiação de R\$ 3000,00 (três mil reais).

Jovem talento, prêmio Henrique de Azevedo Penna, com diploma e premiação de R\$ 1000,00 (hum mil reais).

Jovem Talento, prêmio Evandro Chagas, com diploma e premiação de R\$1000,00 (hum mil reais).

Jovem Talento, prêmio Sérgio Arouca, com diploma e premiação de R\$ 1000,00 (hum mil reais).

O Comitê Técnico- Científico do Seminário agradece a participação dos pesquisadores e demais participantes internos e externos à Fiocruz, o importante apoio da Diretoria de Bio-Manguinhos e a atuação e dedicação da equipe organizadora deste evento.

Cordialmente,

Akira Homma

Presidente do Conselho Político-Estratégico de Bio-Manguinhos

Presidente da Comitê Técnico-Científico do II Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos

Vacinas

V1 Aprimoramento da produção do vírus da febre amarela em biorreatores de tanque agitado de 3 Litros

Marlon Vicente da Silva¹, Diogo Araujo de Mattos¹, Marta Cristina de Oliveira Souza¹, Andréa Nazaré Monteiro Rangel da Silva¹, Sheila Barbosa de Lima¹, Leda dos Reis Castilho², Luciane Pinto Gaspar¹, Elena Siqueira Campos Caride¹, Marcos da Silva Freire¹

¹ Bio-Manguinhos

² UFRJ

Introdução: A febre amarela é doença endêmica em grande parte da América do Sul e da África sub-sahariana. É causada pelo vírus da febre amarela (YFV), do gênero *Flavivirus* e da família *Flaviviridae*, que é transmitido por mosquitos, principalmente dos gêneros *Aedes* ou *Haemagogus*.

Objetivo: A atual vacina disponível contra febre amarela consiste de vírus vivo atenuado, conferindo boa proteção, com efeito duradouro e bom perfil de eficácia e segurança. No entanto, desde os anos 1990, foram observados casos de reações adversas graves, principalmente depois de campanhas de vacinação em larga escala. Sendo produzida em ovos embrionados de galinha, uma tecnologia que pouco se modificou desde sua criação nos anos 1930, possui algumas desvantagens, como a alta demanda de ovos embrionados livres de patógenos e altas concentrações de proteínas do embrião de galinha na formulação final. Além disso, sua produção é lenta, laboriosa e com difícil escalonamento, o que requer a formação de grandes estoques estratégicos para casos de epidemias. Assim, é relevante o desenvolvimento de uma vacina contra febre amarela.

Metodologia: Em trabalhos anteriores, foram descritos cultivos de células Vero e propagação do YFV em *spinners* e biorreatores em meio de cultivo livre de soro fetal bovino, com boa obtenção de YFV ao final do processo (títulos virais $\approx 10^8$ pfu/mL) em volumes de trabalho de até 1 L. Uma vez demonstrada a prova de conceito da produção do YFV em cultivos celulares em escala de bancada, o desafio seguinte é a ampliação de escala, mantendo-se a consistência observada nas bateladas iniciais de ≤ 1 L de volume de trabalho. No presente trabalho, descrevemos o método empregado para operação de biorreatores com vasos de 3 litros, em que se utilizou um protocolo aprimorado de cultivo, com adição gradual de meio de cultivo até a capacidade volumétrica total dos vasos, com objetivo de se diminuir a formação de espuma e agregados de microcarregadores nos vasos. A concentração de microcarregadores empregada também foi reduzida, de modo a repetir a razão células/cm² praticada nos cultivos estacionários do pré-inóculo.

Resultados: A execução de três bateladas de produção do YFV sob as condições do protocolo aprimorado nos forneceu resultados satisfatórios quanto à consistência da cinética de crescimento celular e produtividade específica do vírus, tendo-se atingido satisfatória densidade celular no momento da infecção viral ($>10^6$ céls/mL) e títulos virais semelhantes ($\approx 10^8$ pfu/mL) ao processo na escala de 1 L.

Conclusão: Estes resultados corroboram a possibilidade da produção do YFV em biorreatores após o incremento de escala testado, sem efeitos deletérios na produtividade específica.

Palavras-Chave: Febre Amarela, Biorreatores, Células Vero

V2 Mapeamento dos epitopos B do vírus do papilloma humano: procura de biomarcadores e vaccina

Salvatore Giovanni de Simone¹, Gilda M. S. Barbosa², Alcina F. Ficol², Fabio B. Russomano³, Sergio Meneses Amaro Filho³, Jose A. Nery⁴

¹ CDTS, Fiocruz

² IOC, Fiocruz

³ IFF, Fiocruz

⁴ Santa Casa de Misericórdia

Introdução: O papiloma humano é uma das Doenças Sexualmente Transmissíveis de maior incidência e prevalência no mundo, sendo o câncer cervical o segundo tipo de câncer mais comum entre mulheres no mundo. Os vírus do papiloma humano (HPVs) podem ser divididos em alto e de baixo risco oncogênico e mais de 100 diferentes genótipos foram identificados. Dentre os tipos oncogênicos, em geral, o HPV-16 é o tipo mais frequente em todas as regiões do mundo, seguido do HPV-18, entretanto no Brasil estes dados não estão bem definidos. Por outro lado, quando se trata dos demais tipos virais, observam-se grandes variações nas frequências tanto no Brasil quanto em outras partes do mundo. A possibilidade da aplicação geral de uma vacina para HPV requer um amplo conhecimento do repertório antigênico dos tipos e subtipos virais encontrados em nosso País. Portanto, devido à falta de conhecimento da imunogenicidade da maioria dos vírus e do alto custo de alguns kits internacionais disponíveis, é fundamental o conhecimento dos epitopos dos vírus circulantes em nosso País para o desenvolvimento de kits nacionais de baixo custo para o SUS. Este estudo aplica metodologias de microarranjo de peptídeos para, selecionar epitopos específicos e desenvolver: (a) novos kits de diagnóstico precoce, (b) de marcadores virais e (c) entender o funcionamento das vacinas disponíveis.

Objetivo: Identificar os epitopos B lineares das oito proteínas que constituem o HPV-16 (E1, E2, E4, E5, E6, E7 e L1, L2).

Metodologia: Os soros humanos foram obtidos de pacientes com tumores cervicais, penianos e outras lesões associadas ao HPV. As lesões foram caracterizadas citologicamente e por PCR. Uma biblioteca composta de 780 peptídeos sintéticos (15 mer com sobreposição de 9 aa) cobrindo toda a extensão das 8 proteínas que compõem o vírus foi sintetizada pela técnica de Spotsynthesis em membranas celulósicas e a reatividade antígeno-anticorpo medida por quimioluminescência usando um scanner MF-ChemiBis. Ferramentas de bioinformática foram empregadas para alinhar as diferentes proteínas e buscar homologias e divergências nos epitopos em mais de uma centena de vírus da mesma família (oncogênicos ou não).

Resultados: Cerca de 60 epitopos foram identificados com sucesso nas 8 proteínas, entretanto a proteína E5 não se mostrou imunogênica. Apesar da enorme semelhança estrutural entre os grupos virais, a aplicação das ferramentas de bioinformática permitiu evidenciar epitopos grupoespecíficos e identificar no mapa imunológico a não inclusão nos determinantes antigênicos dos pontos de maior mutação viral.

Conclusão: A identificação dos epitopos específicos reconhecidos por anticorpos humanos induzidos em resposta a infecções por HPV deverá ser útil para: (a) entendermos o funcionamento das vacinas, e (b) o desenvolvimento de testes diagnósticos que permitam o mapeamento rápido do tipo viral infectante, desta forma direcionado o prognóstico e possivelmente a detecção precoce do câncer.

Palavras-Chave: Hpv, Vacina, Epitopos, Diagnóstico

V3 Avaliação da imunogenicidade do componente caxumba da vacina tríplice viral na rotina do programa nacional de imunizações

Eliane Matos dos Santos¹, Glória Regina da Silva e Sá², Marilda Mendonça Siqueira³, Reinaldo de Menezes Martins¹, Luiz Antônio Bastos Camacho⁴, Vanessa dos Reis von Doelinger⁵, Maria de Lourdes Sousa Maia¹

¹ Bio-Manguinhos

² UNIRIO

³ Instituto Oswaldo Cruz

⁴ Escola Nacional de Saúde Pública

⁵ Ministério da Saúde

Introdução: O estudo brasileiro realizado em 2007 (Silva & Camacho, 2011) com a vacina tríplice viral mostrou resultado de soroconversão e TMG mais baixos para o componente caxumba do que os estudos utilizados previamente ao registro da vacina nos Estados Unidos (Usonis *et. al.*, 1998; Usonis *et. al.*, 1999; Gatchalian *et. al.*, 1999). Diante disso, e considerando-se a futura realização de um estudo clínico com a vacina tríplice viral totalmente produzida em Bio-Manguinhos/Fiocruz, a partir de transferência de tecnologia do laboratório GSK, tornou-se fundamental a realização de novos estudos, em busca de se conhecer melhor a imunogenicidade da cepa Caxumba.

Objetivo: Avaliar a imunogenicidade da vacina de sarampo, caxumba e rubéola (tríplice viral), SCR, em crianças de 12 a 23 meses de idade, com ênfase no componente caxumba, pela baixa imunogenicidade encontrada para este componente em estudos anteriores.

Metodologia: Estudo longitudinal, não controlado, conduzido em 150 crianças vacinadas com a vacina SCR, na rotina de três unidades de saúde, localizadas na cidade do Rio de Janeiro, no período compreendido entre 2008 e 2009. Foram realizadas três coletas de amostras sanguíneas: antes da vacinação, após a vacinação (30 a 60 dias) e após a revacinação. A imunogenicidade foi avaliada pela taxa de soroconversão, títulos médios geométricos e razão pós-pré dos títulos.

Resultados: O estudo mostrou 89,5% de soroconversão (IC 95%: 83,3; 94,0) para caxumba, enquanto a bula do produto informa uma soroconversão de 95,5% (IC 95%: 94,0; 96,6) para caxumba, usando o mesmo kit diagnóstico e os mesmos critérios de soroconversão. Todas as crianças analisadas soroconverteram para sarampo e rubéola. Amostras de caxumba foram retestadas em um laboratório de referência no exterior e foram concordantes ($Kappa\ ponderado = 0,96$) com aquelas obtidas previamente no Laboratório Nacional de

Referência para Sarampo e Rubéola (IOC/Fiocruz). Após a revacinação, foram alcançados títulos elevados de anticorpos e 100% de soroconversão contra caxumba.

Conclusão: O presente estudo confirmou a elevada imunogenicidade dos componentes sarampo e rubéola na vacina tríplice viral, mas encontrou uma imunogenicidade mais baixa para o componente caxumba. Os resultados obtidos foram similares a outros estudos conduzidos com metodologias similares, mas foram diferentes dos estudos citados na bula do produto. A principal implicação desses achados é a necessidade de revisão do esquema atual de imunização, recomendado pelo Programa Nacional de Imunizações (PNI/Ministério da Saúde), com a antecipação da segunda dose da vacina SCR, para conferir imunidade elevada contra caxumba durante os primeiros anos de vida.

Palavras-Chave: Vacina Tríplice Viral, Imunogenicidade, Caxumba

V4 Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults

Luiz Antonio Bastos Camacho¹, Maria de Lourdes Sousa Maia², Robson Leite de Souza Cruz², Olindo Assis³, Jandira Campos Lemos⁴, Roberto Henrique Guedes Farias⁵, Vanessa dos Reis de Souza², Marisol Simões², Rita Maria Ribeiro Nogueira⁶, Iramaya Caldas⁷

¹ ENSP

² Bio-Manguinhos

³ CPqRR

⁴ Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte

⁵ Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro

⁶ IOC

⁷ DIREB

Introduction: Available scientific evidence to recommend or to advise against booster doses of yellow fever vaccine (YFV) is inconclusive. A study to estimate the seropositivity rate and geometric mean titres (GMT) of adults with varied times of vaccination was aimed to provide elements to revise the need and the timing of revaccination.

Objective: To estimate the seropositivity rate and geometric mean titres (GMT) of adults with varied times of vaccination.

Methodology: Adults from the cities of Rio de Janeiro and Alfenas located in non-endemic areas in the Southeast of Brazil, who had one dose of YFV, were tested for YF neutralizing antibodies and dengue IgG. Time (in years) since vaccination was based on immunization cards and other reliable records.

Results: From 2011 to 2012 we recruited 691 subjects (73% males), aged 18-83 years. Time since vaccination ranged from 30 days to 18 years. Seropositivity rates (95%C.I.) and GMT (International Units/mL; 95%C.I.) decreased with time since vaccination: 93% (88%-96%), 8.8 (7.0-10.9) for newly vaccinated; 94% (88-97), 3.0 (2.5-3.6) after 1-4 years; 83% (74-90), 2.2 (1.7-2.8) after 5-9 years; 76% (68-83), 1.7 (1.4-2.0) after 10-11 years; and 85% (80-90), 2.1 (1.7-2.5) after 12 years or more. YF seropositivity rates were not affected by previous dengue infection.

Conclusion: Even though serological correlates of protection for yellow fever are unknown, seronegativity in vaccinated subjects may indicate primary immunization failure, or waning of immunity to levels below the protection threshold. Immunogenicity of YFV under routine conditions of immunization services is likely to be lower than in controlled studies. Moreover, infants and toddlers, who comprise the main target group in YF endemic regions, and populations with high HIV infection rates, respond to YFV with lower antibody levels. In those settings one

booster dose, preferably sooner than currently recommended, seems to be necessary to ensure longer protection for all vaccinees.

Keywords: Yellow Fever Vaccine, Immunogenicity

V5 Desenvolvimento e validação de método alternativo para determinação de fósforo no polissacarídeo meningocócico A (PSA) e Polirribosil Ribitol Fosfato (PRRP)

Lauro de Sena Laurentino¹, Cláudio Dutra Figueira¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: O PRRP, polirribosil-ribitol fosfato, é um polissacarídeo presente na formulação da vacina HIB e o PSA, polissacarídeo meningocócico A, é utilizado na formulação das vacinas meningocócicas C, AC e ACW, todas produzidas por Bio-Manguinhos. Ambos os polissacarídeos apresentam o elemento fósforo em sua estrutura e sua quantificação é utilizada para determinar suas purezas através da relação estequiométrica entre a massa de fósforo e a massa total dos polissacarídeos. A técnica utilizada para quantificação de fósforo no laboratório Físico-Químico do Departamento e Qualidade de Bio-Manguinhos é o método de Chen, método colorimétrico, desenvolvido e publicado em 1956. Como proposta de metodologia alternativa, foi desenvolvido um método de determinação de fósforo por espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES). Esta é uma técnica que apresenta como fonte de energia o plasma, que atinge temperaturas de 10000K, sendo capaz de excitar a maioria dos elementos químicos. Ao retornarem para seu estado fundamental, eles emitem radiação eletromagnética, em uma linha muito específica, e proporcional à concentração do elemento presente na amostra.

Objetivo: Desenvolver e validar uma metodologia alternativa para a quantificação de fósforo no polissacarídeo Meningocócico A (PSA) e no polirribosil-ribitol fosfato (PRRP) por ICP-OES.

Metodologia: Para a execução do método de Chen, as amostras são submetidas a um processo de digestão com uma mistura de ácido nítrico e ácido perclórico concentrados, à temperatura de 250°C, sendo necessário aproximadamente 7 horas de análise. A etapa inicial do desenvolvimento do método por ICP-OES consistiu na avaliação do efeito de matriz para a quantificação do fósforo nos polissacarídeos. Testaram-se alguns métodos de digestão da amostra e também os parâmetros de análise no ICP-OES como, por exemplo, fluxo dos gases e os modos axial ou radial de análise. Após a etapa de desenvolvimento, foram avaliados os seguintes parâmetros de validação, baseados na RE nº899 de 2003, da ANVISA: precisão (repetitividade e precisão intermediária), exatidão, linearidade, especificidade e robustez.

Resultados: Todos os parâmetros de validação se encontraram dentro do exigido pela RE nº899 de 2003, da ANVISA. Foi analisado o material de referência de PRRP e o resultado obtido pelo método de Chen foi

8,14% e pelo ICP-OES foi 8,29%. Através do desenvolvimento da metodologia por ICP-OES, a quantificação de fósforo passou a ser realizada em no máximo 30 minutos, garantindo, através da validação realizada, um método altamente rápido, exato e repetitivo.

Conclusão: De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o método para determinação de fósforo por ICP-OES apresenta confiabilidade, além de proporcionar uma redução bastante significativa no tempo de análise. Além disso, essa nova metodologia diminui a exposição e o rejeito de reagentes tóxicos, uma vez que foi eliminado o processo de digestão e adição do reativo de coloração.

Palavras-Chave: Fósforo, PRRP, ICP-OES

V6 Desenvolvimento do processo “downstream” na produção de uma vacina tetravalente recombinante contra dengue

Anna Paula Yorio¹, Maria Carolina de Souza Martins¹, André Tavares da Silva Fernandes¹, Márcia Archer¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: O desenvolvimento de uma vacina tetravalente que confira imunidade protetora de longa duração contra os quatro sorotipos do vírus da dengue é uma das prioridades da OMS. Atualmente, algumas vacinas contra dengue estão em teste, entre elas, a vacina quimérica de vírus vivo atenuado que utiliza, como vetor viral, o vírus vacinal da febre amarela. A produção do vírus quimérico ocorre em células de origem animal e as diretrizes para produção de vacina de vírus vivo atenuado exigem que a concentração de DNA residual celular seja menor que 10 ng/dose. Para alcançar tal objetivo, é necessário que a suspensão viral passe por processos de clarificação e purificação.

Objetivo: Estabelecer a metodologia de purificação viral para a vacina quimérica contra dengue, visando atender às diretrizes para produção de vacina de vírus vivo atenuado.

Metodologia: O processo de clarificação viral elimina as células em suspensão e os restos de células mortas. Este processo pode ser feito por filtração com membrana de 0,45 µm ou por centrifugação a 437 G por 10 minutos. Para diminuir a concentração de DNA celular residual, foram testados diferentes esquemas de purificação. Após a escolha do melhor esquema, testamos três concentrações e três tempos de incubação para o sulfato de protamina (0,5; 2,0 e 5,0 mg/ml por 30 min, 1h e 2h) e para Benzonase® (9; 15 e 25 un/ml por 6; 16 e 30h) para os quatro sorotipos do vírus quimérico dengue. A concentração de DNA residual e o título viral das amostras antes e depois do tratamento foram quantificados, este por ensaio de placa de lise e aquela por colorimetria.

Resultados: No teste dos diferentes esquemas de purificação, observamos que, no tratamento com sulfato de protamina, a etapa de centrifugação após o tratamento pode ser substituída pela filtração, sem perda de eficiência na diminuição na concentração de DNA residual. No esquema com a Benzonase®, observamos que o tempo de 3h apresentou melhor resultado que os tempos menores, sendo, ainda assim, menos eficiente do que o sulfato de protamina. Nos testes com diferentes concentrações e tempos de incubação em gelo, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações e os tempos, por outro lado, o sulfato de protamina foi capaz de reduzir a níveis menores a concentração de DNA residual, independentemente

da concentração de DNA residual inicial, quando comparado à Benzonase®.

Conclusão: Diante destes resultados, podemos concluir que o sulfato de protamina e a Benzonase® são eficientes para reduzir a concentração de DNA residual em concentrações e nos tempos menores testados e que a etapa de centrifugação pode ser retirada do esquema de purificação com sulfato de protamina.

Palavras-Chave: Vacina Quimérica, Dengue, Purificação Viral

V7 Elaboração de material de referência *in house* para vacina de *Haemophilus influenzae* tipo B e seus produtos intermediários

Elô de Oliveira Rodrigues¹, Jéssica Yukie dos Reis Nagashima²

¹ ENSP, Fiocruz, RJ

² Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: De acordo com a norma ABNT NBR ISO/IEC 17025:2005, o laboratório deve estabelecer um sistema da qualidade apropriado ao escopo das suas atividades. A utilização de materiais de referência (MR) confere uma confiabilidade junto a outras ações, tais como calibração e qualificação de equipamentos e validação de métodos analíticos. A aquisição de MR ou padrões que possuam características semelhantes aos produtos biológicos é uma das dificuldades encontradas pelos laboratórios de controle de qualidade de vacinas. Os poucos MR existentes são de custo elevado e com pouca quantidade disponível para aquisição, tornando-os inviáveis para a utilização em análises de rotina.

Objetivo: Estabelecer a metodologia de produção de material de referência *in house* para os ensaios físico-químicos do controle de qualidade dos produtos obtidos em Bio-Manguinhos.

Metodologia: Para este trabalho utilizamos dois produtos intermediários, o polirribosil-ribitol fosfato (PRRP) e o PRRP conjugado com a proteína monomérica tetânica (PSTT), que fazem parte da etapa de produção da vacina de *Haemophilus influenzae* tipo b. A elaboração destes dois MR *in house* foram realizados de acordo com os guias ISO 30-35, que estabelecem os parâmetros e condições para a sua produção, sendo rastreáveis à MR internacional NIBSC e outros, como Pierce e D´ribose, que aumentam a confiabilidade dos MR produzidos. O uso dos MR *in house* se aplica às seguintes análises: determinação de fósforo (Método de CHEN), determinação de D´ribose (método de Bial) e determinação de proteína (Método de Lowry). As etapas para elaboração foram: caracterização, homogeneidade e estabilidade real e acelerada. Os resultados foram avaliados através de ferramentas estatísticas ANOVA e análise de tendência por regressão linear.

Resultados: Todos os parâmetros de aceitação dos MR foram atendidos. A homogeneidade dos dois MR apresentou $F_{calculado} < F_{crítico}$ e valor de $p < 0,05$, confirmando a homogeneidade dos resultados entre frascos e intra-frascos para 95% de significância. As avaliações dos estudos de estabilidade a longo prazo e acelerada através da análise de tendência por regressão linear atenderam à condição estabelecida para estabilidade $l_{b11} < t_{0,95, n-2.s(b1)}$. Através das etapas de elaboração dos MR obteve-se os componentes de incerteza da caracterização, homogeneidade e estabilidade, gerando a incerteza combinada dos materiais de referência para cada método.

Para o MR *in house* PRRP, os valores estabelecidos são: D´ribose $191,12 \pm 11,74 \mu\text{g/mL}$ e Fósforo $36,33 \pm 2,46 \mu\text{g/mL}$. Já para o MR *in house* PSTT os valores estabelecidos são: D´ribose $878,75 \pm 40,80 \mu\text{g/mL}$ e proteína $1314,54 \pm 45,48 \mu\text{g/mL}$.

