

Anais do 1º Seminário Anual Científico e Tecnológico

Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos

Anais do 1º Seminário Anual Científico e Tecnológico

Os atuais desafios para a construção de ambiente favorável à Inovação e ao desenvolvimento tecnológico

Vacinas, Biofármacos, Reativos para diagnósticos e outros temas

Rio de Janeiro

2013

CRÉDITOS

Ministro da Saúde

Alexandre Padilha

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

Chefe de Gabinete

Isabella Lira Figueiredo

Coordenação Científica e Tecnológica

Akira Homma e Reinaldo Menezes

Membros

Amilcar Tanuri I Antonio de Pádua Barbosa I Antonio Gomes Pinto I Cristina de Albuquerque Possas I Elaine Maria de Faria Teles I Elba Regina Sampaio de Lemos
Elena Cristina Caride Campos I Elezer Monte Blanco I Ellen Jessouron I José Antonio de Sá Ferreira I José Godinho da Silva Junior I Marco Alberto Medeiros I Marcos da Silva Freire I Maria da Luz Fernandes Leal I Nadia Maria Bathoreu I José Procópio Senna I Sheila Farage

Comissão Executiva

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

Secretaria Executiva

Cássia Machado e Patricia Pedroso Porto

Assessoria de Comunicação

Renata Ribeiro Gómez de Sousa (Coordenação) I Ana Tereza Camargo I Alessandra Lopes I Bernardo Portella I Danielle dos Santos I Danielle Guedes I Denyse Oliveira I Gabriella Ponte I Isabela Pimentel I Lívia Maldonado I Rodrigo Pereira

Apoio

Marcelo Corrêa de Castro e Demilson Costa Rapello

Sumário

APRESENTAÇÃO	18
INTRODUÇÃO	19
VACINAS	21
Análise da imunogenicidade e grau de proteção de uma vacina inativada para Febre Amarela em modelo murino	
PEREIRA, Renata Carvalho; RANGEL, Andréa Nazaré M.; SOUZA, Marta Cristina de O.; SIMÕES, Marisol; GASPAR, Luciane P.; CARIDE, Elena; GALLER, Ricardo	22
Estudo visando aumento do prazo de validade da vacina Febre Amarela 05 E 10 doses de 24 para 36 meses	
REISDÖRFER, Francis Carazzai; DICK, Paulo César; CRESPO, Izabel Cristina; COSTA, Wagner Nascimento; BRITTO, Eliane Coutinho; HOKAMA, Darcy Akemi	24
Immunization with recombination plant: produced yellow fever virus envelope (E) protein vaccine candidates in Rhesus macaques	
GUIMARÃES, Rosane Cuber; SILVA, Andrea Nazare Monteiro Rangel da; GASPAR, Luciane Pinto, SIMÕES, Marisol; NEVES, Patrícia Cristina da Costa; TRINDADE, Gisela; MARCHEVSKY, Renato	26
Saúde pública mundial em foco: Bio-Manguinhos cria estratégias para atender demandas emergenciais da vacina febre amarela	
LOPES, Cíntia Nunes Cardoso; STURIALE, Thiago; SALEM, Rachelle	28
Eventos adversos graves pós-vacinação contra febre amarela e suas implicações para o Programa Nacional de Imunizações	
OLIVEIRA, Patricia Mouta Nunes de; SANTOS, Paulo Roberto Gomes dos; PAVÃO, Ana Luiza Braz; MARTINS, Reinaldo de Menezes; VON DOELLINGER, Vanessa dos Reis; CARVALHO, Sandra Maria Deotti; MAIA, Maria de Lourdes de Sousa.....	30

Caracterização fenotípica e molecular dos vírus quiméricos, febre amarela/ dengue: candidatos a uma vacina tetravalente recombinante contra Dengue

MENDES, Luiz Gustavo Almeida; FERREIRA, Idevaldo Inácio; FERNANDES, André Tavares da Silva; YORIO, Ana Paula; PESTANA, Cristiane; MOTTA, Márcia Archer da 32

Brazilian meningococcal C conjugate vaccine: scaling up studies

BASTOS, Renata Chagas; SILVA, Milton Neto da; SOUZA, Iaralice Medeiros de; ALVES, Rafael Fichta; SILVA JUNIOR, José Godinho da; MEDRONHO, Ricardo de Andrade; SILVEIRA, Ivna Alana Freitas Brasileiro da 34

Development of capillary electrophoresis method for determining free protein content in a brazilian meningococcal C conjugate vaccine

SOUZA, Iaralice Medeiros de; SILVA, Milton Neto da; FIGUEIRA, Elza Cristina Scott; LEAL, Maria de Lourdes Moura; JESSOUROUN, Ellen; ABRANTES, Shirley de Mello Pereira; SILVEIRA, Ivna Alana Freitas Brasileiro da 36

Estudo de estabilidade de meios de cultura utilizados no processo produtivo da vacina haemophilus influenza b (conjugada)

NEVES, Aline Rodrigues Venancio das; BOECHAT, Núbia; LEAL, Maria de Lourdes 38

Gerenciamento de riscos na obtenção do polissacarídeo conjugado com Toxóide Tetânico para produção da vacina Haemophilus Influenzae b (conjugada)

FERREIRA, Karla Rejane de Alencar Tesch; BARBOSA, Antônio de Pádua Risolia; BELART, Marília Stella Vaz Costa 40

Bordetella pertussis: mapeamento e caracterização dos epítopos da toxina Pertussis e Pertactina

SILVA, Flávio Rocha da; PINTO, Luiz A.L. Teixeira; SAÍSSE, Alexandre de Oliveira; GOMES, Luciano Pinho; DE SIMONE, Salvatore Giovanni 42

Coqueluche no Brasil: caracterização de linhagem de Bordetella Pertussi pós-vacinal

CAMBUY, Diego D.; FREITAS, Fernanda; SCHEIDEGGER, Érica M.; FONSECA, Érica; SILVA, Flávio Rocha da; VICENTE, Ana Carolina P. ... 44

In silico identification, cloning, expression and characterization of surface-exposed proteins of Streptococcus Pneumoniae

ARGONDIZZO, Ana Paula Corrêa; SOUZA, Claudio Marcos Rocha de; PESTANA, Cristiane Pinheiro; RODRIGUES, Camila Borges; MOTA, Fabio Faria da; GALLER, Ricardo; MEDEIROS, Marco Alberto 46

Saccharomyces Boulardii as an alternative expression system for molecules with biotherapeutical applications

DOURADINHA, Bruno; REIS, Vivian Castelo Branco; TORRES, Fernando Araripe Gonçalves; EVANS, Jared David; MARQUES JR, Ernesto Torres Azevedo 48

Modelo para avaliação de riscos de processos produtivos provenientes de transferência de tecnologia aplicado a vacina rotavírus humano g1p1[8] (atenuada)

FARIA, Livia Rubatino de; BARBOSA, Antonio de Pádua Risolia; BELART, Marília Stella Vaz Costa 50

Padronização de PCR em tempo real (TAQMAN) para quantificação de vírus 17 dengue recombinantes candidatos à vacina tetravalente em amostras biológicas

TRINDADE, Gisela Freitas; LIMA, Sheila Maria Barbosa de; PAULA, Vanessa Salete de; MOTTA, Marcia Archer da; YAMAMURA, Anna Maya Yoshida 52

Estudo comparativo de imunogenicidade da vacina tríplice viral, nas apresentações monodose e multidose

PAVÃO, Ana Luiza Braz; SANTOS, Eliane Matos dos; RIBEIRO, Maria das Graças Tavares; NORONHA, Tatiana Guimarães de; VON DOELLINGER, Vanessa dos Reis; MARTINS, Reinaldo de Menezes; MAIA, Maria de Lourdes Sousa 54

Estudo de condições passíveis de ampliação de escala para propagação de células vero em microcarregadores	
ALMEIDA, Aline Guimarães de; PINTO, Rodrigo Coelho Ventura; SOUZA, Marta Cristina de Oliveira; GASPAR, Luciane Pinto; CAMPOS, Elena Caride Siqueira; LIMA, Sheila Maria Barbosa de; YAMAMURA, Anna Maya	56
Influência da taxa de congelamento na velocidade de sublimação durante o processo de liofilização	
ASSUMPCÃO, Sérgio Luiz de Lima; CRESPO, Celso de Farias	58
Selecionando a rolha mais adequada para nossos produtos imunobiológicos	
CRESPO, Celso de Farias; MALUF, Isabella Manjud; ASSUMPCÃO, Sérgio Luiz de Lima	60
BIOFÁRMACOS	62
Estudo de comparabilidade dos lotes de Alfapeginterferona produzidos em escala piloto e escala industrial	
GÓES, Ana Carolina Magalhães Andrade de; LAURENTINO, Lauro de Sena; COELHO, Joyce Brito de; DICK, Paulo Cesar; IDAODY, Dinorah Torres; MEIRELES, Rolando Paez; BATOREU, Nadia Maria	63
Comparação farmacocinética e farmacodinâmica da Alfapeginterferona 2a de 40KDa e Alfapeginterferona 2b de 48KDa em voluntários sadios	
PICON, Paulo Dornelles; SANDER, Guilherme Becker; COSTA, Marisa Boff; AMARAL, Karine Medeiros; QUEVEDO, Amanda; SACCILOTTO, Indara Carmanim	65
Análise de risco em metodologia analítica de controle de qualidade de biofármaco alfainterferona 2b	
ANDRADE, Cleyton Lage; LEMES, Elezer Monte Blanco	67
Efetividade da alfainterferona (+ribavirina) no tratamento da hepatite viral crônica c genótipos 2 e 3 em amostra brasileira	
PICON, Paulo Dornelles; GONÇALVES, Candice Beatriz Treter; AMARAL, Karine Medeiros; SANDER, Guilherme Becker; MARTINS, Norberto Luis Campos; PEREIRA, Lisandra	69

Farmacovigilância da alfainterferona 2b humana recombinante produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz, em portadores de hepatite c crônica genótipos 2 e 3

ROTMAN, Vivian; SANTOS, Eliane Matos dos; CONCEIÇÃO, Deborah Araujo da; VON DOELLINGER, Vanessa dos Reis; PEREIRA, João Luiz; SOARES, Jorge André de Segadas; MAIA, Maria de Lourdes de Sousa..... 71

Retratamento com alfapeginterferona da Hepatite C genótipos 2 e 3 em um serviço do SUS

PICON, Paulo Dornelles; ARTICO, Simara; AMARAL, Karine Medeiros; GONÇALVES, Candice Beatriz Treter..... 73

Optimization of high performance liquid chromatography by size exclusion and reversed phase for homogeneity analysis of recombinant human erythropoietin

MEDEIROS, Ingrid Pinheiro de; NASCIMENTO, Hilton Jorge do; GOMES, Eduardo da Silva; PREMAZZI, Melissa Chamon Alves; SILVÉRIO, Jaline Coutinho; FONSECA, Erica Louro da; GUEDES JR, Daniel da Silva 75

Standardization and optimization of electrophoretic methods for the analysis of homogeneity and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietin

MEDEIROS, Ingrid Pinheiro de; SÁ, Camila Faia de; RIBEIRO, Marisa de Olivera; COELHO, Joyce Brito C.; CRUZ, Alessandra Paes S.; MATTOS, Katherine Antunes de; GUEDES JR, Daniel da Silva 77

Evaluation of a candidate national standard for recombinant human erythropoietin by UPLC/HDMS^E

MARINHO, Anna Carolina Machado; CONCEIÇÃO, Claudia Maria da; SILVA, Filipe Soares Quirino; LEITÃO, Ozéias de Lima..... 79

Comparação de eficácia e segurança da alfaepoetina de Bio-Manguinhos com uma alfaepoetina biossimilar: ensaio clínico randomizado

PICON, Paulo D.; PRIBBERNOW, Suzane Cristina Milech; PROMPT, Carlos Alberto; QUEVEDO, Amanda; ANTUNES, Veronica Verleine Horbe; MENTZ, Bianca Paula; SCHACHER, Fernando Comunello..... 81

Pharmacovigilance of biotechnological therapies: how Bio-Manguinhos has been preparing itself for the challenges that have arisen?

SANTOS, Paulo Roberto Gomes dos; OLIVEIRA, Patrícia Mouta Nunes de; DEFENDI, Hugo Garcia Tonioli; MAIA, Maria de Lourdes de Sousa; LEAL, Maria da Luz Fernandes..... 83

Identification and quantification of somathropin modifications by peptide mapping with UPLC/HDMS^E

CONCEIÇÃO, Claudia Maria da; SILVA, Filipe Soares Quirino da; LEITÃO, Ozéias de Lima; MARINHO, Anna Carolina Machado 85

Construção de vetores lentivirais para modulação da expressão do *DD3^{PCA3}* em células de câncer de próstata

GOULART, Ana Emília; BUENO, Luciana Ferreira; BATOREU, Nadia Maria; BONAMINO, Martin Herman; GIMBA, Etel Rodrigues Pereira 87

Identificação de nós para aplicação da ferramenta de análise de risco *hazop* em sistemas de biorreação

DE LA O HERRERA, Miguel Angel; LEMES, Elezer Monte Blanco; COSTA, Antonio Carlos Augusto; LUNA, Aderval Severino..... 89

Utilização de ferramentas de animação digital para simulação de processos biotecnológicos

DE LA O HERRERA, Miguel Angel; LEMES, Elezer Monte Blanco 91

Desenvolvimento de sistema de expressão em plataforma de célula eucariota para a produção de anticorpos monoclonais recombinantes

CONDE, Luis Vidal; ARAÚJO, Anna Erika Vieira de; MACHADO, Lucas de Almeida; PAZ, Priscila Muniz da; NASCIMENTO, Hilton Jorge; SILVA JÚNIOR, José Godinho; SENNA, José Procópio Moreno 93

Purificação e caracterização de Asparaginase II de *Saccharomyces Cerevisiae* clonada em *Pichia Pastoris*: estudo de um possível fármaco antileucêmico

GIRÃO, Luciana Facchinetti de Castro; ROCHA, Surza Lucia Gonçalves da; TEIXEIRA, Ricardo Sobral; FERRARA, Maria Antonieta; PERALES, Jonas; BOM, Elba Pinto da Silva 95

Avaliação de uma fração proteica de 38 a 40 kda isolada de acinetobacter baumannii como alvo para imunoterapia

MACHADO, Lucas de Almeida; BONIN, Renata Fajardo; ARAUJO, Anna Érika Vieira de; SENNA, José Procópio Moreno 97

Digestão enzimática de anticorpos monoclonais murinos anti-pbp2a de staphylococcus aureus resistentes à meticilina (mrsa) para obtenção de fragmentos f(ab')₂

ARAUJO, Anna Erika Vieira de; SOUZA, Natália Plínio de; CONDE, Luis Vidal; MACHADO, Lucas Almeida; SOUSA, Álvaro Paiva Braga de; SENNA, José Procópio Moreno..... 99

Janela de oportunidades para produção de proteínas terapêuticas de interesse brasileiro

MADEIRA, Luciana da Silva; BORSHIVER, Suzana; PEREIRA JR., Nei..... 101

Estratégias para a logística operacional da identificação, seleção e qualificação de centros de pesquisa para o estudo BIP48

PRADO, Débora Zechmeister do; PICON, Paulo Dornelles; SANDER, Guilherme Becker; MAZZOLENI, Luiz Edmundo; SACCIOTTO, Indara C.; SILVA, Lunara Martins da; CUNI, Hugo Nodarse 103

Avaliação da eficácia e da segurança do BIP48: metodologia do ensaio clínico fase 2/3

PICON, Paulo Dornelles; SANDER, Guilherme Becker; MAZZOLENI, Luiz Edmundo; AMARAL, Karine Medeiros; COSTA, Marisa Boff; MILBRADT, Tobias; SACCIOTTO, Indara Carmanin 105

Alfataliglicerase para doença de Gaucher: experiência do Centro de Referência do Rio Grande do Sul

SCHWARTZ, Ida; WILKE, Matheus Vernet Machado Bressan; VAIRO, Filippo; QUEVEDO, Amanda; RIBEIRO, Camila Blos; KRUG, Bárbara; PICON, Paulo... 107

REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO	109
Lateral flow immunochromatography as a potential test for yellow fever diagnostic	
FREIRE, Diana Praia Borges; JABOR, Alfredo; SILVA, Edimilson Domingos da; SILVA JUNIOR, Jose Godinho da; ANO BOM, Ana Paula Dinis	110
Production of immunoglobulin y specific for human rotavirus for diagnostic method and immunotherapy	
VASCONCELOS, Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de; LANZARINI, Natália Maria; GUIMARÃES, Juliana Rodrigues; SILVA, Alexandre dos Santos da; VOLOTÃO, Eduardo de Mello; PINTO, Marcelo Alves	112
Otimização do processo de obtenção de anticorpos caprinos anti-IGG humana utilizados na produção de imunorreativos para diagnóstico	
PAZ, Priscila Muniz da; MENDES, Edinea Pastro; NASCIMENTO, Hilton Jorge; SILVA JÚNIOR, Jose Godinho da	114
Implantação dos testes rápidos DPP[®] (<i>dual path platform</i>) de Bio-Manguinhos nos laboratórios públicos de âmbito nacional	
PIMENTA, Monique Amorim; BÓGIO, Alessandra; DUARTE, Adriana dos Santos; BOUKAI, Linda Khalili; PINTO, Christiane Teixeira; CARDOSO, Cintia Nunes; SILVA, Camila Arruda Mota da.....	116
Padronização do teste rápido DPP[®] sífilis treponêmico e não treponêmico às amostras brasileiras	
SUCUPIRA, Michel Vergne; RUBIM, Nara Mazarakis; FERREIRA, Antonio G. P.; SILVA, Edimilson Domingos da	118
Desenvolvimento de teste rápido para titulação de anticorpos contra antígeno não treponêmico da sífilis	
RUBIM, Nara Mazarakis; SUCUPIRA, Michel Vergne; FERREIRA, Antonio G. P.; SILVA, Edimilson Domingos da	120

Gerenciamento de riscos na produção de conjugado de proteína a com ouro coloidal usado em reativos para diagnóstico plataforma DPP®

SCHETTINI, Poliana Vita; BARBOSA, Antonio de Pádua Risolia; BELART, Marília Stella Vaz Costa 122

Desenvolvimento do teste de imunofenotipagem para a contagem de linfócitos TCD4⁺

SIDONI, Marli; SANTIAGO, Marta de Almeida; SILVA, Roberto Calado da; NASCIMENTO, Hilton Jorge do; SILVA JUNIOR, José Godinho da; SILVA, Edimilson Domingos da; FERREIRA, Antonio G. P..... 124

Establishment of a tandem conjugation process aiming immunophenotyping assay for TCD4⁺ lymphocyte count

ARAÚJO, Ana Paula; JURGILAS, Patricia Barbosa; PAZ, Priscila Muniz da; SANTIAGO, Marta de Almeida; SIDONI, Marli; NASCIMENTO, Hilton Jorge; SILVA JÚNIOR, José Godinho da 126

Aplicação da citometria de fluxo na avaliação de conjugados fluorescentes utilizados em imunoenaios

SANTIAGO, Marta de Almeida; FONSECA E FONSECA, Bruna de Paula; MARQUES, Christiane de Fátima da Silva; SILVA, Edimilson Domingos da; BERTHO, Álvaro Luiz; NOGUEIRA, Ana Cristina Martins de Almeida..... 128

Comparação de metodologias de acoplamento utilizadas na plataforma de micro arranjos líquidos

LOUREIRO, Bernardo de Oliveira; SILVA, Leila Botelho Rodrigues da; MELLO, Marcelle Bral de; FONSECA E FONSECA, Bruna de Paula; SILVA, Edimilson Domingos da; FERREIRA, Antônio Gomes Pinto; MARQUES, Christiane de Fátima Silva 130

Avaliação da aplicação da plataforma de micro arranjos líquidos no diagnóstico da sífilis

MELLO, Marcelle Bral de; LOUREIRO, Bernardo de Oliveira; SILVA, Leila Botelho Rodrigues da; FONSECA E FONSECA, Bruna de Paula; MARQUES, Christiane de Fátima Silva; SILVA, Edimilson Domingos da; FERREIRA, Antônio Gomes Pinto 132

Development and validation of multiplex for measurement of antibodies against *C.diphtheriae*, *C.tetani* and *H.influenzae* type b

AZAMOR, Tamiris; SILVA, Andréa M. V. da; SOUZA, Alessandro F. de; TUBARÃO, Luciana N.; NEVES, Patrícia C. C.; MATOS, Denise C. de S..... 134

Identificação de antígenos imunodominantes em pacientes com leptospirose através de micro arranjo de proteínas

LESSA-AQUINO, Carolina; PABLO, Jozelyn; LIANG, Li; WUNDER JR., Elsio A.; PESTANA, Cristiane Pinheiro; RIBEIRO, Guilherme S.; GALLER, Ricardo; REIS, Mitermayer G.; KO, Albert I.; FELGNER, Philip L.; MEDEIROS, Marco Alberto 136

Development of a sensitivity and cost-effective real time PCR: measuring a wide range of HBV DNA concentrations

SANTOS, Alcione de Oliveira dos; SOUZA, Luan Felipo Botelho de; BORZACOV, Lourdes Maria; VILLALOBOS-SALCEDO, Juan Miguel; VIEIRA, Deusilene Souza 138

Development of a reverse transcription quantitative real-time PCR-based system for rapid detection and quantification of hepatitis delta virus

VIEIRA, Deusilene Souza; SOUZA, Luan Felipo Botelho de; SANTOS, Alcione de Oliveira dos; BORZACOV, Lourdes Maria; HONDA, Eduardo Resende; VILLALOBOS-SALCEDO, Juan Miguel 140

Ensaio real triplex para HBV e dengue, visando ampliação de alvos do kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos

FERREIRA, Antonio G. P.; ANDRADE, Elisabete; ROCHA, Daniele; FONTANA, Marcela; ALVAREZ, Patrícia 142

Desenvolvimento de teste para diagnóstico molecular de bacilos gram-negativos produtores das carbapenemases mais prevalentes no Brasil

FONTANA, Marcela; ROCHA, Daniele; ANDRADE, Elisabete de; ASENSI, Marise; FERREIRA, Thiago Chagas² Antonio G. P.; ALVAREZ, Patricia 144

Desenvolvimento e validação de teste de quantificação de carga viral de HCV de Bio-Manguinhos	
ALVAREZ, Patrícia; ANDRADE, Elisabete; ROCHA, Daniele; FONTANA, Marcela; CORRÊA, Marcelo; PIRES, William; FERREIRA, Antonio G. P.	146
Estabelecimento do banco de células mestre para produção da TAQ DNA polimerase para o kit NAT HIV / HCV Bio-Manguinhos	
PACHECO, Vanessa da Silveira dos Santos; LEMES, Elezer Monte Blanco	148
Avaliação dos riscos associados ao processo de obtenção da partícula calibradora e controle positivo do kit NAT HIV/HCV de Bio-Manguinhos	
MENDONÇA, Dênis Millan; LEMES, Elezer Monte Blanco	150
Deteção de amostras em período de janela imunológica com kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos, visando ampliar a segurança transfusional no Brasil	
ALVAREZ, Patrícia; ANDRADE, Elisabete; ROCHA, Daniele; FONTANA, Marcella; FERREZIN, Caroline; KHALILI, Linda; FERREIRA, Antonio G. P.	152
Construção de um vetor para recombinação de integrases do HIV-1	
DUARTE, Bianca; OLIVEIRA, Michelli de; PIÑEIRO, Bernard; TANURI, Amilcar	154
OUTROS TEMAS	156
Avaliação de um sistema de informação <i>online</i> para gerenciamento de estudos clínicos	
MAIA, Maria de Lourdes de Sousa; VON DOELLINGER, Vanessa dos Reis; SANTOS, Paulo Roberto Gomes dos; MARQUES, Suelen Renata Estácio; ALBUQUERQUE, Elizabeth Maciel de; CAMACHO, Luiz Antonio Bastos; SANTINI, Marília	157
Produtos para a saúde: desafios para ampliação do acesso	
PEREIRA, Mariana Rebello; MELAMED, Clarice	159
New approaches for standardization and validation of QRT – PCR assays for quantitation of yellow fever on clinical samples with high quality parameters	
FERNANDES, Alice G.; TRINDADE, Gisela F.; YOSHIDA, Anna M.; BRITTO, Constança; LIMA, Sheila Maria B.	161

Análise e controle de riscos associados ao sistema embalagem de produtos farmacêuticos

MIRANDA, Gisele Corrêa 162

Análise da proposta de processo produtivo do L-PAC tendo como base a RDC 17

LEMES, Elezer Monte Blanco; SOARES, Camila Eleoterio Lopes; AMARAL, Priscila 164

Fluorescence analysis used as quality control of monoclonal antibodies

ANO BOM, Ana Paula Dinis; JURGILAS, Patricia Barbosa; NASCIMENTO, Hilton Jorge; ARAÚJO, Ana Paula; SENNA, José Procópio Moreno; ARISSAWA, Marcia; SILVA JÚNIOR, José Godinho da 166

Análise de riscos para priorizar auditorias em fornecedores de material de embalagem secundária: o estudo de caso Bio-Manguinhos

MOREIRA, Jorge Ricardo Silva; MALDONADO, José Manuel Santos de Varge; LEMES, Elezer Monte Blanco..... 168

Metabolômica aplicada na identificação de potenciais alvos de intervenção terapêutica nas doenças micobacterianas

MATTOS, Katherine Antunes de; OLIVEIRA, Viviane Carneiro Gonçalves; ANTUNES, Luiz Caetano Martha; SARNO, Euzenir Nunes; BOZZA, Patricia Torres; ATELLA, Georgia Correa; PESSOLANI, Maria Cristina Vidal..... 170

Structural characterization of pneumococcal surface antigen a (PSAA) of streptococcus pneumonia

SILVA, Izabella Sodré Buty da; ANO BOM, Ana Paula Dinis; ARGONDIZZO, Ana Paula Correa; LAURENTIS, Ariane Leite; MEDEIROS, Marco Alberto; SILVA JÚNIOR, José Godinho da..... 172

Células-tronco adultas humanas para ensaios de citotoxicidade: uma alternativa aos ensaios animais

AGUIAR, Alessandra Melo de; KULIGOVSKI, Crisciele; MORAES, Elizabeth de; ABUD, Ana Paula; ZYCH, Jaiesa; REUS, Thamile; DALLAGIOVANNA, Bruno 174

Diversidade de bactérias isoladas de áreas limpas relacionadas a análises microbiológicas de produtos farmacêuticos

VIDAL, Livia Maria Rubem; VERAS, João Flávio Carneiro; SOUZA, Mariana Oliveira; LADEIRA, Elisa Martins; BAILO, Paulo Victor Pereira; VIEIRA, Verônica Viana..... 176

Gestão da mudança em áreas de suporte às instituições de ciência e tecnologia

TEIXEIRA JÚNIOR, Jorge de Oliveira 178

Perspectivas de desenvolvimento tecnológico em Manguinhos: concepções de ciência, delineamento

PONTE, Carlos Fidelis da 180

Experiência da divisão de atendimento ao cliente e pós-marketing no relacionamento com empresas prestadoras de serviços

MUYLAERT, Flávia Fontenelle; BOUKAI, Linda Khalili; PINTO, Caroline Ferezin; SILVA, Vanessa Martins da; BEZERRA, Ludmila Nascimento Rocha Villar; PINA, Marilúcia Sobrado; SANTOS, Priscila Caroline Almeida dos 182

Práticas de gestão do conhecimento para criação de ambiente propício à inovação e à formação de redes em Bio-Manguinhos

MIRANDA, Gisele Corrêa; CARVALHO, Ana Paula da Silva; GERLETI, Sergio; NUNES, Alexander Soares; FIGUEIREDO, Isabella Lira 184

APRESENTAÇÃO

Prezados participantes,

É com imensa alegria que o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) abre suas portas para ser palco do 1º Seminário Anual Científico e Tecnológico, contando com a participação dos maiores especialistas, estudiosos e pesquisadores do setor de imunobiológicos do país.

Nestes três dias de evento, vamos apresentar o panorama nacional do desenvolvimento de vacinas e da vacinação, as tendências tecnológicas para produção de reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos.

A inovação tecnológica aplicada à biotecnologia, o papel das parcerias público-privadas e a integração das atividades da Fiocruz no contexto no Complexo Industrial da Saúde também serão debatidos. Nosso objetivo é incentivar o aperfeiçoamento, qualificação profissional e a construção coletiva de novas abordagens sobre os principais desafios da saúde pública em nosso país, setor pelo qual somos diretamente responsáveis em nossas práticas diárias.

Acreditando que é possível a criação de um ambiente favorável à inovação e ao desenvolvimento tecnológico no país, através da parceria entre entidades de ensino, pesquisa, empresas e especialmente pela atuação dos jovens talentos, iremos fomentar o debate coletivo dos temas propostos, trocar experiências e saberes, com a colaboração de todos os participantes.

Desejamos que aproveitem ao máximo o Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos!

Cordialmente,



Artur Roberto Couto

Diretor

INTRODUÇÃO

Este primeiro Seminário Nacional Científico & Tecnológico em Imunobiológicos do Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos/Bio-Manguinhos, conta com a participação de pesquisadores da Fiocruz e de outras Instituições com *expertises* nas várias áreas relacionadas à Saúde. Notadamente, os temas científico-tecnológicos incidem sobre questões relacionadas a vacinas, biofármacos, reativos para diagnóstico laboratorial, incluindo ainda temas referentes à gestão tecnológica, controle e garantia de qualidade destas áreas.

Dentro deste diapasão, o primeiro dia é dedicado à discussão sobre os vários aspectos relacionados a vacinas; o dia seguinte é dedicado a biofármacos e reativos para diagnóstico e o último dia dedicado à discussão sobre inovação e parcerias público privadas. Todos os dias contam com apresentações formais, complementados com apresentações orais e pôsteres.

Surpreendentemente, em um curto período de 21 dias – desde a abertura das inscrições em 20 de Junho e até o encerramento em 11 de Julho – foram recebidas 340 inscrições. Oitenta e um resumos foram aceitos para apresentação em forma de pôsteres e destes dezoito foram selecionados para apresentação oral. Isto é um indicativo do interesse da comunidade na busca de um espaço para discussão, troca de experiências e vontade de buscar conhecimentos. Neste contexto, a interação entre vários grupos deverá propiciar sinergismo e fortalecimento institucional.

Com o intuito de estimular e motivar os pesquisadores e tecnólogos envolvidos no tema em tela, os quatro melhores trabalhos serão selecionados por uma Comissão Científica & Tecnológica Externa e agraciados com premiações, a saber:

- 1º lugar, prêmio Oswaldo Cruz, com diploma e premiação de R\$ 10.000,00;
- 2º lugar, prêmio Carlos Chagas, com diploma e premiação de R\$ 6.000,00;
- 3º lugar, prêmio Alcides Godoy, com diploma e premiação de R\$ 4.000,00;
- Jovem Talento, prêmio Evandro Chagas, com diploma e premiação de R\$ 3.000,00.

O Comitê Técnico-Científico do Seminário agradece a participação dos pesquisadores internos e externos à Fiocruz, o apoio da Diretoria de Bio-Manguinhos e

formula votos de um encontro científico e tecnológico muito proveitoso e agradável para todos.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Akira Homma', with a stylized flourish at the end.

Akira Homma

Presidente do Conselho Político e Estratégico de Bio Manguinhos

Resumos dos pôsteres

Vacinas



ANÁLISE DA IMUNOGENICIDADE E GRAU DE PROTEÇÃO DE UMA VACINA INATIVADA PARA FEBRE AMARELA EM MODELO MURINO

Renata Carvalho Pereira¹, Andréa Nazaré M. Rangell¹, Marta Cristina de O. Souza¹, Marisol Simões¹, Luciane P. Gaspar¹, Elena Caride¹, Ricardo Galler¹

¹Programa de Vacinas Virais, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ 21045-900, Brazil.

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo analisar a imunogenicidade e o grau de proteção em camundongos C57BL/6, de uma vacina inativada para febre amarela-cepa 17DD. O desenvolvimento desta nova abordagem vacinal, além de contemplar pessoas que residem ou viajam para áreas endêmicas, também pode ser administrada em pessoas nas quais a vacina atenuada é contraindicada.

Metodologia

A vacina foi desenvolvida a partir do cultivo de células Vero em biorreatores em meio livre de soro, purificada por cromatografia e inativada por agente químico. A análise da imunogenicidade e do nível de proteção foi realizada em camundongos C57BL/6 e a resposta imune humoral avaliada por PRNT, considerando o ponto de corte de 794 mUI/mL. Para o estabelecimento da melhor concentração de antígeno, os camundongos foram imunizados com três doses de 100 µl da vacina inativada clarificada com 7.88 µg/dose, 3.94 µg/dose ou 1.97 µg/dose de proteína. Para a determinação do número mínimo de doses, os animais foram inoculados com uma, duas ou três doses da vacina inativada purificada, na concentração previamente estabelecida e na presença ou ausência do adjuvante hidróxido de alumínio. Os animais foram desafiados através da inoculação intracerebral de 100 DL50 do vírus 17DD. Para determinar o perfil isotípico das imunoglobulinas envolvidas na resposta humoral, foi realizado ELISA para subtipagem de IgG1 e IgG2a nos soros coletados 40 dias após a imunização. Foram considerados positivos soros com densidade óptica (450nm) > 0,3.

Resultados

Os resultados quanto ao estabelecimento da melhor concentração do antígeno demonstraram que, as três concentrações testadas foram capazes de induzir similarmente uma resposta mensurável de anticorpos neutralizantes, com concentrações de 3551 mUI/mL (7.88 µg/dose), 2496 mUI/mL (3.94 µg/dose) e 1901 mUI/mL (1.97 µg/dose). Diante disto, optou-se por escolher a concentração de 2 µg/dose da vacina inativada para dar continuidade aos ensaios. Os resultados da determinação do número mínimo de doses indicaram que apenas os animais que receberam 3 doses da vacina inativada formulada com adjuvante apresentaram títulos de anticorpos neutralizantes acima do ponto de corte considerado positivo para febre amarela e taxa de sobrevivência de 100% após o desafio. Os resultados quanto à subtipagem destes anticorpos mostraram que todos os animais imunizados com a vacina inativada foram negativos para o isotipo IgG2a. No entanto, todos os animais foram positivos para o isotipo IgG1, apresentando maiores concentrações nos grupos que receberam 3 doses da vacina inativada.

Conclusões

A imunização com três doses de 2 µg/dose da vacina de vírus inativado contendo o adjuvante hidróxido de alumínio foi capaz de elicitar altos títulos de anticorpos neutralizantes, principalmente do isotipo IgG1. Além disto, protegeu 100% dos camundongos C57BL/6 após o desafio, apresentando perfil de proteção similar à vacina de vírus vivo atenuado administrada em dose única.

ESTUDO VISANDO AUMENTO DO PRAZO DE VALIDADE DA VACINA FEBRE AMARELA 05 E 10 DOSES DE 24 PARA 36 MESES

Francis Carazzai Reisdörfer, Paulo César Dick¹, Izabel Cristina Crespo¹, Wagner Nascimento Costa¹, Eliane Coutinho Britto¹, Darcy Akemi Hokama¹.

1. Departamento de Controle de Qualidade, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), FIOCRUZ.

Introdução: A vacina febre amarela de Bio-Manguinhos é uma vacina de vírus vivo atenuado, produzida de acordo com as normas da Organização Mundial da Saúde. É utilizada para imunização de adultos e crianças a partir dos 09 meses, principalmente aqueles que transitam em regiões endêmicas. Com o aumento do quantitativo solicitado pelo Ministério da Saúde e para exportação a partir de 2011, inicia-se uma discussão da formação de estoque estratégico desta vacina. Para garantir seu suprimento e melhor aproveitamento de doses distribuídas, evitando o desperdício de uma vacina estável, o aumento do prazo de validade deste produto de 24 para 36 meses é de extrema importância. Assim, Bio-Manguinhos poderia manter um estoque estratégico e ofertar vacina com maior capacidade de uso, suprimindo a demanda do Ministério da Saúde, Organização Pan- Americana de Saúde e da Organização Mundial da Saúde, que distribuem esta vacina, respectivamente, para o Brasil, as Américas e a África.

Objetivo : Avaliar a estabilidade da vacina febre amarela (atenuada) 05 doses e 10 doses por 36 meses.

Metodologia: Para a análise da estabilidade da vacina 10 doses, foram avaliados dados retrospectivos e atuais de estudos de estabilidade longa duração e acompanhamento. O estudo de estabilidade longa duração foi iniciado em 2006 e concluído em 2008, gerando dados de amostras armazenadas por 24 meses a -20°C e a 2-8°C. Visando à extensão do prazo de validade, as amostras continuaram armazenadas nas mesmas temperaturas por mais 24 meses, totalizando 48 meses, e novos dados foram gerados em 2009 e 2010.

Para a análise da estabilidade da vacina 05 doses, foram avaliados dados retrospectivos de estudos de acompanhamento anual com lotes produzidos em 2003, 2004, 2005 e

2006 e armazenados a -20°C por 36 meses. Além disso, lotes de vacina 05 doses produzidos entre 2005 e 2006 e armazenados a -20°C e a $2-8^{\circ}\text{C}$ foram selecionados do arquivo de retenção e avaliados em 2009 e 2010. Para análise estatística foram utilizadas regressão linear e análise de covariância.

Resultados: Os resultados de potência, termoestabilidade e umidade residual mantiveram-se acima do limite especificado durante todo o tempo dos estudos. Os demais parâmetros avaliados também permaneceram dentro das especificações.

A análise estatística mostrou que a potência da vacina 10 doses sofre leve decaimento ao longo do tempo, nas temperaturas de -20°C e $2-8^{\circ}\text{C}$, por 48 meses.

Conclusão: Com esse trabalho, podemos concluir que o prazo de validade das vacinas febre amarela (atenuada) 05 e 10 doses pode ser estendido para 36 meses, quando armazenada a -20°C ou a $2-8^{\circ}\text{C}$, sem alteração da qualida

IMMUNIZATION WITH RECOMBINANT, PLANT-PRODUCED YELLOW FEVER VIRUS ENVELOPE (E) PROTEIN VACCINE CANDIDATES IN RHESUS MACAQUES

Rosane Cuber Guimarães¹, Andrea Nazare Monteiro Rangel da Silva¹, Luciane Pinto Gaspar¹, Marisol Simões¹, Patrícia Cristina da Costa Neves¹, Gisela Trindade¹, Renato Marchevsky¹

1. Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Technological Development, Rio de Janeiro Brazil

Objectives: This work describes a non-human primate immunogenicity study and the humoral and cellular response for the YFE antigen as part of the development of a subunit vaccine against the Yellow Fever envelope (E) protein utilizing the plant-based expression platform.

Methods: This study included 20 animals and two formulations (one each of YF-E alone and fusion to lichenase) were selected based on immunogenicity studies in mice. Monkeys were immunized intramuscularly with 30 µg of YFE-1T and YFE-2 plus Alhydrogel™ three times at 30-days interval. One group was immunized intramuscularly with a single dose of 17DD vaccine. The Neutralizing Antibody Titers (Log₁₀ mIU/mL) were assayed by PRNT 30, 60, 90 days after first immunization and after challenge with 17DD vaccines in all groups (104 DPI). Viremia and RNAemia after challenge of all groups were assayed by titration and qPCR. We also measured yield of total IgG against yellow fever E protein; Avidity Index (AI) of IgG antibodies against E protein in rhesus sera; and magnitude of cellular immune response against E protein measured by IFN-γ-ELISpot. The Functional profile of CD4⁺ T cell and CD8⁺ T cell responses after challenge with 17DD in rhesus monkeys vaccinated with YF 17DD, YFE-1T and YFE-2E was assessed. We carried out multi-parameter ICS at day 104 (14 days after challenge with YF 17DD virus) to determine the ability of protein E-specific CD4⁺ T-cells and CD8⁺ T-cells to degranulate (CD107a) and secrete IFN-γ, TNF-α, and/or IL-2. The antigen stimuli in this assay consisted of recombinant E protein at 20 µg/mL.

Results and Conclusion: All monkeys seroconvert after the second dose of YFE-1T and YFE2E. After challenge, viremia could be detected in 3 animals inoculated with recombinant proteins that indicates a non-sterile immunity even using an attenuated virus for the challenge. Viremia and RNAemia after challenge is lower in mock group when compared with the clean group, indicating an influence of the adjuvant alone. For both recombinant proteins there is a booster effect after the second dose, however there is a decline in day 90 IgG levels when compare to day 60 levels. Increase in samples' avidity index (AI) in the groups immunized with both recombinant proteins and 17 DD group was observed. In this study, it was possible to demonstrate that both recombinant proteins were able to stimulate T cell response specific for the protein E. Although the groups immunized with recombinant proteins receive two more doses, it was not possible to observe an increase in the number of clones responders on days 60 and 90. The ability of protein E-specific CD4⁺ T-cells and CD8⁺ T-cells to degranulate (CD107a) and CD4 TNF- α production are the most impaired functions when compared 17DD with recombinant proteins

SAÚDE PÚBLICA MUNDIAL EM FOCO: BIO-MANGUINHOS CRIA ESTRATÉGIAS PARA ATENDER DEMANDAS EMERGENCIAIS DA VACINA FEBRE AMARELA

Cintia Nunes Cardoso Lopes¹, Thiago Sturiale¹, Rachele Salem¹

¹Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivo

Este trabalho descreve os esforços feitos pela área de exportação de Bio-Manguinhos para mobilizar setores internos e parcerias estratégicas com o objetivo de viabilizar o atendimento de demandas emergenciais de saúde pública em países da África.

Metodologia

Em agosto de 2012, o Instituto foi contatado pelo UNICEF com o desafio de atender uma grande demanda da Costa do Marfim. Este país pretendia organizar uma campanha preventiva de vacinação contra a febre amarela no final de novembro e para tanto precisava de 6 milhões de doses da vacina.

Dada a indisponibilidade de excedente de produção, Bio-Manguinhos utilizou-se da parceria com o Programa Nacional de Imunizações que devido a não ocorrência de surto no Brasil, pôde emprestar mais de 12 milhões de doses. Por ser um produto voltado para abastecimento nacional, foi necessário readequar as embalagens com a inclusão de bulas internacionais e a mudança na disposição dos cartuchos nas caixas de embarque. Também foi necessária a emissão de certificados internacionais. Dessa forma, houve o envolvimento e comprometimento de áreas como produção, logística e qualidade. Destaca-se também a participação do INCQS, que prontamente realizou os trâmites necessários para emissão da documentação de exportação.

Em dezembro de 2012, Bio-Manguinhos recebeu novo pedido do UNICEF para atendimento de uma epidemia de febre amarela que ocorria desde setembro no Sudão. Foram solicitadas 2,2 milhões de doses da vacina. Nesse momento, uma nova mobilização foi feita utilizando a mesma estratégia adotada no caso acima. As distribuições ocorreram após as confirmações através das ordens de compras recebidas pelo Instituto.

Resultado

De forma a atender as necessidades públicas internacionais no combate à febre amarela, Bio-Manguinhos implementou estratégias para o fornecimento da vacina estocada no mercado nacional.

A ordem de compra para a campanha da Costa do Marfim foi recebida em 31 de agosto. Foram readequados e distribuídos 17 lotes, divididos em 8 embarques, entre os dias 24 de setembro e 16 de outubro. Todos os embarques foram recebidos 5 dias após a data de saída de Bio-Manguinhos.

Para o Sudão, a ordem de compra chegou em 03 de janeiro de 2013. A exportação foi dividida em 3 embarques: nos dias 11, 15 e 18 de janeiro. Foram utilizados 9 lotes e as entregas também ocorreram dentro do prazo estimado.

Conclusão

O pronto atendimento a essas duas grandes demandas do UNICEF em 2012 ressaltou a importância de Bio-Manguinhos no cenário internacional, contribuindo com a melhoria dos padrões de saúde pública mundial. Através da mobilização de diversas áreas internas e da estratégia de parceria, foi possível o fornecimento de 8,2 milhões de doses da vacina no tempo solicitado. Os casos da Costa do Marfim e do Sudão podem ser destacados como casos de sucesso das exportações de Bio-Manguinhos.

EVENTOS ADVERSOS GRAVES PÓS-VACINAÇÃO CONTRA FEBRE AMARELA E SUAS IMPLICAÇÕES PARA O PROGRAMA NACIONAL DE IMUNIZAÇÕES

Patricia Mouta Nunes de Oliveira¹, Paulo Roberto Gomes dos Santos¹, Ana Luiza Braz Pavão¹, Reinaldo de Menezes Martins¹, Vanessa dos Reis von Doellinger¹, Sandra Maria Deotti Carvalho², Maria de Lourdes de Sousa Maia¹

1 - Bio-Manguinhos / Fiocruz

2 - PNI / Ministério da Saúde

Objetivo: Analisar a frequência de eventos adversos graves após a administração da vacina febre amarela (atenuada) no Brasil.

Metodologia: Trata-se de um estudo sobre eventos adversos graves à vacina febre amarela (atenuada), com ênfase em doença viscerotrópica aguda, hipersensibilidade e manifestações neurológicas (autoimunes e neurotrópicas), disponibilizados na base de dados do Sistema de Informações de Eventos Adversos Pós-Vacinação do Programa Nacional de Imunizações. Aplicaram-se os critérios de definição de casos adotados pelo Ministério da Saúde. As taxas de eventos adversos foram calculadas dividindo-se o número de casos verificados pelo número de doses aplicadas segundo o Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (Datasus), multiplicando-se por 100.000.

Resultados: Esta é a maior amostra de eventos adversos graves à vacina febre amarela (atenuada) já analisada no Brasil, totalizando 185 casos. Para reações de hipersensibilidade, 92 casos foram verificados entre 2010 e 2012, com uma taxa maior para a primeira dose, 0,867 casos / 100.000 doses aplicadas, do que para os reforços, 0,095. Excetuam-se desta amostra as reações anafiláticas, 4, ocorridas após a 1^a dose, com taxa de 0,021. Para manifestações neurológicas, 65 casos foram verificados entre 2007 e 2012. A taxa total foi de 0,207 casos / 100.000 doses aplicadas. Para doença neurológica autoimune, a taxa total foi de 0,0192/100.000, sendo mais frequente após a primeira dose, 0,0254, do que após os reforços, 0,0097. Para doença neurotrópica (meningoencefalite), a taxa total foi de 0,175, observada apenas na primeira dose, sendo a faixa etária de 5 a 9 anos a que apresentou a taxa mais elevada, 0,741. Para doença

viscerotrópica aguda, 24 casos foram verificados entre 1999 e 2012, todos após a primeira dose, com taxa de 0,024 casos / 100.000 doses aplicadas. A faixa etária de ≥ 60 anos apresentou a taxa mais elevada, 0,081.

Conclusão: O monitoramento constante de eventos adversos, especialmente os graves, é uma importante atividade de farmacovigilância. O uso de taxas torna possível estimar o risco das vacinações e definir recomendações. O risco encontrado de eventos adversos após revacinações contra febre amarela é menor do que aquele após a primeira dose. Estes resultados contribuem para a atual discussão sobre a necessidade ou não de revacinações. Apesar da ocorrência de eventos adversos graves, o perfil benefício/risco para a vacina febre amarela (atenuada) permanece favorável, considerando-se a alta letalidade da doença. Ações de vigilância pós-comercialização como esta refletem o compromisso de Bio-Manguinhos / Fiocruz em fornecer à população produtos eficazes e seguros, avaliados de maneira criteriosa e transparente.

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS VÍRUS QUIMÉRICOS FEBRE AMARELA / DENGUE CANDIDATOS A UMA VACINA TETRAVALENTE RECOMBINANTE CONTRA DENGUE

Luiz Gustavo Almeida Mendes¹, Idevaldo Inácio Ferreira¹, André Tavares da Silva Fernandes¹, Ana Paula Yorio¹, Cristiane Pestana¹, Márcia Archer da Motta¹

1-Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Desenvolvimento Tecnológico, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivo: Avaliar as características genéticas e biológicas de vírus quiméricos febre amarela/dengue, considerando que é um protótipo vacinal tetravalente contra a dengue.