Conclusão: Conclui-se que os MR *in house* produzido atendem aos propósitos preestabelecidos, em conformidade com as normas vigentes. Devido à sua abrangência, estes materiais atendem ao controle de qualidade dos seguintes produtos: PRRP, PSTT e vacina Hib sendo utilizados no controle físico-químico de Bio-Manguinhos e por outros laboratórios, como o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em saúde (INCQS).

Palavras-Chave: Material de Referência, Cálculos Incerteza

V8 Método alternativo por espectrometria de infravermelho próximo para determinação da umidade residual na vacina tríplice viral liofilizada

Melissa Chamon Alves Premazzi¹, Eduardo da Silva Gomes de Castro¹
², Annibal Duarte Pereira Netto³

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

² Universidade Federal Fluminense - UFF

³ Universidade Federal Fluminense - UFF

Introdução: O estudo foi realizado na Vacina Combinada contra Sarampo, Caxumba e Rubéola, conhecida como Tríplice Viral - VVA. Vacinas deste tipo possuem umidade residual-UR entre 1% e 5% da massa do líofilo. Para a sua formação, são usados excipientes, em geral açúcares. A presença dos excipientes influenciará os níveis de UR, na qualidade do líofilo formada e, consequentemente, na estabilidade do produto. O método de determinação de UR frequentemente indicado pelas farmacopeias é o de Karl Fischer - KF. É um método de determinação primário, porém destrutivo, que sofre influência das condições ambientais, do manuseio da amostra, necessita de constante limpeza do eletrodo e troca da solução receptora e apresenta longo tempo de análise. O método proposto é a espectrometria por infravermelho próximo – NIR. O seu princípio é a conversão da radiação eletromagnética absorvida por uma molécula em energia vibracional. É um método rápido, não destrutivo e que não sofre influência do manuseio da amostra. A inexistência de material de referência de UR para estas formulações gera a necessidade de se utilizar um método auxiliar de determinação de umidade e a quimiometria para tratamento dos dados.

Objetivo: Desenvolver um método para determinação de UR na VVA por espectroscopia de NIR, utilizando o método de KF como técnica auxiliar.

Metodologia: Foram coletados espectros de cada frasco de vacina e posteriormente suas UR foram determinadas por KF. Foi construída uma curva utilizando um método de calibração multivariada através da relação entre as bandas de absorção de água e as UR obtidas na determinação por KF. Foram determinadas as UR em 20 frascos de vacina através desta curva e seus valores foram comparados aos obtidos pela técnica auxiliar.

Resultados: Através de comparação entre os resultados de UR determinados por ambos os métodos, observamos que a maior discrepância foi de -0,05%, com valores de UR iguais a 1,82% pelo método de KF e 1,77% por NIR. O método proposto ainda apresentou menor desvio padrão, 0,068 contra 0,24 pelo método de KF e amplitude

de 0,25 contra 0,52 por KF. A curva de calibração utilizada apresentou coeficiente de correlação igual a 0,9982 e RMSEC de 0.0161.

Conclusão: O método de espectroscopia por NIR é aplicável à determinação da UR de VVA e vantajoso pela redução da exposição dos analistas ao reagente de KF, do volume de resíduos químicos, da quantidade de amostras e do tempo de análise. Este último sofre uma redução considerável de 120 minutos por Karl Fischer contra apenas 5 minutos por NIR, por lote de vacina analisado. As próximas etapas do trabalho serão a determinação da influência dos excipientes nas bandas de absorção por NIR, da cinética de absorção de umidade nas condições de estocagem, da validade da curva de calibração e a validação do método.

Palavras-Chave: Umidade Residual, Vacina, NIR

V9 Thermostability study of meningococcal conjugate bulks produced for phase III clinical trials

Milton Neto da Silva¹, Iralice Medeiros de Souza¹, Renata Chagas Bastos¹, Marilza Barbosa Corrêa¹, Camila da Silva Faria¹, Ana Paula dos Santos¹, Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introduction: *Neisseria meningitidis* is one of the most important pathogens as causes of meningitis and other clinical manifestations worldwide. Bio-Manguinhos has developed all steps to produce, purify and control an effective Brazilian meningococcal C conjugate vaccine by modified reductive amination where oxidized-polysaccharide was coupled to hydrazide-activated monomeric tetanus toxoid used as carrier protein.

Objective: This work is related to monitoring of physical-chemical and immunological modifications after conjugate bulks storage at different temperatures in order to establish technical requirements of *quality*.

Methodology: Three conjugate bulks were produced in industrial scale for Phase III clinical trials in 2012. Samples from each batch in triplicate were stocked at 2-8°C (control group), 25°C, 37°C and 55°C during 5 weeks. Quality control analysis followed WHO recommendations as pH, sugar free content, SEC-HPLC profile, 1H NMR spectra, sialic acid content and mice immunogenicity.

Results: Sialic acid amount and pH values did not show expressive variation after 5 weeks of storage at all temperatures. However in 1H NMR spectra were observed structural modifications in carrier protein with temperature increase (37 and 55°C). Signals related to aromatic and aliphatic amino acids degradation were observed at 6.5 to 7.5 ppm and 2.90 to 3.32 ppm range, respectively. Considering SEC-HPLC results all samples were approved according to Kav range (0.2 to 0.35). On the other side, sample profiles stocked at 37 and 55°C showed a peak arising with elution in 10.5 mL as detected by 254 nm. Additionally it was observed a peak base broadening in samples stocked at 55°C, suggesting product degradation. The conjugate bulks samples were also analyzed by ultraviolet in a scanned mode where were observed two bands in 220 and 280 nm. For samples stocked at 55°C there was a small hypsochromic shift which means modification in tertiary structure of protein portion. In Capillary Electrophoresis assays it was observed a progressive increase of a peak correspondent to sugar free and also the appearance of a peak with protein similarity. Samples stocked at 37 and 55°C showed unconjugated sugar values above the specified limit (20%).

Conclusion: These results suggest some modifications in physical-chemical parameters related to structural changes of glycoconjugate and conformational alterations in carrier protein requiring the strict control of storage temperature. Immunogenicity of these samples is being evaluated in mice in order to check temperature interference in immune response induced by Brazilian meningococcal C conjugate vaccine.

Keywords: Meningococcal Vaccine, Thermostability

V10 Cost comparison: from pilot to large scale manufacturing of the Brazilian Meningococcal C conjugate vaccine

Renata Chagas Bastos¹, Milton Neto da Silva¹, Iralice Medeiros de Souza¹, Deyves Mendes Paraguassu¹, Marcio Roberto Begami Escarlante¹, José Godinho da Silva Junior¹, Ricardo de Andrade Medronho², Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

² Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ;

Introduction: A Brazilian Meningococcal C Conjugate Vaccine has been developed by Bio-Manguinhos based on the epidemiological situation in Brazil. Before starting the Phase III trials, vaccine production was scaled up to obtain reproducible industrial batches.

Objective: This work is related to comparative cost analysis between pilot and industrial scales of steps used to produce Brazilian meningococcal C conjugate vaccine under GMP.

Methodology: The costs to produce meningococcal C conjugate bulks (MPCT) in pilot and industrial scales were compared from two perspectives: purification process optimization by tangential flow filtration (TFF) and scaling up reaction volumes in order to obtain intermediate products as oxidized meningococcal C polysaccharide (MPCO) and hydrazide-activated monomeric tetanus toxin (MATT) as well as the final MPCT. Data related to personnel and raw material costs from fifteen batches of MPCO, nine batches of MATT and four batches of MPCT obtained in pilot scale were compared with the same parameters regarding to five batches of MPCO, nine batches of MATT and three batches of MPCT obtained in large scale.

Results: The five-fold increase in MPCO and MPCT reaction scale resulted in 89% and 79% costs reduction, respectively, while 2.5-fold increase in MATT reaction volume led to a reduction of 43% in the production costs, based on the relationship between productivity and staff costs. Considering MPCO and MPCT purification steps optimization by TFF, the cost analysis showed a spending reduction of 63% and 59%, respectively, whereas MATT purification step on the industrial scale led to an increase of 8% in costs. When taken together personnel and input costs, MPCO production in industrial scale resulted in 69% cost decrease while MPCT obtained in the same scale was 60% less expensive. Using the same approach MATT scale up production resulted in an increase of 4% in costs.

Conclusion: Scaling up of MPCO, MATT and MPCT reaction volume led to a decrease in production costs, as well as MPCO and MPCT purification step optimization by TFF. On the other hand, MATT purification step did not promote a significant reduction in costs,

suggesting the necessity of improvements in this process. In general, the vaccine production scaling up contributed significantly to cost reduction of downstream process and it would be applied to produce batches in an industrial scale aiming to supply a higher vaccine demand, after phase III clinical trials. This evaluation will allow the global analysis of all investment made in the vaccine development.

Keywords: Cost analysis, Meningococcal Conjugate Vaccine

V11 Vacina febre amarela de subunidade em plataforma vegetal: imunogenicidade e proteção de camundongos contra desafio letal

Rosane Cuber Guimarães¹, Andrea Nazare Monteiro Rangel¹, Marisol Simões¹, Luciane Pinto Gaspar¹, Elena Caride¹, Marcos da Silva Freire¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: A febre amarela é uma febre hemorrágica viral com cerca de 200.000 casos anuais estimados no mundo, e 30.000 mortes por ano. É também uma ameaça a milhões de pessoas que vivem e viajam para as áreas endêmicas. A atual vacina contra febre amarela, uma vacina de vírus vivo atenuado, vem provando ser a melhor maneira de se prevenir a doença e tem sido usada desde 1937, com notável eficácia. Todavia, desde 2001, raros eventos adversos agudos, mas graves, semelhantes aos da febre amarela silvestre e com alta letalidade, têm sido relatados. Reconhecendo o fato de que uma nova vacina segura deveria ser desenvolvida, Bio-Manguinhos e Fraunhofer têm focado na geração de vacinas de subunidades, utilizando a proteína do envelope (E) do vírus da Febre Amarela. Este antígeno foi escolhido como alvo para o desenvolvimento de uma vacina de subunidade, utilizando a plataforma de expressão transiente em *Nicotiana benthamiana* (tabaco). Nestes estudos de desafio em camundongos foram investigadas a resposta humoral e a taxa de sobrevivência para três formulações do antígeno YFE com diferentes excipientes e adjuvantes.

Objetivo: Avaliar a resposta imunológica e a taxa de sobrevivência de camundongos após a inoculação de três diferentes alvos do antígeno YFE.

Metodologia: Todos os alvos foram produzidos pela Fraunhofer utilizando a plataforma de expressão transiente em plantas. O nível de purificação foi de >95% para as proteínas solúveis e >80% para a VLP. Para o estudo de desafio foram utilizados camundongos C57BL6 com 4 semanas de idade. O esquema vacinal foi estabelecido para os dias 0, 14 e 28, com coletas de sangue para PRNT sempre dois dias antes da aplicação dos antígenos.

Resultados: Foram realizados 4 estudos de desafio letal em camundongos e em dois deles obtivemos uma taxa de sobrevivência de 100% do camundongos após o desafio letal, utilizando os antígenos YFE-1T (proteína solúvel) e YFE-(AL)3 (VLP).

Conclusão: Observou-se que as formulações que mostraram uma melhor eficácia e / ou títulos de anticorpos neutralizantes foram YFE-1T + AbISCO 5 µg, duas doses, intramuscular; YFE- (AL)3 + AbISCO 5 µg, duas doses, intramuscular e YFE-2E + AbISCO 5 µg, duas doses, intramuscular. Apesar de todas as formulações terem a capacidade

para induzir IgG YFE -específico (dados não mostrados) e títulos de anticorpos neutralizantes, não foi possível correlacionar o nível de resposta de anticorpos, com proteção. Correlatos de proteção induzidos por vacinação com uma vacina de subunidade contra a febre amarela deverão ser estabelecidos no futuro. Os resultados sugerem que a imunidade celular desempenha um papel fundamental na proteção contra a febre amarela, uma vez que observamos maiores níveis de anticorpos neutralizantes nos grupos vacinados com formulações contendo AbISCO.

Palavras-Chave: Febre Amarela, Subunidade, Plataforma Vegetal

V12 Host soluble factors induced by moreau BCG, in vitro, in the initiation of monocyte apoptosis in healthy donors

Leandro Peres¹, Suelen Marinho¹, Jéssica Lima¹, Mariana Siqueira¹, Thaize Pedro¹, Dolores Silva¹, Carlos Ponte¹, Paula de Luca², Luiz Castello Branco¹, Paulo Antas¹

¹ Laboratório de Imunologia Clínica, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz

² Laboratório de Imunoparasitologia, Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz

Introduction: Tuberculosis (TB) remains the world's leading cause of mortality. For its control, studies of TB vaccines are needed. Since BCG is the only vaccine against TB currently in use, studies addressing the protective role of BCG are urgent required.

Objective: To evaluate the mechanisms by which BCG develops its protective action.

Methodology: Cohorts of HIV-negative voluntaries have been enrolled: Adult Control Donors (CD; n=18) and neonates Umbilical Vein (UV; n=10). BCG Moreau was primarily used for *in vitro* monocyte infection at both 24h and 48h. After that, harvested conditioned medium (CM) was added to autologous resting cells for an additional 24h or 120h, and Annexin V-FITC and PI were used for apoptosis detection. Also, in those cultures the remaining CD4+ lymphocytes were stained for PD-1 and CD25/FoxP3, and concurrent caspases were detected in monocytes. Supernates were assayed for Nitric Oxide (NO₂).

Results: P levels were setup at < 0.05. Here, conditioned medium (CM) induced higher apoptosis levels in the Adult Control Donors (CD) group only. NO₂ were released equally during BCG infection in both groups, but higher levels were found in CD, when compared to UV group (p<0.05). For PD-1, higher levels were also observed in CD-derived CD4 lymphocytes only. On the other hand, mean levels of Caspases in monocytes and Treg cells (CD4+/CD25high+/FoxP3+) were not induced in either group of individuals, but expression of CD25dim+ as an activation marker was dependent on BCG infection only in the UV group.

Conclusion: The vast majority of the world's current population has been vaccinated with BCG, with the possible requirement for a booster immunization in adulthood for TB protection. Sustained data have shown an enhancement of *in vitro* apoptosis levels in adult monocytes during long-term incubation with CM from BCG Moreau RDJ cultures, but neonate monocytes remained viable when cultured with autologous CM. That was followed by higher NO₂ released and PD-1 expression on CD4+ T cells from the primed group, but not in naïve individuals, although only neonates showed *in vitro* activated lymphocytes. A

booster immunization with BCG may protect the immunized individuals and further studies are needed to better evaluate these findings.

Keywords: Tuberculosis, BCG, Apoptosis

V13 Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de ácido siálico no polissacarídeo meningocócico C por cromatografia iônica

Luiz Claudio Ferreira Pimentel¹, Magda Majores¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: A cromatografia por troca aniônica em pH elevado acoplada com detecção amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) é uma técnica cromatográfica, que pode ser aplicada à análise de carboidratos. A utilização de pH muito básico promove a dissociação de carboidratos hidroxílicos, convertendo-os de espécies neutras em aniônicas. Assim como outras técnicas cromatográficas, a sua quantificação pode ser feita por padronização interna, externa ou fortificação. O PSC, polissacarídeo meningocócico sorogrupo C é constituído de unidades repetidas do ácido siálico conhecido por ácido *N*-acetilneuramínico (Neu5Ac). Este polissacarídeo é utilizado nas formulações da vacina meningocócica C, AC e ACW, sendo todas produzidas por Bio- Manguinhos.

Objetivo: Desenvolver uma metodologia alternativa para a quantificação de ácido siálico no polissacarídeo Meningocócico sorogrupo C por HPAEC-PAD.

Metodologia: A etapa inicial do desenvolvimento do método consistiu no estudo da melhor condição de hidrólise do polissacarídeo em questão, devido à suscetibilidade do ácido siálico liberado em meio ácido. Esta condição foi alcançada com ácido clorídrico 1M por 30 minutos a 80°C e, a fim neutralizar o ácido clorídrico utilizado, houve uma posterior adição quantitativa de hidróxido de sódio 1M. As condições cromatográficas foram otimizadas com a utilização de uma coluna carboPac PA10, fase móvel com composição de 100mM NaOH/NaOAc 100mM em modo isocrático, detetor de ouro e a utilização de uma *waveform* para ácidos siálicos (triple potential) sugerida pelo fabricante. O desenvolvimento do método resultou em uma análise de 10 minutos por injeção com economia de padrão e menores limites de quantificação. Os resultados foram confrontados com o método atual por espectrofotometria (Svennerholm) cujo princípio se baseia na hidrólise do polissacarídeo com liberação e conversão do ácido siálico para reação com cobre (II) e resorcinol, formando um composto colorido após aquecimento, que, após ser extraído com solvente orgânico, é medido espectrofotometricamente.

Resultados: O método desenvolvido foi validado e encontra-se de acordo com a RE nº899 de 2003, da ANVISA. Foram analisados cinco lotes diferentes de PSC através das duas metodologias e o teste ANOVA demonstrou não haver diferenças significativas entre os

resultados obtidos pelos dois métodos ($F_{cal} = 0,64 < F_{crit} = 5,32$) com 95% de confiança.

Conclusão: De acordo com os resultados obtidos na validação e na comparação entre os lotes pelas duas metodologias, conclui-se que o método por HPAEC-PAD pode ser utilizado com segurança como um método alternativo ou na substituição do método espectrofotométrico. Ele é mais vantajoso por utilizar menor quantidade de padrão, ácidos inorgânicos mais diluídos, menor limite de quantificação, menor tempo de análise e por não utilizar solventes orgânicos.

Palavras-Chave: Polissacarídeo, Ácido Siálico, HPAEC-PAD

V14 Development and validation of multiplex test for measurement of antibodies against heptavalent vaccine componentes

Tamiris Azamor¹, Luciana N. Tubarão¹, Andréa M. V. da Silva¹, Alessandro F. de Souza¹, Jane da Silva¹, Patrícia C. C. Neves¹, Denise C. de S. Matos¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introduction: Multiplex is a liquid microarray assay that is replacing the immunoenzymatic assays (ELISA) in assessing the immunogenicity of multicomponent vaccines in pre-clinical and clinical trials. This technology utilizes fluorescent distinct microspheres as carriers for different molecules, allowing the simultaneous detection of multiple reactions in a small amount of samples and reagents with high reproducibility and sensitivity. The aim of this study is to develop and validate a multiplex assay for quantitation of antibodies against vaccine antigens present in current pentavalent vaccine (Difteric toxin, Tetanic toxin, H. influenzae type B (Hib) polysaccharide (PRRP), *B. pertussis* and Hepatitis B virus) besides the antigens intended to be used in na heptavalent formulation (N. Meningitidis type C conjugated and Poliovirus). During the upcoming introduction of the heptavalent vaccine in the National Immunization Program, this test might reduce the number of reactions to be performed during pre-clinical and clinical studies, generating working time optimization and lower costs for the National Health System of Brazil.

Objective: The aim of our study is to develop and validate a multiplex assay to quantify IgG against all antigens present in heptavalent vaccine formulation.

Methodology: For this purpose, we have constructed standard curves utilizing diphtheria toxin (Dtx), tetanus toxin (Ttx), capsular polysaccharide of Hib (fosforibosilribitol phosphate – PRRP) and pertussis toxin (Ptx). In addition, 10 serum samples were dosed in monoplex and multiplex assays.

Results: The results demonstrated a good performance of all those curves when comparing monoplex assay and multiplex assay. We have demonstrated that there is a high correlation between monoplex assay, multiplex assay and ELISA tests.

Conclusion: These results show the feasibility and applicability of this approach for clinical studies of combined vaccines.

Palavras-Chave: Multiplex, Heptavalent Vaccine

Biofármacos

B1 Clonagem, expressão e purificação de proteína imunogênica de *Acinetobacter baumannii*

Anna Erika Vieira de Araujo¹, Luis Vidal Conde¹, Lucas Almeida Machado¹, José Procópio Moreno Senna¹

¹ Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Programa de Biofármacos Laboratório de Tecnologia Recombinante Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introdução: *Acinetobacter baumannii* é um importante patógeno oportunista no mundo inteiro, com alta incidência em unidades de tratamento intensivo, acometendo principalmente pacientes imunossuprimidos. Recentemente foi relatado que, no Brasil, de 15 a 20% dos isolados desta bactéria apresenta resistência aos antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenems, o que dificulta o tratamento e abre espaço para a busca de terapias alternativas, como as imunoterapias. Em trabalhos anteriores, foi identificada uma proteína com potencial imunogênico denominada OmpA.

Objetivos: Clonagem, expressão e purificação da proteína OmpA de *Acinetobacter baumannii*.

Metodologia: Para amplificação do gene bacteriano por PCR, foram utilizados *primers* sintetizados pela empresa IDT[®], a partir da sequência tirada do banco de dados do NCBI e montada com o auxílio do programa DNA Vector. O gene da proteína OmpA foi amplificado e clonado no vetor pET28a, com as enzimas de restrição *NheI* e *HindIII*, em *Escherichia coli* TOP10. A expressão do gene foi feita em *Escherichia coli* BL-21 (DE3) e a purificação foi realizada a partir da solubilização dos corpos de inclusão com uréia, submetendo-se em seguida à cromatografia por afinidade em coluna de níquel. O *refolding* da proteína foi realizado através de diálise em PBS.

Resultados: Da amplificação e clonagem foi possível obter um gene de 1005bp, correspondente à sequência da proteína OmpA. Na indução de expressão proteica com IPTG, verificou-se a superexpressão do gene de interesse, na forma de proteína com peso molecular de aproximadamente 45 kDa, sendo que a maior parte desta foi expressa na forma insolúvel de corpos de inclusão. Após a purificação, diálise e *refolding*, foi possível obter uma fração homogênea da proteína de interesse na faixa de peso correspondente a 45 kDa.

Conclusão: Este estudo mostrou que é possível obter a proteína imunogênica OmpA de *Acinetobacter baumannii* em sistema de expressão de *Escherichia coli*, e purificá-la através de cromatografia

por afinidade, obtendo uma fração proteica homogênea com banda majoritária na faixa de 45 kDa. Esses resultados são essenciais para avaliar o potencial da OmpA como alvo imunoterápico, podendo ser futuramente utilizada em vacinas ou anticorpos monoclonais.

Palavras-Chave: Acinobacter baumannii, OmpA, Proteína, Imunoterapias

B2 Avaliação da homogeneidade da eritropoetina humana recombinante através de métodos Farmacopeicos

Ingrid Pinheiro de Medeiros¹, Hilton Jorge do Nascimento¹, Camila Faia de Sá¹, Eduardo da Silva Gomes¹, Melissa Chamon Alves Premazzi¹, Carina Cantelli Pacheco de Oliveira¹, Darcy Akemi Hokama¹, Daniel da Silva Guedes Jr.¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: A clonagem do gene da Eritropoetina Humana levou à produção da proteína recombinante (EPOhr) para o tratamento de anemias associadas à insuficiência renal crônica, uso terapêutico de Zidovudina, tratamentos oncológicos e redução de transfusões sanguíneas.