Metodologia: Para a caracterização biológica avaliamos as curvas de crescimento viral pela infecção de monocamadas de células em frascos de T-175cm² e garrafas Cellfactory de duas, quatro e dez camadas tendo cada camada 632cm². Utilizamos 60.000 células/cm² e 24hrs após semeadura infectamos com moi de 0,002. Para caracterização genética fizemos a análise molecular através da estabilidade genética, onde culturas de células Vero foram inoculadas com os vírus quiméricos, oriundos da purificação viral, a fim de estabelecermos o perfil genético do vírus. Assim oito passagens sucessivas foram realizadas utilizando os clones virais de DEN1, DEN2, DEN3 e DEN4. A análise deste sequenciamento foi feito no DNASTar. Já que os nossos vírus possuem maquinaria replicativa de febre amarela (vírus neurotrópico) e proteínas de envelope e membrana do vírus dengue, realizamos um teste de neurovirulência dividido em dois experimentos com camundongos Swiss de três semanas de idade com input viral de 10³ PFU/30µl no primeiro experimento e no segundo com input viral não diluído e um segundo experimento com camundongos neonatos com input viral de 10³ PFU/20µl. Seguimos com os testes em camundongo C57/bl6, mas agora avaliando a proteção dos vírus quiméricos e seus derivados com input viral de 10⁴ PFU/100µl.

Resultados: As construções dos vírus recombinantes YFV/DENV prM/E são viáveis, produzindo vírus que replicam eficientemente em garrafas estacionárias T-175cm² e CellFatory, com propriedades de replicação similares aos vírus dengue selvagens parentais, sugerindo que a troca da prM/E de febre amarela pela mesma região de dengue é capaz de afetar esta característica fenotípica do vírus YFV17D. Após a etapa

de purificação clonal os clones foram sequenciados e comparados com o lote de trabalho P2. Esta comparação revelou algumas alterações de aminoácido entre as passagens P2 e CP2 em todos os clones, exceto para os clones YFV/DENV4. Os clones CP2 foram propagados por mais oito vezes em célula Vero para determinar se os vírus eram geneticamente estáveis. Após as passagens observamos que muitas alterações foram de caráter adaptativo à célula Vero. Os resultados de neurovirulência não mostraram nenhuma diferença entre os dois testes com camundongos de três semanas, entretanto com os neonatos foram neurovirulentos. O teste de proteção demonstrou que o clone YFV/DENV2C alcançou 93% de sobrevivência, YFV/DENV2A 81% e YFV/DENV2B 75%.

Conclusões: As quimeras alcançaram títulos satisfatórios quando produzidos em média escala. Apresentaram baixo número de mutações após as oito passagens. São menos neurovirulentos quando comparados a febre amarela e possuem níveis elevados de proteção.

BRAZILIAN MENINGOCOCCAL C CONJUGATE VACCINE: SCALING UP STUDIES

Renata Chagas Bastos¹, Milton Neto da Silva¹, Iaralice Medeiros de Souza¹, Rafael Fichta Alves², José Godinho da Silva Junior¹, Ricardo de Andrade Medronho³, Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira¹

¹Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Technological Development, Rio de Janeiro, Brazil

²Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Bacterial Vaccine Department, Rio de Janeiro, Brazil

³Chemical Engineering Department, Federal University of Rio de Janeiro, Center of Technology, Rio de Janeiro, Brazil

Objectives: This work is related to comparative analysis between obtained data from pilot and industrial scale of the meningococcal C conjugate vaccine under GMP.

Methods: Some relevant parameters were used to compare differences/similarities between pilot and industrial scales referred to meningococcal C conjugate bulk (MPCT) production. Such parameters were: time spent in the production process; processing losses during purification by tangential flow filtration and the polysaccharide to protein ratio (PS/Prot) in final conjugate. Data from fifteen batches of oxidized meningococcal C polysaccharide (MPCO), 9 batches of hidrazide-activated monomeric tetanus toxoid (MATT) and 4 batches of MPCT obtained in pilot scale were compared with scale up data concerned to 5 batches of MPCO, 9 batches of MATT and 3 batches of MPCT. SEC chromatographic profile, ¹HNMR spectrum and content of free polysaccharide by capillary zone electrophoresis (CZE) were also used to provide comparison between both scale processes.

Results: Five-fold increase in reaction and purification scale of the MPCO, allowed reaching a final volume eight times greater with final product concentration close to the observed in pilot scale, practically spending the same pilot scale time. Such

modification gave sufficient amount of MPCO for two batches of conjugation reaction from only one batch of oxidized product. During the scale up: in the MPCO purification step it was observed a minor loss (16%) compared to the pilot scale process; the 2.5-fold increase in the reaction and purification of the MATT resulted in 20 minutes increasing, without significant losses; the five-fold increase in MPCT reaction and purification has shown the same PS/Prot with a small increase of 20 minutes in the total processing time compared with pilot scale. The preliminary data related to quality control assays (SEC, ¹HNMR and CZE) indicated efficiency of scale up purification process by tangential flow filtration in the removal of reagents and by-products during the purification of MPCO and MATT. In addition the purification process was able to minimize unbound polysaccharide in the conjugate bulks. Moreover the SEC chromatographic profiles and ¹HRMN spectra were similar for the products obtained in both scales. Conjugate production was clearly demonstrated by disappearance of the aldehyde groups assignments observed in analysis of MPCO. All MPCT batches in pilot and industrial scale exhibited sugar free contents below 10% as shown by CZE analysis.

Conclusion: The scaling up of all processes involved in the production of meningococcal C conjugate aiming vaccine preparation was considered relevant and the physicochemical characteristics of the molecules (MPCO, MATT, MPCT) related to studied scales were similar. These results demonstrated the industrial plant capacity of Bio-Manguinhos to supply annual demand of vaccines to the National Program of Immunization, after conducting phase III clinical trials.

DEVELOPMENT OF CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD FOR DETERMINING FREE PROTEIN CONTENT IN A BRAZILIAN MENINGOCOCCAL C CONJUGATE VACCINE

Iaralice Medeiros de Souza¹, Milton Neto da Silva¹, Elza Cristina Scott Figueira¹, Maria de Lourdes Moura Leal¹, Ellen Jessouroun¹, Shirley de Mello Pereira Abrantes², Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira¹.

¹ Laboratory of Bacterial Technology, Technological Development, Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation

² Laboratory of Foodstuffs and Contaminants, Department of Chemistry, National Institute of Quality Control in Health, Oswaldo Cruz Foundation

Objectives: This study aims the development of a method for free protein separation and quantitation in the meningococcal C conjugate vaccine developed by Bio-Manguinhos, in accordance with WHO requirements.

Methods: Capillary electrophoresis (CE) was used for method development where micellar electrokinetic chromatography (MEKC) and free zone capillary electrophoresis (CZE) were the modes tested. In both modes sodium tetraborate buffer (TBNa) and uncoated fused-silica were used for analysis. For MEKC mode analysis, sodium dodecyl sulfate was used to form micelles and improve separation resolution. In CZE experiments, samples were analyzed in two ways: only with buffer and adding different concentrations of diamine, a capillary wall modifier, in order to promote vaccine components separation. Different parameters such as: temperature, electric current, voltage, buffer concentration, pH and sample volume were tested in both CE modes. Vaccine conjugate bulk (MPCT), hidrazide-activated monomeric tetanus toxoid (MATT), MPCT spiked with MATT and oxidized meningococcal C polysaccharide (MPCO) samples were introduced into capillary using MEKC and CZE modes, in order to obtain optimum separation resolution and evaluate method selectivity.

Results: After optimization of analysis parameters, assays performed by MEKC were able to discriminate conjugate and free protein peaks, but presented a peak broadening profile with low separation resolution. On the other hand, unknown and characteristic

conjugate and protein peaks were observed in CZE analysis performed by adding diamines to buffer with uncompleted separation ($R_s \approx 1$). In addition consecutive introduction of MPCT spiked with MATT sample showed migration times unstable. Moreover, in the MPCT analysis by CZE using 20 mM TBNa pH 9.3 was not observed a signal corresponding to MATT. However three peaks (MATT, MPCO and MPCT) with good separation resolution ($R_s > 1.5$) were observed when MPCT spiked with MATT sample was introduced suggesting low free protein content in MPCT samples.

Conclusion: CZE mode has shown good efficiency in preliminary separation and quantitation of free protein in conjugate vaccine. However, treatment and conditioning optimization of the capillary would be required to obtain a robust method for quality control process of Brazilian meningococcal C conjugate vaccine.

ESTUDO DE ESTABILIDADE DE MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS NO PROCESSO PRODUTIVO DA VACINA HAEMOPHILUS INFLUENZAE b (CONJUGADA)

Aline Rodrigues Venancio das Neves¹, Núbia Boechat², Maria de Lourdes Leal¹.

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivos: Este trabalho descreve o estudo de estabilidade realizado com os meios de cultura que fazem parte da etapa de fermentação do processo produtivo da vacina *Haemophilus influenzae* b conjugada (Hib) viabilizando a determinação do *holding time* dos mesmos. Com o objetivo de atender as recomendações da ANVISA, deve ser avaliado o *holding time* dos produtos intermediários, uma vez que os resultados de estabilidade disponibilizados pela empresa responsável pela transferência de tecnologia precisam ser estabelecidos localmente.

Métodos: O *holding time* fornecido pela GlaxoSmithKline-Bélgica durante a transferência de tecnologia foi utilizado como base para definição dos tempos do estudo de estabilidade dos cinco meios: meio sólido empregado na semeadura da bactéria, meio líquido utilizado no pré-cultivo e cultivo final em biorreator, meio sólido para controle de pureza do cultivo e a solução de extrato de levedura dialisado, que faz parte da composição de todos os meios. Devido à falta de legislação específica para a realização de estudos de estabilidade de meios de cultura, foram preconizados os testes de pH, esterilidade e promoção de crescimento. A premissa utilizada no desenho do estudo se baseou no preparo de três lotes distintos e análise em seis tempos diferentes (0, 15, 30, 45, 60 e 90 dias) e para o meio sólido de semeadura da bactéria utilizam-se outros intervalos de tempo (0, 10, 15, 20, 30 e 45 dias).

A avaliação de pH e esterilidade foi realizada em todos os meios. Entretanto, o teste de promoção de crescimento foi definido para os meios líquidos de pré-cultivo e cultivo final em biorreator e para os meios sólidos (semeadura da bactéria e controle de pureza), com inoculação da cepa referência de Hib ATCC 10211/INCQS 00398. O meio líquido para cultivo de Hib utilizado no fermentador passará por testes em escala industrial chegando até a etapa de purificação do polissacarídeo de Hib.

Resultados: O estudo do dialisado de extrato de levedura foi finalizado com aprovação nos testes de pH e esterilidade em todos os tempos. Com base nestes resultados, foi possível alterar a validade deste insumo de trinta para noventa dias. A avaliação da estabilidade dos outros meios está em andamento e os resultados parciais têm sido promissores.

Conclusão: Estes resultados preliminares demonstram grandes possibilidades de extensão da validade de todos os meios de cultura envolvidos no estudo e com isso uma considerável redução de custos, perdas de processo. Além de possibilitar o atendimento a eventuais demandas (estoque estratégico) e flexibilizar as atividades de rotina na produção da vacina conjugada.

GERENCIAMENTO DE RISCOS NA OBTENÇÃO DO POLISSACARÍDEO CONJUGADO COM TOXÓIDE TETÂNICO PARA PRODUÇÃO DA VACINA *Haemophilus influenzae* b (CONJUGADA)

Karla Rejane de Alencar Tesch Ferreira¹, Antônio de Pádua Risolia Barbosa¹, Marília Stella Vaz Costa Belart¹

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivos O objetivo deste trabalho consiste na aplicação do gerenciamento de riscos à qualidade no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, especificamente na obtenção do polissacarídeo conjugado com a proteína monomérica tetânica, a partir do poliribosil-ribitol fosfato para a produção da vacina *Haemophilus influenzae* b (conjugada). O trabalho contempla a identificação e a análise dos perigos potenciais; a proposição de medidas de controle dos perigos encontrados e a validação da ferramenta de *Hazard Analysis and Critical Control Points* – HACCP para análise dos pontos críticos de controle – PCC do processo conforme modelo proposto pelo instituto.

Metodologia: O processo produtivo foi levantado em detalhes, por meio de pesquisa bibliográfica e da análise da documentação: relatórios técnicos, memoriais descritivos, fluxogramas, dossiês de produção e laudos de controle de qualidade. Em seguida, realizou-se o acompanhamento da produção, de modo a verificar, *in loco*, seu desenvolvimento. Com base nesta observação e nos dados levantados na documentação, foi realizada a elaboração de fluxogramas do processo. Então, foi realizada a aplicação do HACCP, utilizando árvore de decisão para determinação dos PCC. Para definição das ações de tratamento dos riscos, foram entrevistados profissionais envolvidos nos processos, em consonância com a análise dos resultados. Foram elaboradas planilhas de determinação de PCC e o plano HACCP para as atividades ocorridas nos setores de ativação e conjugação de polissacarídeos.

Resultados: Para o setor de ativação, foram identificadas 54 etapas, sendo 46 classificadas como PCC. Foram encontrados 103 perigos distribuídos nas 46 etapas.

Para o setor de conjugação foram identificadas 62 etapas, sendo 52 classificadas como PCC. Foram encontrados 153 perigos distribuídos nas 52 etapas. Perigos físicos predominaram para o setor de ativação (71%). Já para o setor de conjugação, embora a proporção de riscos físicos seja também predominante (59%), observou-se um aumento dos riscos microbiológicos (18%), em contraste ao observado para o setor de ativação (4%), o que possivelmente está relacionado ao fato de parte do processo ocorrer em área limpa. Quanto à existência de ações corretivas e preventivas, para o setor de ativação foram encontradas 50% de etapas com medidas de controle sem necessidade de propostas adicionais. Para o setor de conjugação foram propostas ações para 58% das etapas com medida de controle existente, como forma de contribuir para a melhoria do processo.

Conclusão

A ferramenta HACCP se mostrou versátil e aplicável, embora possua a limitação de não priorizar perigos. Todas as etapas consideradas como PCC apresentaram monitoramento e medidas de controle, no entanto, uma vez que as ações preventivas e corretivas propostas neste trabalho sejam implementadas, a instituição aumentará a segurança, com riscos ao processo minimizados de modo preventivo e assertivo. O trabalho evidenciou que o processo é seguro, apresentando resultados compatíveis com um processo robusto e bem delineado.

BORDETELLA PERTUSSIS: MAPEAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS EPITOPOS DA TOXINA PERTUSSIS E PERTACTINA

Flávio Rocha da Silva¹, Luiz A.L. Teixeira Pinto¹, Alexandre de Oliveira Saísse¹, Luciano Pinho Gomes¹, Salvatore Giovanni De Simone^{1 e2}

1- Laboratório de Bioquímica Proteína e Peptídeo- Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz.

2- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Negligenciadas ((INCT-IDN)/Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde (CDTS), Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil,

Introdução: A coqueluche é uma doença respiratória re-emergente, com ocorrência de cerca de 50 milhões casos e ≥ 300 mil mortes/ano em todo mundo. É causada pela bactéria *Bordetella pertussis* e atualmente vem apresentando um crescente problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, As principais causas apontadas para o ressurgimento são: (a) mudança genética da bactéria, (b) aumento do número de portadores assintomáticos, (c) seleção natural de variantes resistentes à vacina e (d) perda da imunidade. No Brasil, são notificados em média 2 mil casos/ano e crianças \geq um ano de idade, pertencem ao grupo que apresenta taxas de incidência e letalidade mais acentuadas. A vacinação pode ser feita com dois tipos de imunógenos, a vacina celular (DTP-Hib) e a vacina acelular (DTPa). Devido aos efeitos adversos da vacina celular, estudos têm sido desenvolvidos para o aperfeiçoamento de vacinas acelulares, capazes de induzir uma boa resposta imunológica, sem causar efeitos colaterais graves. A vacina DTPa (normalmente contem 5 proteínas) é preparada com componentes antigênicos de *pertussis* obtidos por técnicas moleculares ou tornados atóxicos por tratamento químico. Os componentes são a hemaglutinina, pertactina, fímbrias sorotipo 2 e 3 e toxina pertussis detoxificada, sendo este o componente em maior concentração.

Objetivo: Neste estudo realizamos o mapeamento de todos os epitopos B lineares da toxina pertussis (TP, subunidades S1 a S5) e pertactina induzidas pela vacina DTP e DTPa utilizada no PNI.

Metodologia: Uma biblioteca peptídica cobrindo toda a extensão das proteínas foi preparada semi-automaticamente utilizando a técnica F-moc em membranas celulósicas funcionalizadas. Os peptídeos positivos com 14 aminoácidos de extensão e cobertura de 9 resíduos foram revelados pela reatividade com soros de camundongos imunizados com a vacina DTP e DTPa (tri-valente) empregando método quimioluminescente.

Resultados: Do arranjo peptídico foram identificados 41 epitopos B lineares utilizando soro de animais vacinados com DTP e 23 epitopos identificados utilizando a vacina DTPa. Estes epitopos possuíam 4-12 aminoácidos e estavam localizados na superfície das moléculas e portanto expostos ao sistema imune do hospedeiro.

COQUELUCHE NO BRASIL: CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM DE *Bordetella pertussis* PÓS-VACINAL

Diego D. Cambuy, Fernanda Freitas, Érica M. Scheidegger, Érica Fonseca, Flávio Rocha da Silva, Ana Carolina P. Vicente

Laboratório de Genética Molecular de Microrganismos

Instituto Oswaldo Cruz

Coqueluche é uma infecção do trato respiratório que tem como principal agente etiológico a bactéria *Bordetella pertussis*. A imunoprevenção é feita, desde os anos 50, com vacinas de células inativadas ou acelulares compostas por proteínas imunogênicas: toxina pertussis, pertactina e fímbrias. Esta é a doença imunoprevenível mais comum no ocidente onde tem sido observado um substancial aumento de casos nos últimos anos. Diferenças entre isolados de *B. pertussis* do período pré e pós-vacinal foram observadas em diversos países com alta cobertura vacinal. Estas diferenças estão presentes em algumas das proteínas imunogênicas, o que poderia ter como consequência a diminuição ou perda da eficácia da vacina. No Brasil, surtos de coqueluche vem acontecendo nos últimos anos em todos os estados que poderiam ser determinados por falta de cobertura vacinal e/ou circulação de novas linhagens do patógeno.

Objetivos: Caracterização genética de isolados de *B. pertussis* do Brasil, considerando genes de virulência, que codificam proteínas usadas na composição da vacina acelular, e genes do genoma estável.

Metodologia: Isolados de *B. pertussis* dos anos de 2008 e 2009 de surtos nos estados do Rio Grande do Sul e de Alagoas foram analisados por duas abordagens de MLST, uma baseada em genes de virulência e outra em genes *housekeeping*, para a determinação de sua relação clonal. Foi feito PCR e sequenciamento dos genes: *adk*, *fumC*, *tyrB*, *icd*, *pepA*, *pgm* (genoma estável) e para os genes de virulência: *ptxP* (região promotora do gene da toxina), *ptxA* (toxina pertussis), *prn*(pertactina) e *fim3* (fimbria sorogrupo 3).

Resultados: Ambas as abordagens de MLST revelaram a presença de um único perfil alélico e, portanto de uma única linhagem circulante nestas regiões do Brasil. Essa

linhagem é caracterizada pelo perfil alélico ptxp3-ptxA1-prn2-fim3B, e ST 1, que é o mesmo da linhagem pós-vacinal prevalente em países com alta cobertura vacinal em todo o mundo. Este perfil é distinto daqueles presentes nas linhagens usadas para a produção de vacina, incluindo a produzida no Brasil, que é ptxp2-ptxA4-prn1-fim3A. Esses resultados demonstram que, também no Brasil, infecções por *B. pertussis* estão sendo determinadas por linhagem adaptada a um “ambiente vacinado”.

IN SILICO IDENTIFICATION, CLONING, EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF SURFACE-EXPOSED PROTEINS OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Ana Paula Corrêa Argondizzo¹, Claudio Marcos Rocha de Souza¹, Cristiane Pinheiro Pestana¹, Camila Borges Rodrigues¹, Fabio Faria da Mota², Ricardo Galler¹, Marco Alberto Medeiros¹

¹ Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Technological Development, Rio de Janeiro, Brazil

² IOC, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

Objectives: The aim of this study was to identify, *in silico*, surface-exposed proteins of pneumococci, clone, express and purify these recombinant proteins as well as to evaluate the expression of these proteins in bacterial cellular surface, and verify the interaction with cellular matrix proteins. The distribution of the genes in pneumococci clinical samples as well as the degree of gene and protein identity were also evaluated in this study.

Methods: In this work, we sequenced and analyzed *S. pneumoniae* serotype 5 genome and also produced a database containing pneumococcal proteins. We selected a set of genes from this database that codify to surface-exposed proteins. The cellular localization prediction was performed by *in silico* analysis. To confirm surface-proteins expression on the cell surface, bacterial cells were analyzed by FACS and by IEF. We also evaluated the ability of these proteins to interact with extracellular matrix proteins, as well as the presence and degree of identity of these genes in clinical samples by PCR and sequencing.

Results: The genes were amplified by PCR, cloned into expression vectors and the soluble proteins were purified by “IMAC”. Antisera were produced by immunization of mouse with recombinant proteins adsorbed in Alhydrogel. Recombinant proteins were shown to react by immunoblotting with these antisera. The antisera were used to confirm the extracellular localization of the proteins in 10 serotypes of pneumococci. Among the

proteins evaluated 4 were able to interact with fibronectin, laminin, fibrinogen and collagen IV. We confirm by PCR that the genes are present in 51 pneumococcal clinical isolates of different serotype. The degree of nucleotide and protein identity showed more than 95%, by sequencing.

Conclusion: Altogether, these results strongly suggest that the proteins investigated in this study have a high degree of conservation and are present in a large number of pneumococcal serotypes as well as are expressed in bacterial cellular surface. These are important characteristics for proteins candidate to compose a recombinant vaccine. Furthermore, the interaction of some proteins with matrix proteins increase the potential of these proteins play important roles in nasal colonization.

SACCHAROMYCES BOULARDII AS AN ALTERNATIVE EXPRESSION SYSTEM FOR MOLECULES WITH BIOTHERAPEUTICAL APPLICATIONS

Bruno Douradinha^{1,2}, Vivian Castelo Branco Reis³, Fernando Araripe Gonçalves Torres³, Jared David Evans², Ernesto Torres Azevedo Marques Jr²

1. Fondazione Rimed, Palermo, Italy, 2. University of Pittsburgh Center for Vaccine Research, Pittsburgh (PA), USA, 3. Centro de Biotecnologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil

Objectives: This work shows that *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*), a probiotic yeast related to *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) shares with the latter several genetic features which prompt its use as an alternative expression system for molecules with potential biotherapeutical applications.

Methodologies: *S. boulardii* is a probiotic yeast related to *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), but with distinct genetic, taxonomic and metabolic properties. *S. cerevisiae* has been extensively used in biotechnological applications. Currently, many strains are available and multiple genetic tools have been developed, which allow the expression of several exogenous proteins of interest with applications in the fields of medicine, biofuels, food industry and scientific research, among others. Although *S. boulardii* has been widely studied due to its probiotic properties against several gastrointestinal tract disorders, very few studies addressed the use of this yeast as a vector for expression of foreign genes of interest with biotechnological applications. Here we applied to the probiotic yeast a simple plasmid transformation technique based on the lithium acetate protocol used for *S. cerevisiae* with minor modifications. We also tried different protocols for screening based on the protoplast formation. We further screened by PCR the genome of *S. boulardii* for the presence of promoters and other molecules of interest (PGK1, PYK1, ENO1, ADH1, REP1, REP2, CAN1, TAF10, AGA1 and δ transposons).

Results: We developed a simple protocol to efficiently perform plasmid DNA transformation into *S. boulardii* and consequent screening of successful transformants. We also show that several genes frequently used in genetic manipulation of *S. cerevisiae* (e.g., promoters, resistance markers) are present in *S. boulardii*, but some of them are not eligible to be targeted during transformation of the latter.

Conclusion: This work shows that although *S. boulardii* and *S. cerevisiae* are highly similar at several levels, not all tools used for genetic transformation of the latter can be applied to the probiotic yeast. This work has important applications toward the potential of *S. boulardii* as an expression system for genes of interest.