Objetivo: Dentre as metodologias preconizadas pela Farmacopéia Européia (F.E.) para análise da homogeneidade da EPOhr, destacam-se IEF, CZE, SDS-PAGE, SEC-HPLC e RP-HPLC. O objetivo do estudo foi avaliar a homogeneidade da EPOhr através das técnicas preconizadas, bem como otimizar tais metodologias, visando ao controle de qualidade do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) da EPOhr em Bio-Manguinhos.

Metodologia: As análises foram realizadas utilizando-se as amostras IFA de EPOhr e a Preparação de Referência Biológica (BRP) da F.E. Foi utilizado para IEF uma combinação de anfólitos que gera um gradiente de pH ácido, 4 µg da EPOhr dessalinizada e coloração automatizada com nitrato de prata. A análise CZE foi realizada usando os parâmetros descritos na metodologia proposta pela F.E. ajustando-se temperatura, pressão, tempo de injeção e a concentração da amostra. Para a SDS-PAGE foi utilizada gel de poliacrilamida a 12,5% e coloração rápida com azul de coomassie. Para as análises cromatográficas foi ajustado a coluna analítica, fluxo, eluentes e gradiente de eluição. Em SEC-HPLC foi utilizada coluna analítica Gel de TSK G2500 e RP-HPLC foi usada a Vydac C8 e Bakerbond WP octadecil com um fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção.

Resultados: Em IEF evidenciou-se a presença de oito isoformas principais, e o pI estimado de 6,43 a 4,12. A percentagem de cada uma das isoformas foi calculada e comparada com o limite definido pela F.E. e pelo CIM, havendo concordância de resultados entre as réplicas. Uma vez estabelecidas as condições de análise por CZE, a técnica demonstrou sensibilidade e reprodutibilidade, sendo detectadas oito isoformas em eletroferogramas de alta resolução. A SDSPAGE demonstrou ser como uma metodologia robusta e com excelente reprodutibilidade. As amostras são homogêneas e a média do PM encontrado foi de 34kDa. Em SEC-HPLC e RP-HPLC as amostras apresentaram um pico com tempo de retenção e área equivalentes

entre as réplicas. Foi possível definir o limite de quantificação e detecção. A análise foi realizada com a metade do tempo gasto pelo que é descrito pela F.E e CIM. A integração dos picos cromatográficos demonstra percentagem de pureza de acordo com as especificações.

Conclusão: Os métodos otimizados permitirão uma análise adequada do IFA de EPOhr quanto à homogeneidade e caracterização físico-química e deverão ser implementados na rotina do controle de qualidade a partir da produção do biofármaco em Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Palavras-Chave: Qualidade, Homogeneidade, Eritropoetina

B3 Análise da marcação do Anticorpo Monoclonal anti-PBP2a com ^{99m}Tc para diagnóstico de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA)

Janio da Silva Mororó¹, Natália Plínio de Souza², Marcelo Mamede Lewer¹, José Procópio Senna², João Alberto Osso Júnior³

¹ Diretoria de Radiofarmácia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), São Paulo, SP, Brasil

² Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), RJ, Brasil

³ Departamento de Anatomia e Imagem, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), MG, Brasil

Introdução: *Staphylococcus aureus* é um dos principais microorganismos causadores de infecção em humanos, sendo as formas mais graves da doença bacteremia e endocardite nos indivíduos infectados. Diversas cepas desta bactéria apresentam resistência a vários tipos de antibióticos, dentre eles a metilina e amoxicilina, como no caso da bactéria *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA/SARM). A Proteína ligadora de Penicilina 2a (PBP2a) tem sido identificada como a principal enzima responsável por conferir resistência para a MRSA aos antibióticos β-lactâmicos, sendo uma molécula promissora para terapia com anticorpos monoclonais (AcM). Assim como na terapia, o diagnóstico desta doença também não apresenta elevada eficiência, apresentando algumas desvantagens, como longo tempo para os resultados, elevados custos dos exames, a necessidade da obtenção da amostra de um paciente, e a incapacidade de estimar a presença de focos bem como o grau de infecção no paciente. Com isso é importante que sejam desenvolvidos técnicas de diagnóstico para detectar infecções causadas por MRSA.

Objetivo: Promover estudos de radioimunomarcagem do AcM anti-PBP2a, desenvolvido em Bio-Manguinhos/FioCruz, utilizando o elemento radioativo Tecnécio-99-mestável (^{99m}Tc), para realizar diagnóstico *in situ* da bactéria MRSA.

Metodologia: O AcM anti-PBP2a foi inicialmente reduzido com o agente redutor 2-mercaptoetanol (2-ME) para gerar grupos sulfidrilas (-SH), local onde se ligam os átomos de ^{99m}Tc. Logo após, foram utilizados dois diferentes métodos de radiomarcagem, variando as concentrações dos reagentes, tempo de reação e a atividade radioativa do ^{99m}Tc com o objetivo de produzir maior quantidade de AcM marcado com ^{99m}Tc (AcM-^{99m}Tc). Em seguida foram realizados ensaios de avaliação funcional para analisar a integridade e imunorreatividade do AcM após a radioimunomarcagem, utilizando os métodos de eletroforese em gel SDS-PAGE não redutor;

immunoblotting; ELISA; ensaio de neutralização *in vitro* e análise do tempo de meia-vida plasmática.

Resultados: A quantidade média de grupos sulfidrilas produzidos por AcM foi de 5 e o Método 2 de marcação apresentou bons rendimentos de marcação, sendo o maior rendimento de 73,5% de AcM-99mTc, que se manteve com boa estabilidade após 2 horas. O Método 2 de marcação utilizou um kit comercial, o kit do MDP, e o maior rendimento de marcação obtido foi com 15 minutos de reação. Nos Ensaio de Avaliação Funcional verificou-se que o AcM manteve a integridade e imunorreatividade à enzima PBP2a após os processos de redução e radiomarcção.

Conclusão: Neste trabalho foi obtido um radioimunocorpo que apresentou bom rendimento de marcação e que manteve suas propriedades e atividade funcional após a marcação, na qual o método mais eficiente demonstrou ser prático e simples por utilizar um kit de marcação pronto (kit do MDP), obtendo bons resultados com apenas 15 minutos de reação. Os resultados obtidos nos permitirão realizar ensaios em modelo animal para avaliar a capacidade do anticorpo radiomarcado de reconhecer focos infecciosos *in situ*.

Palavras-Chave: MRSA, Anticorpo Monoclonal, Diagnóstico, Radiomarcção

B4 Computational characterization of the CDR regions of two distinct mAbs targeting the interaction with HBSAG

João Herminio Martins da Silva¹, Alexandre Bezerra Conde Figueiredo², Carlos Otávio Alves Viana³, Márcia Arissawa²

¹ Fiocruz, Ceará,

² LATAM, Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

³ LATER, Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introduction: Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the major health problems worldwide. The diagnosis of the infection is based on the detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg) by the use of monoclonal antibodies (mAbs). We report here the investigation of two specific Fv fragments against HBsAg that were developed by the use of hybridoma technology. The sequences of complementarity determining regions (CDRs) of VH and VL regions were determined in order to investigate the main aspects of the mAbs affinity against the antigen of interest based on bioinformatics analysis. The Homology Modeling methodology was used to build the 3D model of Fv, followed by Docking with the antigen. Complexed Fv structures were analyzed by molecular dynamics (MD).

Objective: Computational structural characterization of mAbs aiming at an understanding of the molecular parameters involved in the recognition of HBsAg in order to establish a structureactivity correlation and to improve the affinity of the mAb.

Methodology: In order to build the light and heavy chains of the A and B clones, the Modeller v.9.12 software was used. The template structures were 1JRH and 3LIZ respectively. The docking with HBeAg provided the confirmation of the binding site. The MD simulations were processed to assess the conformational features of both mAbs.

Results: The identity found between the light and heavy chains was 86,5% and 82,9%, respectively. Validation of the homology model was done with Procheck and Verify3D softwares. The values for Procheck are above the minimum values considering the residues in the most favored regions, while according to Verify3D, more than 80% of the residues have a score higher than 0.2. The putative binding site was characterized by molecular docking with Haddock software, allowing the identification of the residues involved in the recognition between HbsAg and the mAbs. According to the MD analysis, the thicker regions in the structure depict the segments with wider flexibility and the thin regions highlight rigid segments of CDRs and suggest functional importance in the molecular recognition. The next steps will be the mutation of specific aminoacids followed by the evaluation of the theoretical free energy and the affinity between the mAbs and HBsAg peptides.

Conclusion: The results showed structural aspects of the Fv fragments for both mAbs that contribute significantly in the affinity interaction with the antigen and will be explained by the analysis of the complex. The flexibility showed by some CDR regions reveals a variety of conformations that enable them to accommodate the antigen. Based on these results, site direct mutagenesis can be suggested in order to improve the affinity between the mAb and the HBsAg surface antigen.

Keywords: Molecular Dynamics, mAbs, HBV, Homology

B5 Eficiência da purificação, concentração e formulação dos soros hiperimunes do Instituto Vital Brazil, segundo a dinâmica dos níveis de imunoglobulinas

Aniesse Silva Aguiar¹, Michelle Pacheco de Lima¹, Moacir de Souza Silva¹, Camila Braz Pereira da Costa¹, Jorge Luiz Coelho Mattos¹

¹ Instituto Vital Brazil

Introdução: Os soros hiperimunes são imunoglobulinas purificadas (IgG), fracionadas em F(ab)₂ (porção bivalente, com dois sítios de agregação para o antígeno) e concentradas a partir do plasma de equídeos hiperimunizados. O processo envolve diversas fases e variadas condições físico-químicas cujas manipulações podem ser determinantes na facilitação de perdas de rendimento, conforme a labilidade da imunoglobulina trabalhada.

Objetivo: O estudo objetivou avaliar a eficiência dos processos de produção do Instituto Vital Brazil (IVB), correlacionando às frações dos anticorpos quantificados proteicamente, com sua capacidade neutralizante “in vivo”.

Metodologia: Foram analisadas 61 amostras de soros hiperimunes. As proteínas dos soros foram determinadas pelo método do Biureto e as potências obtidas pela técnica de soroneutralização (utilizando os diferentes antígenos nas doses padrões de desafio) em camundongos albinos suíços. O grau de pureza foi avaliado pelo perfil eletroforético dos soros. Assim, foram feitas identificações das proteínas presentes em cada fase do processo produtivo através da eletroforese em filme de agarose geral com o sistema tampão descontínuo, integrados em scanner modelo CanoScan LiDE 25, e da eletroforese de gel de poli(acrilamida) (EGPA-SDS).

Resultados: Nas avaliações de proteínas totais nas ampolas encontramos um valor médio de 3,5g%. Nos perfis (EGPA-SDS) dos plasmas comparados com as amostras dos soros já concentrados e acabados, observamos que na grande maioria, a faixa das imunoglobulinas íntegras no plasma (de 150 a 180 kDa) passaram a figurar de forma reduzida nos soros (com hidrólise da IgG para F(ab')₂), aparecendo na faixa de 100 a 130 kDa. Igualmente observamos nas amostras de plasma a presença significativa de traços de albumina (peso molecular de 66kDa) que praticamente desaparecem nos soros que também passaram pelo fracionamento (digestão péptica), figurando entretanto numa faixa de peso inferior, com peso aproximado de 20 kDa, resultante da proteólise da albumina. Destacamos os soros antirrábicos e antiescorpiônicos como os mais críticos quanto à eficiência do processo de produção quando comparados aos antiofídicos e antitetânicos. Os soros ampolados possuem uma concentração média de 71% de proteínas correspondentes às

Imunoglobulinas, variando segundo o tipo de soro. Os antibotrópicos são os de maior rendimento, chegando o antibotrópico-Laquético à média de 80%, ao contrário dos soros Antirrábico e Anticrotálico com médias de 64-66%.

Conclusão: Pelas análises eletroforéticas, concluímos que o teor de proteínas e o teor de F(ab')₂/ampola entre os diferentes lotes e diferentes tipos de soros variam consideravelmente. Em decorrência, sugerimos a inclusão da análise do perfil eletroforético como prova de rotina do controle de qualidade para acompanhamento do processo produtivo, no sentido de revelar a eficiência da remoção das proteínas inespecíficas às F(ab)₂. Cabe destacar que os soros do IVB sempre tiveram a potência neutralizante acima do exigido, e os seus teores de proteína total muito abaixo dos valores máximos de referência da Farmacopéia Brasileira.

Palavras-Chave: Imunobiológicos, Biofármacos, Anticorpos Heterólogos

B6 Análise do rendimento do complexo produtivo dos soros hiperimunes do Instituto Vital Brazil (IVB)

Aniesse Silva Aguiar¹, Larissa de Oliveira Valadares², Michelle Pacheco de Lima¹, Moacir de Souza Silva¹, Jorge Luiz Coelho Mattos¹

¹ Instituto Vital Brazil

² Famath - PIBIC

Introdução: Segundo a ANVISA, soros hiperimunes são imunoglobulinas heterólogas inteiras ou fragmentadas, purificadas, obtidas de plasma de animais hiperimunizados com toxinas de animais, microorganismos ou vírus.

Objetivo: Este estudo objetivou avaliar a eficiência da imunização, purificação e concentração dos soros do IVB.

Metodologia: Foram pesquisadas e analisadas as fichas de 67 lotes de produção dos soros fabricados entre 2008 e 2012 para os cálculos dos rendimentos.

Resultados: Os resultados de rendimento quanto à potência x volume de plasma hiperimune e gamaglobulina concentrada, são expressos nas médias percentuais de recuperação das imunoglobulinas: soro Antibotrópico (27,50% \pm 0,04); Anticrotálico (37,78% \pm 0,09); Antibotrópico-crotálico (fração antibotrópica 26,85% \pm 0,11 e fração anticrotálica 50,75% \pm 0,05); Antiescorpionico (19,46% \pm 0,05); Antitetânico (32,05% \pm 0,07) e Antirrábico (aproximadamente de 4,70%). Dificuldades de obtenção de antígenos para os soros antilaquéticos e antirrábicos nem sempre permitiram a determinação de potência dos plasmas hiperimunes correspondentes, o que tornou inconsistente o cálculo percentual médio de recuperação destas imunoglobulinas. Os cálculos de rendimento mostram a produtividade (ampolas/equino/ano) com as seguintes médias: soro Antitetânico (4.923 \pm 1.698,04); Antiescorpionico (4.487 \pm 609,75); Antirrábico (3.968 \pm 651,36); Antibotrópico (2.965 \pm 257,90); Anticrotálico (1.676,5 \pm 143,75); Antibotrópico-laquético (609,75 \pm 180,66) e Antibotrópico-crotálico (530 \pm 89,00). Os maiores rendimentos de ampolas/equino encontrados foram no Antitetânico, Antiescorpionico e Antirrábico. A aparente contradição com os resultados acima expressados deve-se ao fato de que as ampolas dos soros Antitetânico, Antiescorpionico e Antirrábico contém um volume de 5 ml, enquanto os soros antiofídicos (Antibotrópico; Anticrotálico; Antibotrópico-laquético e Antibotrópico-crotálico) são apresentados em ampolas de 10ml. Portanto duas ampolas dos primeiros correspondem a uma dos últimos. Por outro lado observamos que dos soros antiofídicos, o Antibotrópico-laquético e Antibotrópico-crotálico são os de menor rendimento em número de ampolas /equino, o que se explica pelo fato de que compreendem dois tipos de antígenos que são inoculados em equídeos diferentes (na

imunização) e produzidos separadamente, para posterior mistura em uma única ampola. Observamos também diferenças no rendimento entre os mesmos tipos de soros. Estas variações parecem ser indicativas de heterogeneidades no processo de produção, que podem ir desde variabilidades no manejo dos equídeos, a inconstâncias no processo fabril, obsolescência da malha industrial, ou ainda devido às peculiaridades imunogênicas dos soros. A hidrólise das diferentes formas de IgG não é homogênea, na IgG(T) ocorre mais rapidamente do que na IgGa, e portanto soros cuja neutralização dependam fundamentalmente da primeira estariam sendo mais degradados, resultando num menor rendimento.

Conclusão: Entendemos ser oportuna a revisão e as adequações metodológicas segundo cada tipo de soro a ser produzido, de forma a aperfeiçoar o processo e aumentar o rendimento das imunoglobulinas purificadas. Em face destas considerações, a unidade de purificação e concentração de soros do IVB vem sendo renovada em todo seu processo fabril desde 2013.

Palavras-Chave: Imunobiológicos, Purificação de Imunoglobulinas, Anitocorpos

B7 Avaliação de alternativas de meio de cultivo para a produção da eritropoetina humana recombinante expressa em células CHO em suspensão

Alexandre Borges Murad¹, Esther Vinhais Gutierrez¹, Tiago Pereira dos Santos¹, Álvaro Paiva Braga de Sousa¹, Rodrigo Coelho Ventura Pinto¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: Com o avanço das técnicas de biologia molecular, os cultivos celulares passaram a ser uma importante plataforma para a produção dos biofármacos, que são proteínas recombinantes com fins terapêuticos, obtidos através de processo biotecnológicos. A manutenção dos cultivos sob condições ideais são de grande importância para a obtenção do produto conforme especificações de qualidade e requisitos de segurança. Desta forma, os meios de cultivo garantem o ambiente e o fornecimento de nutrientes às células, possibilitando o funcionamento normal do metabolismo, do crescimento celular e, conseqüentemente, a correta síntese do produto de interesse. Neste trabalho serão avaliados meios comerciais e mais modernos em alternativa ao utilizado atualmente no processo de obtenção da EPO_{hr}, observando-se a capacidade de promoção de crescimento, produtividade e qualidade da molécula.

Objetivo: Comparar diferentes alternativas de meios de cultivo comerciais livres de soro fetal bovino e componentes animais com o meio de cultivo atualmente utilizado para o cultivo em suspensão de células CHO secretoras de EPO.

Metodologia: De um banco de células de trabalho, células CHO secretoras de EPO_{hr} foram cultivadas em frascos estáticos do tipo T25 cm² em meio SFM4CHO–Utility™ (Thermo Hyclone GE), na concentração inicial de 2,0x10⁵ células viáveis/mL, em seguida em frascos T75 cm² de meio SFM4CHO™ ou HyCell™ na concentração de 3,0x10⁵ células viáveis/mL e em garrafas rotatórias na concentração de 2,0x10⁵ células viáveis/mL em cinco passagens. A cinética (candidato e controle) foi iniciada a partir da última etapa do sub-cultivo, durando 9 dias. Diariamente, foram retiradas alíquotas para quantificação celular em hemacitômetro corando com Azul de Trypan (Células mortas) e cristal violeta (Células totais) e no equipamento NucleoCounter®.

Resultados: Os meios testados foram introduzidos através de um protocolo de adaptação direta por passagens sucessivas, sendo a substituição realizada na 2ª passagem. A adaptação ao meio SFM4CHO™ apresentou concentração de células viáveis relativamente superior ao controle, com viabilidades acima de 80%. Nesta etapa, o meio HyCell™ obteve concentração celular inferior ao controle e baixa viabilidade (<80%) nas últimas passagens. O meio

SFM4CHO™ foi submetido a uma cinética de crescimento, obtendo concentração máxima $2,42 \times 10^6 \pm 0,06$ células viáveis/mL (6º dia), em comparação com o controle, $1,79 \times 10^6 \pm 0,05$ células viáveis/mL (7º dia). A viabilidade inicial do cultivo no meio testado se manteve na faixa de 80-90%, diferente do controle, que sustentou o cultivo com maior viabilidade, na faixa de 90-100%.

Conclusão: O meio de cultivo SFM4CHO™ apresentou boa capacidade de sustentar a proliferação, apesar do protocolo de adaptação direta, e alcançou concentração máxima de células viáveis superior ao controle, indicando possuir melhor desempenho, pois manteve a viabilidade em níveis aceitáveis. Os resultados sugerem que, para o meio HyCell™, o protocolo de adaptação precisa ser alterado, utilizando-se estratégia de substituição.

Palavras-Chave: Alfaepoetina, Biofármaco, CHO, EPOhr, Roller

B8 Production of monoclonal antibodies in suspension culture of D1-4G2-4-15 hybridoma using spinner flasks system

Guillermo Marini¹, Marcia Arissawa¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introduction: Production of monoclonal antibodies involves *in vivo* or *in vitro* procedures. *In vivo* production presents great variability and difficulty of scaling-up, as well as ethical problems. *In vitro* processes are robust and achieve high cell densities, an easy scaling-up, and a better control/regulation of the process. The most widely used *in vitro* systems for antibody production include *spinners* and *rollers* flasks and bioreactors. Culture conditions have a significant impact on the cell growth and antibody production. In this work, D1-4G2-4-15 hybridoma, producer of monoclonal antibodies anti-flavivirus group antigen, were cultivated. Cellular viability, cell growth rate, IgG production, glucose and L-lactate concentrations have been used as investigation criteria in order to establish the optimized conditions of antibody production in spinner flasks.

Objective: Establish a suspension culture in spinner-flask of D1-4G2-4-15 hybridoma.

Methodology: D1-4G2-4-15 murine hybridoma was grown in suspension using both pendulum and impeller *spinners* in high glucose medium supplemented with fetal bovine serum and L-Glutamine. Initially, the hybridoma culture was adapted to growth in suspension, maintaining the culture at low cellular concentration and changing the medium periodically to keep it in exponential growth phase. Subsequently, cell growth and IgG production kinetic of hybridoma were carried out to characterize the suspension culture in batch mode. Finally, the suspension culture was carried out in semi-continuous mode changing medium every 48h to evaluate the cell culture behaviour at three different cell concentration ranges. Samples were taken in order to quantify metabolites and IgG production.

Results: The hybridoma adaptation to suspension culture was successfully implemented in both pendulum and impeller *spinners*, with specific growth rate of $0.038 \pm 0.004 \text{ h}^{-1}$ and $0.031 \pm 0.005 \text{ h}^{-1}$ respectively, and viability above 90%. The cell growth kinetic in suspension culture presented an exponential cell growth during the first 48h, followed by a 24h stationary phase. The maximum viable cells concentration in pendulum *spinners* was about 25% higher than that obtained in impeller *spinners*. The IgG production reached a maximum of $139 \pm 22 \text{ mg/L}$ (day 5 and 6 - pendulum) and $123 \pm 23 \text{ mg/L}$ (day 5 to 8 - impeller). Based on these results, 10-day culture in semi-continuous mode using pendulum *spinners* proceeded within the range of $0.4 - 2.0 \times 10^6 \text{ cel/mL}$. The average specific growth rate was $0.031 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$. The

IgG concentration ranged 17 ± 3 - 88 ± 11 mg/L. Both results are in agreement with the literature data published. Higher cell concentration range culture at the same conditions was not feasible.

Conclusion: The suspension culture of D1-4G2-4-15 hybridoma in semi-continuous mode was established using spinner flasks. Maximum levels of IgG obtained were similar to those reported in the literature for this type of culture. The results are promising and will serve for future studies using serum-free media in order to optimize the production process.

Keywords: Hybridoma, Suspension Culture, IgG Production

B9 Estudo de diferentes suplementos de meios de cultivo para otimizar cultivos de células CHO para produção de eritropoetina humana recombinante

Álvaro Paiva Braga de Sousa¹, Ethiene da Silva Correa¹, Tiago Pereira dos Santos¹, Marina Vergne de Almeida¹, Rodrigo Coelho Ventura Pinto¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: Bio-Manguinhos/Fiocruz, em atendimento à demanda do Ministério da Saúde do Brasil, produz biofármacos, imunobiológicos e reagentes para diagnósticos. A produção de biofármacos baseada no cultivo de células animais depende de diversos fatores que podem influenciar na qualidade final do produto. Suplementos e meios nutrientes contendo substratos essenciais ao crescimento celular e para a síntese das proteínas heterólogas são de grande importância, pois influenciam diretamente no perfil bioquímico do produto e, conseqüentemente, nos atributos de qualidade da molécula. Meios de cultivos e suplementos capazes de aumentar as concentrações de células e produtividade volumétrica, sem alterar as principais características do produto, tornam-se fundamentais para a produção em larga escala. Neste contexto, diferentes suplementos foram estudados, comparados ao meio de cultivo padrão, quanto à capacidade de sustentar a proliferação celular, visando à otimização do cultivo para a produção da Alfaepoetina.

Objetivo: Comparar diferentes suplementos (Hyclone GE), livres de componentes animal, para otimizar os cultivos de células CHO produtoras da eritropoetina humana recombinante (rh-EPO) em frasco estático.

Metodologia: Células CHO produtoras da rh-EPO foram cultivadas em frascos estáticos do tipo T25cm², utilizando meio de cultivo SFM4CHO – Utility™ (Hyclone GE), 100mM de L-Glutamina, em um volume de trabalho de 6mL por frasco. Cada suplemento a ser estudado foi preparado na concentração de 100g/L e adicionados ao meio de cultivo na concentração de 10% (v/v) no dia zero de cultivo, 30 minutos antes da realização do inóculo celular inicial de 2.0x10⁵ células viáveis/mL e viabilidade inicial na faixa de 90-95%. A quantificação celular foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando Cristal Violeta (células totais) e Azul de Trypan (células viáveis) a 0.4% (p/v) (Sanford et al. 1950).

Resultados: Foram adicionados 06 diferentes suplementos ao meio de cultivo controle. Nos cultivos inoculados com o suplemento CB2, a concentração máxima foi 26.67x10⁵ células viáveis/mL no 4º dia, e maior viabilidade do 2º (88.21%) ao 8º dia (63.75%). Nos cultivos inoculados com o suplemento CB4, as concentrações máximas foram

de 32.55×10^5 a 32.77×10^5 células viáveis/mL, do 4º ao 6º dia, respectivamente, e maior viabilidade do 3º (88.29%) ao 8º dia (36.86%). A viabilidade do controle a partir do 6º dia sofreu queda significativamente maior quando comparado à maioria dos suplementos.

Conclusão: Em geral os suplementos CB2 e CB4 apresentaram relativa melhora na performance do cultivo. Apesar do suplemento CB2 não alcançar concentração máxima significativamente superior ao meio controle, este sustentou uma maior proliferação na fase exponencial, além do maior período com alta viabilidade. O Suplemento CB4 obteve melhor performance quanto à concentração celular máxima e sua manutenção por período mais prolongado, além de melhor viabilidade celular. Sugere-se que os suplementos citados possuem influência positiva na proliferação celular, viabilidade e possivelmente na produtividade volumétrica do processo.

Palavras-Chave: Produção Alfaepoetina, Biofármacos, Células CHO

B10 Complementarity determining regions (CDR) identification in Monoclonal antibodies gene sequences

Alexandre Bezerra Conde Figueiredo¹, Carlos Otavio Alves Viana², Márcia Arissawa¹

¹ Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais, Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

² Laboratório de Tecnologia Recombinante, Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introduction: Monoclonal antibodies (mAb) have many applications, including the use in diagnostic kits, quality control of vaccines and therapy. MABs can be developed in the laboratory through hybridoma technology which consists in fusion and selection of B lymphocytes with tumor B-cells producing antibody of interest. Although effective, hybridoma technology has disadvantages, such as genetic instability caused by the fusion of different cells and emergence of subpopulation clones during cultivation. Each mAb that binds to a specific target (epitope) is derived from a B lymphocyte clone. The region responsible for binding and specificity of the antibody to the antigen is found in three complementarity determining regions (CDRs) in the heavy (VH) and light (VL) chains of the mAb variable region. The nucleotide sequence encoding these regions is originated from recombinant genes to specific immunoglobulins in B lymphocytes, which can be identified using molecular biology techniques. Thus, the identification of CDRs is an important step to understand and preserve the genetic patrimony of mAb from LATAM's hybridoma bank. In later stages, the information will be used on new platforms of expression in order to increase productivity and efficiency in the production of antibodies.

Objective: Identify mAb CDRs from the LATAM's hybridoma bank.

Methodology: Initially we chose eight murine hybridoma from the bank, based on the service requests since last 5 years in the laboratory, among which stood out those producing mAb against hepatitis B, yellow fever and dengue serotype 1, 2 3 and 4. RNA was extracted from hybridomas (RNeasy, Qiagen), and then cDNA was constructed from the reverse transcriptase reaction (SuperscriptIII, Invitrogen). The VH and VL regions were amplified by polymerase chain reaction (PCR), using 11 primers sense to VH and 9 to VL, besides an individual antisense primer for each region. PCR products were resolved on agarose gel and used for automated sequencing (3500XL Genetic Analyzer, Life). The sequences were analyzed using the database of immunoglobulins (Vbase2 and IgBlast - NCBI) for identification and determination of the degree of CDR homology.

Results: The VH and VL regions of all hybridomas involved in this study were amplified by PCR and visualized on agarose gel 1.2%, yielding a

single band of 570 and 370 bp, respectively. The functional sequences were identified and compared using the database of immunoglobulin, obtaining 85% of homology in all of the CDR (VL and VH) analyzed.

Conclusion: The CDRs of the six major LATAM hybridomas were identified, thus generating the possibility of population genetic homogeneity control after cloning processes, gene expression in another cell platform with higher genetic stability and, in the future, CDR manipulation by molecular biology techniques for future improvements of mAb affinity.

Keywords: Monoclonal Antibody, CDR

B11 Clonagem e expressão de anticorpo monoclonal anti-CD20 recombinante: primeiros passos para desenvolvimento de novos anticorpos terapêuticos contra o câncer

Vinicius da Cunha Lisboa¹, Eneida Almeida Santos¹, Maria da Glória Martins Teixeira¹, Carlos Otávio Vianna¹, Aline Almeida-Oliveira¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: O Linfoma não-Hodgking (LNH) é uma neoplasia maligna que acomete os linfócitos B, sendo a segunda doença hematológica maligna mais frequente. Entre todas as neoplasias no Brasil é a décima primeira e, segundo o Instituto Nacional de Câncer existe a estimativa de 9079 casos para o ano de 2014. Além da quimioterapia convencional, a utilização de anticorpos monoclonais como tratamento contra o câncer vem sendo amplamente empregada. Em 1997, o FDA aprovou o primeiro medicamento composto por anticorpo monoclonal para o tratamento de LNH, o Rituximab (Mabthera), que revolucionou a terapia desta doença. O alvo molecular é a proteína CD20, que é expressa na membrana plasmática de quase todas as células B, inclusive linfócitos B tumorais. Atualmente, por conta do fim da vigência da patente do Rituximab, novos anticorpos anti-CD20 estão sendo desenvolvidos com o intuito de melhorar a eficácia terapêutica deste biofármaco.

Objetivo: Realizar clonagem e expressão das sequências de cadeias leve e pesada do Rituximab, a partir da sequência adquirida comercialmente, a fim de padronizar metodologia para posteriores ensaios com uma nova molécula produzida a partir do Rituximab.

Metodologia: Os genes do Rituximab foram sintetizados e clonados nos plasmídeos pDTSmart (cadeia leve) e pUCIDT (cadeia pesada). Após digestão enzimática sítio específica, os insertos foram subclonados no plasmídeo comercial pCDNA3, específico para expressão em células de mamíferos. Sequenciamento nucleotídico para confirmação das sequências gênicas. Para transfecção transitória em células da linhagem HEK 293T, utilizou-se o método FuGene (Roche). A primeira análise do sobrenadante da cultura de células foi feita pelo teste imunoenzimático ELISA.

Resultados: As digestões enzimáticas revelaram que os insertos correspondentes à sequência do Rituximab, apresentavam o tamanho esperado (1400pb para a cadeia pesada e 726pb para a cadeia leve), quando comparados ao padrão de peso molecular. O sequenciamento nucleotídico confirmou a sequência gênica dos insertos. A análise do sobrenadante, pelo método de ELISA das culturas de HEK 293T transfectadas, revelou uma concentração de aproximadamente 10ng/mL de anticorpo.

Conclusão: A metodologia utilizada se mostrou eficaz na expressão e detecção do anticorpo recombinante, sendo uma ferramenta útil para o desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais contra o câncer a partir do Rituximab.

Palavras-Chave: Anticorpo Monoclonal Quimérico, Linfoma

B12 Clonagem e expressão do hormônio do crescimento humano recombinante (hGH) em *Escherichia coli*

Thiago Santos Chaves¹, Daniel Tait Vareschini², Fernanda de Almeida², Cristiane Pinheiro Pestana², Haroldo Cid da Silva Junior², Marco Alberto Medeiros²

¹ Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinante, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil - Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

² Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Laboratório de Tecnologia Recombinante, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introdução: O hGH (*Human growth hormone*) é um polipeptídeo de cadeia simples com 191 resíduos de aminoácidos. Em Junho de 2013, o Ministério da Saúde Brasileiro anunciou parcerias entre laboratórios públicos e privados para incentivo da produção nacional de biofármacos, entre eles a somatropina, nome comercial dado ao hGH. Com o objetivo de desenvolver competências e qualificar profissionais para atuar no desenvolvimento e acompanhamento de novos processos relacionados a este produto foi realizado o trabalho de otimização de códon, clonagem e expressão de hGH recombinante em *E. coli*, desde a construção *in silico* até o crescimento e expressão em escala de bancada.

Objetivo: Este trabalho tem como objetivo obter hGH recombinante.

Metodologia: O gene que codifica o hGH, foi avaliado *in silico* e os códons otimizados para expressão em *E. coli*. O gene foi amplificado por PCR, o amplicon purificado e digerido com as enzimas de restrição *NcoI* e *HindIII*, clonado no vetor de expressão e amplificado em *E. coli* TOPO10. A clonagem foi confirmada por PCR e sequenciamento de nucleotídeos demonstrando identidade. Os clones positivos foram expandidos e o hormônio recombinante expresso em *E. coli* BL21 star DE3 em meio *Terrific Broth* (TB) contendo canamicina e IPTG. Os ensaios de expressão foram realizados em shaker e biorreator.

Resultados: A sequência de hGH foi otimizada para a expressão em *E. coli* obtendo um CAI (*Codon Adaptation Index*) de 0,76. O gene foi amplificado por PCR e analisado em gel de agarose confirmando o tamanho do amplicon gerado. O amplicon foi purificado, quantificado e clonado no vetor de expressão. O produto da clonagem foi transformado em *E. coli* TOP10 resultando, após seleção, em 3 clones recombinantes, confirmados por PCR e sequenciamento. Os clones foram expandidos, seu DNA extraído e utilizado para transformação em *E. coli* BL21 para expressão. Um dos clones obtidos em *E. coli* BL21 foi cultivado em shaker em meio TB suplementado com canamicina a uma temperatura de 37°C e induzido com IPTG a 28 °C

com agitação de 200 rpm, produzindo 0,6 g/L de proteína solúvel, representado 76% da proteína total expressa no extrato bruto. Na condição de cultivo em biorreator, com aeração de 1 vvm e 6 horas de cultivo, sendo 4 de indução, obtivemos 1 g/L, mantendo a solubilidade e atingindo um aumento de 40% em relação ao cultivo em shaker.

Conclusão: Utilizando condições padrões do laboratório, conseguimos demonstrar a expressão de hGH recombinante em *E. coli*, solúvel e em alta concentração, 1g/ L de cultura. Este resultado confirma a qualificação para o desenvolvimento de novos insumos e processos dentro da Unidade. Cabe ressaltar que experimentos de otimização utilizando planejamento experimental poderão aumentar ainda mais a produtividade do hormônio em reatores.

Palavras-Chave: hGH, Biofármacos, Expressão, Clonagem

B13 Rapid and efficient immunization method using popliteal lymph nodes to generate monoclonal antibodies

Fernando de Paiva Conte¹, Milena Mouta Verdan França Carvalho¹, Alexandre Bezerra Conde Figueiredo¹, Isabel Maria Alexandre Freire², Fernanda Rimolli de Castro Araujo², Márcia Arissawa¹

¹ Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

² Laboratório de Experimentação Animal, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

Introduction: Monoclonal antibody (mAb) is a remarkable tool in the advancement of research, diagnostic, and therapeutic applications. Its generation can be achieved through hybridoma fusion technique, a traditional method for generating highly specific mAb. Until the moment, different hybridoma protocols (e.g. different routes of immunization, antigen concentration and number of immunizations) were published. Previous work from our group demonstrated that mice immunization accounts for more than 30% (47 days) of the total time of mAb generation using hybridoma technology. It includes 4 immunizations and B lymphocyte harvesting from mice spleen. The increasingly demand for mAb development at Bio-Manguinhos led us to develop a rapid and efficient immunization methodology to generate IgG mAb within 19 days through intraplantar immunizations and recovery of B lymphocytes from popliteal lymph nodes, reducing time, costs, number of immunizations and the amount of antigen necessary to mAb generation.

Objective: To develop an efficient and faster protocol for generating monoclonal antibody against human alpha 2b interferon (hIFNa2b).

Methodology: BALB/c mice (6 weeks old; n=6) were injected at day 0 into the footpad with an emulsion (1:1) containing 25 mL of purified hIFNa2b (25 µg) in a final volume of 50 µL with complete Freund's adjuvant. Fifteen days after initial immunization, mice were injected into the footpad with an emulsion (1:1) of purified hIFNa2b (25 µg) in a final volume of 50 µL with incomplete Freund's adjuvant. Mice IgG serum titration was assayed at day 18 using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against hIFNa2b. Mice presenting serum titer absorbance (λ: 450nm) 3x higher than the cut-off were euthanized and the popliteal lymph node cells were pooled and fused with nonsecreting SP2/0-Ag14 cell line using 50% polyethylene glycol (MW 3,000-3,700). Hybridomas were selected in HAT (hypoxanthine-aminopterin-thymidin)-containing medium for 15 days and the supernatants from growing hybrids were screened by ELISA to select positive clones against hIFNa2b. The positive wells were cloned under limiting dilution conditions and re-screened by

hIFNa2b ELISA. After recloning, the antibody generated from the clone with higher response against hIFNa2b was further characterized.

Results: Eighteen days after the first immunization, all 6 immunized mice showed increased specific immunoglobulin G (IgG) serum titer against hIFNa2b when compared to sera from nonimmunized mice. The highest serum IgG antibody titer achieved was 24475. After fusion and HATmedium selection, 181 wells containing hybridomas secreting mAb against hIFNa2b were generated, as confirmed by specific indirect ELISA against hIFNa2b. Among the positive hybridomas generated, we characterized the hybridoma with highest optical density (O.D.) in ELISA.

Conclusion: The protocol of intraplantar immunization associated with the use of popliteal lymph nodes successfully generated murine IgG mAb against hIFNa2b. This simple approach may become an efficient, easier and faster method of choice for the generation of mAb.

Keywords: Monoclonal Antibody, Hybridoma, Fusion, Immunization

B14 Comparação de metodologias de quantificação celular para monitoramento de cultivos de células animais em suspensão

Esther Vinhais Gutierrez¹, Maira Peixoto Pellegrini¹, Alexandre Borges Murad¹, Marina Vergne de Almeida¹, Tiago Pereira dos Santos¹, Eduardo Ruback dos Santos¹, Ana Carolina Siqueira Couto de Oliveira¹, Rodrigo Coelho Ventura Pinto¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: O cultivo de células animais é um sistema já estabelecido na produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico e, conseqüentemente, o controle e monitoramento do crescimento celular são cruciais para a condução apropriada do processo produtivo, sendo empregadas diversas metodologias para a sua avaliação. O processo de produção da eritropoietina humana recombinante (rhEPO), foco de Transferência de Tecnologia em Bio-Manguinhos/Fiocruz, utiliza a técnica de exclusão do corante azul de tripano para a quantificação celular. Porém, a linhagem celular empregada no processo produtivo se caracteriza pelo crescimento em suspensão formando agregados celulares. Este fenômeno pode dificultar a contagem, pois grumos de maior tamanho não conseguem acessar os quadrantes de contagem e as células mais internas não entram em contato com o corante, resultando em um potencial erro de quantificação.

Objetivo: Comparar diferentes metodologias para monitoramento do cultivo celular, com o intuito de implementação na rotina de produção.

Metodologia: Foram utilizadas quatro estratégias de quantificação celular para o monitoramento de cultivos de células CHO expressando a rhEPO: coloração de células mortas pelo azul de tripano (padrão); desagregação de grumos celulares (tripsinização) e posterior quantificação com azul de tripano; coloração dos núcleos pelo corante cristal violeta; e quantificação pelo equipamento NucleoCounter. A citometria de fluxo foi utilizada a fim de se estabelecer um padrão preciso para análise de viabilidade celular dos cultivos.

Resultados: As estratégias de quantificação de células totais com azul de tripano pós tripsinização e coloração por cristal violeta não apresentaram diferença significativa quando comparadas à técnica padrão. Em relação às células mortas, foi observada uma variação quando comparadas às técnicas de coloração por azul de tripano com e sem tripsinização, tendo este último apresentado um quantitativo superior entre os dias 5 e 7 do cultivo. A partir do terceiro dia de cultivo, a quantificação de células totais com o equipamento NucleoCounter foi cerca de 50% inferior à obtida por meio da técnica padrão. Em relação às células mortas, esta variação foi muito grande, alcançando níveis incompatíveis com o estado e a fase do cultivo. A viabilidade celular

obtida pelo NucleoCounter manteve-se superior a 98% até o sétimo dia de cultivo, enquanto os valores apontados pelas demais metodologias, incluindo a citometria de fluxo, sofreram queda a partir do quinto dia de cultivo, como era de se esperar.

Conclusão: Os resultados indicam que a quantificação celular pelo NucleoCounter se mostrou inconsistente, impossibilitando, por enquanto, a substituição dos métodos mais laboriosos, como o azul de tripano e o cristal violeta. Nas concentrações alcançadas durante o experimento, a formação de poucos agregados celulares não gerou interferência na quantificação pela técnica padrão. No entanto, para maiores densidades celulares e cultivos mais prolongados, é necessário avaliar o impacto de prováveis agregados na metodologia de quantificação celular.

Palavras-Chave: Cultivo Celular, Quantificação Celular, Viabilidade

B15 Determinação de Eritropoetina Humana Recombinante em amostras do produto final Alfaepoetina humana recombinante por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência

Eduardo da Silva Gomes de Castro¹, Melissa Chamon Alves Premazzi¹

¹ Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introdução: A Eritropoetina Humana (EPO) é uma glicoproteína produzida primariamente pelos rins, a qual regula a produção de células vermelhas no sangue. A eritropoetina humana recombinante (rhEPO) tem sido expressa através da tecnologia de DNA recombinante e diversos preparos farmacêuticos encontram-se disponíveis por fabricantes pelo mundo. Como se trata de uma proteína recombinante, a rhEPO sofre espontâneas modificações estruturais, tais como: desaminação, oxidação e agregação. Desta forma, do ponto de vista do Controle de Qualidade, é de fundamental importância o conhecimento da concentração de rhEPO nas formulações produzidas em Bio-Manguinhos, para a avaliação da estabilidade e qualidade do produto. O desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a determinação da substância ativa (rhEPO) pode apresentar algumas dificuldades oriundas principalmente da presença da Albumina Humana usada como excipiente em suas formulações. A presença desta outra proteína inviabiliza a utilização de técnicas como a espectrofotometria de absorção na região do UV/VIS sem uma etapa prévia de separação. Dentro deste contexto insere-se a Cromatografia a Líquido de Alta eficiência (CLAE) como ferramenta imprescindível para a obtenção de uma resolução mínima necessária para a determinação de EPO livre de interferências oriundas da Albumina humana e de outras substâncias eventualmente presentes na formulação que possam vir a coeluir com este analito.

Objetivo: Desenvolver metodologia analítica para a determinação de rhEPO em amostras do biofármaco alfaepoetina humana recombinante nas apresentações 2000, 4000 e 10000 UI.

Metodologia: Durante o desenvolvimento da metodologia, utilizou-se amostras de diferentes lotes do biofármaco alfaepoetina humana recombinante nas 3 apresentações 2000, 4000 e 10000 UI, além do Material de Referência *in house* de EPO (rHEPO, MRT, lote 0208) para a construção da curva analítica. O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (Waters, Alliance), equipado com um detector de UV, modelo 2996. Empregou-se uma coluna analítica do tipo C18, marca Bakerbond, 4,6 x 100nm, 5 mm. Fase móvel "A": Ácido Trifluoracético 0,1% em água Milli-Q e fase móvel "B": Ácido Trifluoracético 0,1% em Acetonitrila, modo gradiente, vazão 1,5 mL/min.

Resultados: A metodologia proposta apresentou exatidão melhor que 98% para as apresentações 2000 e 10000 UI e melhor que 96% para a apresentação 4000 UI, quando comparadas com o Material de Referência *in house*. Além disso, o método se mostrou linear na faixa de 10 - 50 mg/mL, com coeficiente de determinação (R^2) > 0,999.