MODELO PARA AVALIAÇÃO DE RISCOS DE PROCESSOS PRODUTIVOS PROVENIENTES DE TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA APLICADO A VACINA ROTAVÍRUS HUMANO G1P1[8] (ATENUADA)

Lívia Rubatino de Faria¹, Antonio de Pádua Risolia Barbosa², Marília Stella Vaz Costa Belart¹

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Garantia da Qualidade, Rio de Janeiro, Brasil

2. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Vice-Diretoria de Produção, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivo: Este estudo de caso tem como objetivo realizar a avaliação de riscos dos equipamentos e processos produtivos de produtos de Bio-Manguinhos adquiridos por transferência de tecnologia.

Metodologia: Para alcançar o objetivo proposto, utilizou-se a ferramenta FMEA (*Failure Mode and Effect Analysis*) na avaliação dos riscos das etapas de preparo dos constituintes, descongelamento do insumo farmacêutico ativo (IFA) e de formulação da vacina rotavírus humano G1P1[8] (atenuada). A etapa de envase da vacina em estudo será realizada por máquina de envase específica que teve seu impacto avaliado e seus riscos identificados com a ferramenta HAZOP (*Hazard and Operability Study*).

Resultados: Como resultados, foram elaborados os fluxogramas das etapas do processo produtivo e foram avaliados, com a ferramenta FMEA, 217 riscos sendo que 147 foram encontrados na etapa de preparo dos constituintes, 33 foram encontrados na etapa de descongelamento do IFA e 37 foram encontrados na etapa de formulação. Também foi realizada a avaliação do impacto e a identificação dos riscos da máquina envasadora utilizando a ferramenta HAZOP.

Conclusão: Nas etapas de preparo dos constituintes, de descongelamento do IFA e de formulação da vacina rotavírus humano G1P1[8] (atenuada), a aplicação da ferramenta FMEA se mostrou bem sucedida, demonstrando que a mesma pode ser aplicada em processos de transferência de tecnologia. Em relação à máquina envasadora, a avaliação de impacto não foi capaz de selecionar os componentes mais críticos, visto que todas as partes, segundo o método proposto, alcançaram a mesma classificação. Na identificação

dos riscos deste equipamento, a ferramenta HAZOP foi bem sucedida, mas as informações necessitarão de aprofundamento e revisão conforme avanço da transferência de tecnologia.

PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL (TAQMAN) PARA QUANTIFICAÇÃO DE VIRUS 17DDENGUE RECOMBINANTES CANDIDATOS A VACINA TETRAVALENTE EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Gisela Freitas Trindade¹, Sheila Maria Barbosa de Lima¹, Vanessa Salete de Paula², Marcia Archer da Motta¹, Anna Maya Yoshida Yamamura¹.

1- Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Desenvolvimento Tecnológico, Rio de Janeiro, Brasil.

2- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Introdução: A introdução de novos produtos e serviços de qualidade para ampliar o acesso da sociedade brasileira a insumos estratégicos de saúde é o principal objetivo de Bio-Manguinhos, que para isso investe constantemente em pesquisa, desenvolvimento e inovação com foco nas demandas de saúde pública do país. Dentro da carteira de projetos da Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), se insere o projeto “Uso do vírus amarílico vacinal 17D para a expressão de antígenos de Dengue visando o desenvolvimento de novas vacinas vivas atenuadas”. O projeto consiste no desenvolvimento de uma vacina tetravalente viva atenuada quimérica de Dengue-Febre Amarela, através da substituição da região prM/E, que codifica as proteínas de membrana e de envelope do vírus Dengue em um clone da linhagem vacinal 17D do vírus da Febre Amarela.

Metodologia: Para acompanhar a cinética *in vitro* e *in vivo* de propagação viral dos vírus recombinantes 17DDengue (1-4), é de grande interesse a aplicação da técnica de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR) que permita avaliar de forma eficaz e rápida o cultivo dos vírus em cultura celular, bem como a viremia produzida em modelos animais pós-vacinação. Neste sentido, a técnica de qPCR está em fase de padronização no Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV).

Resultados: Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados de forma a amplificar uma sequência de junção entre os genes do envelope (Dengue) e NS1 (Febre Amarela)

para garantir que apenas o genoma de vírus quiméricos seja detectado. As concentrações de oligonucleotídeos iniciadores [300nM] e de sondas [150nM] a serem utilizadas já foram definidas. Além disso, foram testadas sondas com marcação para diferentes fluoróforos (FAM, VIC, NED) a fim de aprimorar a eficiência no estabelecimento de um teste biplex, ou seja, uma reação capaz de discriminar diferentes sorotipos de vírus quiméricos presentes na mesma amostra biológica. As clonagens no vetor TOPO para obtenção das curvas padrão para quantificação da carga viral estão em andamento, o que tornará possível a determinação do número de cópias do genoma viral e sua correlação com o título viral obtido pela técnica de plaqueamento.

Conclusões: O desenvolvimento desta metodologia tem como finalidade otimizar o tempo para obtenção do título viral de amostras em cultura e a tomada de decisões em um processo de escalonamento de produção viral. Da mesma forma, este teste será aplicado na titulação dos antígenos vacinais circulantes nos animais testados em estudos pré-clínicos desta vacina recombinante.

ESTUDO COMPARATIVO DE IMUNOGENICIDADE DA VACINA TRÍPLICE VIRAL, NAS APRESENTAÇÕES MONODOSE E MULTIDOSE

Eliane Matos dos Santos¹, Maria das Graças Tavares Ribeiro¹, Tatiana Guimarães de Noronha¹, Ana Luiza Braz Pavão¹, Vanessa dos Reis von Doellinger¹, Reinaldo de Menezes Martins¹, Maria de Lourdes Sousa Maia¹

1. Bio-Manguinhos / FIOCRUZ

Objetivo: avaliar a imunogenicidade da vacina tríplice viral, após uma dose, em crianças de 12 a 23 meses de vida, comparando as apresentações do frasco multidose (10 doses por frasco da vacina formulada em Bio-Manguinhos/Fiocruz, através de transferência de tecnologia do Laboratório GlaxoSmithKline - GSK) com o frasco monodose (1 dose por frasco, da vacina produzida pela GSK).

Metodologia: foi conduzido um estudo clínico de fase IV, randomizado, simples-cego, com dois braços da vacina tríplice viral: multidose e a monodose. O estudo foi realizado em três Centros Municipais de Saúde do Rio de Janeiro. A população do estudo foi composta de 240 crianças saudáveis, na faixa etária de 12 a 23 meses e 29 dias de idade, elegíveis para a vacinação com a tríplice viral. Foram coletadas duas amostras de sangue: uma pré-vacinal e outra pós-vacinal, 42 dias após a dose vacinal, com intervalo mínimo de 30 e máximo de 60 dias. Os dados foram analisados segundo a abordagem por intenção de tratamento (IT) e por aderência ao protocolo (AP). A não inferioridade para imunogenicidade foi baseada nos seguintes critérios: limite inferior do intervalo de confiança das proporções de soroconversão ($> -10\%$) e limite inferior do intervalo de confiança da razão entre os títulos médios geométricos ($\geq 0,75$).

Resultados: 120 crianças receberam a vacina monodose e 120 receberam a multidose. Na análise IT, a soroconversão de sarampo foi 99,1% e 98,3%, para as vacinas multidose e monodose, respectivamente, rubéola foi de 100% para a vacina multidose e de 98,3% para a vacina monodose e caxumba foi de 90,4%, para a vacina multidose, e 89,6%, para a vacina monodose. Na análise AP, a soroconversão de sarampo foi 99,1%

e 98,2%, para as vacinas multidoses e monodose, respectivamente, rubéola, foi de 100% e 98,1%, para as vacinas multidoses e monodose, respectivamente e caxumba, as foram bastante próximas 89,9% e 89,8%, para as vacinas multidoses e monodose, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados de soroconversão e os títulos médios geométricos para as vacinas monodose e multidoses. Os critérios de não inferioridade foram atendidos para todos os componentes, exceto para caxumba, que teve o limite inferior do intervalo de confiança da razão entre os títulos um pouco abaixo de 0,75 (0,699, na análise IT, e 0,672, na análise AP).

Conclusão: a vacina multidoses foi não inferior, em relação à monodose, pois os critérios de não inferioridade foram atendidos para todos os componentes da vacina, exceto caxumba. Entretanto, deve-se levar em consideração que o critério de não inferioridade $\geq 0,75$, da razão entre os títulos médios geométricos, é extremamente conservador, pois, em estudos com vacinas, normalmente são utilizados limites inferiores mínimos de 0,50 ou 0,67.

ESTUDO DE CONDIÇÕES PASSÍVEIS DE AMPLIAÇÃO DE ESCALA PARA PROPAGAÇÃO DE CÉLULAS VERO EM MICROCARREGADORES

Aline Guimarães de Almeida^{1,3}, Rodrigo Coelho Ventura Pinto², Marta Cristina de Oliveira Souza¹, Luciane Pinto Gaspar¹, Elena Caride Siqueira Campos¹, Sheila Maria Barbosa de Lima¹, Anna Maya Yamamura¹

1- Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ

2- Vice-Diretoria de Produção, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ

3 - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivo: Devido à necessidade crescente de desenvolvimento de bioprocessos para produção de vacinas virais empregando linhagens de células de mamíferos, bem como a proposta de uma nova metodologia para a produção de uma vacina inativada contra a febre amarela baseado na propagação do vírus amarílico em biorreatores sob condições monitoradas e controladas, utilizando microcarregadores, o estudo do escalonamento desses processos torna-se de grande relevância. Uma parte fundamental dessa ampliação de escala é a multiplicação celular. No caso de células aderentes cultivadas em biorreatores agitados, as alternativas para obtenção de inóculo celular em quantidade suficiente que possa ser reproduzido em escala industrial é um desafio. Neste trabalho estudou-se diferentes condições, passíveis de ampliação de escala, da propagação de células Vero em sistema agitado, utilizando microcarregadores.

Metodologia: Diferentes técnicas para transferência de células foram investigadas. Para estudar a transferência *bead-to-bead* foi proposto um planejamento experimental fatorial completo 2² onde a agitação contínua ou intermitente, bem como o intervalo de agitação e intermitência foram variados. O crescimento celular foi avaliado pela contagem dos núcleos celulares corados com cristal violeta e a concentração de glicose e lactato presente no sobrenadante avaliada utilizando-se analisador bioquímico marca YSI. Uma avaliação visual da confluência dos microcarregadores foi feita por microscopia óptica invertida. A tripsinização das células aderidas aos microcarregadores também foi estudada, acrescentando um tratamento prévio do meio de cultivo com NaOH, alcalinizando-o até que atingisse um pH entre 8 – 9.

Resultados: Das condições experimentais propostas no planejamento experimental, verificou-se que apenas na condição experimental 2 (60 minutos de repouso/15 minutos de agitação) ocorreu a transferência *bead-to-bead*, com um posterior crescimento celular significativo, e constatação de pontes de células entre os microcarregadores. Independente das concentrações de tripsina testadas, observou-se que apesar das células apresentaram capacidade de aderir novamente aos microcarregadores, não houve proliferação significativa. No entanto, ao se alcalinizar o meio de cultivo antes da tripsinização, além de obter um processo eficaz, as células demonstraram capacidade de aderir novamente aos microcarregadores e também de se multiplicar nos mesmos.

Conclusões: Nos ensaios de transferência *bead-to-bead* somente na condição 2 do planejamento experimental ocorreu a transferência de células entre microcarregadores e subsequente proliferação. Já empregando a metodologia de tripsinização, observou-se que a manutenção de um pH ideal para a atividade da enzima é crítico para o processo.

INFLUÊNCIA DA TAXA DE CONGELAMENTO NA VELOCIDADE DE SUBLIMAÇÃO DURANTE O PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO

Sérgio Luiz de Lima Assumpção¹, Celso de Farias Crespo.

1. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivo: Correlacionar a taxa de congelamento de uma formulação à velocidade de sublimação alcançada durante o processo de liofilização.

Metodologia: Esse trabalho consistiu em produzir dois lotes liofilizados de formulação à base de sacarose, onde os parâmetros dos ciclos de liofilização foram fixados, ou seja, as programações de temperatura e pressão dos dois ciclos utilizados eram idênticas à exceção das taxas de congelamento que, no primeiro ciclo foi de $-0,22^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e no segundo $-1,77^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Nos dois experimentos, durante a sublimação do produto na câmara do liofilizador, foi medida a velocidade de redução de massa do produto no frasco. Esse método consiste em coletar amostras cujas massas do volume envasado tenham sido registradas logo após o envase. A coleta de amostras é feita com auxílio do “braço” do liofilizador piloto. Os frascos que foram previamente identificados e pesados são pesados novamente após o tempo de exposição à secagem. Com os valores de massa inicial, massa final e intervalo de tempo sob sublimação foi feito o tratamento computacional utilizando o software Origin 7.0. A metodologia consiste em montar curvas de redução de massa em relação ao tempo sob a condição de programação do ciclo de liofilização.

Resultado: A taxa de congelamento programada no ciclo apresenta um alto impacto na velocidade de sublimação da formulação à base de sacarose que utilizamos. Com as taxas de congelamento utilizadas verificou-se que, para taxa de congelamento mais lenta, $-0,22^{\circ}\text{C}/\text{min}$, tem-se uma sublimação mais rápida que a sublimação alcançada no outro experimento, onde a formulação foi congelada à taxa de $-1,77^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Assim, verificou-se experimentalmente, conforme se encontra na literatura, que para um congelamento mais lento, obtém-se uma sublimação mais rápida.

Conclusão: A taxa de congelamento é um parâmetro importante a ser considerado quando da elaboração de um ciclo de liofilização, pois está relacionada fortemente com o tempo total do processo, com o tempo total do ciclo. Além disso, sabe-se da literatura que o tipo de cristal formado durante o congelamento tem um importante impacto nos resultados biológicos. Devido a efeitos desnaturantes das baixas temperaturas, e do tamanho dos cristais formados, pode-se observar danos a membrana plasmática e ao citoplasma celular. Neste trabalho, não foram realizados estudos biológicos para avaliar ganhos e perdas, por exemplo, em parâmetros como a potência. Entretanto, a utilização de uma taxa de congelamento adequada à formulação a ser liofilizada, sobretudo na produção em escala comercial, deve considerar a condição que otimize o tempo do processo, preservando sobretudo os requisitos da qualidade de produto final estabelecidos por agências reguladoras.

SELECIONANDO A ROLHA MAIS ADEQUADA PARA NOSSOS PRODUTOS IMUNOBIOLÓGICOS

Celso de Farias Crespo¹, Isabella Manjud Maluf¹ e Sérgio Luiz de Lima Assumpção¹

1. Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivo: Bio-Manguinhos vem realizando uma série de experimentos para avaliar a performance de diferentes tipos de rolhas na liofilização e estabilidade da vacina Hib. O objetivo desses experimentos é respaldar, por meio de base científica sólida, a escolha da rolha mais adequada ao processamento de imunobiológicos liofilizados, melhorando a qualidade de sua produção.

Metodologia: Foram estabelecidas metodologias para estudar os seguintes parâmetros:

- . Nível de umidade adicionado às rolhas devido ao processo de esterilização a vapor, determinado a partir das perdas percentuais de umidade das rolhas antes e após a esterilização;
- . Nível de umidade adicionado às rolhas devido ao processo de liofilização, determinado a partir das perdas percentuais de umidade das rolhas antes e após a liofilização;
- . Estabilidade em tempo real (em andamento), acelerada e crítica – evolução da umidade residual do líofilo de vacina de lotes processados com diferentes tipos de rolhas - em função das condições de estocagem: temperatura de 2 a 8°C por 4 anos, 25°C por 6 meses, 40°C e 51°C, ambas por 48 horas;
- . Operacionalidade industrial - simulação comercial.

A umidade adicionada às rolhas devida aos processos de esterilização e de liofilização foi determinada por termogravimetria, a 105°C por 48h. Os lotes experimentais processados com diferentes tipos de rolhas foram produzidos em liofilizador piloto – Lyoflex 1.0 Edwards. A umidade residual desses lotes, estocados às temperaturas de 25°C, 40°C e 51°C, foi determinada por titulação coulométrica. Para o tratamento de dados e simulações computacionais utilizou-se Origin 8.6 Pro.

Resultado: A aplicação das metodologias revelou diferenças significativas de performance, seja das rolhas individualmente, seja de parâmetros de qualidade dos lotes de vacina Hib processados com diversos tipos de rolhas. As metodologias foram

adequadas para classificar as rolhas segundo o nível de umidade adicionado devido aos processos de esterilização e de liofilização e também para classificar qualitativamente os diversos lotes de vacina quanto à evolução da umidade residual em função das condições de estocagem. Além disso, foi possível avaliar os tipos de rolhas que se mostram viáveis de serem operadas nos equipamento da produção comercial.

Conclusão: Esse trabalho avaliou rolhas de diversos designs e fornecedores. A seleção da rolha mais adequada a um produto envolve avaliação de aspectos logísticos, de Produção e, sobretudo, aspectos da qualidade do produto, que são expressos através da estabilidade ao longo do tempo. Para Bio-Manguinhos, produtor de vacinas liofilizadas que precisam ser estáveis por longos períodos, interessa a rolha que, ao longo do tempo, libera a menor quantidade de umidade para o produto. Nesse trabalho, metodologias científicas foram estabelecidas para apontar as rolhas com essas características e assim, colaborar com as iniciativas internas que buscam constantemente a melhoria da qualidade dos produtos fornecidos por Bio-Manguinhos.

Resumos dos pôsteres

Biofármacos



ESTUDO DE COMPARABILIDADE DOS LOTES DE ALFAPEGINTERFERONA PRODUZIDOS EM ESCALA PILOTO E ESCALA INDUSTRIAL

Ana Carolina Magalhães Andrade de Góes¹; Lauro de Sena Laurentino²; Joyce Brito de Coelho²; Paulo Cesar Dick²; Dinorah Torres Idaody³; Rolando Paez Meireles³; e Nadia Maria Batoreu.¹

1-Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Laboratório de Tecnologia Recombinante/ Programa de Biofármacos; Brasil

2- Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Departamento de Controle de Qualidade; Brasil

3-Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia, Departamento de Desenvolvimento Tecnológico – CIGB; Cuba

Introdução: A hepatite C emergiu nas últimas décadas como uma das mais importantes causas de doença hepática crônica constituindo, atualmente, a principal indicação para transplante hepático. A verdadeira prevalência desta doença no mundo não é bem determinada. O tratamento da Hepatite C baseia-se no uso da alfainterferona associado a ribavirina, porém, esta citocina apresenta problemas que são intrínsecos das proteínas terapêuticas tais como: meia vida sanguínea curta, alta imunogenicidade, alta degradação. Para minimizar estes problemas, a alfainterferona passou por um melhoramento, que consiste em conjugar esta citocina ao polietileno glicol (peguilação). Esta conjugação proporciona uma melhora na farmacocinética da molécula e na eficácia da terapêutica. Outra vantagem obtida com este processo de conjugação é uma menor injúria do paciente, já que a alfapeginterferona é administrada apenas 1 vez por semana.

Objetivo: O referido trabalho tem por objetivo realizar um estudo de comparabilidade entre as diferentes escalas utilizadas no desenvolvimento de uma nova molécula de alfapeginterferona. Este projeto é uma parceria entre Bio-Manguinhos e o Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia, de Cuba.

Metodologia: A comparabilidade entre lotes foi feita utilizando os resultados obtidos no estudo de estabilidade acelerado e em tempo real realizado pelo Departamento de

Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos. Foram comparados lotes obtidos em escala piloto (1g) e em escala industrial (12g). Os primeiros lotes foram utilizados no Estudo Pré-Clínico e Estudo Clínico Fase I, enquanto que os da escala industrial serão utilizados no Estudo Clínico Fase II/III.

Resultados: Foram avaliados os seguintes parâmetros: concentração de proteína, homogeneidade por HPLC, atividade biológica, pureza por SDS-PAGE, caracterização de isômeros de posição, conteúdo de PEG total, porcentagem de PEG livre e identidade. Em nenhum dos parâmetros descritos acima foi observada variação significativa entre os resultados obtidos nas duas escala, tanto para IFA como para produto final. Vale lembrar que a escala industrial é 12x maior que a escala piloto.

Conclusão: Os resultados, apresentados neste trabalho, demonstram a comparabilidade entre as escalas utilizadas. Desta forma, o processo de escalonamento realizado na produção da alfapeginterferona não influenciou na qualidade e características do produto obtido para o Estudo Clínico Fase II/III.

COMPARAÇÃO FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DA ALFAPEGINTERFERONA 2A DE 40KDA E ALFAPEGINTERFERONA 2B DE 48KDA EM VOLUNTÁRIOS SADIOS

Paulo Dornelles Picon¹, Guilherme Becker Sander², Marisa Boff Costa³, Karine Medeiros Amaral³, Amanda Quevedo³, Indara Carmanim Saccilotto²

Instituições: (1)UFRGS, (2)HCPA, (3)Fundação Médica do RS

Introdução: O comportamento farmacocinético de uma molécula de fármaco de natureza proteica unida a uma estrutura química que pertence família do polietilenglicol produzida em Bio-Manguinhos (BIP48) é discutido neste estudo. O processo de peguilação consiste de um método de modificação da estrutura proteica com o propósito de minimizar as limitações que estão associadas às proteínas terapêuticas: retardar a absorção, reduzir o volume de distribuição e reduzir o clareamento do produto. A soma destes três fatores em conjunto a um incremento significativo no tempo de permanência da molécula no organismo justifica a possibilidade de administração semanal do produto.

Objetivo: Comparar o comportamento farmacocinético e farmacodinâmico da alfapeginterferona-2a de 40KDa (Pegasys[®]) e da alfapeginterferona-2b de 48KDa (BIP48).

Métodos: Realizou-se um estudo de fase I, aleatório, cruzado, duplo cego e unicêntrico incluindo 31 voluntários do sexo masculino, sadios, com idade entre 19 e 35 anos. O estudo foi realizado em duas etapas com duração de 14 dias consecutivos cada uma e com cinco semanas de “wash-out” entre cada administração subcutânea (180 µg de um dos produtos) na região deltóide. A variável principal foi a avaliação da concentração sérica de alfapeginterferona, determinada por ensaio imunoenzimático em 15 coletas durante o tempo do estudo. As variáveis de farmacodinâmica foram a \square -2 microglobulina, 2'5'-oligoadenilato sintetase, neopterinina e atividade antiviral em soro.

Resultados: Não foram observadas diferenças para as medidas de magnitude (C_{max} (p=0,318), $ASC_{(0-336)}$ (p=0,464) nem de absorção ($CAV_{(0-336)}$ (p=0,384), MIT (p=0,299). Os parâmetros farmacocinéticos de tempo apresentaram resultados significativamente maiores para a alfapeginterferona-2b (BIP48) em comparação a alfapeginterferona-2a

(Pegasys[®]) (T_{max} : 73 vs 54 horas ($p=0,0010$); $MRT_{(0-336)}$: 133 vs 115 horas ($p=0,0324$); K_e : 0.008 vs 0.009 horas⁽⁻¹⁾ ($p=0,0153$); $t_{1/2}$: 192 vs 118 horas ($p=0,0218$), respectivamente). Os resultados dos parâmetros farmacodinâmicos de magnitude apresentaram intensidade semelhante entre as alfapeginterferona para a variável atividade antiviral em soro ($P=0,584$). Quando estudamos a β -2 microglobulina e a neopterinina, a intensidade foi maior para o Pegasys[®]. O comportamento médio das determinações séricas basais e do aumento de neopterinina, β 2MG e 2'5'OAS apresentaram perfis semelhantes em comparações individuais, mas com maior magnitude de indução pelo Pegasys[®]. Observou-se que a atividade antiviral no pico máximo de concentração sérica foi similar para ambos os produtos e gerou o efeito biológico esperado.

Conclusões: A alfapeginterferona-2b(BIP48) apresentou os perfis farmacocinéticos de magnitude semelhantes aos da alfapeginterferona-2a e diferentes quanto aos parâmetros de tempo. Quanto ao perfil farmacodinâmico, concluiu-se, que a alfapeginterferona-2b (BIP48), induz atividade antiviral e ativa os genes suscetíveis ao interferon, mas com magnitude inferior ao produto referência.

ANÁLISE DE RISCO EM METODOLOGIA ANALÍTICA DE CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOFÁRMACO ALFAINTERFERONA 2B

Cleyton Lage Andrade¹, Elezer Monte Blanco Lemes¹,

1. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivos: Neste trabalho, nossa proposta foi estabelecer uma metodologia alternativa para o controle de qualidade do biofármaco IFN α -2b utilizando como metodologia a ferramenta de análise de risco, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP).

Métodos: A análise de produtos biotecnológicos baseia-se no uso de métodos analíticos sofisticados para demonstrar sua identidade estrutural, homogeneidade de proteínas e avaliar sua vida útil ou estabilidade. Embora não haja relatos de efeitos adversos para a saúde pelo DNA do hospedeiro no produto intermediário de produtos biotecnológicos, as agências regulatórias tem requerido às indústrias a garantia de que o nível de DNA neles seja o menor possível. A técnica comumente utilizada pelo CIGB para quantificar níveis de DNA é o dot-blot radioativo. No entanto, vários fatores tornam impraticável seu uso na rotina dos laboratórios analíticos: é trabalhoso, demorado, semi-quantitativo e requer um radioisótopo. Para determinar essas pequenas quantidades de DNA, um método analítico deve ser extremamente sensível e robusto. Em princípio, três técnicas têm a sensibilidade requerida: a hibridização, os métodos baseados em ligação de DNA e proteína (como o *Threshold*) e o PCR quantitativo. A Gestão de Riscos para Qualidade (GRQ) é um processo sistemático para avaliação, controle, comunicação e análise de riscos para a qualidade do produto (medicamento) em todo seu ciclo de vida. O gerenciamento de riscos auxilia na decisão, levando em consideração as incertezas, a possibilidade de circunstâncias ou eventos futuros e seus efeitos sobre os objetivos acordados. A GRQ apoia uma abordagem científica e prática para a tomada de decisões e podem avaliar e gerenciar riscos utilizando ferramentas próprias. A partir disso, foi escolhido o HACCP como ferramenta da GRQ para a avaliação dos riscos/perigos de cada abordagem escolhida para compará-las.

Resultados: Foram observados 25 perigos para o dot-blot nas oito etapas do ensaio, 14 perigos nas cinco etapas do qPCR e 19 perigos nas cinco etapas do *Threshold*. Vários desses perigos, nos respectivos ensaios, apresentam causas, efeitos, detecção e medidas de mitigação semelhantes. Verificou-se que o e dot-blot radioativo é o ensaio que apresenta maior número de pontos críticos de controle (PCC) devido a sua natureza radiativa, 16 no total. Logo após vem o qPCR com seis PCC em três etapas seguido do *Threshold* com cinco PCC estando quatro em uma única etapa, o que evidencia que a alta criticidade da etapa e que muitas medidas de mitigação precisam ser implementadas para que o ensaio esteja dentro dos padrões de controle de uso na rotina dos laboratórios.

Conclusão: A partir da análise dos perigos pelo uso do HACCP, concluiu-se que a metodologia analítica alternativa melhor avaliada para a questão proposta é o qPCR.

EFETIVIDADE DA ALFAINTERFERONA (+ RIBAVIRINA) NO TRATAMENTO DA HEPATITE VIRAL CRÔNICA C GENÓTIPOS 2 E 3 EM AMOSTRA BRASILEIRA

Candice Beatriz Treter Gonçalves¹, Karine Medeiros. Amaral¹, Guilherme Becker Sander³, Norberto Luis Campos Martins¹, Lisandra Pereira¹, Paulo Dornelles Picon²

(1) SES-RS, Porto Alegre, RS; (2)UFRGS, (3) HCPA

Estudos de farmacovigilância têm por objeto a detecção, avaliação, compreensão e prevenção dos riscos dos efeitos adversos dos medicamentos ou qualquer outro possível problema relacionado com medicamento. A alfainterferona (IFN) está sendo produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz e utilizada no tratamento da hepatite C crônica no âmbito do Sistema Único de Saúde (Sistema Único (SUS)).

Objetivo: O objetivo principal deste estudo foi conhecer o perfil de segurança e efetividade deste IFN em uma amostra de pacientes brasileiros com hepatite crônica pelo vírus C genótipos 2 e 3, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Metodologia: Trata-se de uma coorte de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C genótipos 2 e 3 tratados com IFN e ribavirina e acompanhados em um serviço ambulatorial especializado no sul do Brasil. Os eventos adversos foram coletados e classificados de acordo com a gravidade em entrevistas mensais estruturadas. Para medida de eficácia foi avaliada a carga viral do HCV antes, ao final e 24 semanas após o término do tratamento.

Resultados: Foram acompanhados 141 pacientes no período do estudo, sendo 52,5% do sexo feminino com média de idade de 52 anos. Os eventos adversos mais frequentes foram fadiga (84%), cefaléia (79%) e mialgia (75%). Ocorreram 13 interrupções de tratamento por eventos adversos, sendo nove destes considerados eventos adversos graves. A resposta virológica ao final do tratamento foi de 54,6% e 24 semanas após de 39,7%, considerando todos os pacientes que iniciaram o tratamento.

Conclusão: O produto produzido por Bio-Manguinhos possui eficácia e um perfil de eventos adversos e de resposta virológica sustentada comparáveis aos encontrados na literatura. Este foi o primeiro estudo de farmacovigilância realizado com o produto brasileiro. Estes dados serão úteis para planejamento e gestão do tratamento desta doença no Brasil.

FARMACOVIGILÂNCIA DA ALFAINTERFERONA 2B HUMANA RECOMBINANTE PRODUZIDA POR BIO-MANGUINHOS/FIOCRUZ, EM PORTADORES DE HEPATITE C CRÔNICA GENÓTIPOS 2 E 3

Vivian Rotman 1;2, Eliane Matos dos Santos 1, Deborah Araujo da Conceição 1, Vanessa dos Reis von Doellinger 1, João Luiz Pereira 3, Jorge André de Segadas Soares 2, Maria de Lourdes de Sousa Maia 1

Bio-Manguinhos/Fiocruz 1; HUCFF/UFRJ.2.; HFB 3

Introdução: Bio-Manguinhos(BIO) desenvolve e produz biofármacos, reativos e vacinas. Através de uma parceria com a Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos tornou-se um dos fornecedores de Alfa interferona 2b(α IFN2b) para o MS.

Objetivos: Complementar as informações acerca do perfil de efetividade/segurança da α IFN2b/BIO Conhecer a frequência de reações adversas relacionadas a α IFN2b/BIO.

Metodologia: Seguimento prospectivo de coorte não controlada de portadores de hepatite crônica C(HCV), genótipos 2 ou 3, virgens de tto, com indicação de uso de α IFN2b e ribavirina por 24 semanas (PCDT). Realizado de janeiro de 2009 a novembro de 2010, nos hospitais HFB e HUCFF-UFRJ, com inclusão de 85 voluntários. Os eventos adversos foram mensurados nas consultas médica e farmacêutica. Exames laboratoriais foram realizados e carga viral foi mensurada (PCR), para determinação da resposta virológica sustentada (RVS). Reações adversas à α IFN2b e RVS foram os desfechos de interesse.

Resultados e Discussão: Dos voluntários incluídos, 86% tinham idade >45 anos, 70% genótipo 3, 52% carga viral >600 mil pré-tratamento, 71% raça branca e 44% fibrose avançada (F3/F4). Realizadas 7 consultas mensais e uma última na semana 48 para avaliação da RVS. A adesão às consultas foi >95%. A adesão ao tto, definida como uso de >80% da α IFN2b prescrita, foi >90%. Quanto à reatogenicidade, os sintomas gerais foram os mais frequentes, seguidos pelos gastrointestinais, psíquicos e neurológicos. Valores de TSH >5 mcUI/mL foram encontrados em 17 pacientes (20%), sem necessidade de interrupção do tto. Não se observou valor de TSH <0,3 mcUI/mL. As medianas de Hb, leucócitos e plaquetas não variaram significativamente entre pré e pós-tratamento. Em 8 voluntários houve necessidade de uso de alfaepoetina. Um paciente

apresentou Hb < 7,0 g/dL, porém sem interrupção do tto, 3 apresentaram plaquetas < 50.000, com suspensão da alfa interferona em 2 e redução da dose em 1. Não houve valores de leucócitos < 1500/mm³. Perda de seguimento aconteceu com 9 voluntários (5 por internação, 1 abandono e 3 perda de contato). Dos 76 voluntários que completaram o tto, a taxa de resposta ao final do tto foi de 63% por protocolo e 57% por intenção de tto, sendo não avaliada em 5. A RVS foi de 54% por protocolo e 48% por intenção de tto. Não houve associação entre RVS e idade, raça, uso de drogas ilícitas ou álcool, fibrose avançada e carga viral pré-tratamento. A aproximação com a prática rotineira trouxe limitações. Kits de PCR quantitativo com diferentes pontos de corte foram utilizados, criando um possível viés de análise, mesmo com uso de fatores de correção. A RVS observada foi semelhante à de estudos brasileiros de vida real, com genótipo 2 e 3, mesmo com predomínio do genótipo 3 no presente estudo. **Conclusão:** A α IFN2b avaliada apresentou perfis de reatogenicidade e efetividade semelhantes aos descritos na literatura, confirmando sua efetividade no tratamento da hepatite C crônica (HCV - genótipos 2 e 3).

RETRATAMENTO COM ALFAPEGINTERFERONA DA HEPATITE C GENÓTIPOS 2 E 3 EM UM SERVIÇO DO SUS

²Simara Artico; ²Karine Medeiros Amaral; ²Candice Beatriz Treter Gonçalves; ^{1,2}Paulo Dornelles Picon

Instituições: ¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ²Centro de Monitorização de Medicamentos Injetáveis (CAMMI)-Hospital Sanatório Partenon

Objetivo: A hepatite Viral Crônica C tem sido reconhecida como um dos principais problemas em saúde pública, com grande impacto econômico e na qualidade de vida das populações. Estima-se que cerca de 3% da população mundial esteja cronicamente infectada por este agente viral. O vírus da hepatite C (HCV) constitui, atualmente, a principal causa de hepatite crônica e é uma importante causa de cirrose em todo mundo. Mais do que 50% dos pacientes infectados pelo HCV não respondem ao tratamento com interferon convencional (IFN) associado a ribavirina (RBV). O objetivo do nosso estudo foi avaliar a efetividade do retratamento com alfapeginterferona 2a ou 2b (PEG-IFN 2a ou 2b) concomitantemente com RBV, em pacientes com HCV, genótipo 2 e 3, que foram não-respondedores ou recidivantes ao primeiro tratamento convencional com IFN/RBV e identificar possíveis fatores preditivos de resposta virológica sustentada (RVS).

Metodologia: No período de setembro de 2003 a março de 2009 uma coorte de 216 pacientes portadores de hepatite C foram acompanhados em um serviço especializado, implementado no Sistema Único de Saúde-Rio Grande do Sul/Brasil. Todos os pacientes foram retratados com PEG-IFN 2a ou 2b, na dose de 180 mcg ou 1,5 mcg/Kg de peso corporal por semana, respectivamente, associado a RBV na dose de 1.000-1.250 mg/dia por 48 semanas. O HCV-RNA foi testado por Polymerase Chain Reaction (PCR) nas semanas 12 (por PCR quantitativo), 48 e 72 (por PCR qualitativo). A resposta virológica (RV) nas 48 semanas e a RVS nas 72 semanas foram considerados para avaliação de eficácia do tratamento. As análises foram realizadas nos pacientes que receberam pelo menos 1 dose de PEG-IFN 2a ou 2b.

Resultados: A taxa de RVS para os pacientes não-respondedores ao primeiro tratamento foi de 34,4% e para os recidivantes foi de 50% (P=0,031) através do teste exato de Fisher. Foram identificados como fatores preditivos que contribuem na

melhora da RVS, a idade ($P=0,005$), ser recidivante ao tratamento anterior ($P=0,023$) e apresentar exame de biópsia hepática Metavir F0-F2 ($P=0,004$), os demais fatores avaliados não demonstraram diferença estatística significativa. Na avaliação do perfil de segurança 51 pacientes (23,6%) interromperam precocemente o tratamento. Destes, 18,5% por eventos adversos onde os mais frequentes foram anormalidades laboratoriais (40%), óbito (20%) e cirrose descompensada (17,5%).

Conclusão: Este é o primeiro estudo pragmático realizado no cenário da realidade do SUS brasileiro que avalia a efetividade do retratamento com PEG-IFN 2a ou 2b e RBV. Esta alternativa de retratamento para pacientes que falharam à terapias prévias anti-HCV, tem demonstrado uma promissora taxa de RVS, desde que seja feita uma seleção cuidadosa dos pacientes com fatores preditivos de resposta e monitorizados os eventos adversos.

OPTIMIZATION OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY BY SIZE EXCLUSION AND REVERSED PHASE FOR HOMOGENEITY ANALYSIS OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Ingrid Pinheiro de Medeiros¹, Hilton Jorge do Nascimento¹, Eduardo da Silva Gomes¹, Melissa Chamon Alves Premazzi¹, Jaline Coutinho Silvério¹, Erica Louro da Fonseca¹, Daniel da Silva Guedes Jr.¹

1. Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Quality Control, Rio de Janeiro, Brazil.

Objectives

Among the chromatographic methods advocated by the European Pharmacopoeia (E.P.) for the analysis of homogeneity of Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) stands the High Performance Liquid Chromatography by Size Exclusion (SEC-HPLC) and High Performance Liquid Chromatography by Reversed Phase (RP-HPLC). The aim of this study was to standardize and optimize the chromatographic methods in order to determine the purity, the presence of aggregates and the degradation products of rhEPO.

Methods

In accordance with E.P. some parameters were adjusted such as: analytical column, flow, eluents and gradient elution. For SEC-HPLC analysis of the rhEPO's candidate reference material (cMR) was used analytical column TSK Gel G2500 and for RP-HPLC analysis was used analytical column Vydac C8 and Bakerbond WP octadecyl with a flow of 1.0 $\mu\text{L}/\text{min}$, injection volume 100 μL , pressure limit 10 mPa and detection at 220nm and 280nm. The analysis was performed with different concentrations of cMR and the results compared to BRP (Biological Reference Preparation of E.P.).

Results

The samples presented a single chromatographic peak with retention time and area equivalent between replicas of cMR and BRP. The area increases with the concentration of the sample, it is possible to set the limit of quantification and detection. Analysis was

performed in less time compared to what is described by E.P. The integration of chromatographic peaks of the samples demonstrates purity percentage specifications as the E.P.

Conclusion

The standard and optimized techniques demonstrated to be effective and reproducible for purity and aggregates analysis, as well as to confirm the stability of rhEPO. Thus, such methods to be implemented in Quality Control routine of Bio-Manguinhos/Fiocruz, will enable a proper analysis of the rhEPO concentrated solution as its homogeneity and physicochemical characterization.

STANDARDIZATION AND OPTIMIZATION OF ELECTROPHORETIC METHODS FOR THE ANALYSIS OF HOMOGENEITY AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN

Ingrid Pinheiro de Medeiros¹, Camila Faia de Sá¹, Marisa de Oliveira Ribeiro¹, Joyce Brito C. Coelho¹, Alessandra Paes S. Cruz¹, Katherine Antunes de Mattos, Daniel da Silva Guedes Jr.¹

- ¹. Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Quality Control, Rio de Janeiro, Brazil.

Objectives

Like other glycosylated proteins, the rhEPO comprises a mixture of isoforms related to the degree of glycosylation and the presence of sialic acid, influencing the electrophoretic mobility and isoelectric point (pI) of the molecule. The aim of this study was to standardize the distribution of rhEPO isoforms and analyzing the homogeneity by isoelectric focusing polyacrylamide gel (IEF-PAGE), zone capillary electrophoresis (ZCE) and electrophoresis denaturing polyacrylamide gel (SDS-PAGE) seeking the quality control of biopharmaceuticals in Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Methods

For this study, we used rhEPO's Reference Material candidate (cMR), and Biological Reference Preparation (BRP) of the European Pharmacopoeia (E.P.). It was used for IEF-PAGE the equipment PhastSystem with PhastGel dry with a combination of ampholytes which generates an acid pH gradient, using 4 μ g of desalted rhEPO and staining with silver nitrate. The CZE analysis was performed using the parameters described in the methodology proposed by the E.P. and certain parameters were adjusted such as temperature, pressure, injection time and concentration of the sample to obtain an electropherogram with high resolution. SDS-PAGE was used to identify and

confirm homogeneity of rhEPO by its molecular weight (MW) using polyacrylamide gel 12.5% and coomassie blue staining.

Results

In IEF-PAGE it has been evidenced the presence of eight major isoforms, and the estimated pI indicated mean values: 6.43 and 4.12. The percentage of each isoform of the samples was calculated and compared to the limit set by E.P. with concordance of results between the replicas. Since established the conditions for CZE analysis results were reproducible and the technique showed sensitivity and reproducibility for the analysis of isoforms of rhEPO demonstrated by high resolution electropherograms with 8 isoforms. The percentage of each isoform is within specifications and the results were homogeneous among the samples analyzed. The SDS-PAGE showed as a robust methodology with excellent reproducibility. The samples are homogeneous and the average MW 34kDa was found according to specifications of the E.P. and the literature.

Conclusion

Methods based on separation by difference in liquid load and molecular weight standard and optimized in this study will enable a proper analysis of the concentrated solution of rhEPO as its homogeneity and physicochemical characterization by Quality Control in Bio-Manguinhos/Fiocruz.

EVALUATION OF A CANDIDATE NATIONAL STANDARD FOR RECOMBINANT HUMAN ERYTHROPOIETIN BY UPLC/HDMS^E

Anna Carolina Machado Marinho¹, Claudia Maria da Conceição², Filipe Soares Quirino da Silva², Ozéias de Lima Leitão²

¹Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. ²National Institute for Quality Control in Health, Laboratory of biological and articles on health supplies, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

Objective: Recombinant human Erythropoietin (rh-EPO), a 34 kDa glycoprotein, is the most used biopharmaceuticals in the world. In this work, from a candidate national standard developed for rh-EPO a methodology was established to evaluate impurities and to elucidate the structure of peptides in protein digests by UPLC/HDMS^E.

Methods: Peptide mapping and intact protein analysis were performed. For peptide mapping specificity and selectivity were increased based on the active ion mobility separation by T-wave device inside the mass spectrometer in positive ion mode with electrospray ionization and UPLC configured with HSS T3 column, flow rate: 800 uL/min, column temperature: 60°C mobile phase A: 0.1% formic acid in water, B: 0.1% formic acid in acetonitrile. The batch was digested trypsin after reduction and alkylation. Reduced protein was injected using Massprep Intact protein analysis kit. For intact protein analysis was performed using micro desalting column and 1,5 ug injected. The data was processed using Biopharmalynx software to confirm the protein sequence.

Results: The raw spectrum of rh-EPO tryptic peptides was processed and 99,4 % rh-EPO sequence was verified. The deconvoluted mass spectrum is showed for intact protein analysis and information on heterogeneity was measured. The glycosylation sites were also identified in N-linked N24, N38 and N83 and O-linked S126 which is in agreement with the literature.

Conclusion: It was demonstrated that candidate could be used as national standard for rh-EPO final product and peptide mapping identification. The characterization of rh-EPO peptide maps was showed with high sequence coverage and was successful

identified in the batch. The results clearly show the benefits in terms of software and data analysis by mass spectrometry and UPLC to sequence confirmation and post translational modification.

COMPARAÇÃO DE EFICÁCIA E SEGURANÇA DA ALFAEPOETINA DE BIO-MANGUINHOS COM UMA ALFAEPOETINA BIOSSIMILAR: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Paulo D. Picon^{1,2,3}, Suzane Cristina Milech Pribbernow², Carlos Alberto Prompt^{1,2}, Amanda Quevedo², Veronica Verleine Horbe Antunes², Bianca Paula Mentz², Fernando Comunello Schacher²

Instituições: 1-UFRGS, 2-HCPA, 3-SES-RS

Introdução: A anemia é uma complicação comum em pacientes com doença renal crônica (DRC) em hemodiálise e decorre principalmente da deficiência de eritropoetina. No Brasil, o tratamento com alfaeopetina é oferecido gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde e utilizado por cerca de 90% da população de pacientes em tratamento com hemodiálise. Desde o segundo semestre do ano de 2006 o Laboratório Bio-Manguinhos (FioCruz, Ministério da Saúde) produz a alfaeopetina que vem sendo dispensada, no Brasil, aos pacientes portadores de DRC.

Objetivo: avaliar a eficácia e segurança da alfaeopetina produzida pelo laboratório Bio-Manguinhos em relação a uma biosimilar anteriormente dispensada pelas secretarias estaduais e municipais de saúde. **Material e Métodos:** ensaio clínico, randomizado e duplo-cego em pacientes adultos em hemodiálise, alocados para dois grupos que receberam ou alfaeopetina produzida por Biomanguinhos-FioCruz ou alfaeopetina Blaussigel® por um período de seis meses, assumindo o pressuposto da equivalência entre ambos os produtos. Todos os pacientes foram avaliados mensalmente pelos médicos participantes do estudo, os resultados dos seus exames revisados e a dose de alfaeopetina ajustada com o objetivo de manter a hemoglobina entre 11 e 12 g%. Segurança foi avaliada por eventos adversos e perfil laboratorial. O desfecho de interesse foi o nível de hemoglobina e sua variação ao longo do tempo nos dois grupos.

Resultados: 86 pacientes foram triados, tendo sido 74 randomizados, 36 e 38, respectivamente nos grupos que receberam alfaeopetina Bio-Manguinhos (EPO Bio-Manguinhos) e alfaeopetina biosimilar (EPO-Biosimilar). No *baseline* e nos 6 meses do estudo os dois grupos experimentais apresentaram similaridade em todos os parâmetros estudados (níveis séricos de hemoglobina, ferritina, ferro, índice de redução de uréia

(URR) e hormônio paratireoideo, dose de epoetina UI/kg, potássio sérico, proporção de diabetes melito). A taxa de eventos adversos foi semelhante nos 2 grupos.

Conclusões: A alfaepoetina humana recombinante produzida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz/MS) mostrou eficácia e segurança similar à da Blausigel, em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise.

PHARMACOVIGILANCE OF BIOTECHNOLOGICAL THERAPIES: HOW BIO-MANGUINHOS HAS BEEN PREPARING ITSELF FOR THE CHALLENGES THAT HAVE ARISEN?

Paulo Roberto Gomes dos Santos¹, Patrícia Mouta Nunes de Oliveira¹, Hugo Garcia Tonioli Defendi¹, Maria de Lourdes de Sousa Maia¹, Maria da Luz Fernandes Leal¹

1 - The Immunological Technology Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Ministry of Health, Rio de Janeiro, Brazil

Objectives: To evaluate the current methods and propose new approaches for optimize the efficacy and safety assessment system, envisioning debates and partnerships for the development of the pharmacovigilance activities on account of the specificities of the biopharmaceuticals.

Methods: Considering the incorporation of drugs to the institute portfolio by “Partnerships for Productive Development (PDPs)” and its commitment with innovation, quality, efficacy and safety, also the Brazilian, European and North American present regulations and initiative projects, a situational analysis of the pharmacovigilance activities have been developed. The current assessment methods for products that have been marketed since 2004 (epoetin alfa and interferon alfa-2b) have been indicated. Confronting these, most adequate methodologies for the products that will be launched on the following years (growth factors, monoclonal antibodies and pegylated molecules) have been sought.

Results: As expected, post-authorisation efficacy and safety studies of paramount importance for public health have been conducted for validating signals from spontaneous reports and active surveillance programs by bibliographic and clinical research. Nevertheless, while Bio-Manguinhos has been leading original and follow-on biologics joint development and technology transfer processes, given the nature of the new products, it has been found that the use of existing practices would not be sufficiently effective for detecting adverse events, and thus minimizing risks. Breaking out of paradigm and invest in new pharmacovigilance approaches is essential before the regulatory requirements and the public opinion about follow-on biologics. The most

proactive and cost effective strategies should be included on the pharmacovigilance activities. Especially the ones that approach the industries to the opinion former professionals based in health education, research and service institutions. For instance, long-term drug utilisation studies, intensive monitoring schemes, prescription event monitoring, registries and sentinel system that should be placed in a collaborative partnership.

Conclusion: In order to attend the increasing demand of the Ministry of Health, guaranteeing non-charged access of the Brazilian population to effective and safe drugs, including cutting edge biotechnological therapies; and alongside this, overcome the challenges that have arisen, such as the establishment of higher regulatory standards for post-authorisation monitoring in due to the concern regarding the risk-benefit balance of biologics and biosimilars; and their acceptance by the organized civil society and scientific community in replacement of known brands that have been sold for more than a decade in the pharmaceutical market, the Pharmacovigilance team at Bio-Manguinhos have been properly preparing themselves for assuring the efficacy and safety of the biopharmaceutical therapies.

IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF SOMATHROPIN MODIFICATIONS BY PEPTIDE MAPPING WITH UPLC/HDMS^E

Claudia Maria da Conceição¹, Filipe Soares Quirino da Silva¹, Ozéias de Lima Leitão¹, Anna Carolina Machado Marinho²

¹National Institute for Quality Control in Health, Laboratory of biological and articles on health supplies, Oswaldo Cruz Foudation, Rio de Janeiro, Brazil. ²Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foudation, Rio de Janeiro, Brazil.

Objective: Somathropin is part of an important class of biopharmaceutical product. This product is subject to a variety of covalent modifications that could be occur during manufacturing, formulation and storage. In this work was developed a new methodology for identification and quantification of covalent modifications, by UPLC/HDMS^E.

Methods: We developed a methodology based peptide mapping for detection of covalent modifications and characterization of intact somathropin without enzymatic degradation. The somathropin sample and standard were digested with enzyme trypsin after reduction with dithiothreitol and alkylation with iodocetamide. The resulting peptide mixture was separated using ultra performance liquid chromatography (UPLC) system using C₁₈ column, with a mobile phase A 0,1% formic acid in water and mobile phase B 0,1% formic acid in acetonitrile. A gradient elution was employed with flow was set at 600µL/min. and detection using high definition mass spectrometry (HDMS) with electrospray ionization on a UPLC/HDMS^E system. Freshly prepared tryptic digest (10 pmol) was injected for the UPLC/HDMS^E analysis. The analysis was repeated three times. The acquired data were processed by Biopharmalynx Software. The processed data were first searched against a somathropin database with trypsin specificity and one potential miscleavage. N-deamidation, M-oxidation, N-terminal acetylation and C-carbbamidomethylation were allowed as variable modifications. The solution of somathropin (1mg/mL) was infused into the source region of the MS for the intact analysis.

Results: The HDMS^E data were searched against a truncated database containg only somathropin sequence. The somathropin sequence coverage was 100%. The modification type, site and stoichiometry as well as retetion time of identified modified

peptides are presented. The relative quantification of modified peptides calculated from HDMS^E signal intensity shows that one methionine was change for cistyne. The spectrum of intact somathropin was showed to identify the protein and is possible to observe that impurities were detected.

Conclusion: The results presented here demonstrate with successfully the characterization of somathropin peptide maps with high sequence coverage and application of UPLC/HDMS^E . The Acquity UPLC and Synapt MS^E system meets requirements for robust and flexible methods that are needed to monitor safety and stability of bi biopharmaceutical protein. This method is potentially applicable for the quality control for somathropin during final product.

CONSTRUÇÃO DE VETORES LENTIVIRAIS PARA MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO $DD3^{PCA3}$ EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA

Ana Emília Goulart^{1,2}; Luciana Ferreira Bueno²; Nadia Maria Batoreu¹; Martin Hernan Bonamino² e Etel Rodrigues Pereira Gimba^{2,3}.

1-Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Laboratório de Tecnologia Recombinante/ Programa de Biofármacos

2-Instituto Nacional de Câncer, Centro de Pesquisa, Programa de Carcinogênese Molecular

3-Pólo Universitário de Rio das Ostras - Universidade Federal Fluminense, Departamento Interdisciplinar

Objetivo: O estudo proposto tem como objetivo construir vetores lentivirais que modulem a expressão do RNA não codificante $DD3^{PCA3}$ em células de câncer de próstata (CaP) visando testá-lo como potencial alvo terapêutico para esta neoplasia.

Metodologia: Foram construídos vetores lentivirais não indutíveis pLVTHM contendo duas sequências shRNA complementares ao transcrito $DD3^{PCA3}$ (cuja expressão é específica em tecidos prostáticos). Células LNCaP (que expressam o $DD3^{PCA3}$ em altos níveis) foram transduzidas com os vetores lentivirais contendo os shRNA. Estudos funcionais *in vitro* (viabilidade celular, frequência de células GFP+, nível de expressão de RNAm por PCR em tempo real) foram realizados para avaliar o possível efeito da diminuição da expressão do $DD3^{PCA3}$ induzida pela interferência com os shRNAs. Os efeitos específicos da ação do shRNA do $DD3^{PCA3}$ foram determinados ao comparar com os efeitos promovidos em células não transduzidas, células transduzidas com vetores contendo sequências inespecíficas de shRNA (*scrambles*) ou com o vetor vazio (sem sequência de shRNA clonada). Atualmente, estamos construindo vetores lentivirais indutíveis controlados por doxíciclina denominados pInducer 11 e pInducer 13 contendo uma sequência shRNA complementares ao $DD3^{PCA3}$ e uma sequência inespecífica de shRNA (*scramble*).

Resultados: A transdução de células LNCaP com os lentivírus não indutíveis gerados mostrou-se eficiente, com elevado percentual de células GFP positivas na leitura por

citometria de Fluxo (cerca de 80%). Foi observada uma diminuição de até 60% no percentual de células GFP positivas transduzidas com uma das sequências de shRNA específica para *DD3^{PCA3}*. O nível de expressão do *DD3^{PCA3}* diminuiu em até 70% quando comparado com células controle não transduzidas com vetores virais. Do mesmo modo, foi possível observar a diminuição da viabilidade das células transduzidas com uma das sequências de shRNA específica para *DD3^{PCA3}*.

Conclusão: Os resultados supracitados sugerem que a expressão da sequência de shRNA específica para *DD3^{PCA3}* induz as células LNCaP à morte.

IDENTIFICAÇÃO DE NÓS PARA APLICAÇÃO DA FERRAMENTA DE ANÁLISE DE RISCO HAZOP EM SISTEMAS DE BIORREAÇÃO

Miguel Angel de la O Herrera¹, Elezer Monte Blanco Lemes¹, Antonio Carlos Augusto da Costa², Aderval Severino Luna².

1. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Instituto de Química, Universidade Do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivo: Este trabalho foi realizado com o intuito de traçar as estratégias e critérios na seleção dos nós (falhas) para aplicação da ferramenta qualitativa de análise de risco HAZOP, considerando como caso de estudo um sistema de biorreação bacteriana para produção de proteínas recombinantes.

Metodologia: Para aplicação da metodologia da análise de risco HAZOP foram utilizados como base os diagramas de tubulação e instrumentação (P&ID) do equipamento. A identificação dos nós utilizou os critérios de seleção como: ocorrência de mudança de estado ou composição, grandes equipamentos separados com parâmetros de processo distintos, interfaces com outros sistemas que possam interferir com o sistema em estudo, linhas e equipamentos relacionados aos maiores inventários de produtos perigosos, reatores, caldeiras e fornos, trocadores de calor, equipamentos sujeitos à pressurização excessiva, interfaces com sistemas de gases tóxicos. Posteriormente foram agrupados os nós com funções equivalentes ou nos que quando houver falha o resultado desta seria similar, esse critério é fundamentado na premissa que os sistemas de biorreação são altamente complexos e constam de um grande numero de linhas de entrada e saída de materiais, utilidades e produtos, além de contar com diferentes acessórios e equipamentos dentro do mesmo sistema. A seguinte etapa consistiu em determinar o nível de risco dos desvios utilizando uma matriz de risco e foram classificados como: insignificantes, aceitáveis, não desejáveis e não aceitáveis. Por ultimo foram definidas as medidas de mitigação ou redução do nível de risco.

Resultados: Foram identificados cinco nós no sistema de biorreação. O primeiro nó foi definido como distribuição de utilidades constituída pelas linhas de água para injeção,

água purificada, vapor puro e solução para sanitização e apresentou níveis de risco dos desvios como aceitáveis. O segundo nó das linhas de transferência de soluções necessárias durante o processo de biorreação, manteve o nível de risco dos desvios como aceitáveis. O terceiro nó foi definido como o sistema de trocadores de calor e mostrou níveis de risco aceitáveis e não desejáveis. O quarto nó que foi caracterizado como sistema de filtração de gases de processo e de exaustão apresentou um nível de risco aceitável. O quinto nó identificado como o tanque de processo incluindo as entradas e saídas mostrou um nível de risco de desvios insignificantes e aceitáveis.

Conclusões: O presente trabalho evidenciou que a utilização da ferramenta de análise de risco HAZOP para um sistema novo de biorreação, não substitui o processo de qualificação do equipamento, porém ajuda a promover a aquisição de conhecimentos do equipamento e instalações que serão utilizados posteriormente e assim darão suporte durante a avaliação dos pontos críticos que são o foco de atenção dos procedimentos de Qualificação de Instalação e Qualificação de Operação do sistema exigido pelos órgãos reguladores da área.

UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS DE ANIMAÇÃO DIGITAL PARA SIMULAÇÃO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Miguel Angel de la O Herrera¹, Elezer Monte Blanco Lemes¹

1. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivo: Este trabalho teve como objetivo a criação de um ambiente virtual de uma planta industrial para produção de proteínas recombinantes utilizando como ferramentas a modelagem e simulação digital com o propósito de facilitar o treinamento do pessoal envolvido nos processos de manufatura e favorecer a imagem institucional dos visitantes na unidade.

Metodologia: A metodologia utilizada durante a elaboração dos modelos em 3d e na simulação do processo baseou-se na coleta e análise dos diagramas de tubulação e instrumentação (P&ID) dos equipamentos nas etapas do processo, da mesma forma foram utilizados os manuais e especificações técnicas fornecidas pelos fabricantes bem como fotografias de equipamentos já existentes dentro da unidade. As salas do processo (áreas físicas) foram desenhadas seguindo as dimensões exatas relatadas nos *layouts* de arquitetura. Também foram coletadas as informações do processo através de fluxos do processo, procedimentos operacionais padrão (POPs) e experiência do pessoal técnico com conhecimento específico das áreas. Para a modelagem e simulação foram utilizadas as ferramentas de cômputo *Cinema 4d Studio* da *MAXON* para modelagem de equipamentos complexos do processo, por exemplo: HPLC, Sistemas Cromatográficos, Sistema de Biorreação, Centrifugas Tubulares, entre outros, o *3d studio Max* da *Autodesk* foi aplicado com o intuito de detalhar os modelos elaborados e aplicar texturas de alta resolução, já o *Autocad* da *Autodesk* serviu como base para representar as dimensões e medidas arquitetônicas exatas do prédio produtivo.

Resultados: O trabalho foi submetido num processamento digital (*rendering*) gerando a animação digital (vídeo) da área produtiva para proteínas recombinantes mostrando todos os equipamentos utilizados na produção assim como o fluxo do processo. Este material apresenta as operações de multiplicação bacteriana, a etapa de biorreação e recuperação do produto, a ruptura e lavagem dos corpos de inclusão, as etapas de

purificação, filtração esterilizante e áreas de serviços como controle em processo, lavagem e montagem de materiais e preparo de meios e soluções. A partir da modelagem das áreas foi identificada a necessidade de modificar o *layout* da sala de controle em processo, especificamente na distribuição dos equipamentos e divisórias na planta proposta dado que originalmente esta não atendia os requerimentos do processo e limitava o espaço necessário para efetuar as operações.

Conclusões: A criação do vídeo do passeio virtual dentro da área produtiva permitiu acrescentar o conhecimento do processo e facilitou a identificação de pontos de melhoria contínua tanto da estrutura do processo como das atividades realizadas durante a rotina.

Foi demonstrado que modelagem e simulação virtual do processo é uma ferramenta fundamental para melhorar a percepção do espaço real disponível para realizar as operações dos processos biotecnológicos principalmente em fase de projeto e também para o desenvolvimento de estratégias para organização dos equipamentos e arranjo no layout das salas procurando otimizar o ambiente produtivo.

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA DE EXPRESSÃO EM PLATAFORMA DE CÉLULA EUCARIOTA PARA A PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS RECOMBINANTES

Luis Vidal Conde¹, Anna Erika Vieira de Araújo¹, Lucas de Almeida Machado¹, Priscila Muniz da Paz², Hilton Jorge Nascimento², Jose Godinho da Silva Junior², José Procópio Moreno Senna¹.¹

Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos, Vice-diretoria de Desenvolvimento Tecnológico (VDTEC), Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER), Programa de Biofármacos. ²Laboratório de Macromoléculas (LAMAM).

INTRODUÇÃO: A tecnologia de hibridomas (Köhler e Milstein, 1975) foi muito utilizada nas últimas décadas para produzir anticorpos monoclonais (AcMs) a partir de clones originados da fusão entre células B murinas e células de mieloma. Porém, esta técnica apresenta limitações para a produção de AcMs para uso terapêutico, principalmente pela resposta imune do hospedeiro contra as imunoglobulinas murinas. Uma alternativa consiste em produzir anticorpos recombinantes (quimeras ou humanizados) em células eucariotas. Para o estabelecimento deste sistema, utilizou-se como modelo um anticorpo monoclonal capaz de reconhecer e neutralizar cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA).

OBJETIVO: Desenvolver um sistema de expressão de anticorpos monoclonais recombinantes em plataforma de célula eucariota empregando como modelo anticorpos monoclonais anti-MRSA.

METODOLOGIA: A partir do RNA de um hibridoma murino produtor de anticorpo anti-MRSA (desenvolvido previamente no laboratório), foram sintetizadas as sequências de DNA codificante das regiões variáveis de IgG (VHH -*variable heavy chain* e VLH - *variable light chain*). As sequências foram clonadas em plasmídeos (pAG4622 e pAH4604) que permitem expressar as regiões variáveis clonadas junto com regiões constantes de IgG₁, sob o controle de um promotor de cadeia pesada murino. Células de mieloma murino (NS0) foram transfectadas por eletroporação e semeadas em placas de 96 poços, dentre os quais foram selecionados os poços com colônias únicas e resistentes a altas concentrações de L-histidinol. Os clones com maior concentração de IgG₁ (ELISA) nos sobrenadantes de cultivos foram selecionados para gerar um banco

celular de trabalho e posteriormente re-avaliados em garrafas T25 (batelada simples) usando meio DMEM LG/F12 10 % SFB para seleção do melhor clone produtor de IgG₁. A afinidade do anticorpo pela bactéria foi avaliada por ensaio do tipo ELISA indireto. O anticorpo foi purificado a partir de sobrenadantes de cultivo em sistemas estáticos T175 por cromatografia de afinidade à proteína A (MabSelectSure™ - GE) e concentrado por unidades filtrantes Amicon® MWCO 10 kDa. Amostras de anticorpo purificado foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e focalização isoeletrica (IEF – PAGE).

RESULTADOS: Foram analisados 60 clones com colônia única e resistentes a L-histidinol, dos quais 10 apresentaram títulos de IgG₁ acima de 100 ng mL⁻¹. Todos os clones apresentaram afinidade pelo alvo, entre estes se selecionou o melhor clone produtor (K4F2) com título de IgG₁ de 3422 ± 717 ng mL⁻¹. O anticorpo purificado apresentou um peso molecular de 149 kDa e 2 isoformas com pIs 8,64 e 8,57.

CONCLUSÃO: O sistema de expressão empregando célula eucariota possibilitou obter um clone NS0 produtor de anticorpo anti-MRSA em sistemas estáticos e purificá-lo por cromatografia de afinidade. O anticorpo demonstrou ter afinidade pela proteína alvo o que permitirá avaliar a eficácia terapêutica em ensaios de neutralização *in vivo* e *in vitro*.

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ASPARAGINASE II DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE CLONADA EM PICHIA PASTORIS: ESTUDO DE UM POSSÍVEL FÁRMACO ANTILEUCÊMICO

Luciana Facchinetti de Castro Girão^{1,2,*}, Surza Lucia Gonçalves da Rocha², Ricardo Sobral Teixeira¹, Maria Antonieta Ferrara³, Jonas Perales², Elba Pinto da Silva Bon^{1,*}

¹Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

²Laboratório de Toxinologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

³Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil

Introdução: Asparaginases bacterianas oriundas de *Escherichia coli* e *Erwinia chrysanthemi* são utilizadas como medicamentos para tratamento de leucemia linfocítica aguda e linfomas não Hodgkin. Apesar das propriedades terapêuticas destas enzimas, reações adversas têm sido relatadas: por vezes tão severas que impossibilitam a utilização destes medicamentos por alguns pacientes. Além disso, o único medicamento que o Brasil importava parou de ser produzido. Tendo em vista esses dois aspectos, propôs-se a produção de asparaginase de fonte não bacteriana.

Objetivo: Purificar e caracterizar a asparaginase II de *Saccharomyces cerevisiae* clonada e expressa em *Pichia pastoris* visando à produção de um fármaco antileucêmico.

Metodologia: A metodologia estabelecida para a purificação da asparaginase recombinante envolveu três etapas: ultrafiltração em membrana Amicon de 50 kDa, cromatografia de exclusão molecular em coluna Superdex200 e cromatografia de troca aniônica em coluna Mono-Q. A homogeneidade foi confirmada através de SDS-PAGE em condições redutoras e por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF; a atividade enzimática foi determinada pela reação de hidroxilaminólise. O ponto isoelétrico foi estimado por eletroforese bidimensional e a massa molecular foi determinada utilizando SDS-PAGE 12% e cromatografia de exclusão molecular. A porção glicídica da asparaginase recombinante em sua forma homogênea foi analisada através de SDS-PAGE 12% em condições redutoras, seguido de coloração pela técnica de ácido periódico/reagente de Schiff. Além disso, realizamos a clivagem enzimática dos glicídios N-ligados com PNGase F à 37 °C por 3 horas, seguido de análise por SDS-

PAGE. Caracterizou-se o pH e a temperatura ótima da enzima por reação de hidroxiaminólise em diferentes valores de pH e temperatura.

Resultados: A fração homogênea oriunda da troca aniônica apresentou atividade específica de 204 UI mg⁻¹, representando um grau de purificação de 10,9 vezes e uma recuperação de atividade de 51,3 % em relação ao extrato bruto. Após eletroforese, observamos a presença de duas bandas, com massa molecular estimada em 48 e 46 kDa respectivamente. Após análise por espectrometria de massas, verificamos que estas bandas correspondem à enzima asparaginase II de *S. cerevisiae*. As duas bandas apresentaram coloração positiva para glicosilação. A massa molecular da enzima nativa foi estimada em 136 kDa, sugerindo que a enzima é um oligômero. No entanto, foram observados dois valores de pH ótimo em 7,2 e 9,0. Após clivagem enzimática dos glicídios por PNGase F, as duas bandas migraram como uma única banda em SDS-PAGE, indicando que a principal diferença entre elas é o grau de glicosilação. O ponto isoelétrico foi estimado em aproximadamente 4,55 utilizando o programa de análise de imagens ImageMaster (GE Healthcare).

Conclusão: Os resultados obtidos dão suporte à continuação da pesquisa visando o uso da asparaginase de levedura recombinante como medicamento antileucêmico, já tendo sido iniciados os estudos pré-clínicos *in vitro*.

AVALIAÇÃO DE UMA FRAÇÃO PROTEICA DE 38 A 40 KDA ISOLADA DE ACINETOBACTER BAUMANNII, COMO ALVO PARA IMUNOTERAPIA

Lucas de Almeida Machado¹, Renata Fajardo Bonin¹, Anna Érika Vieira de Araujo¹, José Procópio Moreno Senna¹,

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

INTRODUÇÃO: *Acinetobacter baumannii* é um importante patógeno oportunista no mundo, com alta incidência em unidades de tratamento intensivo, acometendo principalmente pacientes imunossuprimidos. Este patógeno vem apresentando resistência aos antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenens, perfil que se mostra presente em 15 a 25% dos isolados no Brasil, o que dificulta a terapêutica, abrindo espaço para alternativas como a imunoterapia.

OBJETIVOS: Em trabalho anterior realizado por nosso grupo, foi identificada uma proteína com massa de 38 a 40 kDa com potencial imunogênico, presente em processos infecciosos causados por este patógeno. Neste trabalho, realizamos ensaios de imunização em modelo murino com a utilização da fração proteica de 38 a 40 kDa de *A. baumannii*, avaliando a proteção gerada pela imunização, os anticorpos gerados e sua capacidade de neutralizar o crescimento bacteriano *in vitro*.

METODOLOGIA: Para a obtenção das proteínas, foram preparadas culturas de *A. baumannii* em caldo de Luria-Bertani suplementado com ampicilina. Estas foram centrifugadas e os *pellets* submetidos à eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida. Após a eletroforese, a banda de interesse (38-40kDa) foi recortada e submetida à eletroeluição. As proteínas foram precipitadas pela adição de acetona e quantificadas pelo método de Lowry. Para os ensaios em modelo animal, foram utilizados dois grupos de camundongos balb/C. Um grupo foi imunizado com a fração proteica e hidróxido de alumínio como adjuvante (*priming*) e o grupo controle recebeu apenas o adjuvante; após o *priming* foi realizado o reforço (*booster*) 12 dias após a primeira imunização. O sangue dos animais foi coletado no dia anterior ao *priming*, 11 dias após o *priming* e 10 dias após o *booster*. A avaliação da presença de anticorpos foi

feita por imunoenensaio enzimático utilizando a fração proteica ou a bactéria íntegra como antígeno. A fim de avaliar a capacidade de neutralização *in vitro*, um *pool* de soro hiperimmune murino foi incubado junto a um inóculo de *A. baumannii*, sendo realizada a quantificação bacteriana ao longo do tempo. Os camundongos receberam após a etapa de imunização, um inóculo de *A. baumannii* suplementado com mucina, e foi realizada uma curva de sobrevida.

RESULTADOS: Foi observada uma significativa geração de anticorpos, que foram capazes de reconhecer tanto a fração proteica isolada quanto na superfície da bactéria íntegra. Os anticorpos foram também capazes de reduzir a quantidade de bactérias no ensaio de neutralização *in vitro*. Os testes de proteção demonstram tendência à sobrevida no grupo imunizado, mas ainda não foram conclusivos.

CONCLUSÃO: Os resultados obtidos mostraram que a fração proteica de 38 a 40 kDa é imunogênica e capaz de gerar anticorpos neutralizantes; indicando que esta proteína é um alvo promissor para a imunoterapia. Serão testados camundongos C57/B16 como modelo, já que segundo dados recentes na literatura, esta linhagem parece se adequar melhor.

DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE ANTICORPOS MONOCLONAIS MURINOS ANTI-PBP2a DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTES À METICILINA (MRSA) PARA OBTENÇÃO DE FRAGMENTOS F(ab')₂

Anna Erika Vieira de Araujo¹, Natália Plínio de Souza¹, Luis Vidal Conde¹, Lucas Almeida Machado¹, Álvaro Paiva Braga de Sousa¹, José Procópio Moreno Senna¹.

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

INTRODUÇÃO: Infecções causadas por *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) são um problema de saúde mundial, especialmente devido à dificuldade de tratamento, alto grau de virulência e elevada morbidade associada. Por ser uma bactéria multirresistente, estratégias alternativas de tratamento têm sido pesquisadas, como, por exemplo, imunoterapias passiva e ativa, porém até agora nenhuma obteve sucesso. Diante desse quadro, Bio-Manguinhos vem desenvolvendo um anticorpo monoclonal para o tratamento de infecções causadas por MRSA tendo como alvo a PBP2a, uma proteína de baixíssima afinidade por β -lactâmicos encontrada exclusivamente em cepas de MRSA. Fragmentos de anticorpos, contendo apenas as duas porções Fab', são descritos na literatura como ferramentas imunoquímicas, reagentes de diagnóstico e terapêutica, apresentando uma farmacocinética mais rápida, menor imunogenicidade e maior poder de penetração em tecidos quando comparados à IgG.

OBJETIVOS: Digestão enzimática de anticorpos monoclonais murinos anti-PBP2a por papaína e pepsina para a obtenção de fragmento F(ab')₂ e avaliação da afinidade à PBP2a do fragmento F(ab')₂ por ensaios imunoenzimáticos.