Conclusão: A metodologia proposta mostrou-se vantajosa por apresentar uma boa resolução cromatográfica entre os picos de rHEPO e Albumina Humana, seu principal interferente. Além disso, foi possível observar boas figuras de mérito alcançadas durante a validação, demonstrando assim que o método atende às necessidades do Controle de Qualidade.

Palavras-Chave: rHEPO, CLAE, Biofármacos

B16 Investigação dos mecanismos moleculares pelos quais o PCA3 modula a sobrevivência de células de câncer de próstata

Ana Emília Goulart¹, Luciana Bueno Ferreira², Nadia Maria Batoreu³, Martin Hernan Bonamino⁴, Etel Rodrigues Pereira Gimba⁵

¹ LATER, Programa de Biofármacos e Instituto Nacional de Câncer, Centro de Pesquisa, Programa de Carcinogênese Molecular, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

² IPATIMUP, Universidade do Porto, Portugal,

³ Programa de Biofármacos, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ

⁴ Instituto Nacional de Câncer, Centro de Pesquisa, Programa de Carcinogênese Molecular

⁵ Instituto Nacional de Câncer, Centro de Pesquisa, Programa de Carcinogênese Molecular e Universidade Federal Fluminense, IHS, Departamento Interdisciplinar

Introdução: O RNA não codificante (ncRNA) PCA3 está envolvido no controle da sobrevivência de células de câncer de próstata (CaP), através da modulação da via de sinalização do receptor de androgênio (AR).

Objetivo: Para melhor caracterizar por quais mecanismos moleculares o PCA3 controla a sobrevivência das células LNCaP, objetivamos investigar se os diversos genes relacionados ao câncer – incluindo os envolvidos na transição epitelial mesenquimal (EMT), os que apresentam potencial *stemness* e os co-reguladores da via do AR – podem estar envolvidos no processo de resposta à inibição do PCA3.

Metodologia: Empregamos *small interfering RNA* (siRNA) ou *short hairpin RNA* (shRNA) com expressão baseada em vetores lentivirais para inibir a expressão de PCA3 e avaliar os efeitos deste silenciamento na sobrevivência de células LNCaP. Após a interferência do PCA3, analisamos por RT-PCR a expressão de marcadores EMT, co-reguladores do AR, genes com potencial *stemness* e diversos genes relacionados ao câncer; utilizamos microscopia confocal para analisar a expressão da vimentina; empregamos citometria de fluxo para verificar o percentual de células LNCaP GFP+, após a transdução com vetores lentivirais.

Resultados: Dentre 84 genes relacionados ao câncer, 16 apresentaram expressão alterada nas células LNCaP interferidas com siPCA3 em relação ao controle de células LNCaP interferidas com siScrl. Desses, 30% codificam moléculas de transdução de sinais e/ou fatores de transcrição. Observou-se expressão aumentada de E-caderina, Claudina-3, Citoqueratina-18, Snail, Twist e Slug em células LNCaP transfectadas com siPCA3 em relação ao controle, enquanto observou-se expressão diminuída de Claudina-4, Citoqueratina-8 e

Vimentina. O padrão de marcação de vimentina foi similar em células LNCaP – siPCA3 e células LNCaP – siScrb1. Dentre os coreguladores, ARA 70, ARA 54, Smad3 e EBP1 apresentaram expressão aumentada em células LNCaP- siPCA3 em relação ao controle, enquanto Smad 4 e ciclina D1 apresentaram expressão diminuída. Não foi detectada a expressão de genes com potencial *stemness* nas condições testadas. Células transduzidas com vetores lentivirais carregando shPCA3 apresentaram diminuição estável da expressão do PCA3. Foi observada redução estável de cerca de 60% de células LNCaP-GFP+transduzidas com shPCA3 em relação aos controles. O mesmo foi observado em experimentos empregando siPCA3.

Conclusão: O silenciamento do PCA3 por RNAi permite diminuição de viabilidade e envolve moléculas-chaves de transdução de sinais e fatores de transcrição que podem orquestrar a sobrevivência de células de CaP. A diminuição na viabilidade das células transfectadas com siPCA3 não é modulada de forma clássica pelo programa EMT, embora alguns marcadores da transição possam regular a morte celular induzida por siPCA3. A desregulação da expressão de coreguladores observada pode modular negativamente a expressão dos genes alvo do AR. A redução estável da expressão de PCA3 mostra o potencial deste ncRNA como ferramenta terapêutica contra o CaP, por sua modulação negativa da sobrevivência celular.

Palavras-Chave: Câncer de Próstata, PCA3

B17 Determinação de aminoácidos usados como excipientes no biofármaco alfaepoetina humana recombinante por eletroforese capilar com detecção por uv sem derivatização

Izabel Cristina de Souza Crespo¹, Annibal Duarte Pereira Netto², Flávia Ferreira de Carvalho Marques²

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

² Universidade Federal Fluminense – UFF

Introdução: Eritropoetina é uma glicoproteína com aproximadamente 34 kDa e uma sequência polipeptídica com 166 aminoácidos. Sintetizada nos rins, funciona como estimulador da eritropoese, provocando a proliferação e a diferenciação de células eritróides na medula óssea. Obtida pela tecnologia de DNA recombinante, é produzida em células superiores, onde o gene da eritropoetina foi transfetado. Contém uma sequência de aminoácidos idêntica à eritropoetina natural. Proteínas como a eritropoetina não apresentam boa solubilidade em água por serem moléculas grandes. A albumina de soro humano é usada nos processos de formulação como solvente estabilizante, mas o seu uso está sendo desencorajado pelas autoridades regulatórias. Aminoácidos como glicina, alanina e ácido glutâmico são usados por sua compatibilidade com a estrutura macromolecular e funcional das células, não interferindo nas atividades enzimáticas ou estrutura funcional das proteínas e aumentando sua estabilidade. O desenvolvimento de métodos analíticos adequados é fundamental para a determinação destes aminoácidos. A eletroforese capilar (EC) tem se tornado importante técnica em análise biofarmacêutica. Em geral, a derivatização dos aminoácidos é realizada antes da separação por EC, a fim de melhorar a sensibilidade para detecção em UV ou fluorescência, aumentando o tempo de análise e gerando produtos cuja estabilidade depende de condições experimentais como pH e temperatura.

Objetivo: Desenvolver metodologia analítica por eletroforese capilar com detecção por UV, sem derivatização química, para determinação dos aminoácidos (ácido glutâmico, glicina, alanina) utilizados como excipientes no biofármaco alfaepoetina humana recombinante.

Metodologia: Um equipamento de EC (CE7100, Agilent) com detector UV/Vis de arranjo de diodos foi empregado. O método de Eletroforese Capilar de Zona (CZE) foi aplicado e separações realizadas usando capilar de sílica fundida com comprimento total de 55 cm (46,5 cm efetivo) e diâmetro interno de 50 µm. Introdução hidrodinâmica das soluções padrões e amostras a 50 mbar por 15s, potencial -25kV, temperatura 15 °C e detecção direta em 220 nm foram utilizados. O eletrólito de trabalho foi tampão fosfato 30 mmol L⁻¹ (pH 11,5), contendo CTAB 0,6 mmol L⁻¹ e metanol 10% v/v.

Resultados: O método se mostrou linear na faixa de 50 a 2500 mg L⁻¹. Valores adequados de precisão foram alcançados e os limites de quantificação foram 19,6, 20,4 e 19,5 mg L⁻¹ para ácido glutâmico, glicina e alanina, respectivamente. A viabilidade do método foi estudada através de testes de recuperação (recuperação média = 97,4%). Não houve necessidade de derivatização química e tratamento prévio da amostra. Tempo de migração menor que 5 min foi obtido para a separação dos três analitos.

Conclusão: Os resultados obtidos mostraram um conjunto de condições que possibilitaram o uso de EC para determinação simultânea de ácido glutâmico, glicina, alanina utilizados como excipientes no biofármaco alfaepoetina humana recombinante, sem necessidade de derivatização química e tratamento da amostra.

Palavras-Chave: Aminoácidos, Excipientes, Eletroforese Capilar

B18 High-throughput cloning and expression of human ABC transporters in Baculovirus/Insect Cell system customized for X-ray crystallography studies

Rafael de Oliveira Resende¹, Chitra Shintre², Claire Strain-Damerell², Shubhashish Mukhopadhyay², Nicola Burgess-Brown², Liz Carpenter²

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

² Structural Genomics Consortium, Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford, United Kingdom

Introduction: ATP-binding cassette (ABC) transporters are complex integral membrane proteins that perform key functions in the cell, such as those related to energy transport and other substances moved into and out of the cell and organelles. More than 40 ABC superfamily genes have been identified so far and they are involved in the expression of seven protein subfamilies, which defects were found to be associated to the several diseases such as: Tangier disease, Schizophrenia, pancreatitis, cystic fibrosis and immune deficiencies. It is also known that they are potentially involved in cholesterol homeostasis and translocation of peptides for antigen presentation via MHC class I and based on these fact, they constitute potential targets for drug discovery by structural studies.

Objective: We aimed to clone, express and purify human recombinant ABC transporters by screening different DNA constructs using eukaryotic system in a high throughput-based pipeline developed at the Structural Genomics Consortium/University of Oxford for X-ray crystallography.

Methodology: Clones derived from 9 human ABC transporter targets were obtained by Ligase-Independent-Cloning using different DNA constructs associated to a C-terminal His-Flag expression vector based on FastBacTM (pFBCT10HF-LIC) then transformed into *E.coli* DH10Bac cells. Plasmid containing inserts was transfected into *Spodoptera frugiperda* Sf9 cells and after a small-scale high-throughput test expression, positive proteins were submitted to solubilization test using 12-detergent screening then led to high-scale expression. Membrane proteins were extracted with the chosen detergent then purified by immobilized metal affinity chromatography and analytical gel filtration. SDS-PAGE and LC-MS intact mass analyses were used for quality control.

Results: All the targets analyzed showed at least 67% of the constructs successfully cloned. Proteins were expressed in 8% of the clones in the small-scale test and all of them were successfully scaled up although they exhibited different purification patterns.

Conclusion: High-Throughput LIC using customized vector is an important tool for obtaining successful clones for human ABC transporters. However, additional approaches are required in order to improve yield and stability for crystallography studies.

Keywords: Protein Expression, Baculovirus, Crystallography

B19 Avaliação da expressão gênica de citocinas e polimorfismo da IL-28B em voluntários sadios após administração de IFN α peguilhado

Andréa M. V. da Silva¹, Camilla F. Bayma¹, Tamiris Azamor¹, Patrícia Cristina C. Neves¹, Ana Carolina M. Andrade¹, Lucia Elena Alvarado A.², Alexandre S. de Almeida², Marcelo R. Alves³, Eliane M. dos Santos¹, Milton O. Moraes², Denise Cristina de S. Matos¹

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

² IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

³ IPEC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: O vírus de hepatite C (HCV) é um dos principais causadores de doença crônica no fígado, levando muitos casos progredirem para cirrose/hepatocarcinoma. Estudos demonstram que diferenças genéticas podem ter impacto na resposta imunológica ao tratamento. Polimorfismos de base única (SNP) no gene da IL28-B atuam como fatores preditivos na resposta ao tratamento com interferon alfa (IFN- α), a despeito do genótipo do vírus que infecta o hospedeiro. O IFN- α age na indução de centenas de genes que estabelecem um estado antiviral inespecífico ao vírus dentro da célula. Entretanto, o mecanismo da função antiviral do IFN- α bem como papel dos SNPs de IL-28B ainda não está completamente elucidado.

Objetivos: Avaliar a expressão gênica de citocinas e sua relação com o polimorfismo da IL-28B, em voluntários sadios, após administração de uma dose de IFN-PEG (A ou B), buscando identificar assinaturas gênicas/ fatores genéticos que possam ser correlacionados a cada um dos tratamentos.

Metodologia: Foram avaliados 18 voluntários, nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 horas após administração do tratamento A ou B (CONEP - 2530.214576/2011-44). Foi avaliada a expressão de 89 genes de citocinas utilizando qPCR multiplex no sistema BioMark HD®. Para a detecção de polimorfismos foram avaliados 7 SNPs (IL-28B) por qPCR com o auxílio de sondas TaqMan, equipamento StepOne Plus (Life Technologies).

Resultados: Foi observado um aumento na expressão de genes estimulados pela via de interferon (*ISGs – IFN stimulated genes*), destacando os genes que codificam a *OAS 1 e 3, ISG15*, e outros como *RIG-1, STAT-2, TICAM-1 e IRF9*, que estão diretamente relacionados à produção de proteínas que induzem o bloqueio da transcrição e degradação do RNA viral, inibindo a tradução ou interferindo com várias etapas da replicação do vírus. Houve uma diferença no perfil de expressão desses genes, ao longo da cinética, entre os tratamentos, privilegiando o tratamento B. A expressão gênica também foi analisada, estratificando-se os indivíduos em função dos genótipos do

SNP rs12979860 (CC associada com RVS, e genótipos CT e TT associados a falha terapêutica). Os resultados demonstraram uma associação do genótipo CC com o aumento da expressão gênica de moléculas como *OAS1* e *OAS2*. Além disto, a análise de haplótipos (r^2 - programa Haploview) identificou que os SNPs rs12979860 encontram-se em forte desequilíbrio de ligação (DL) com rs4803217($r^2= 0,84$), e ainda, o rs8099917 apresentou valor de $r^2=1$ com rs8105790.

Conclusão: Estes resultados indicam que há influência genética na expressão de citocinas/quimiocinas observada após os tratamentos, com indivíduos do genótipo CC (SNP rs12979860) apresentando aumento da expressão de genes destas moléculas em comparação com indivíduos dos genótipos CT e TT. Além disto, as análises de DL sugerem que outros SNPs podem também estar relacionados com o desfecho do tratamento. Além desses fatores genéticos, também observou-se que a expressão de alguns dos genes estudados podem ser influenciada pelo tratamento administrado.

Palavras-Chaves: Interferon Peguilado, Citocinas, IL-28B

Reativos para diagnóstico

R1 O papel de Bio-Manguinhos na prestação de serviços ao produto NAT HIV/HCV: assessoria científica e suporte técnico à base instalada

Linda Khalili Boukai¹, Caroline Ferezin Pinto¹, Ludmila Nascimento Rocha Villar Bezerra¹, Marilucia Sobrado Pina¹, Roberta Eitler Bruno¹, Joyce Lemos Lima¹, Adriana Rodrigues Pedro¹, Priscila Caroline Almeida¹, Vivian Rabello Areias¹

¹ Divisão de Atendimento ao Cliente e Pós- Marketing, Departamento de Relações com o Mercado, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, RJ

Introdução: Bio-Manguinhos desempenha um papel fundamental na prestação de serviços de suporte técnico/científico ao produto NAT HIV/HCV para 14 Hemocentros executores do ensaio NAT na Hemorrede Brasileira.

Objetivo: Avaliar a atuação da DIACM –Bio-Manguinhos na área de prestação de serviços, com ênfase na assessoria científica ao kit e ao suporte técnico aos ativos que compõem a plataforma de equipamentos.

Metodologia: Registro das ocorrências e de sua resolubilidade, considerando-se o tempo para a solução do problema e a avaliação pelos usuários.

Resultado: Desde o lançamento do produto foram registradas 5729 ocorrências, sendo 21% relacionadas ao kit e 79% referentes à plataforma de equipamentos. A base instalada é composta por 93 equipamentos fabricados pelas empresas: *PerkinElmer* (31), *Qiagen* (31) e *Life Technologies* (31). A DIACM coordena a prestação dos serviços, provendo respostas rápidas e esclarecedoras às solicitações/notificações. Mais de 81% dos chamados cumpriram o prazo de 20 horas para resolução do problema. A DIACM resolveu 54% das ocorrências, enquanto 11% foram compartilhadas com outras UO e 35% encaminhadas às empresas parceiras. A equipe de atendimento tem um papel fundamental no planejamento, controle e agendamento das intervenções programadas e não programadas objetivando, continuamente, o desempenho ideal do instrumento. A prestação dos serviços também envolve o treinamento dos usuários e a realização de visitas técnicas para investigação e resolução de problemas *in loco*. Mais de 275 usuários já foram treinados/re treinados e cerca de 36 visitas técnicas foram realizadas. Em pesquisa aplicada em 2013, foi apontado um grau de 81,4 % de satisfação dos usuários com a prestação dos serviços pela DIACM.

Conclusão: A DIACM considera aceitável o grau de satisfação mensurado na última avaliação e entende o seu papel fundamental na

agregação de valores para uma prestação de serviços eficiente e que atenda às demandas dos usuários do produto NAT HIV/HCV. A DIACM tem como premissa o aperfeiçoamento contínuo das suas atividades no campo.

Palavras-Chave: Produto NAT HIV/HCV, Serviços

R2 *Schistosoma mansoni* antigens recognized by serological-proteomic approach as potentially able to distinguish the clinical status of endemic area residents

Fernanda Ludolf¹, Isabela A Rodrigues¹, Rodrigo Corrêa-Oliveira², Andréa Gazzinelli³, Franco H. Falcone⁴, Rosiane A Silva-Pereira¹, Guilherme C. Oliveira¹

¹ Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, MG, Genomics and Computational Biology Group, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

² Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz, MG, Cellular and Molecular Immunology Laboratory, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³ Universidade Federal de Minas Gerais, Nursing School, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴ The University of Nottingham, School of Pharmacy, Division of Molecular and Cellular Science, Nottingham, East Midlands, United Kingdom

Introduction: Despite intensive efforts towards schistosomiasis control, the disease is still one of the most prevalent in the world. Improvements in the diagnostic would represent a step forward to the transmission control, being a suitable diagnostic assay essential for epidemiological surveys. Diagnosis procedures require continuous adaptation to the disease control stage and assays that are simple, inexpensive, sensitive, specific and able to distinguish active from prior infection have yet to be developed. Progress on post-genomic technologies resulted in a more rational approaches for new biomarkers discovery.

Objective: To confirm *Schistosoma mansoni* antigens recognized by serological-proteomic approach as potentially able to distinguish the clinical status of the schistosomiasis endemic area residents.

Methodology: Immunoreactive proteins were identified by our group using *S. mansoni* adult worm protein extracts probed with pooled sera of infected (INF), non-infected individuals from endemic area (NE) and of non-infected individuals from non-endemic area (NI), in a twodimensional Western-blotting assay (2D-WB). For further validation of the rSmP40 as diagnostic candidate, WBs were conducted using the serum samples individually.

Results: A total of 47 different immunoreactive proteins were identified. Of these proteins, seven reacted exclusively to the INF sera pool, suggesting a possible use of this antigen panel for diagnostic purposes. Western-blotting (WB) with the *S. mansoni* recombinant protein Major Egg Antigen (rSmP40), one of the INF sera pool exclusively recognized antigen, showed a similar serum recognition profile to the native protein in the 2D-WB. Of the 12 INF individually serum samples, 8 (67%)

recognized a protein band of approximately 40 KDa, corresponding to the rSmP40. None of the 8 NE (0%) and neither of the 7 NI (0%) serum samples were reactive to this same protein. The rSmP40 were reactive to the serum of individuals with different gender, age, TBM (total body minutes), and intensity of infection with low and high epg (eggs/gram of stool).

Conclusion: Once the proteins which make up the panel of exclusively INF sera pool recognized antigens were identified simultaneously in a same 2D-WB assay, it is proposed that all of them might have the same potential as the rSmP40 for the development of a new diagnostic test. These antigens may be used as a diagnostic kit based on the detection of at least one of them, being capable to distinguish the clinical status of the schistosomiasis endemic area residents.

Keywords: Schistosoma Mansonii, Biomarkers, Immunodiagnostic, Proteomics

R3 Teste de quantificação de CV HCV desenvolvido em Bio-Manguinhos: avaliação do desempenho frente a amostras de pacientes em tratamento com AlfaPeg-Interferona

Elisabete Andrade¹, Daniele Rocha¹, Marcela Fontana¹, Antonio G. P. Ferreira¹, Ana Carolina de Andrade¹, Roberta Milan¹, Patrícia Alvarez¹

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

Introdução: O vírus da Hepatite C (HCV) leva à inflamação crônica do fígado, atingindo 3,0% da população mundial. A quantificação da carga viral (QCV) do HCV circulante em plasma humano representa uma ferramenta importante para o prognóstico e o acompanhamento clínico do paciente, auxiliando na administração, duração e monitoramento do tratamento com alfa peg interferona. Os ensaios comerciais destinados à QCV do HCV no Brasil têm custos abusivos e a obtenção de uma alternativa nacional possibilitará ampliar significativamente o acesso da população.

Objetivo: Avaliar o desempenho do método de QCV do HCV de pacientes portadores de HCV utilizando o teste desenvolvido e validado por Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, dentro dos padrões estabelecidos na RDC nº 27/2012.

Metodologia: O teste de QCV é um ensaio duplex contendo alvos para HCV e Calibrador Interno (Patente Fiocruz), com base na plataforma de PCR em tempo real utilizando uma curva padrão (*VLP-virus like particle*) com a inserção de parte do genoma do HCV. Foram testadas amostras de pacientes (n=191) com sorologia HCV positiva das regiões Sul e Sudeste do Brasil, em tratamento com alfa peg interferona. A CV HCV foi acompanhada desde a visita antes da administração com alfa peg interferona, até a 12ª ou 24ª semana após o início do tratamento, dependendo da resposta virológica de cada indivíduo: Precoce Parcial, com redução da CV HCV em 2 log ou mais na semana 12; Precoce Completa, na qual pacientes positivos na semana 4 e na semana 12 encontram-se indetectáveis; Lenta com a CV HCV positiva na 12ª semana e negativa na 24ª semana, ou não responder ao tratamento, quando sem redução da CV HCV em pelo menos 2 log, na 12ª semana após início do tratamento.

Resultados: Todas as amostras foram processadas com o método de QCV desenvolvido e validado por Bio-Manguinhos, determinando e caracterizando, na 12ª semana de tratamento, os pacientes da seguinte forma: 51% apresentaram RVP completa, 21% RVP parcial e 28% não responderam ao tratamento. Em paralelo, foram testadas 30% das amostras (n=60), com o kit COBAS Taqman HCV Test (v2.0). Os resultados foram comparados e a média de variação foi inferior a 0,4 log. Os resultados obtidos com a QCV HCV auxiliaram na indicação da eficácia da terapia com alfa peg interferona em pacientes portadores

de HCV, onde 61% (n=117) dos tratados tiveram CV HCV não detectada em até 24 semanas.

Conclusão: A avaliação do desempenho do teste de QCV de HCV desenvolvido e validado em Bio-Manguinhos com 191 amostras foi considerada satisfatória e adequada sob os aspectos técnico, operacionais e de funcionalidade. Os resultados obtidos indicam que o potencial produto após registro junto aos Órgãos Regulatórios servirá como alternativa eficaz e de menor custo a ser ofertado para a população brasileira.