METODOLOGIA: Para otimizar a obtenção dos fragmentos F(ab')₂ por digestão enzimática com papaína e pepsina, foram testadas diversas variáveis, como diferentes proporções enzima/anticorpo, variabilidade nos tempos de digestão e uso de inibidor de proteases (PMSF, para a papaína). As frações F(ab')₂ obtidas foram purificadas através de cromatografia de afinidade utilizando resinas de Proteína A, como a MabSelectSure

(GE) e concentradas por unidades filtrantes Amicon[®] MWCO 50 kDa. As amostras de anticorpo digerido e suas frações foram submetidas à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) na ausência de agente redutor. Para avaliar a afinidade do fragmento F(ab')₂ pela PBP2a foram realizados ensaios imunoenzimáticos, como ELISA do tipo indireto e *Western Blot*.

RESULTADOS: A análise dos SDS-PAGE indicaram que foi possível a obtenção e o isolamento de fragmentos F(ab')₂ por digestão com papaína e pepsina (banda de aproximadamente 110 kDa), nas proporções de 1:10 (enzima/anticorpo, p/p) por 30 minutos e com uso de PMSF, para a digestão com a papaína. A digestão com a pepsina apresentou melhor produção de F(ab')₂ com melhor rendimento (74%, enquanto que a digestão com a papaína obteve 56%). Os ensaios de ELISA e *Blot* demonstraram que os F(ab')₂ não perderam afinidade pela PBP2a, apresentando perfil semelhante ao da IgG, mesmo após o processo de digestão enzimática com pepsina e papaína.

CONCLUSÃO: Foi possível obter o fragmento F(ab')₂ por digestão enzimática e isolá-lo por cromatografia de afinidade e ultrafiltração. Tal fragmento apresentou afinidade à PBP2a de forma semelhante à IgG, demonstrando que o processo de digestão enzimática não foi capaz de alterar esse parâmetro.

JANELA DE OPORTUNIDADES PARA PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS TERAPÊUTICAS DE INTERESSE BRASILEIRO

Luciana da Silva Madeira¹, Suzana Borshiver² e Nei Pereira Jr.²

¹ Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

² Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivo: Avaliar as oportunidades de conhecimento e produção para o setor de proteínas terapêuticas, através do cenário mercadológico e análise prospectiva. Foram selecionadas as proteínas Betainterferona, Fator VIII, Filgrastima, Imiglucerase, Infleximabe e Somatropina para realização desse estudo, que não são produzidas no Brasil, estão presentes na lista de produtos estratégicos obtido por rota biológica e possuem alto custo para o Ministério da Saúde (MS).

Metodologia: O cenário mercadológico foi projetado através do processo de incorporação de informações, a partir de fontes confiáveis, para construção de uma visão técnica sobre o assunto. Para análise prospectiva foi utilizada como fonte de informação a base de patentes *Derwent Innovations Index*, utilizando como estratégia de busca palavras chaves e Classificação Internacional de Patentes para área biotecnológica: A61K, A61P e C12N. Foi utilizada uma ferramenta para mineração de texto (*data mining*), sendo adotado nesse estudo o programa VantagePoint 7.1. A geração dos mapas de conhecimento foi realizada através da correlação cruzada dos 20 maiores depositantes. Com o programa Aduna Cluster foi possível observar as conectividades existentes entre os depositantes, apresentando de forma clara as patentes depositadas como resultado das parcerias.

Resultados: Com a geração dos mapas de conhecimento identificou-se 15 *clusters*, sendo um *cluster* de Fator VIII, dois para Betainterferona e Infleximabe, três de Imiglucerase e Somatropina, além de quatro para Filgrastima. Para proteína Betainterferona destacou-se a divisão Merck-Serono como depositante destaque do mercado. A avaliação para proteína Fator VIII identificou a empresa Baxter como central entre as parcerias com outras empresas, inclusive as conceituadas, demonstrando a busca pela liderança dessa empresa no mercado. Os resultados para proteína

Filgrastima foram bastante vago devido à dificuldade de formação de *clusters* mais específico. No estudo da enzima Imiglucerase identificou-se a busca por produtos capazes de serem administrados em pacientes com a doença de Gaucher, porém que não são produtos biossimilares. Na avaliação para a proteína Infliximabe, identificou-se a busca por compostos orgânicos como alternativa para o tratamento de esclerose múltipla, além de observar que a empresa Centocor busca a manutenção de seu monopólio no mercado através dos depósitos de patentes. Provavelmente, devido à molécula Somatropina apresentar um grande número de produtos comercializados, foi relacionado um pequeno número de parcerias entre as empresas consolidadas.

Conclusão: As proteínas Imiglucerase e Infliximabe apresentaram melhores oportunidades de mercado no Brasil devido ao monopólio de produção, além da Betainterferona 1a baseado nos gastos do MS. Não existe uma empresa majoritária nos depósitos das proteínas estudadas, porém foi possível identificar que os principais depositantes de patentes foram as *Big Pharmas*, detentoras das tecnologias consolidadas, bem como as empresas portadoras de tecnologia de futuro, empresas emergentes ou *spin-offs*, sendo que essas últimas estão cada vez mais disputando o mercado com as grandes corporações.

ESTRATÉGIAS PARA A LOGÍSTICA OPERACIONAL DA IDENTIFICAÇÃO, SELEÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE CENTROS DE PESQUISA PARA O ESTUDO BIP48

Paulo Dornelles Picon¹, Guilherme Becker Sander², Luiz Edmundo Mazzoleni¹, Indara C. Saccilotto², Lunara Martins da Silva³, Débora Zechmeister do Prado³, Hugo Nodarse Cuni⁴

Instituições: (1) UFRGS, (2)HCPA, (3)Única Suporte e Regulatório,(4)Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)

Objetivo: Apresentar as estratégias desenvolvidas para operacionalizar a identificação, seleção e qualificação de centros de pesquisa para o estudo clínico fase 2-3 do medicamento biológico Alfapeginterferona 2b 48 kDa (BIP48), projeto transferência tecnológica Brasil-Cuba, patrocinado por BioManguinhos-FioCruz.

Metodologia: O Ensaio Clínico é uma exigência da ANVISA para registro de novos medicamentos. A identificação dos centros de pesquisa foi realizada pela coordenação nacional do estudo em parceria com a Organização Representativa de Pesquisa Clínica - ORPC. Com o apoio da ASCLIN-BioManguinhos, da Rede Nacional de Pesquisa Clínica (RNPC) e do DECIT-MS, partiu-se de uma lista de pesquisadores da Sociedade Brasileira de Hepatologia e com expertise no tratamento de pacientes infectados pelo vírus C, além da busca por centros de pesquisa pertencentes à RNPC, composta por unidades vinculadas a universidades brasileiras. Durante a seleção, foram avaliados: 1) experiência do investigador principal (IP) na condução e estudos clínicos em Hepatite C; 2) experiência do IP e equipe em Boas Práticas Clínicas e 3) potencial para inclusão de pacientes com a patologia em estudo. A etapa de seleção foi seguida da qualificação dos centros. Nessa etapa, consultores da ORPC visitaram cada centro e identificaram conformidades e não-conformidades, com base em regulamentações aplicáveis e com ênfase na IN nº4 da ANVISA. Além destas etapas da qualificação, ocorreram as etapas regulatória (Plataforma Brasil) e contratual (Centro-ORCP).

Resultados: Dezenove centros de pesquisa foram qualificados para o estudo: Cinco no Rio Grande do Sul, 1 no Paraná, 4 em São Paulo, 5 no Rio de Janeiro, 1 em Goiás, 2 na Bahia e 1 em Pernambuco. Destes, 8 fazem parte da Rede Nacional de Pesquisa Clínica. Em média, cada centro levou de 4-5 meses para ser qualificado, sendo que a maioria das

pendências envolvia a elaboração e implementação de Procedimentos Operacionais Padrão (POP) das rotinas de trabalho, bem como a estruturação física do centro, incluindo calibração dos equipamentos, acesso restrito a refrigeradores para armazenamento dos medicamentos e freezer para amostras biológicas. Na etapa regulatória, os 19 centros fizeram a submissão ao CEP via Plataforma Brasil (PB). Por ser um sistema novo, a PB está em validação e o estudo BIP48 tem confrontado diversos e constantes problemas e apresentado alternativas de soluções. A etapa contratual foi extensa e complexa, pois alguns centros não puderam participar por questões apontadas por seus jurídicos. Vencidas as etapas de qualificação, regulatória e contratual, ocorreram as visitas de iniciação dos centros.

Conclusões: O planejamento, desde a identificação e seleção dos centros de pesquisa até a padronização dos procedimentos, passando pelas etapas regulatória e contratual, têm sido de fundamental importância para a realização do estudo BIP48. A composição de parcerias estratégicas é fundamental para o futuro da pesquisa clínica de financiamento público no Brasil.

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E DA SEGURANÇA DO BIP48: METODOLOGIA DO ENSAIO CLÍNICO FASE 2/3

Paulo Dornelles Picon¹, Guilherme Becker Sander², Luiz Edmundo Mazzoleni¹, Karine Medeiros Amaral³, Marisa Boff Costa³, Tobias Milbradt³, Indara Carmanim Saccilotto²

Instituições: (1)UFRGS,(2) Hospital de Clínicas de Porto Alegre e (3)Fundação Médica do RS

Objetivo: Apresentar a metodologia do estudo clínico “Avaliação da eficácia e da segurança do BIP48 (Alfapeginterferona 2b 48 kDa) comparado ao Pegasys® (Alfapeginterferona 2a 40 kDa), associados a ribavirina, no tratamento de pacientes com hepatite crônica pelo vírus C: estudo randomizado, aberto, com análise cega, multicêntrico”.

Metodologia: O estudo foi desenhado como um ensaio clínico competitivo, randomizado, multicêntrico, aberto, com 740 sujeitos de pesquisa, comparando a alfapeginterferona 2b 48 kDa (BIP48) com a alfapeginterferona 2a 40 kDa (Pegasys®), associados à ribavirina, em uma randomização de 1:1, a fim de comprovar a não inferioridade da nova molécula, considerando um limite de não inferioridade de 10%. Os sujeitos de pesquisa serão de ambos os sexos, entre 18 e 70 anos, com hepatite viral crônica C, virgens de tratamento, infectados pelos genótipos 1, 2 ou 3. O tempo previsto para a inclusão dos 740 sujeitos será de 52 semanas após aprovações regulatórias. O tempo total de execução previsto para esse estudo é de 124 semanas a partir da aprovação. Os sujeitos de pesquisa serão tratados por até 24 a 48 semanas quando infectados por HCV genótipo 2 e 3 e por até 48 semanas quando infectados pelo genótipo 1. A etapa anterior para a execução do estudo envolveu a aprovação do projeto de pesquisa nas instâncias regulatórias (CEP, CONEP e ANVISA), a qualificação dos centros selecionados e a contratação dos mesmos. As visitas de iniciação, cruciais para início efetivo da pesquisa clínica, estão ocorrendo nos centros que cumpriram tais etapas.

Resultados: Dezenove centros de pesquisa foram qualificados para o estudo, sendo que 5 no Rio Grande do Sul, 1 no Paraná, 4 em São Paulo, 5 no Rio de Janeiro, 1 em Goiás, 2 na Bahia e 1 em Pernambuco. Atualmente, há 7 centros já iniciados e 3 incluindo sujeitos de pesquisa. Cento e nove sujeitos estão em processo de seleção, sendo que 12 destes foram considerados falhas de seleção.

Conclusão: O êxito de um estudo clínico envolve desde a elaboração de um plano metodológico bem delineado até o cumprimento integral das etapas regulatórias e de qualificação dos centros. O estudo está em fase de execução, com a seleção dos sujeitos de pesquisa. Espera-se que os obstáculos sejam vencidos e que cumpra-se o objetivo final da pesquisa com a comprovação da eficácia e segurança do BIP48.

ALFATALIGLICERASE PARA DOENÇA DE GAUCHER: EXPERIÊNCIA DO CENTRO DE REFERÊNCIA DO RIO GRANDE DO SUL

Ida Schwartz^{1,2}, Matheus Vernet Machado Bressan Wilke⁴; Filippo Vairo²; Amanda Quevedo², Camila Blos Ribeiro³; Bárbara Krug³ e Paulo Picon^{1,2,3}

1- UFRGS, 2- HPCA, 3-SES-RS, 4-UFRGS/FAPERGS

Introdução: A Doença de Gaucher (DG) é a doença lisossômica mais frequente decorrente de atividade deficiente da *B-glicocerebrosidase* cursa com acúmulo de glicocerebrosídeos nos macrófagos. Causa anemia, trombocitopenia e hepatoesplenomegalia e reduz a qualidade de vida. O tratamento é a reposição enzimática (TRE). Até 2011, a única forma de enzima recombinante disponível no Brasil era a imiglucerase. Atualmente estão disponíveis também a alfavelaglicerase e a alfataliglicerase.

Objetivos: Descrever a evolução clínica e laboratorial de pacientes do RS em tratamento com alfataliglicerase.

Metodologia: Estudo transversal de base ambulatorial. A alfataliglicerase é infundida(i.v) a cada 15 dias. Dos 40 pacientes com DG no RS, seis pacientes (04 do sexo masculino; todos com idade > 18 anos) com DG-I estão em uso de alfataliglicerase (mediana de tempo= 15 meses; IQ25-75=11 -17 meses; mediana de dose= 24UI/kg/inf). Todos faziam uso prévio de imiglucerase: mediana de tempo=5 anos; IQ25-75=2,5-12 anos; mediana de dose= 15U/kg/inf). Em 3/6 pacientes, a alfataliglicerase foi prescrita em dose semelhante àquela que vinha sendo utilizada de imiglucerase (dois pacientes com 15UI/kg/inf e um paciente com 30UI/kg/inf); em 1/6 pacientes, esta dose foi aumentada (de 15UI/kg/inf para 30UI/kg/inf) e em 2 pacientes houve redução de dose ao ser implementada a alfataliglicerase (ambos de 45UI/kg/inf para 30UI/kg/inf). As medianas dos níveis de Hb, plaquetas e escores do WHOQOL foram comparadas em relação aos períodos de uso de imiglucerase (pré-tali) e de alfataliglicerase (pós-tali), assim como a prevalência de anemia (Hb ≤ 11g/dL em mulheres e ≤ 12g/dL em homens) e de plaquetopenia (≤ 120.000 plaq/mm³) entre o início e o final do período pós-tali.

Resultados: As medianas dos níveis de Hb e de plaquetas, no período pré e pós tali foram respectivamente de: Hb pré 13,2 (IQ25-75: 13-15,7), Hb pós 13,75 (IQ: 13,2-15,47g/dL); plaquetas pré: 119.250, (IQ25-75: 87.265- 338.667), plaquetas pós:

151.165 (IQ25-75: 109.375- 323.333 plaq/mm³). Ao início do período pós-tali, nenhum paciente apresentava anemia, e ao final anemia estava presente em um paciente (paciente com Mieloma Múltiplo). Em relação às plaquetas, três pacientes não apresentavam plaquetopenia no início do período pós-tali e continuaram não apresentando após; dois pacientes plaquetopênicos possuíram melhora, mas não normalização, dos níveis de plaquetas (Paciente 01= dose pré-tali 15UI/kg/inf nos 5 meses anteriores ao início de alfataliglicerase, e de 15UI/kg/inf por 14 meses no período pós-tali. Paciente 02= 4 anos de tratamento pré-tali, dose 30UI/kg/inf, e com 1,5 anos de tratamento com alfataliglicerase na dose de 15UI/kg/inf). Um paciente, após o tratamento com alfataliglicerase, apresentou melhora da plaquetopenia (tempo de tratamento pré-tali= 12 anos, dose 15UI/kg/inf tempo de tratamento pós-tali= 5 meses, dose= 30UI/kg/inf). O escore WHOQOL teve média =66,34±7,8 para o período pré-tali e 71,52±7,8 para o período pós-tali. Considerando somente os pacientes que não tiveram alteração de dose (n=3), a média dos períodos pré e pós tali para Hb e plaquetas foram de, respectivamente, 14,1±1,53 e 14±1,6 g/dL, e de 176.722±142.330 e 190.778±124.235 plaquetas/mm³. Um paciente apresentou prurido como única reação adversa ao medicamento depois da 14^a infusão. O manejo ocorreu por interrupção da infusão e administração de Dexclorfeniramina 2 mg. Após 20 min, foi reiniciada a infusão, não sendo registrada nova reação. Outra paciente referiu dor abdominal e diarreia 24 horas pós-infusão, na 21^a infusão com alfataliglicerase. Manejou-se com aumento do tempo de infusão para 02h30, por 04 infusões, sem novas reações. Não foi usado medicamento pré-infusão nos períodos subseqüentes. Um paciente faleceu durante o período de estudo devido à complicações do Mieloma Múltiplo doença que já havia sido diagnosticada no período pré-tali.

Conclusões: Apesar das limitações (tempo de tratamento e tamanho amostral) podemos sugerir que a alfataliglicerase constitui-se em alternativa a imiglucerase mesmo na dose de 15UI/kg/inf. Observamos um efeito superior da alfataliglicerase sobre o número de plaquetas, e maior prevalência de eventos adversos leves

Resumos dos pôsteres

Reativos para diagnóstico



LATERAL FLOW IMMUNOCHROMATOGRAPHY AS A POTENTIAL TEST FOR YELLOW FEVER DIAGNOSTIC

Diana Praia Borges Freire¹, Alfredo Jabor¹, Edimilson Domingos da Silva¹, Jose Godinho da Silva Junior¹, Ana Paula Dinis Ano Bom¹

1. Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Technological Development, Rio de Janeiro, Brasil

Objectives: The present report describes the physicochemical characterization and posterior use of a yellow fever virus (YFV) antigenic protein for detection of antibody against YF. Yellow Fever (YF) is a viral infectious disease which can be transmitted to humans. The yellow fever virus (YFV) belongs to the *Flavivirus* genus and its genome encodes three structural proteins and seven non-structural proteins. The 17D vaccine protects against YF and is used worldwide in vaccination programs. Techniques for YF diagnosis are crucial for correct identification, prevention, control and reporting of this infection and lateral flow immunochromatography is a serological technique employed for the rapid, simple and economical detection of infectious diseases.

Methods: The protein was analyzed by isoelectric focusing (pH range 3.0 – 9.0), SDS-PAGE 12.5% and it was evaluated for detection of virus specific human immunoglobulin M (IgM) using MAC-ELISA. Lateral flow test components were evaluated in the immunochromatography model, such as different nitrocellulose membranes, variable antigen and immunogold conjugate concentrations and distinct running buffer formulations. Positive serum samples of individuals infected and vaccinated with the YF 17DD vaccine, unvaccinated negative and positive control antibody were used to evaluate a test prototype.

Results: Tests showed that recombinant YFV antigen did not cross-react with Dengue positive sera in MAC-ELISA. One prototype test showed 78.5% of sensitivity and 100% of specificity using serum samples of vaccinated individuals positive for immunoglobulin G (IgG).

Conclusion: The data reported here are important for the further development of studies aiming at a rapid diagnostic test for yellow fever disease.

PRODUCTION OF IMMUNOGLOBULIN Y SPECIFIC FOR HUMAN ROTAVIRUS FOR DIAGNOSTIC METHOD AND IMMUNOTHERAPY

Gentil Arthur Lins Bentes Mendonça de Vasconcelos¹; Natália Maria Lanzarini¹; Juliana Rodrigues Guimarães¹; Alexandre dos Santos da Silva¹; Eduardo de Mello Volotão¹; Marcelo Alves Pinto^{1,2}

¹Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Lab. de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Rio de Janeiro, Brasil

²Escola de Medicina Veterinária, C.C.S./UNIFESO, Teresópolis, Brasil

Objectives: In this study we describe the production, purification and characterization of IgY anti-rotavirus A group (RV-A) antibody proceeded in immunized hens for use in diagnostic methods and immunotherapy. The IgY antibodies production against rotavirus is justified by several advantages presented by this antibody such as easy achievement, low cost, wide scale production and more appropriate method about the bioethics aspect.

Methods: Six hens were divided in two groups (I and II) and immunized at intervals of one month with different protocols: Group I – received three immunizations with human and simian RV-A associated with incomplete Freund adjuvant (IFA) and oligodesoxynucleotides that have C-fosfatoguanosin (CpG-ODN); Group II – received three immunizations with IFA and CpG-ODN (negative control). The study was approved in Ethics Commission in Animals Tract-UNIFESO (n°0331/11). The eggs were collected and the yolks were purified by precipitation in polyethylene glycol (PEG) method. The IgY was quantified by *Lowry* method and characterized by the techniques of electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) and Western Blotting. A neutralization assay *in vitro* was performed to evaluate the specificity and the ideal concentration of purified IgY for neutralize the rotavirus in MA-104 cell culture.

Results: The hens had no change in growth kinetics by reason of immunizations and their egg laying was high, with 358 eggs laid during thirteen weeks. The purification of IgY with polyethylene glycol was efficient and reached high concentration. In group I,

the average of concentration was 37,5mg/mL and the peak occurred at 10th week with 59,5mg/mL of total protein. In group II, the average was 27,5mg/mL and the peak occurred at 12th week with 52,5mg/mL. In SDS-PAGE we confirmed that the IgY was the protein purified analyzing your molecular weight profile, 70kDa of high chain and 25kDa of light chain. The Western Blotting confirmed the specificity of IgY to rotavirus. In neutralization assay *in vitro*, the specificity also was demonstrated, but the ideal concentration of IgY anti-rotavirus was obtained. Until the antibody concentration of 1,5mg/mL neutralized totally the virus, in lower concentrations the virus replicate.

Conclusion: The characterization methods of IgY demonstrated specificity to the rotavirus antigens and efficacy in rotavirus neutralization in culture cells. The IgY anti-rotavirus was successfully produced, and their use in diagnostic methods and immunotherapy need to be tested in the future.

OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ANTICORPOS CAPRINOS ANTI-IgG HUMANA UTILIZADOS NA PRODUÇÃO DE IMUNORREATIVOS PARA DIAGNÓSTICO

Priscila Muniz da Paz, Edinea Pastro Mendes, Hilton Jorge Nascimento e Jose Godinho da Silva-Junior.

Objetivo: Este trabalho está relacionado ao melhoramento das etapas metodológicas envolvidas na produção da imunoglobulina anti-IgG humana a ser usada no *kit* de diagnóstico da Leishmaniose humana.

Métodos: As amostras de soro policlonal caprino anti-IgG humana foram submetidas a diferentes concentrações de sulfato de amônio (SA) para determinar a condição adequada de precipitação. Em seguida o precipitado foi solubilizado e submetido à dessalinização em cromatografia de exclusão molecular na matriz Sephadex G25. A fração proteica recuperada foi quantificada pelo método de Folin-Lowry modificado e analisada por SDS-PAGE 12,5%. Visando a seleção da coluna cromatográfica de troca iônica mais apropriada para a purificação do anticorpo em questão foram testadas as matrizes Hitrap ANX, Hitrap Q FF, DEAE Hicap, TMAE Hicap, DMAE Hicap e Poros HQ50 – todas contendo 1 mL de leito cromatográfico. Os eluentes e as condições cromatográficas foram as mesmas para todas as colunas. Visando a determinação da capacidade de ligação dinâmica das colunas Poros HQ, DEAE Hicap scout e TMAE Scout – aquelas que apresentaram os melhores resultados usou-se uma fração anti-IgG humana purificada na coluna Poros HQ 50.

Resultados: A melhor condição para a precipitação de imunoglobulina caprina anti – IgG humana foi de 30% de saturação de sulfato de amônio (1,2 M). As colunas Hitrap ANX, DEAE Hicap, TMAE Hicap e DMAE Hicap apresentaram frações que efluíram no volume morto das colunas. As colunas Hitrap Q FF e Poros HQ50 apresentaram perfis cromatográficos similares, mostrando significativa resolução entre a fração de IgG e o pico de albumina.

Conclusão: O uso da matriz cromatográfica Sephadex G25 em uma coluna XK 50 (5cmx30cm) com o propósito de dessalinização do soro caprino anti-IgG humana precipitado com 30% de sulfato de amônio mostrou-se eficiente. Dentre as colunas cromatográficas previamente selecionadas, em um total de 7 colunas, aquelas que mostraram a melhor resolução para a purificação – separação da albumina da IgG de cabra (anti – IgG humana), foram as colunas Poros HQ 50 e Hitrap Q FF. A Poros HQ mostrou a maior capacidade de ligação da matriz (*Binding Dynamic Capacity*) dentre as colunas testadas, a saber, Poros HQ 50 , DEAE Hicap e TMAE Hicap. Os resultados auferidos neste trabalho são auspiciosos no sentido de propor futuramente a substituição da coluna de DEAE Sephacel, classicamente utilizada na purificação de anticorpos, levando-se em conta não só a sua resolução, como também sua alta capacidade de ligação à amostra em tela. Ademais, podemos salientar que a coluna de perfusão cromatográfica Poros HQ 50 pode operar com um fluxo de pelo menos 10 vezes maior do que o tradicionalmente usado com a coluna de DEAE Sephacel, resultando tal fato em uma economicidade de tempo (*high-throughput*).