Palavras-Chave: HCV, Carga Viral, Quantificação

R4 Incorporação do alvo HBV no Kit NAT brasileiro produzido por Bio-Manguinhos

Patrícia Alvarez¹, Elisabete Andrade¹, Daniele Rocha¹, Marcela Fontana¹, Marisa Ribero¹, Elaine Motta¹, Antonio G. P. Ferreira²

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

² PRED, VDTEC, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: Atualmente, para triagem de doadores de sangue no Brasil, são realizados testes NAT para HIV e HCV. Visando ampliar ainda mais a segurança transfusional, o Kit NAT foi aperfeiçoado para detectar, adicionalmente, amostras com o vírus da Hepatite B (HBV). A partir da decisão estratégica, conseguimos, em curtíssimo espaço de tempo (6 meses), a definição dos alvos moleculares, padronização de insumos e modelo de apresentação, além das análises de desempenho, estando pronto para ser incorporado ao produto.

Objetivo: Estabelecer o ensaio de diagnóstico molecular para detecção do HBV na plataforma de PCR em Tempo Real, incorporando ao Kit NAT HIV/HCV de Bio-Manguinhos um segundo módulo de amplificação contendo os alvos para HBV/FAM e Partícula Calibradora/Dye3. Este novo modelo, ampliado, deverá cumprir requisitos técnicos de desempenho, como sensibilidade de 50UI/mL, entre outros.

Metodologia: Os iniciadores e sonda usados na padronização do ensaio estão na região S do HBV. Foram obtidas as provas de conceito e o alcance de todos os requisitos técnicos de desempenho, através do processamento de amostras clínicas verdadeiras positivas, amostras de painel internacional e de soro-conversão para HBV, definindo a sensibilidade do novo modelo de produto. Amostras verdadeiras negativas permitiram estabelecer níveis de especificidade. A padronização e testes foram realizados, individualmente e em “pool” de 6 amostras.

Resultados: O processamento do LOD de 8 replicatas de cada concentração de cerca de 20 amostras HBV verdadeira positivas, demonstrou que o ensaio é capaz de detectar para todas estas amostras todas as replicatas de 10UI/mL. O Módulo de Amplificação para HBV foi também capaz de detectar o painel de soro-conversão em “pool” e em “single”. Além disso, a partir de amostras de painel internacional, obtivemos sensibilidade de 4,86 UI/mL (Probit 95%). Os testes de especificidade foram feitos com 300 amostras verdadeiras negativas e demonstraram 100% de especificidade.

Conclusão: Todas as características técnicas de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade foram definidas em tempo recorde. O limite de sensibilidade de 4,86 UI/mL é extremamente satisfatório e está cerca de 10 vezes menor que o requisito de 50UI/mL aceito

internacionalmente. A prova de conceito deste novo Módulo de Amplificação foi obtida através da total detecção do painel de soro-conversão HBV. A incorporação do alvo HBV no Kit NAT Brasileiro é uma realidade e está em fase de validação de lotes Piloto, visando à submissão de processo junto a ANVISA.

Palavras-Chave: NAT, HBV, Diagnóstico Molecular

R5 Plataforma alternativa e flexível para o Kit NAT brasileiro

Antonio G. P. Ferreira¹, Elisabete Andrade¹, Daniele Rocha¹, Marcela Fontana¹, Marisa Ribero¹, Elaine Motta¹, Patrícia Alvarez¹

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

Introdução: O kit NAT HIV/HCV Brasileiro produzido por Bio-Manguinhos foi desenvolvido para atender altas capacidades de processamento. A abertura de pool de amostras e o processamento de pequenas rotinas significam um considerável custo no processamento no formato atual do NAT. O estabelecimento de uma Plataforma NAT de equipamentos focado no processamento de poucas amostras 12-30 reações, permitirá um melhor aproveitamento das rotinas e economia de recursos, permitindo o atendimento de potenciais serviços com pequenas demandas que estejam alinhadas com a estratégia de descentralização de ensaios NAT, na Hemorede Brasileira.

Objetivo: O objetivo do Flex NAT é definir e padronizar um modelo alternativo de produto/Kit NAT, processado numa plataforma de equipamentos flexível, contemplando os requisitos técnicos e operacionais definidos pela Hemorede Brasileira, com custo viável. Com um considerável nível de nacionalização dos insumos e, se possível, agregando processos de TT. Esta proposta de novo produto, baseia-se em um ensaio discriminatório, independente, com sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e rastreabilidade, comparáveis com o Kit NAT HIV/HCV já desenvolvido por Bio-Manguinhos.

Metodologia: Foram identificadas alternativas de sistemas de extração de ácidos nucléicos, equipamentos/ insumos, baseados em beads magnéticos: Prepito/Chemagen (Perkin Elmer), EZ1 (QIAGEN) e Nimbus/ Biopur (Biometrix). A comparação desses sistemas de extração teve como parâmetro o MDx (QIAGEN), equipamento da plataforma NAT. Visando melhor sensibilidade/especificidade/reprodutibilidade quando comparado com o equipamento MDx os protocolos de extração de ácidos nucléicos foram ajustados. Os ajustes realizados incluíram: alterações dos volumes de amostra, eluição, partícula magnética, concentração de protease, tempos de lise e de secagem das beads magnéticas, entre outros. Foram utilizadas amostras HIV e HCV verdadeiras positivas, com cargas virais conhecidas.

Resultados: Os resultados, após comparação com MDx, demonstraram que o equipamento Nimbus/Biopur, apresentou ganho de sensibilidade, cerca de 2 Cts, para amostras HIV/HCV na concentração de 500 cópias/mL ou UI/mL, respectivamente. O equipamento EZ1 apresentou resultados de sensibilidade pouco satisfatórios. O

Prepito/Chemagen, apresentou resultados bastante satisfatórios, com melhor sensibilidade e desempenho, com amostras HIV/HCV na concentração de até 12,5cópias/mL ou 25UI/mL, respectivamente, sendo capaz de detectar 8 replicatas destas concentrações.

Conclusão: Os resultados preliminares demonstram que os sistemas de equipamentos/insumos Prepito/Chemagen e Nimbus/ Biopur são promissores e altamente satisfatório para avançar na definição do modelo Flex NAT. Visando estabelecer este novo produto, será necessário estabelecer os níveis de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade dos kits/equipamentos. A padronização de um ensaio FLEX NAT e a possibilidade de aplicação nas rotinas de triagem de doadores de sangue no Brasil poderão gerar significativos impactos operacionais e de custo. Além disto, representa mais um exemplo de produto inovador para o Complexo Industrial da Saúde, contribuindo para consolidar competências tecnológicas na área de imunobiológicos e diagnóstico molecular na FIOCRUZ, atendendo à demanda de produtos estratégicos do Ministério da Saúde para o SUS.

Palavras-Chave: NAT, Kit, Flexível

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

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

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

² INCQS, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

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

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

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

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

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

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

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

R7 Comparative study of physico-chemical and immunological properties of the monoclonal anti-CD4 produced by bioreactor and murine sources

Priscila Muniz da Paz¹, Ana Paula Araújo¹, Patricia Barbosa Jurgilas¹, Ana Paula Dinis Ano Bom¹, Marli Sidoni¹, Hilton Jorge Nascimento¹, José Godinho da Silva Junior¹

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

Introduction: The Institute of Technology in Immunobiology Bio-Manguinhos has been developing a kit of immunophenotyping to quantify CD4 + and CD8 + lymphocytes levels on HIV serum positive patients by flow cytometry. Currently, this kit consists of monoclonal antibodies (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD45) produced in mice by the Center of Molecular Immunology (CIM) in Cuba. Aiming to improve the antibodies production by application of the 3R's rule (**R**eduction the number of animals, **R**efinement of production conditions and **R**eplacement of *in vivo* assays), bioreactor production has been employed through scientific cooperation between CIM and Bio-Manguinhos.

Objective: In this work we have compared the monoclonal anti-CD4 from bioreactor process to that produced by murine, to evaluate if the first one can be used to compose the immunophenotyping kit.

Methodology: Monoclonal antibodies anti-CD4 were analysed by Size Exclusion Chromatography (SEC) on Superdex 200 column 10/300, gradient SDS-PAGE (8 – 25%) and native IEF-PAGE (3.0 – 9.0). Tryptophan fluorescence emission spectra were obtained by setting the excitation wavelength at 280 nm, and the emission spectrum was recorded from 295 to 415 nm and Circular Dichroism (CD) spectra were monitored from 200 to 260 nm. At last, the anti-CD4 was conjugated to fluorochrome PE to be immunologically evaluated by flow cytometry (FC).

Results: The SEC analysis of monoclonal anti-CD4 produced by bioreactor and murine showed similar chromatography profile presenting a single homogeneous peak. The anti-CD4 from murine and bioreactor presented by denaturing gel electrophoresis two bands with MW compatible with light and heavy chains of gamma immunoglobulin and relative standard deviation around 0.15%. Slightly differences in the distribution pattern of the multiple bands were observed at pH range of 7.0-6.30 by isoelectric focusing, probably it is due to carbohydrate microheterogeneity. CD and fluorescence spectra were identical for the antibodies analyzed, suggesting that they present the same conformational structure and reinforcing the hypothesis of carbohydrate microheterogeneity. The anti-CD4 antibodies presented the same profile and titer by flow cytometry analysis of +CD4 lymphocytes.

Conclusion: Based on the methods used so far the anti-CD4 from bioreactor is equivalent to that produced by murine and can be utilized in the immunophenotyping kit. More experiments such as N-terminal amino acid sequencing and/or mass spectrometry could be used to enclose this study.

Keywords: Monoclonal Antibody, +CD4 lymphocytes

R8 Padronização da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real na detecção do DNA de *Leishmania*

Diego Lima Candido da Silva¹, Otávio de Melo Espíndola¹, Aline Fagundes da Silva¹

¹ Instituto Nacional de Infectologia, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: O diagnóstico de certeza para leishmaniose tegumentar é realizado através da observação do parasito no material obtido das lesões sugestivas. O resultado favorável do diagnóstico depende de fatores como a espécie de parasito, a forma clínica e o tempo de evolução da doença e outras variáveis. Ainda são poucos os trabalhos utilizando a quantificação de ácidos nucleicos de *Leishmania* em diagnóstico, no entanto, a padronização dessa ferramenta poderia ser útil na obtenção da melhoria da eficiência do diagnóstico e da caracterização clínica e epidemiológica da doença.

Objetivo: Padronizar a q-PCR para *Leishmania*, incluindo as etapas de titulação dos iniciadores da reação; construção da curva padrão com DNA de cepa referência de *Leishmania* e determinação da faixa de detecção da q-PCR.

Metodologia: A q-PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores direcionados à região conservada do DNA do cinetoplasto de *Leishmania*, com o kit ROTOR- GENE® SYBR GREEN (Quiagen®). A ciclagem consistiu de um estágio de 5 segundos a 95°C, e 30-40 ciclos de 15 segundos a 60 °C. Uma curva de dissociação foi realizada para cada reação, para identificação dos produtos amplificados. A reação foi realizada em 25 µL de solução contendo 5µL de DNA alvo, 12,5 µL PCR master mix (do kit Rotor Gene®), água milli Q e os iniciadores, titulados para padronização da melhor concentração. Para avaliação da reação, foram realizadas curvas padrão, utilizando DNA de cepa referência de *L. (V.) braziliensis* e *L.(L)amazonensis*, em 5 concentrações conhecidas. A determinação da faixa de detecção da reação por meio de curva de titulação de DNA alvo extraído de promastigotas de cepa referência de *Leishmania (V.) braziliensis*. O software integrado ao sistema ROTOR GENE possibilita a análise computadorizada dos resultados.

Resultados: As seguintes concentrações de iniciadores foram utilizadas na detecção de DNA das culturas (HM1- 15 pMol / µL; HM2- 30 pMol / µL e HM3- 15 pMol / µL). Com essas concentrações todas as amostras de cultura amplificaram, demonstrando o reconhecimento das espécies de *Leishmania* mais importantes do Brasil. A curva de dissociação da reação acima mostrou que as espécies puderam ser identificadas. Para a curva de titulação, foram utilizadas diluições seriadas de base 10 variando de 0,07 a 0.00000007 nG/µL. Na diluição de 0.00000007 nG/µL foi observado um pico de dissociação

inespecífico na curva de dissociação, compatível com o pico observado nos controles negativos. Assim sendo, a diluição anterior foi considerada o limiar de detecção da metodologia, a saber 0.0000007 nG/ μ L.

Conclusão: A metodologia de q-PCR padronizada neste trabalho detectou, quantificou e identificou DNA de diferentes espécies de *Leishmania*, com limiar de detecção de 0.0000007 nG/ μ L. A partir da reação padronizada, poderão ser realizados ensaios para a determinação da sensibilidade diagnóstica do ensaio e do seu potencial para utilização em diagnóstico clínico.

Palavras-Chave: Leishmanioses, q-PCR, Diagnóstico

R9 Padronização de uma metodologia de ensaio na plataforma de microarranjos líquidos utilizando sífilis como modelo

Perieli da Silva Vasconcelos Sousa¹, Christiane de Fátima Silva Marques¹, Bruna de Paula Fonseca e Fonseca¹, Bernardo Oliveira Loureiro¹, Marcelle Bral de Mello¹, Leila Botelho Rodrigues da Silva¹, Nara Mazarakis Rubim¹, Rosa Teixeira de Pinho²

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

² IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: Entre os imunoenaios com alta sensibilidade e especificidade mais utilizados em diagnóstico estão o ensaio imunoenzimático, o radioimunensaio e a citometria de fluxo. Além destes, existe a tecnologia Luminex, que passou a ser utilizada mais recentemente no final da década de 1990 (Vignali, 2000). Esta tecnologia apresenta vantagens em relação às outras, como a análise simultânea de analitos de diversas doenças numa mesma reação e logo, uma redução de custo e tempo (Elshal & McCoy, 2006).

Objetivo: Padronizar uma metodologia de seleção e avaliação de antígenos com potencial uso em testes diagnósticos com base na plataforma tecnológica de microarranjos líquidos empregando sífilis como modelo de ensaio.

Metodologia: A seleção dos antígenos para serem utilizados nesta avaliação foi baseada primariamente na frequência com que estes eram referenciados na literatura, na própria experiência do laboratório e na disponibilidade destes antígenos pelos seus principais fornecedores. Diferentes massas de antígenos estão sendo testadas e selecionadas para o acoplamento às microesferas. Também serão avaliados no formato em *single*, os parâmetros relacionados à etapa de acoplamento (tampão, concentração de antígenos) e etapa de reação (agitação durante a incubação, composição do tampão). Posteriormente a avaliação será realizada no formato em *multiplex*.

Resultados: Foram avaliados três antígenos do *Treponema pallidum* de cada um dos dois diferentes fabricantes (F1 e F2) e foram selecionadas as massas de proteína para o acoplamento às microesferas. As massas de proteína selecionadas do F1 foram 5 µg dos antígenos p17 e TmpA e 25 µg do antígeno p47, do F2 foram 1 µg dos antígenos p47, p17 e p15+17+47. A diluição dos soros testados foi selecionada a 1/100. Avaliamos até agora 6 soros (três positivos e três negativos para sífilis) com as diferentes massas desses antígenos e obtivemos resultados promissores. Adicionalmente, avaliamos a influência de diferentes rotações (600, 800 e 1000 RPM) na incubação, porém não foi observada diferença significativa. Além disso, observamos que a utilização de soro albumina bovina (BSA) de dois

diferentes fabricantes, no tampão utilizado no ensaio também não influenciou no resultado.

Conclusão: A versatilidade e robustez da plataforma de microarranjos líquidos são grandes atrativos nesta tecnologia. Para torná-la prontamente utilizável, propomos a padronização dos métodos empregados nas diferentes etapas do ensaio. Dentre os diversos parâmetros, avaliamos a massa ideal para o acoplamento dos antígenos às microesferas frente a 6 diferentes soros teste, as diferentes rotações de incubação e insumos do tampão, testando também diferentes fabricantes. A massa para acoplamento variou de acordo com a proteína utilizada enquanto a velocidade de rotação e as diferenças entre os BSAs provenientes de diferentes fornecedores não foram determinantes na otimização do ensaio. Outros parâmetros importantes para o ensaio ainda serão testados em maior número de amostras e os selecionados serão avaliados em *multiplex*.

Palavras-Chave: Diagnóstico, Multiplex, Sífilis

R10 Technological innovation: adaptation of a latex agglutination test for anti-Rotavirus-A IgY employment

Natália Maria Lanzarini¹, Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos¹, Juliana Rodrigues Guimarães¹, Alexandre dos Santos da Silva¹, Marcos Bryan Heinemann², José Paulo Leite¹, Eduardo de Melo Volotão¹, Luiz Guilherme Dias Heneine³, Marcelo Alves Pinto¹

¹ IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

² UFMG

³ FUNED

Introduction: The infection by rotavirus (RV) is responsible for approximately 453,000 deaths annually and approximately 40% of hospitalizations by diarrhea in children under five years worldwide, being the major cause of acute gastroenteritis in this population group. The development of a rapid method, inexpensive, sensitive and specific for rotavirus diagnosis is important from the disease because it allows the identification of outbreaks of the disease in the site of occurrence. The use of Immunoglobulin Y (IgY) antibody purified from egg yolk, has been grown in recent years, due to the advantageous features compared to immunoglobulin G (IgG), as a noninvasive recovery of antibodies and production in high concentrations.

Objective: The aim of this method was to adapt a diagnostic test by replacing the IgG capture antibody by specific IgY for RV-A antigen (LATEXY-ROTA).

Methodologia: For that, 09 laying hens were immunized with RV-A, the eggs were collected and IgY purified from egg yolk by polyethylene glycol 6,000, followed by purification by ion Exchange chromatography. The purified anti-IgY RV-A was covalently bound to polystyrene particles, being tested in a panel of positive and negative fecal samples previously determined by the Rotavirus Regional Reference Center of Comparative and Environmental Virology Laboratory (LVCA/IOCFIOCRUZ).

Results: A sensitivity of 75% and specificity of 85,7% was observed when the adapted test was compared to a commercial available enzyme immunoassay (golden standard). When compared to two commercial latex agglutination tests using the IgG tested on the panel of samples, the LATEXY-ROTA had a sensitivity of 100% and specificity of 88.2%.

Conclusion: Based on the obtained data, we suggest the feasibility of replacing the IgG by IgY in the latex agglutination assay.

Keywords: Imunoglobulina Y, Rotavírus, Látex

R11 Avaliação de Novos Insumos e Reagentes para Viabilizar a Conservação do Kit EIE Leishmaniose Canina entre 2 e 80 C

Maria Celia Chaves Zuma¹, Hevandro de Souza Campos¹, Keila Gisele Azevedo dos Santos¹, Renata Alves Mota¹, Cláudia Moraes Molinaro¹, Nara Mazarakis Rubim¹, Antonio Gomes Pinto Ferreira¹, Edimilson Domingos da Silva¹

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

Introdução: A Leishmaniose Visceral Canina (LVC) continua sendo um problema de saúde pública. Esta doença é causada pelo protozoário *Leishmania*, sendo a *Leishmania chagasi* responsável por esta infecção no Brasil. Cães domésticos são um dos reservatórios do parasito e quando são picados pelo flebótomo, vetor desta doença, podem infectar os seres humanos. Apesar das medidas de controle, as notificações por Leishmaniose têm aumentado constantemente. O diagnóstico precoce e correto é muito importante, pois ajuda na prevenção e controle da doença. Bio-Manguinhos/Fiocruz-RJ, desde 2004, vem produzindo o conjunto diagnóstico para atender à demanda do Ministério da Saúde. Com a alteração do algoritmo de testagem da Leishmaniose Canina, houve a necessidade da manutenção do fornecimento do teste Elisa que passou a ser usado como confirmatório, sendo imprescindível a otimização nos processos de estocagem e transporte, facilitando a sua utilização pelo usuário final e possibilitando a redução de custos.

Objetivo: Neste estudo testamos reagentes comerciais que possibilitem a armazenagem e o transporte de todo o kit entre 2 e 80 C. Atualmente, parte dos reagentes é mantida a -200C e outra sob refrigeração, o que implica em maior complexidade logística tanto de transporte como de estocagem e, conseqüentemente, maior custo.

Metodologia: Resultados obtidos em ensaios com placas de Elisa sensibilizadas com antígeno de Leishmaniose (*L. Major*) e mantidas a -200C foram comparados aos obtidos com placas sensibilizadas com o mesmo antígeno e mantidas entre 2 e 80C. Nestas últimas, adicionou-se um estabilizante que previne degradação e desnaturação, além de bloquear qualquer sítio livre na superfície da placa, minimizando possíveis reações cruzadas. Para mantermos o conjugado entre 2 e 80C, o mesmo foi diluído 1:10 em estabilizante e testado em ensaio imunoenzimático, comparando-se os resultados obtidos com os resultados do conjugado diluído em PBS-glicerol 80% e mantido a -200C. Para a conservação dos controles positivo e negativo, adicionou-se 0,2% de azida sódica a fim de evitar contaminações no kit mantido entre 2 e 80C. Estes controles foram testados para avaliarmos possíveis interferências da azida sódica e a performance em relação aos mantidos à -200C.

Resultados: Testes de equivalência foram realizados e as placas de Elisa mantidas entre 2 e 80C apresentaram mesmo índice de reatividade que as placas congeladas. O conjugado se manteve estável, com o mesmo título encontrado no início do estudo, apresentando mesmo índice de reatividade. A utilização da azida sódica nos soros controle positivo e negativo foi satisfatória. Os mesmos não apresentaram alteração de título e não houve interferência com a peroxidase, possibilitando mantê-los entre 2 e 80C.

Conclusão: Este estudo demonstra a viabilidade da modificação da temperatura de estocagem dos insumos integrantes do kit EIE Leishmaniose Visceral Canina, de -200C para 2 a 80C, uma vez que não foi observada alteração das condições e desempenho do teste.

Palavras-Chave: Leishmaniose Canina, Diagnóstico

Outros temas

OTR1 Management of the database system cells: development and implementation

Milena M.V.F. Carvalho¹, André Queiroz da Silveira², Márcia Arissawa¹

¹ Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais, Vice-Diretoria de Desenvolvimento, Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

² Seção de Desenvolvimento de Sistemas, Divisão de Tecnologia da Informação, Bio-Manguinhos, Fiocruz, RJ

Introduction: The Monoclonal Antibodies Technology Laboratory (LATAM) works in the development and production of antibodies for different purposes, supporting internal development projects, technology transfers and other institutions which have collaboration with Bio-Manguinhos. Since the beginning of its activities, the Laboratory created a database with approximately five hundred clones, totaling more than five thousand cells currently stored, making unfeasible the control through records and spreadsheets that did not provide the reliability for detecting the actions involved in the processes. Based on this fact, it has become imperative to develop a tool that could provide access to information quickly, ensuring the storage of data in a consistent and secure manner, according to the current regulatory requirements.

Objective: Develop a validatable tool to be employed in the management of biological materials, according to the requirements of Good Manufacturing Practices.

Methodology: The first stage of the project consisted in modeling the processes of the Laboratory using the ARIS tool, from which the scope of the system has been set. Based on this model, the prototype was used as the basis for the development of the current system. This system was developed using requirements for engineering with prototyping. It is used in a network environment, allowing multi-user access on Windows platform. Thus, the validation process was started according to ANVISA RDC 17 criteria.

Results: The system showed satisfactory results regarding its features and specifications required by the processes. There was a need for some adjustments to submit the system for approval. As a result, the system currently supports all the details of the processes that gave rise to every cell and the characterization of the antibodies expressed by each strain as well as consumption data and local storage of these cells.

Conclusion: Based on these results, we can consider that the system met the need of developing a tool for tracking and managing the information in order to modify, store or retrieve information, reducing the risks of inconsistencies or problems with data integrity. Their

development represented a considerable difference to the processes by providing the reliability and traceability necessary for the development and production of biological materials. Because it is a tool whose characteristics are based on the applicability and flexibility, it can be customized based on the needs of laboratories with related activities, providing a greater range of services to other Institutions that can benefit from this system.

Keywords: Cell Bank, Database, Traceability, Security

OTR2 BioForm: o CRF eletrônico de Bio-Manguinhos

Elizabeth Maciel de Albuquerque¹, Suelen Renata Estácio Marques¹, André Queiroz da Silveira¹, Kellen Cristina de Almeida Nery¹, Marcelo Corrêa de Castro¹, Sergio Fernando Oliveira Theodoro dos Santos², Maria de Lourdes Sousa Maia¹

¹ Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

² Serviço Federal de Processamento de Dados, SERPRO

Introdução: A Assessoria Clínica do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Asclin/Bio-Manguinhos/Fiocruz) incorporou no gerenciamento de seus estudos clínicos, novas tecnologias, com softwares que ajudam na tomada de decisão e facilitam a condução de pesquisas clínicas, hoje realizadas de forma descentralizada em vários estados brasileiros. Um dos sistemas é o eCRF (*electronic Case Report Form*) BioForm, uma ferramenta *online* que facilita a entrada de informações em um sistema de Banco de Dados.

Objetivo: Além de acelerar o processo de análise estatística dos dados, o sistema permitirá também um gerenciamento mais efetivo dos processos de monitoria e acompanhamento das pesquisas para posterior resolução por parte de investigadores dos estudos clínicos. Como objetivo secundário, está prevista a disponibilização desse sistema para as instituições que fazem parte da Rede Fiocruz de Pesquisa Clínica (RFPC/VPPLR) e da Rede Nacional de Pesquisa Clínica (RNPC/DECIT/MS), o que representará avanços para a pesquisa clínica nacional.

Metodologia: Para a construção desse sistema, firmou-se uma parceria entre Bio-Manguinhos (através da Asclin e da Divisão de Tecnologia da Informação – DITIN) e o Serviço Federal de Processamento de Dados (SERPRO). O desenvolvimento do sistema se deu com a utilização de metodologia ágil. Um aspecto positivo dessa metodologia é o acompanhamento, por parte de Bio-Manguinhos, quase em tempo real. Isto permitiu que alinhamentos fossem feitos ainda durante a construção do sistema, obtendo-se assim uma primeira versão do sistema mais robusta. Outros aspectos do seu desenvolvimento: sistema totalmente em português; segue a documentação regulatória da Anvisa (RDC 17/2010); validação realizada pelo Laboratório de Metrologia e Validação de Bio-Manguinhos (LAMEV); e realização de estudo piloto utilizando duas tecnologias para concluir a validação.

Resultados: O BioForm foi estruturado e construído em módulos: Cadastros básicos e centralizados de profissionais e centros de pesquisa; Inclusão de um estudo clínico e construção de seus respectivos formulários; Randomização (estrutura de blocos, com

inclusão competitiva e não competitiva); Acompanhamento do preenchimento das fichas clínicas do estudo (execução do estudo); Monitoramento de preenchimento das fichas clínicas; Emissão de Relatórios e Extração do banco de dados para análise estatística.

Conclusão: A primeira versão para uso está prevista para entrar no ar em abril deste ano. Acredita-se que essa ferramenta contribuirá muito com a agilidade, redução de custos e condução de estudos clínicos.

Palavras-Chave: Pesquisa Clínica, eCRF

OTR3 Notificações de eventos adversos e queixas técnicas: interface entre Divisão de Atendimento ao Cliente e Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos

Linda Khalili Boukai¹, Adriana dos Santos Duarte¹, Monique Amorim Pimenta¹, Alessandra Bógio¹, Cíntia Nunes Cardoso Lopes¹, Paulo Roberto Gomes dos Santos¹, Ramon Lemos Calaça¹, Ricardo Cristiano Brum¹, Patrícia Mouta Nunes de Oliveira¹

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

Introdução: A Divisão de Atendimento ao Cliente e Pós Marketing (DIACM) centraliza o recebimento das notificações referentes aos produtos do portfólio de Bio-Manguinhos e tem a responsabilidade de retornar uma resposta dentro dos prazos estabelecidos em POP (Procedimento Operacional Padronizado). Muitas vezes, a tratativa das notificações é compartilhada com outras Unidades Organizacionais (UO), como no presente trabalho que enfatiza a cooperação e a integração com a Assessoria Clínica (ASCLIN).

Objetivo: Reportar a frequência relativa de eventos adversos relacionados aos biofármacos e vacinas, e queixas técnicas relacionadas a kits diagnósticos em usuários brasileiros.

Metodologia: Durante o primeiro atendimento, a DIACM coleta informações chave relacionadas às notificações. Todas as informações são registradas em sistema operacional, classificadas de acordo com critérios pré-definidos e, quando pertinente, encaminhadas às UO responsáveis para tratativa do caso. A DIACM tem uma relação estreita com os setores de interface, baseada em fluxogramas de comunicação pré-estabelecidos que padronizam as ações. Os casos de notificações de eventos adversos e queixas técnicas são compartilhados com a Assessoria Clínica: Farmacovigilância e Tecnovigilância. Estes setores são responsáveis pela investigação da causalidade e notificação do caso ao órgão regulatório por meio do sistema NOTIVISA, conforme preconizado pela RDC nº 04/2009 e RDC nº 67/2009. Eventos adversos são tratados com prioridade pelos profissionais da ASCLIN que interagem com a DIACM e são responsáveis pelo retorno de uma resposta ao notificador. Um parecer técnico no qual consta a conclusão com as devidas ações corretivas e/ou planejamento das ações preventivas é emitido após o término das investigações.

Resultados: No ano de 2013, foram entregues ao Ministério da Saúde 4.709.836 reativos (reações) para diagnóstico (exceto o produto NAT), 92.513.825 vacinas (doses) e 11.061.459 biofármacos (frascos). Destes, foram registradas um total de 66 notificações para linha de vacinas, 07 para os biofármacos e 42 para os reativos (exceto o produto NAT). Para a linha das vacinas os dados revelam que apenas 0,00002% referem-se a eventos adversos. Para os Biofármacos,

0,00001%. Os dados analisados pela Farmacovigilância, revelam que nenhuma notificação teve sua causa estritamente associada ao produto, mas sim a diversas doenças de base devidamente investigadas. Para Tecnovigilância, nenhuma notificação teve sua causa associada à falhas de fabricação do produto. Neste caso, medidas alternativas, como por exemplo, esclarecimento de dúvidas e intervenção técnica nos equipamentos foram eficientes e suficientes para a correção dos problemas relatados nas notificações.

Conclusão: Os resultados apresentados indicam que os reativos para diagnóstico produzidos por Bio-Manguinhos estão dentro dos melhores padrões de qualidade quando se trata de diagnóstico de uso “in vitro”.

Palavras-Chave: Atendimento, Farmacovigilância, Tecnovigilância

OTR4 Determinação e comparação dos pontos de corte ideais de duas metodologias para o micro PRNT de sarampo

Vanessa de Oliveira Santos¹, Marisol Simões¹, Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville¹, José Henrique Rezende Linhares¹, Emily Hime Miranda¹, Sheila Maria Barbosa de Lima¹

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

Introdução: O sarampo é uma doença viral exantemática da infância, ocasionada pelo vírus pertencente à família *Paramyxoviridae*, sub-família *Paramyxovirinae*, gênero *Morbillivirus*. A doença é altamente contagiosa e pode apresentar quadro clínico leve a moderadamente grave. Uma alta cobertura vacinal (95%), exigida para um vírus de elevada infecciosidade como o sarampo, não ocorre de modo homogêneo no mundo, dificultando a sua erradicação. No Brasil, a imunização para sarampo é realizada através da triplice viral no Programa Nacional de Imunização, conferindo aproximadamente 98% de soroconversão. O Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT) é considerado o método sorológico de referência para quantificação de anticorpos neutralizantes, que conferem imunidade protetora, desempenhando importante papel na avaliação da eficácia vacinal.

Objetivo: Diante disto, observou-se a necessidade de melhorias do micro PRNT de sarampo, visando minimizar as variações climáticas sujeitas ao teste no protocolo já estabelecido, determinando o seu ponto de corte ideal e comparando os títulos de ambas as metodologias, possibilitando a geração de resultados mais acurados.

Metodologia: Para isto, foi realizado micro PRNT de 200 soros utilizando-se uma nova metodologia (neutralização e adsorção a 37°C em estufa de 5% CO₂ e utilização de meio sem HEPES), em comparação à metodologia preconizada pelo laboratório (neutralização em temperatura ambiente, adsorção em estufa BOD e utilização de meio com HEPES). Os resultados obtidos foram organizados e analisados em programa estatístico, correlacionando os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos pelas diferentes metodologias e avaliando se as mudanças metodológicas interferiram nos resultados.

Resultados: Ao analisar os resultados obtidos das amostras, eles se apresentaram em uma separação bem definida de duas populações de soros (negativos e positivos), mostrando que o ponto de corte ideal para ambas as metodologias foi de 2,3 Log₁₀ mUI/mL (200 mUI/mL) ou 1,4 Log₁₀ recíproca da diluição (1:25). Dos 200 soros analisados, 62 e 63 soros foram considerados negativos (abaixo do ponto de corte) para a antiga e a nova metodologia, respectivamente.

Conclusão: Os dois métodos geraram resultados com o mesmo perfil de dispersão e os mesmos pontos de corte ideais para definir soropositividade para sarampo. Sendo assim, as mudanças realizadas no micro PRNT de sarampo não geraram mudanças para a classificação de soro positividade ou soro negatividade dos títulos de anticorpos neutralizantes, ou seja, a utilização de temperatura e concentração de gases estáveis não interferiu nos títulos de anticorpos neutralizantes obtidos pelo PRNT.

Palavras-Chave: Sarampo, Micro PRNT, Ponto de Corte, Anticorpos Neutralizantes

OTR5 Constelação gênica dos genótipos: Wa-like/DS-1-like/AU-1-like, de rotavírus a antes e após a introdução da vacina monovalente (g1p[8]) no Brasil

Tatiana Lundgren Rose¹, Mariela Martínez Gómez¹, Anibal Carvalho-Costa¹, Eduardo de Mello Volotao¹, Marcelle Figueira Marques da Silva¹, Hugo Reis Resque², Alexandre Madi Fialho¹, Rosane Maria Santos de Assis¹, José Paulo Gagliardi Leite¹

¹ IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

² Instituto Evandro Chagas

Introdução: A Organização Pan-Americana da Saúde e o Grupo de Assessoria Estratégica de Especialistas em Imunização da Organização Mundial da Saúde recomendaram, em 2008, a introdução de uma vacina oral rotavírus, como prioridade nas Américas, para prevenir hospitalizações e mortes causadas pelos rotavírus da espécie A (RVA). Mais de 40 países incorporaram a vacina monovalente G1P[8] (Rotarix® - RV1 ou VORH) em seus Programas Nacionais de Imunização (PNI). No Brasil a RV1 foi introduzida no PNI em março de 2006 e, após a sua introdução, observou-se uma mudança no perfil epidemiológico dos RVA circulantes na população, assim como uma redução no número de hospitalizações e mortes infantis.

Objetivo: Analisar a diversidade genética de RVA dos genótipos: G1P[8], G2P[4], G3P[8], G9P[8], G12P[8] e G12P[9] detectados no Brasil, em dois períodos: pré- e pós-vacinal, tanto em crianças vacinadas quanto em não vacinadas, com o objetivo de identificar e caracterizar variantes de RVA emergentes e/ou reemergentes no país.

Metodologia: O dsRNA das amostras analisadas foi extraído utilizando o método de Boom adaptado. Os genes que codificam para as proteínas VP7 e VP8* foram amplificados e sequenciados. Cento e dezessete estirpes foram selecionadas para análise da constelação gênica (11 genes virais). Os segmentos gênicos foram amplificados utilizando o Kit OneStep RT-PCR (QIAGEN®). As seqüências foram obtidas através da plataforma de sequenciamento de Bio-Manguinhos e PDTIS (Fiocruz), editadas e analisadas usando os programas: SeqMan™, Bioedit v.7.2.3, MEGA5.0, FindModel/Model Generator.

Resultados: As estirpes de RVA de genótipos G1P[8] (n=90; 1986-2013), G3P[8] (n=26; 2005-2011), G9P[8] (n=48; 2001-2011) e G12P[8] (n=3; 2006-2011) analisadas revelaram uma constelação gênica *Wa-like*: I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1. Enquanto, as cepas G2P[4] (n=53; 2005-2011) e G12P[9] (n=2; 2008-2010) revelaram uma constelação gênica *DS-1-like* (I2-R2--2-M2-A2-N2-T2-E2-H2), e *AU-1-like* (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H6), respectivamente. A análise dos sítios antigênicos das proteínas VP7 e VP8* das amostras brasileiras em comparação com a RV1 demonstrou que a maioria das mudanças

observadas já estava presente nas amostras coletadas no período pré-vacinal.

Conclusão: Variantes genéticas dos genótipos analisados foram observadas circulando no período pré- e pós-vacinal no Brasil. Todas as estirpes P[8] (*Wa-like*) foram homotípicas quando comparadas com a RV1, apesar de agruparem em diferentes linhagens (P[8]-1, P[8]-2 e P[8]-3); enquanto as estirpes G2P[4] (*DS-1-like*) e G12P[9] (*AU-1-like*) foram heterotípicas. Considerando que os estudos de Fase III com as vacinas rotavírus demonstraram eficácia entre 45-95%, provavelmente outros fatores não relacionados aos RVA estejam relacionados à variação do perfil epidemiológico dos mesmos, entre os quais: i) características genéticas restritas ao hospedeiro; ii) concentrações elevadas de anticorpos específicos para RVA no leite materno; iii) níveis de IgA específicos anti-RVA no lúmen do intestino, entre outros. **Suporte Financeiro:** PROEP/Fiocruz- CNPq, IOC-Fiocruz, PAPES VI Fiocruz-CNPq, CGLAB-SVS-MS, FAPERJ, OPAS.

Palavras-Chave: Rotavírus, Diversidade Genética, Genogrupo, RV1

OTR6 Epidemiology of group a rotavirus diarrhea in the context of universal monovalent (G1P[8]) vaccination in Brazil

Eduardo de Mello Volotão¹, Filipe Anibal Carvalho-Costa¹, Mariela Martínez Gómez¹, Marcelle Figueira Marques da Silva¹, Tatiana Lundgren Rose¹, Alexandre Madi Fialho¹, Rosane Maria Santos de Assis¹, José Paulo Gagliardi Leite¹

¹ IOC, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introduction: Group A rotavirus (RVA) vaccines have been considered strategic in order to reduce both mortality and hospitalization due to acute diarrheal diseases (AD), with other measures such as oral rehydration, breastfeeding, zinc administration and improvement of sanitation in developing countries. Brazil is extremely heterogeneous regarding income, living conditions, and access to basic sanitation.

Objective: To assess the changing epidemiology of AD in Brazil, particularly RVA-AD, six years after the beginning (March 2006) of universal mass RVA monovalent (RV1: G1P[8] Rotarix®) vaccination.

Methodology: RVA was detected by enzyme immunoassay (EIA) and/or polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), and genotyped by multiplex semi-nested RT-PCR, as recommended by World Health Organization. Vaccine effectiveness (VE) was calculated as $(1 - \text{odds ratio of vaccination}) \times 100$ (%), stratified by age group and RVA genotype. Diarrhea-associated mortality data were gathered from the Brazilian Ministry of Health databank. Regression analyses were performed in order to estimate the annual expected number of diarrhea-associated deaths during the post-vaccination period based upon pre-vaccination annual trends.

Results: RVA detection decreased from 2010 (25.4%) to 2012 (12.7%). A reduction in the frequency of G2P[4]/G2P[NT] genotype was observed between 2010 (87%) and 2012 (9.6%). It was accompanied by an increase in detection of G3P[8]/G3P[NT] RVA genotype, 2.3% in 2010, 39% in 2012. VE against AD requiring medical attention or hospitalization was higher in children aged 5–11 months (VE = 75%[54%–87%]), declining in the older groups, being higher against P[8] RVA genotype (93%[75%–98%]), when compared to G2P[4] (73%[38%–88%]) RVA genotype. Diarrhea-specific mortality rates were higher in the Northeastern region, declining from 8.5% (1,971 DD deaths [DD] / 23,275 total deaths [TD]) in 1996 to 2.4% (322 DD/13,197 TD) in 2011, when compared to the Southern region, where they decreased from 4.2% (387 DD/9,187 TD) in 1996 to 0.7% (30 DD/4,220 TD) in 2011. For children aged ≤ 1 year old, the number of diarrhea deaths DT was below from expected in the year 2011 in regions Northeastern, Northern, Central-Western and Southern, and in 2009, 2010, and 2011 for the Northeastern region.

Conclusion: RV1 has impacted substantially on the etiological profile of AD by reducing significantly the burden of RVA disease. The number of deaths caused by AD was underestimated in the period of 2008-2011 in Brazil. A shift (G2/G3) in genotypes distribution has occurred between 2010 and 2012. RV1 vaccine, introduced in 2006, can be considered as one of other measures impacting AD burden in Brazil.

Financial Support: PROEP/Fiocruz-CNPq, IOC-Fiocruz, PAPES VI Fiocruz-CNPq, CGLAB-SVS-MS, FAPERJ, OPAS.

Keywords: Rotavirus, Monovalent Vaccine, Epidemiology, Prevalence

OTR7 Gestão orientada para resultados e apuração dos custos da pesquisa clínica associada à assistência: uma avaliação da experiência do Ipec/Fiocruz

Marcelino José Jorge¹, Cristina Monken Avellar¹, Daniela de Souza Ferreira¹, Alexandre Monken Avellar¹, Jaqueline Watanabe Oliveira¹, Patrícia Santos Cavalheiro Silva¹

¹ Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: Com a adoção da gestão orientada para resultados na Fiocruz nos anos 90, os demonstrativos característicos do modelo de acompanhamento da execução orçamentária sob a ótica da gestão de processos foram complementados por estimativas das despesas por objetivos, desde então requeridas dos planos estratégicos submetidos ao Conselho Deliberativo da Fundação pelos Institutos (PA). Quanto ao Ipec, implantou as subestruturas de pesquisa clínica associada à assistência em 1999 e, em 2004, iniciou o Projeto de Avaliação e Acompanhamento - Indicadores de Gestão (PAA-IGs), devotado ao desenvolvimento de dois modelos: um, de levantamento, em nível de microcustos, das despesas inscritas nos orçamentos do Ipec e da Administração Central da Fiocruz, e de apuração, pelo método de Custeio Baseado em Atividades, dos custos unitários efetivos das ações integradas de pesquisa clínica associada à assistência do Ipec (PAI); e, o segundo, de análise de eficiência destas ações no uso de recursos.

Objetivo: Caracterizar a variedade de tipos de atividades e serviços cujas estimativas de despesas foram apuradas pelo PAA-IGs a cada dois anos a partir de 2004 e compará-las com as estimativas constantes dos demonstrativos da execução orçamentária e das planilhas do PA.

Metodologia: A comparação da abrangência das despesas estimadas sobre os serviços monitorados no Ipec pelo PAA-IGs, pelo PA e pela execução orçamentária toma por base o estudo de caso da atividade de assistência do Ipec no ano 2009. Finalmente, esses três modelos de estimativa de despesas são comparados quanto à compatibilidade de cada um com as prescrições da literatura de gestão orientada para resultados.

Resultados: O PAA-IGs apura as despesas incorridas em diversos tipos de: exames (420); consultas médicas e de clínicas complementares (23); procedimentos médicos e de enfermagem (97); egressos de cursos (5); produção científica (4); PAI (13) e projetos em andamento (264). A preços de 2009, os valores das despesas estimadas pelo PAA-IGs é maior que o das despesas estimadas pela execução orçamentária e pelo PA. Das 9 prescrições de procedimentos

de apuração de custos identificadas na literatura da gestão orientada para resultados, 6 são atendidas somente pelo PAA-IGs.

Conclusão: A análise empreendida permite evidenciar a variedade das informações levantadas pelo sistema de gerenciamento de custos PAA-IGs para o apoio à tomada de decisão, assim como caracterizar a compatibilidade do modelo com os princípios da gestão orientada para resultados, além de confirmar a hipótese de aferição das estimativas anteriores de apuração de custos da pesquisa clínica associada à assistência através dos procedimentos de levantamento de dados básicos e de cálculo adotados. Os resultados obtidos não podem ser generalizados, mas justificam a utilização do modelo PAA-IGs em estudos de análise custo-efetividade dos esquemas de tratamento com tempo de seguimento finito e conhecido das organizações públicas multipropósito de saúde.

Palavras-Chave: Pesquisa Clínica, Avaliação, Microcusto

OTR8 Optimized production of monoclonal antibody used in Flavivirus immunoassays for different projects of vaccine development

Raquel de Souza Martins¹, Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville²,
Fernando de Paiva Conte¹, Márcia Arissawa¹

¹ Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

² Laboratório de Tecnologia Viroológica, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction: D1-4G2-4-15 hybridoma is responsible for secreting a monoclonal antibody (mAb) against Flavivirus group antigen and is currently used in different projects of vaccine development at Bio-Manguinhos. Despite considerable progress in cell culture techniques, fetal bovine serum (FBS) supplemented media are still commonly used during hybridoma growth and maintenance *in vitro*. However, its use is controversial due to batch-to-batch composition variations, increased safety risk, low mAb yields after purification steps and ethical aspects related to the use of animals. In this context, adaptation of the hybridoma culture to serum-free medium meets regulatory concerns regarding the safety of animal-derived products.

Objective: To develop an optimized process using serum-free medium for production of mAb used in Flavivirus immunoassays for different projects of vaccine development.

Methodology: Hybridoma D1-4G2-4-15 was cultivated in roller bottles using high glucose DMEM supplemented with 10% FBS and 6.4 mM L-glutamine (DMEM/FBS10%). In another set of experiments, the hybridoma cultivated in roller bottles with DMEM/SFB10% was weaned directly in serum-free medium EX-CELL/6.4 mM glutamine, until considered adapted (viability > 90% for, at least, three cell passages with cells in logarithmic phase). Cell counts were performed in Neubauer chamber, under optical microscope, after dilution in trypan blue 0.4%. Each sample was centrifuged (200 g, 10 min) and the supernatant was used for determination of murine IgG (Easy-Titer Antibody Assay kit, Pierce), L-glutamine (YSY 2700 analyzer) and L-lactate (Roche commercial kit). Specific cell growth rate (μ) and doubling time (dt) were calculated using the differential method, during the exponential growth phase. Specific L-glutamine consumption rate (qSglu), and specific L-lactate and IgG production rates (qPlac and qPIgG, respectively) were estimated by plotting total cell concentration, cumulative substrate consumption or production, versus the integral of viable cells and fitting the plots with a regression coefficient of close to one. Foci reduction neutralization test (FRNT) using Vero cells infected with Dengue virus serotypes 1, 2, 3, 4 and Yellow Fever virus FA17DD was used to confirm mAb titer and specificity.

Results: The maximum hybridoma viable cell concentration achieved in DMEM/FBS10% was 3.4×10^6 cells/ml; with $\mu=0.035$ h⁻¹, dt=19.8h, qPIgG= $9,0 \times 10^{-7}$ $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, qPlac= 4.0×10^{-9} g.L⁻¹.h⁻¹ and qSglu= 3.0×10^{-9} g.L⁻¹.h⁻¹. D1-4G2-4-15 direct serum-free adaptation was achieved after 15 passages in EX-CELL, with maximum viable cell concentration of 2.8×10^6 cells/ml; with $\mu=0.033$ h⁻¹, dt=24.4h, qPIgG = 5.0×10^{-7} , qPlac = 4.0×10^{-9} and qSglu = -4.0×10^{-9} . mAb produced in DMEM FBS10% specifically recognized Dengue-1,-2,-3,-4 and FA17DD virus as commercial available antibody. Further experiments will be performed to check mAb produced in EX-CELL.

Conclusion: The results showed that although serum-free adapted hybridoma had a slower growth and metabolism rate, as expected, its IgG production capacity was preserved. Thus, we provide a more controlled and standardized cell culture environment for mAb production.

Keywords: Fetal Bovine Serum, Hybridoma, Antibodies

OTR9 Effect of zinc on the structural stability of pneumococcal surface antigen A (PsaA)

Izabella Buty da Silva Corrêa¹, Ana Paula Dinis Ano Bom¹, Ana Paula Correa Argondizzo¹, Ariane Larentis², Marco Alberto Medeiros¹, José Godinho da Silva Junior¹

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

² ENSP, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction: The *Streptococcus pneumoniae* is the most common human respiratory pathogen responsible for at least million of deaths worldwide annually. *S. pneumoniae* has two types of virulence determinants, the heterogenic capsule and the surface proteins. PsaA protein (pneumococcal surface antigen A) is a virulence factor of *S. pneumoniae* that belongs to the manganese and zinc bacterial transport system. The manganese PsaA binding has been associated with oxidative stress resistance which becomes a pivotal element in the proliferation and virulence of the bacteria. It has been shown that the excess of zinc promote bacteria toxicity since zinc inhibits the acquisition of manganese.

Objective: We have performed a conformational and stability analysis of PsaA recombinant protein in the presence (Zn-PsaA) or absence of zinc (free-PsaA), aiming to understand how zinc homeostasis impacts on the host protection and bacteria toxicity.

Methodology: In this study, PsaA was isolated and analyzed by SDS-PAGE-12%. The structural characterization of PsaA (0.08 mg/mL) was analyzed by fluorescence spectroscopy. We performed a test in the presence of increasing concentrations of zinc (5-500 μ M) to determine the metal minimum concentration which induces a conformational change. The (Zn-PsaA or free-PsaA) protein stability was observed in the presence of different Urea (1–9 M), Guanidine (GdmCl) (1–7 M) or salt concentrations (25-500 mM). Moreover, the samples were analyzed in the pH range (2.6 at 8.0) or treated with temperatures from 25oC to 85oC.

Results: The experiments in the zinc presence demonstrated that the PsaA conformational changes started at 5 μ M until 50 μ M metal concentration. After 50 μ M the structural modifications were stabilized. The free-PsaA and Zn-PsaA protein presented different unfolding profiles upon chemical denaturation. Conformational change for free-PsaA occurs at 1.0 M Urea or 0.5 M of GdmHCl. In contrast, the Zn-PsaA unfolding occurs in higher concentrations of Urea (4 M) or GdmHCl (1.5 M). In the free-PsaA or Zn-PsaA heat denaturation process we verified conformational changes at 43°C and 73°C. It was demonstrated by light scattering that PsaA aggregation is inhibited by 50 μ M zinc concentrations. To evaluate the PsaA hydrophobic surface

exposure we used bis-ANS probes, but these experiments showed no significant differences between the free or zinc bound protein. Moreover, the pH experiments showed a decrease of PsaA fluorescence intensity in acid pH when compared to neutral and basic pH, both in the zinc presence and absence. The free-PsaA, when submitted to salt concentrations, presented a higher center of mass variation when compared to Zn-PsaA.

Conclusion: Our data shows that free-PsaA has a lower stability if compared to the Zn-PsaA protein when they are subjected to physical or chemical denaturation. This study may contribute to elucidate the mechanism of colonization or inhibition of proliferation dependent of metal in the bacteria.

Keywords: Bioquímica, Caracterização Estrutural

OTR10 Proposta de um sistema integrado de identificação e investigação de microorganismos no Controle de Qualidade em Indústrias Farmacêuticas

Luciane Martins Medeiros¹, Cledir Santos², Nelson Lima², Manuela da Silva³, Verônica Viana Vieira⁴

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

² Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho

³ VPPLR, Presidência, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

⁴ Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: A microbiota em ambientes industriais farmacêuticos apresenta grande diversidade, nem sempre tendo sua identificação concluída pelo Controle de Qualidade (CQ). Métodos estão sendo propostos para superar este problema, como espectrometria de massa por MALDI-TOF e métodos genotípicos. Outro problema consiste na investigação de fontes de contaminação, realizada apenas por registros impressos. A proposta de uma abordagem holística, que abranja a identificação da microbiota autóctone em nível de espécie e a investigação fidedigna das fontes de contaminação, se mostra como uma necessidade do CQ.

Objetivo: Propor um sistema integrado de identificação de microorganismos e de investigação de fontes de contaminação que consiga atender as necessidades do CQ

Metodologia: Foi elaborado um fluxograma do sistema proposto e, para verificar sua funcionalidade, bactérias isoladas na rotina do CQ foram submetidas à triagem de identificação proposta. Os isolados foram criopreservados (-80°C) na Coleção de Culturas de Microorganismos Autóctones (CCMA) e seus dados foram inseridos em um banco de dados (BD). Uma amostragem dos isolados não identificados na triagem (N=36) foi submetida ao kit MicroSEQ 500 e submetida ao MALDI-TOF, para a construção de um BD "in house". Para avaliar a interface entre o armazenamento de cepas e de informações numa investigação de fonte de contaminação, foram selecionados 11 isolados da CCMA correlacionados à ocorrência de um desvio. Para esta avaliação, foi utilizada a técnica de eletroforese de gel em campo pulsado (PFGE).

Resultados: O sistema proposto reduziu o tempo e o custo de identificação pelo CQ de Bio-Manguinhos: redução em 30% do custo por amostra e de 24 h para 20 min o tempo de resultado. Na identificação, a porcentagem dos não identificados também diminuiu, quando comparada ao método anteriormente utilizado. Todas as 36 bactérias foram identificadas pelo MicroSEQ e tiveram seus perfis proteômicos inseridos no BD do MALDI-TOF. Destas, 8 cepas foram identificadas como *Micrococcus*, sendo 4 *M. luteus*. Estes últimos

foram utilizados para a construção de um espectro de referência em MALDI-TOF, que foi introduzido no BD "in house". Na investigação de um evento de contaminação, foi possível a recuperação das cepas envolvidas pelo uso do BD da CCMA. Na análise por PFGE destas cepas foi evidenciada a provável fonte de contaminação.

Conclusão: O espectro de referência criado a partir de cepas autóctones de *M. luteus* permitiu a ampliação do BD do MALDI-TOF com sucesso e outras cepas não identificadas estão sendo introduzidas, seguindo o mesmo procedimento. A CCMA foi útil na recuperação de cepas envolvidas em desvios da qualidade e permitiu a investigação de sua origem de contaminação pela técnica de PFGE. O sistema proposto se mostrou viável, reduziu custos e apresentou melhorias na identificação de cepas e na investigação de fontes de contaminação. Apoio financeiro: CNPq (CsF) e FIOTEC.

Palavras-Chave: Identificação Microbiana, Controle de Qualidade, MALDI-TOF, Coleções

OTR11 Aplicação de modelo de efeitos aleatórios na quantificação das fontes de variabilidade dos parâmetros de qualidade de imunobiológicos

Igor Araújo¹, Paulo César Dick¹

¹ Departamento de Controle de Qualidade, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: Boa parte do portfólio de Bio-Manguinhos é de matriz biológica. Estes produtos necessitam passar por avaliação de controle de qualidade, para garantir sua adequação ao uso, através de testes de diversos parâmetros. Uma parcela considerável destes testes é de origem microbiológica, que, dada a sua natureza, apresenta uma variabilidade intrínseca. Contudo, não é habitual a avaliação e a quantificação dos fatores que influenciam nesta variabilidade, o que permitiria conhecer de forma mais adequada a variabilidade dos parâmetros, levando a análises mais precisas destes resultados. Consequentemente, seria possível estabelecer de forma mais adequada os limites de controle para o monitoramento de rotina, já que a abordagem usual aponta, em alguns casos, a variabilidade natural do parâmetro como comportamento não-aleatório, indicando irreal desvio do controle estatístico.

Objetivo: Aplicar um modelo de regressão linear com efeitos aleatórios, quantificando fatores que podem influenciar na variabilidade dos parâmetros, e usar tais resultados para melhor estabelecimento de cartas de controle.

Metodologia: Foram usados dados simulados a partir dos resultados obtidos de estudo com objetivo de estabelecer novo material de referência para o teste de potência da vacina tríplice viral. As condições analisadas neste estudo foram o dia do teste e o frasco testado. A variação dos diferentes dias se deve, em grande parte, às diferentes passagens de células usadas em cada dia. A simulação foi feita considerando sete dias distintos, sete frascos por dia, testados em quadruplicata, totalizando 196 resultados. Os resultados foram analisados usando regressão linear com efeitos aleatórios, com distribuição de probabilidade Normal para os resultados e também para os efeitos do dia e do frasco, permitindo estimar separadamente as variações, em termos de desvio-padrão dos efeitos do dia, do frasco e residual (referente às quadruplicatas), ou seja, não explicado pelo modelo. As quantificações das fontes de variabilidade foram, então, combinadas matematicamente para explicar a faixa de variação esperada de futuros resultados, permitindo o estabelecimento de limites de controle que consideram todas as fontes de variação descritas.

Resultados: A abordagem proposta apresentou resultados satisfatórios para os dados analisados, alcançando o objetivo de quantificar as fontes de variação e estabelecer limites de controle a partir destas, para serem introduzidos nas cartas de controle usadas no monitoramento de rotina. As cartas de controle construídas a partir desta análise forneceram limites de controle mais realistas.

Conclusão: Esta forma de analisar os dados permite maior precisão na avaliação dos resultados, além da comparação entre resultados obtidos em dias distintos. O conhecimento e a quantificação das fontes de variação que mais interferem no processo podem ajudar a guiar decisões que permitam tornar o processo mais estável, reduzindo as chances de se ter alarme falso ou de erros não captados pelo gráfico de controle.

Palavras-Chave: Imunobiológicos, Parâmetros de Qualidade, Variabilidade

OTR12 Concepção de indicadores de desempenho por processos do Departamento de Controle de Qualidade em aderência aos objetivos estratégicos de Bio-Manguinhos

Cristine Maria de Lima Andrade¹, André Ribeiro de Oliveira²

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

² Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Introdução: A concepção de indicadores de desempenho que apóiem efetivamente a tomada de decisão nas organizações é uma etapa crítica nos projetos de sistema de medição de desempenho. Utilizando-se os processos do Departamento de Controle de Qualidade (DEQUA) de Bio-Manguinhos e aplicando-se a metodologia do Balanced Scorecard (BSC) aos objetivos estratégicos previamente definidos da organização, alinharam-se os indicadores da área em busca de melhores resultados.

Objetivo: Definir indicadores de desempenho a partir dos macroprocessos, aplicável diretamente ao Departamento de Qualidade (DEQUA), por método qualitativo que seja reprodutível às demais áreas estratégicas em aderência ao Mapa Estratégico de Bio-Manguinhos 2010-2020.

Metodologia: Primeiramente realizaram-se entrevistas com os gestores ou substitutos das seções, definindo-se os focos principais das suas atividades, isto é, os seus macroprocessos, entradas e saídas, em um programa Power Point. Em seguida, definiu-se os atributos de desempenho (tempo, flexibilidade, confiabilidade e prontidão), relativos a cada processo e agrupados em níveis superiores (laboratórios e divisões), verificando a coesão, coerência e importância para validação, em planilha Excel. Por meio de entrevistas com a Gerente do Departamento e a Vice-Diretora de Qualidade, foi possível revisar os macroprocessos o nível estratégico, definindo-se os indicadores de maior aderência ao Mapa Estratégico 2010-2020 da unidade. Por fim, mapeados os indicadores do Departamento, estes foram submetidos à Assessoria de Planejamento de Bio-Manguinhos para avaliação.

Resultados: Foram selecionados para o DEQUA sete importantes indicadores de desempenho: a) índice percentual de retestes; b) atendimento a novas demandas e exigências; c) satisfação ao cliente (interno); d) prazo para fechamento de certificados de análise de produtos, e) estudos de estabilidade finalizados por categorias, f) atendimento ao SAC; g) capacidade de atendimento e demanda no prazo. Estes indicadores têm alinhamento com os seguintes objetivos definidos pela organização no Mapa Estratégico, nas perspectivas: 1) Auto sustentabilidade - Eficácia na utilização dos recursos; 2) Sociedade - Atendimento das demandas de saúde, Satisfação dos

Clientes, Atendimento das demandas de saúde pública, Fortalecimento da Imagem Institucional Pública; 3) Processos - Lançamento de novos produtos e serviços; 4) Aprendizado e Crescimento com os objetivos - Motivação dos funcionários, Excelência Gerencial, Retenção de pessoas, Qualificação de funcionários, Eficiência na comunicação, definidos para a perspectiva de aprendizado e crescimento. Estes resultados deixam claro que a teoria de *Balanced Scorecard* com as relações de causa e efeito para alinhamento da estratégia com os vetores entre os objetivos, facilitará a posição desejada de acordo com a Estratégia pretendida de Bio-Manguinhos.

Conclusão: A introdução dos Conceitos de *BalancedScorecard*, Macroprocessos e Indicadores de Desempenho aos Gestores do Departamento de Qualidade, proporcionou o estabelecimento de indicadores de desempenho de cunho participativo e alinhados à estratégia definida por Bio-Manguinhos. A definição dos indicadores de desempenho por processos pode ocasionar, com a sua implantação, o acompanhamento e a melhoria no gerenciamento do macroprocesso bem como o fortalecimento do negócio no mercado competitivo atual.

Palavras-Chave: Indicadores de Desempenho, Balanced Scorecard, Alinhamento, Estratégia

OTR13 Anticorpos monoclonais para o tratamento do câncer: um estudo exploratório a partir das agências reguladoras e dos estudos clínicos

Fabricia Pires Pimenta¹, André Prucoli Fragoso Carvalho²

¹ Laboratório de Informação Científica e Tecnológica em Saúde – LICTS, ICICT, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

² Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

Introdução: Com a mudança do perfil demográfico da população, o câncer vem se tornando causa cada vez mais comum de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Juntamente com esse crescimento, se observa um aumento nos índices hospitalares relacionados às internações e aos gastos de recursos públicos com tratamentos e diagnósticos. Com o advento de novas tecnologias, o tratamento do câncer tem evoluído drasticamente a fim de se tornar mais seletivo e direcionado às células tumorais. Neste cenário, os anticorpos monoclonais (mAbs) vêm se destacando desde sua primeira aprovação anticâncer. Devido ao êxito da aplicação desses medicamentos no tratamento do câncer e o consequente sucesso de vendas, os mAbs representam uma parcela significativa dos medicamentos biológicos em desenvolvimento. Em consequência, existe uma necessidade de sinalizar cenários de produção destes medicamentos para instituições nacionais com vistas a torná-los mais acessíveis à população brasileira.

Objetivo: O presente trabalho visa realizar um estudo prospectivo acerca dos anticorpos monoclonais para o tratamento contra o câncer a partir do cenário dos medicamentos aprovados e disponíveis no mercado e dos estudos clínicos de fase III.

Metodologia: Os medicamentos já aprovados foram utilizados para realizar a análise do mercado, os estudos clínicos de Fase III para identificar os mAbs anticâncer que estão próximos de chegar aos pacientes foram utilizados para avaliar os anticorpos em uma fase mais inicial do desenvolvimento.

Resultados: A análise de mercado mostrou que existem 15 mAbs anticâncer aprovados em pelo menos um dos órgãos reguladores estudados (Anvisa, FDA e EMA). A apreciação das indicações dos anticorpos aprovados mostrou que poucas indicações terapêuticas possuem terapias aprovadas. Observou-se também que o mercado é concentrado, sendo constatado que apenas um anticorpo não foi desenvolvido por empresas originadas nos EUA ou Europa. Essa concentração também foi observada nos estudos clínicos de Fase III. A partir dos estudos clínicos foi possível notar uma tendência de internacionalização dos centros de estudos, com um crescimento do Brasil nesse cenário entre os anos de 1995 e 2012. Também foi

identificada uma maior variedade de indicações terapêuticas em estudo. Os estudos clínicos permitiram identificar uma tendência de realização de novos testes para medicamentos aprovados a fim de obter aprovação para segundo uso terapêutico.

Conclusão: A análise do mercado de anticorpos monoclonais para o tratamento do câncer demonstrou o sucesso desses medicamentos, com valores de venda globais alcançando mais de 23 bilhões de dólares em 2012, e três medicamentos figurando entre os dez medicamentos biológicos mais vendidos. A partir do grande êxito dos medicamentos aprovados associado a mudança do perfil demográfico e o conseqüente aumento das doenças causadas pelo envelhecimento da população, é possível afirmar que o mercado para esse medicamento é promissor e existe uma demanda garantida para tratamento das doenças do envelhecimento como o câncer.

Palavras-Chave: Câncer, Anticorpos Monoclonais, Tratamento, Agências Reguladoras, Ensaios Clínicos

OTR14 Pesquisa e desenvolvimento de formulações para proteção de protoxinas de *Bacillus* e outras bactérias esporuladas entomopatogênicas

Vera Cristina Pessoa de Lima¹, Adriana Marcus Vivoni¹, Leon Rabinovitch¹, Maria Alice Varjal de Mello Santos², Ricardo Tadeu Lopes³

¹ Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ

² Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães – CPqAM, Fiocruz, PE

³ Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Introdução: *Bacillus* e Gêneros correlatos apresentam espécies que são larvicidas, particularmente de mosquitos vetores de doenças. Alguns sorovares produzem protoxinas as quais os insetos transformam em estruturas químicas altamente tóxicas para si próprios. Com base nesse conhecimento e achado, alguns sorovares de *Bacillus thuringiensis* e de *Lysinibacillus sphaericus* (ex *B. sphaericus*) são usados em preparações inseticidas.

Objetivo: Desenvolver preparações à base de *L. sphaericus* altamente entomotóxico, obter a toxina ativa e isenta de esporos viáveis, utilizar radiação ionizante para se alcançar a inativação exclusiva dos esporos.

Metodologia: A cepa de *L. sphaericus* 2362 foi semeada em Ágar Nutriente com Metais e incubada a 33°C até 80% de esporulação. Em seguida, o induto bacteriano foi transferido para Erlemeyer contendo 35 mL de NaCl a 0,85% onde ficou sob agitação por 2 h. Desta suspensão, colocou-se 6 mL em 5 tubos para a realização da Termorresistência a 70°C por 15 min. As diluições foram realizadas na proporção de 1:10 e delas plaqueadas 100 µL em placas de Petri contendo Ágar Plate Count. Da suspensão-mãe, tomou-se 50µL do inóculo e transferiu-se para 4 Erlemeyer contendo 100mL de Caldo NYSM, onde ficou sob agitação a 33°C até 80% de esporulação. Transferiu-se a suspensão para 6 tubos Falcon e centrifugou-se até “pellet” firme, que foi lavado com 1 mL de água destilada e re-centrifugado. Suspendeu-se o “pellet” em 5 mL de salina e distribuiu-se em 12 Eppendorf com 500 µL cada, e novamente centrifugou-se. Este processo se repetiu várias vezes quando se separou 6 Eppendorf para receberem respectivamente as doses em kgy (5,0;7,5;10;12,5;15;17,5 e 20) com Co60.

Resultados: Após a irradiação ficou demonstrado que a dose de 20 kgy apresentou melhor resultado quanto à inativação de esporo com a preservação da toxina. As amostras foram separadas em frascos estéreis em biomassa irradiada e não irradiada, onde foram secas, pesadas e enviadas ao CPqAM- PE para a determinação de potência UTI. Para o ensaio qualitativo do tipo “mata não mata” utilizou-se larvas L3 jovens de *Culex quinquefasciatus*. O mesmo processo foi feito para

a biomassa não irradiada. Os resultados mostraram que as preparações com Larvas tiveram 100% de mortalidade, como era esperado.

Conclusão: O sistema empregado permitiu separar toxicidade de esporos viáveis.

Palavras-Chave: Bacillus, Radiação Ionizante, Co-60, Esporos