IMPLANTAÇÃO DOS TESTES RÁPIDOS DPP® (DUAL PATH PLATFORM) DE BIO-MANGUINHOS NOS LABORATÓRIOS PÚBLICOS DE ÂMBITO NACIONAL

Monique Amorim Pimenta, Alessandra Bógio, Adriana dos Santos Duarte, Linda Khalili Boukai, Christiane Teixeira Pinto, Cintia Nunes Cardoso, Camila Arruda Mota da Silva.

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

Objetivo: Neste trabalho apresentamos as abordagens estratégicas usadas pela Divisão de Atendimento ao Cliente e Pós-Marketing, DIACM, para implantação dos testes rápidos da plataforma DPP® em laboratórios diagnósticos da rede pública vinculados à Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) do Ministério da Saúde (MS).

Metodologia: Os testes da Plataforma DPP® do portfólio de Bio-Manguinhos incluem o Imunoblot Rápido DPP® HIV 1/2, Teste Rápido DPP® HIV 1/2, Teste Rápido DPP® Sífilis, Teste Rápido DPP® Leishmaniose Visceral Canina e Teste Rápido DPP® Leptospirose. Esta nova geração de testes tem a vantagem de reduzir os procedimentos laboratoriais e facilitar as ações em campo, além de melhorar efetivamente a qualidade do resultado final com volumes mínimos de amostras. A partir de 2011, a DIACM promoveu a implantação destes testes nos laboratórios da rede pública brasileira. A estratégia de implantação foi desenvolvida pela DIACM e apresentada à Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública – CGLAB e ao Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais e envolveu a capacitação de profissionais multiplicadores nomeados pelo respectivos órgãos da Saúde. A DIACM ficou a cargo do planejamento e organização da metodologia de implantação e a definição da estratégia foi consensual. A implantação se deu de forma gradual e segmentada, e os treinamentos ocorreram em laboratórios de referência de cada estado que receberam profissionais das cidades circunvizinhas. Ainda como parte do planejamento, a DIACM elaborou documentos necessários para regulamentação do treinamento, como as certificações, e material didático-pedagógico como manuais de treinamento. A capacitação teve um caráter

multidisciplinar e envolveu temas afins em nível teórico e prático. Ao final de cada etapa de treinamento, foram distribuídos formulários para aplicação de pesquisa de avaliação do processo de capacitação.

Resultado: Entre julho de 2011 e junho de 2013, foram realizados 42 treinamentos. Foram capacitados 1.092 profissionais distribuídos por toda rede nacional de laboratórios públicos. A avaliação dos treinamentos revelou que uma média de 99% dos profissionais consideraram o objetivo alcançado e 98% tiveram uma impressão geral ótima ou boa sobre o treinamento aplicado. A partir das implantações, Bio-Manguinhos passou a atender rotineiramente às demandas dos produtos. O fornecimento dos testes rápidos compreendeu 50% da demanda total de reativos entregue para a SVS neste período. As ocorrências relacionadas a estes produtos somaram 1.053 registros, perfazendo 51 % do total de atendimento à linha dos reativos para diagnóstico para esta secretaria.

Conclusão: A implantação dos testes DPP[®] foi bem sucedida em todo o território brasileiro. Hoje, eles são ferramentas essenciais para o acesso ágil e fácil ao diagnóstico, tornando viável a testagem de patologias em diferentes locais (*point of care*). A distribuição destes reativos para diagnóstico atende plenamente à missão institucional, provendo produtos de qualidade em prol da saúde pública brasileira.

PADRONIZAÇÃO DO TESTE RÁPIDO DPP[®] SÍFILIS TREPONÊMICO E NÃO TREPONÊMICO ÀS AMOSTRAS BRASILEIRAS

Nara Mazarakis Rubim¹, Michel Vergne Sucupira¹, Antonio G. P. Ferreira², Edimilson Domingos da Silva¹,.

¹ Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Bio-Manguinhos, Fiocruz

² Programa de Reativos para Diagnósticos, Bio-Manguinhos, Fiocruz

OBJETIVO

Avaliar o desempenho da plataforma de teste rápido DPP[®] para a detecção de antígenos Treponêmicos e Não Treponêmicos e padronizar o teste às amostras brasileiras.

MÉTODOS

Os antígenos Treponêmico e Não Treponêmico foram impregnados em membrana de nitrocelulose e montados na plataforma de duplo percurso (DPP[®]) para a avaliação do desempenho frente a um painel de amostras brasileiras positivas e negativas (35). Amostras de gestantes negativas (50) e positivas (22) para sífilis também foram avaliadas para verificar possíveis interferentes nesta população. Nesta plataforma apenas 5µl são necessários para a detecção dos anticorpos. Após 20 minutos de teste, a detecção apenas da banda treponêmica pode representar uma cicatriz sorológica ou infecção recente, enquanto que a presença apenas da banda não treponêmica pode ser indicativa de infecção recente. No entanto, a detecção simultânea de ambos os antígenos sugere infecção ativa.

RESULTADOS

O ensaio da triagem e confirmação dessas amostras com o DPP[®] Sífilis Duo produziu resultados concordantes com os obtidos com testes de referência. Dentre as amostras de gestantes apenas 1 entre as negativas mostrou reatividade fraca na banda treponêmica que foi confirmada com o teste DPP[®] treponêmico.

CONCLUSÃO

O teste rápido DPP[®] Sífilis Duo foi desenvolvido diante da necessidade do serviço médico em obter um diagnóstico rápido e preciso para que o paciente, quando necessário, seja encaminhado imediatamente ao tratamento. O teste mostrou-se promissor em detectar antígenos treponêmicos e não treponêmicos em amostras brasileiras e de soros de gestantes.

DESENVOLVIMENTO DE TESTE RÁPIDO PARA TITULAÇÃO DE ANTICORPOS CONTRA ANTÍGENO NÃO TREPONÊMICO DA SÍFILIS

Nara Mazarakis Rubim¹, Michel Vergne Sucupira¹, Antonio G. P. Ferreira², Edimilson Domingos da Silva¹.

¹ Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Bio-Manguinhos, Fiocruz.

² Programa de Reativos para Diagnósticos, Bio-Manguinhos, Fiocruz.

OBJETIVO

Obter teste rápido do tipo fluxo lateral de baixo custo e alta sensibilidade capaz de detectar e semi-quantificar anticorpos contra o antígeno não treponêmico da sífilis.

MÉTODOS

O antígeno Não Treponêmico é constituído por micelas formadas por cardiolipina, colesterol e lecitina, que constituem o VDRL (Venereal Diagnostics Research Laboratories). Anticorpos Não Treponêmicos são indicadores de infecção ativa, pois a redução do seu título pode indicar sucesso da terapia enquanto o aumento pode representar um possível relapso ou reinfecção. O antígeno Não Treponêmico foi impregnado em membrana de nitrocelulose utilizando diferentes abordagens: aplicado em concentrações crescentes, decrescentes e na mesma concentração produzindo um formato de teste com inúmeras bandas e acrescido do controle com proteína A. Os testes foram montados e avaliados frente a inúmeras amostras de soros, além de painéis internacionais para sífilis, visando a obtenção de provas de conceito.

RESULTADOS

Os resultados preliminares indicam que a melhor conformação para o teste foi a obtida com a mesma concentração do antígeno Não Treponêmico impregnado nas bandas testes. As amostras com títulos mais altos correlacionaram bem com a quantidade de bandas e foram marcando por esgotamento do anticorpo na medida em que o fluxo da amostra percorria a área teste evidenciando uma maior intensidade de marcação na primeira banda. Estes resultados preliminares sugerem uma possibilidade de utilizar o

antígeno Não Treponêmico em teste rápido de fluxo lateral para uma quantificação de anticorpos contra a sífilis.

CONCLUSÃO

O teste do VDRL é o mais utilizado para a confirmação do diagnóstico da sífilis, porém, depende da utilização de equipamentos disponíveis apenas em laboratórios e especialmente da experiência do usuário. A proposta deste teste é possibilitar o uso deste antígeno em uma semi-quantificação do anticorpo na detecção da sífilis e para o acompanhamento da queda do título durante o tratamento. A forma de fluxo lateral possibilita a utilização deste teste em “beira de leito” e em locais e populações de difícil acesso. O resultado preliminar é promissor e nos inspira a continuar o desenvolvimento.

GERENCIAMENTO DE RISCOS NA PRODUÇÃO DE CONJUGADO DE PROTEÍNA A COM OURO COLOIDAL USADO EM REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO PLATAFORMA DPP®

Poliana Vita Schettini¹, Antonio de Pádua Risolia Barbosa², Marília Stella Vaz Costa Belart¹

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Garantia da Qualidade, Rio de Janeiro, Brasil

2. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Vice-Diretoria de Produção, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivo: Os testes rápidos da plataforma DPP® são uma nova linha de produtos de Bio-Manguinhos, proveniente de transferência de tecnologia com a ChemBio, e a etapa de produção do conjugado de proteína A com ouro coloidal, ainda não foi implementada. O objetivo do trabalho foi demonstrar a viabilidade da aplicação dos princípios de Gerenciamento de Riscos à Qualidade (GRQ) ao processo produtivo do conjugado de proteína A com ouro coloidal e verificar a aderência da ferramenta FMEA, aplicada no gerenciamento de riscos de Bio-Manguinhos para processos produtivos de vacinas, aos reativos para diagnóstico.

Metodologia: O desenvolvimento do trabalho deu-se mediante a metodologia de estudo de caso desse processo de produção e contemplou a utilização da ferramenta FMEA. Através de um *brainstorming* com pessoas entendedoras do processo produtivo, foi possível avaliar os riscos de forma prospectiva.

Resultados: Dos resultados gerais gerados a partir da análise FMEA, 72 modos de falhas foram identificados, analisados, classificados e a existência de controles nas etapas de produção também foram verificados. Observou-se ainda que, embora a maioria dos modos de falhas que exibiram causas potenciais relacionados a fatores humanos apresentarem índices de severidade alta, a ocorrência apresentou índices baixos e a detectabilidade apresentou índices altos.

Conclusão: O trabalho demonstrou a viabilidade da aplicação da FMEA ao processo produtivo de conjugado de proteína A com ouro coloidal que será usado na produção de reativos para diagnóstico da plataforma DPP[®] de Bio-Manguinhos. A avaliação de riscos feita neste trabalho, de forma prospectiva, contribuirá para otimizar a transferência da tecnologia deste processo produtivo para Bio-Manguinhos, uma vez que a permitirá o direcionamento de esforços e recursos a fim de prevenir riscos aos produtos e processos com a implementação da rotina de produção no Instituto. Este trabalho também foi o primeiro marco de atendimento a RDC 16 de 27 de março de 2013 da ANVISA para esta linha de produtos uma vez que esta exige a implementação do GRQ no processo produtivo de produtos médicos e produtos para diagnóstico de uso *in vitro*.

DESENVOLVIMENTO DO TESTE DE IMUNOFENOTIPAGEM PARA A CONTAGEM DE LINFÓCITOS TCD4⁺

Marli Sidoni¹, Marta de Almeida Santiago¹, Roberto Calado da Silva¹, Hilton Jorge do Nascimento², José Godinho da Silva Junior², Edimilson Domingos da Silva¹, Antonio G. P. Ferreira³.

¹ Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Bio-Manguinhos, Fiocruz

² Laboratório de Macromoléculas, Bio-Manguinhos, Fiocruz

³ PRED- Gerencia de Programa de Reativos para Diagnóstico, Bio-Manguinhos, Fiocruz

Objetivo: Desenvolver insumos alternativos para a contagem das subpopulações linfocitárias T CD3/CD4/CD8/CD45. A proposta de nacionalização dos processos de obtenção dos Anticorpos Monoclonais, bem como todos os processos de conjugação e avaliação dos insumos que compõem o produto complementam as ações, visando à futura implementação na Rede Pública de Saúde do País.

Método: A cooperação técnica estabelecida entre Bio-Manguinhos/Fiocruz e o Centro de Imunologia Molecular (CIM) de Cuba possibilitou a aquisição dos anticorpos monoclonais anti-CD3/CD4/CD8/CD45 que foram marcados com quatro fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína, ficoeritrina, cianina 5 e ao tandem ficoeritrina-cianina 7, para identificação dos marcadores celulares por citometria de fluxo.

Entretanto, a interpretação clínica é dada pelos percentuais e valores absolutos das populações linfocitárias. Para tanto, foram utilizadas microesferas comerciais para a avaliação imunológica do estado do paciente.

Resultado: Foram avaliadas amostras de cerca de 100 indivíduos infectados pelo HIV e submetidos a tratamento com antirretrovirais. Os resultados obtidos não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os valores dos anticorpos monoclonais conjugados em Bio-Manguinhos frente ao teste comercial utilizado, atualmente, na Rede Nacional de Laboratórios para Contagem de linfócitos T CD4⁺ formada por 90 laboratórios distribuídos pelo País.

Conclusão: O produto/kit em desenvolvimento em Bio-Manguinhos poderá ser utilizado visando o monitoramento da evolução clínica de indivíduos infectados pelo HIV ou quando da introdução de terapias com antirretrovirais em novos pacientes. Esse monitoramento possibilita a adoção de terapias preventivas às infecções oportunistas e busca a efetividade do tratamento.

ESTABLISHMENT OF A TANDEM CONJUGATION PROCESS AIMING IMMUNOPHENOTYPING ASSAY FOR TCD4⁺ LYMPHOCYTE COUNT

Ana Paula Araújo¹, Patricia Barbosa Jurgilas¹, Priscila Muniz da Paz¹, Marta de Almeida Santiago², Marli Sidoni², Hilton Jorge Nascimento¹, José Godinho da Silva Junior¹

Laboratório de Macromoléculas (LAMAM)¹ and Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED)², Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

Objectives: The Brazilian Health Ministry demands a continuous following of lymphocytes CD4⁺ and CD8⁺ levels on HIV serum positive patients by Flow Cytometry methodology. An alternative assay has been developed by Bio-Manguinhos using four monoclonal antibodies labeled with different fluorochromes. In this context, the aim of this work is the establishment of a conjugation process of anti-CD4 with Phycoerythrin - Cyanin 7 (PECy7) fluorochrome, once this conjugate is essential to compose an immunophenotyping assay with four lymphocytes markers.

Methods: The conjugation process was based on Roederer's protocol. In the first step, Cyanin 7 (Cy7) reacted with free amino groups from Phycoerythrin (PE) to produce the Tandem fluorochrome. PECy7 was derivatized with the crosslinking agent Succinimidyl-4-(*N*-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC). Meanwhile the antibody anti-CD4 was partially reduced with dithiothreitol (DTT) and further added to the activated Tandem. The conjugation reaction was stopped with *N*-Ethylmaleimide (NEM) to block non reacted sulphhydryl groups. Monoclonal antibody (anti-CD4), PE and the anti-CD4-PECy7 conjugate were evaluated by gradient-SDS-PAGE (8 – 25%), IEF-PAGE (3.0 – 9.0) and Size Exclusion Chromatography (SEC - Superdex 200) as process control to assure homogeneity of reactants and products. Spectrophotometric absorptions at 280nm, 565 nm, 620nm and 755nm were used to follow each step. At last, the anti-CD4-PECy7 conjugate was analysed by flow cytometry (FC).

Results: The anti-CD4 and PE preparations were considered homogeneous by denaturing gel electrophoresis and SEC analysis. The fluorochromes PE and Cy7

presented UV-VIS spectra seemed to that described in the literature. No bleeding signal of PE was observed in the flow cytometry analysis of anti-CD4-PECy7. Moreover, the anti-CD4-PECy7 conjugate presented similar FC results to those obtained by Becton and Dickinson's anti-CD4 conjugate used as gold standard.

Conclusion: The absence of bleeding signal of PE by FC analysis suggests that all phycoerythrin emission light was absorbed by Cy7 molecules and this fact demonstrates the tandem synthesis was successful. Several check points must be performed as process control to ensure the reproducibility of anti-CD4-PECy7 production. The behaviour of the anti-CD4-PECy7 in FC assay demonstrates that this conjugate can be used in the composition of an immunophenotyping kit for TCD4⁺ lymphocyte count as fourth marker.

APLICAÇÃO DA CITOMETRIA DE FLUXO NA AVALIAÇÃO DE CONJUGADOS FLUORESCENTES UTILIZADOS EM IMUNOENSAIOS

Marta de Almeida Santiago¹, Bruna de Paula Fonseca e Fonseca¹, Christiane de Fátima da Silva Marques¹, Edimilson Domingos da Silva¹, Álvaro Luiz Bertho², Ana Cristina Martins de Almeida Nogueira³.

1. Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Bio-Manguinhos, FIOCRUZ.
2. Laboratório de Imunoparasitologia & Plataforma de Citometria de Fluxo, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.
3. Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia de Infecções Virais, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ.

Objetivos: O presente trabalho teve como objetivo avaliar a aplicação da citometria de fluxo como ferramenta para monitoramento de conjugados utilizados em imunoenaios e como parâmetro de acompanhamento da estabilidade desses insumos. Tais resultados fazem parte do projeto de tese de doutorado de Marta de Almeida Santiago intitulado “Aplicação da citometria de fluxo no controle de qualidade de insumos e processos utilizados no desenvolvimento de kits para diagnóstico”, do curso de Pós-graduação em Vigilância Sanitária do INCQS.

Metodologia: Microesferas magnéticas (xMAP®, Luminex, Austin) foram acopladas com diferentes concentrações de anti-IgG humana (5, 2,5, 1 e 0,5ug/ mL) e anti-HBS (1:300, 1:1000 e 1:3000) conjugadas à ficoeritrina (PE) e submetidas a análise citofluorimétrica no citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton & Dickinson) do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED), Bio-Manguinhos. O protocolo de aquisição foi realizado utilizando o programa CellQuest (BD) e as análises dos resultados foram feitas através do software FlowJo (Tree Star Inc, USA). Para cada amostra foram adquiridos 2000 eventos na região (“gate”) de microesferas. Os conjugados foram avaliados quanto ao seu perfil de marcação, média geométrica e coeficiente de variação (CV) em histogramas de leitura no canal de fluorescência com filtro 585/42 (FL2 / PE).

Resultados: Não houve diferença no grau de acoplamento quando foram utilizados diferentes códigos de microesferas (#12, #35 e #70). A avaliação das concentrações dos conjugados demonstrou que no caso dos conjugados S1, S4 e M2 a melhor concentração de acoplamento foi 5ug/ mL, enquanto para F2 e C1 a diluição 1:300 da solução estoque apresentou melhores resultados. Em tais concentrações, os conjugados apresentaram as maiores médias geométricas (maior grau de marcação) e os menores coeficientes de variação (maior homogeneidade de acoplamento). Em relação ao acompanhamento da estabilidade dos conjugados, observou-se uma tendência à redução das médias geométricas nos conjugados S2 e S3 ao longo do tempo de avaliação, tendência esta não observada nos outros conjugados estudados.

Conclusão: O acoplamento dos conjugados às microesferas demonstrou ser uma boa ferramenta para avaliação direta desses insumos pela citometria de fluxo.

Os resultados observados sugerem que conjugados do mesmo fabricante podem apresentar variações significativas de estabilidade lote a lote, demonstrando a importância deste acompanhamento durante o processo produtivo de kits para imunoenaios.

O acompanhamento da estabilidade de insumos pela citometria de fluxo poderá contribuir de forma significativa para o estabelecimento de metodologias de controle de qualidade de insumos e processos utilizados em imunoenaios.

COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS DE ACOPLAMENTO UTILIZADAS NA PLATAFORMA DE MICROARRANJOS LÍQUIDOS

Leila Botelho Rodrigues da Silva¹, Marcelle Bral de Mello¹, Bernardo de Oliveira Loureiro¹, Bruna de Paula Fonseca e Fonseca¹, Edimilson Domingos da Silva¹, Antônio Gomes Pinto Ferreira¹, Christiane de Fátima Silva Marques¹.

¹Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Bio-Manguinhos, Fiocruz

Objetivos: Neste trabalho foi feita uma comparação de duas metodologias de acoplamento de antígenos utilizadas na plataforma de microarranjos líquidos, visando sua transferência para a produção. Este estudo faz parte de um projeto do Programa de Reativos para Diagnóstico de Bio-Manguinhos/Fiocruz, que prevê o desenvolvimento de um multiteste para triagem sorológica de bolsas de sangue nos hemocentros brasileiros.

Metodologia: Na plataforma de microarranjos líquidos, antígenos e/ou anticorpos são acoplados a microesferas magnéticas de poliestireno que atuam como suporte sólido para a captura de moléculas em amostras biológicas. A reação de acoplamento é baseada na ligação covalente de grupamentos carboxílicos presentes na superfície das microesferas às aminas primárias existentes nos antígenos e/ou anticorpos. Foram avaliadas duas metodologias de acoplamento de antígenos/anticorpos à microesferas. A metodologia 1 consiste na realização do ensaio em placas de 96 poços (volume final de 100uL), que permite o acoplamento de um milhão de microesferas por vez. A metodologia 2 se utiliza de microtubos de 1mL, onde a reação de acoplamento ocorre em volume de 500uL, com quantidades superiores de microesferas. Para comparação entre as metodologias foram acoplados seis antígenos específicos de HIV, HTLV, HBcAg, Sífilis, Chagas e HCV e um anticorpo (anti-IgG) à diferentes códigos de microesferas. Foram acoplados um milhão e cinco milhões de microesferas nas metodologias 1 e 2, respectivamente, para cada antígeno/anticorpo. O resultado do acoplamento foi avaliado por meio de ensaio padrão, onde as microesferas foram expostas a amostras de soro previamente caracterizadas para cada antígeno/anticorpo acoplado. Também foi avaliado um pool de amostras sabidamente positivas para cada agravo de interesse. Os resultados das reações, apresentados na forma da mediana da intensidade de fluorescência (MFI), foram comparados por meio de um Teste T.

Resultados: O rendimento final médio obtido no acoplamento com a metodologia 1 foi de 91,4%, e de 76,4% na metodologia 2. Dos seis antígenos avaliados, quatro (HIV, HTLV, Sífilis e HCV) apresentaram valores de MFI significativamente maiores ($p < 0,05$) quando acoplados com a metodologia 2, assim como o único anticorpo avaliado.

Conclusão: A metodologia 1 permite a realização de múltiplos acoplamentos em uma mesma placa, podendo ser automatizada com o auxílio de uma lavadora de placas. A metodologia 2 exige que os acoplamentos sejam feitos separadamente, mas permite que maiores quantidades de microesferas sejam acopladas de uma só vez. Apesar do rendimento da metodologia 1 ser superior ao obtido na metodologia 2, os valores de MFI obtidos nas duas metodologias mostraram-se bastante diferentes. Como resultado, a metodologia 2 apresentou maior capacidade de diferenciação entre amostras positivas e negativas, uma característica bastante desejável, em se tratando de um ensaio para triagem sorológica de bolsas de sangue. Assim, conclui-se que a metodologia 2 é mais adequada à aplicação do multiteste em desenvolvimento.

AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO DA PLATAFORMA DE MICROARRANJOS LÍQUIDOS NO DIAGNÓSTICO DA SÍFILIS

Marcelle Bral de Mello¹, Bernardo de Oliveira Loureiro¹, Leila Botelho Rodrigues da Silva¹, Bruna de Paula Fonseca e Fonseca¹, Christiane de Fátima Silva Marques¹, Edimilson Domingos da Silva¹, Antônio Gomes Pinto Ferreira¹.

¹Laboratório de Tecnologia Diagnóstica, Bio-Manguinhos, Fiocruz

Objetivo: Avaliar o desenvolvimento de uma nova plataforma para o diagnóstico de Sífilis, utilizando uma metodologia multiteste, com potencial aplicação em um sistema automatizado de diagnóstico.

Métodos: A metodologia diagnóstica selecionada para este estudo é baseada na tecnologia de microarranjos líquidos com microesferas magnéticas. Estas microesferas são coradas internamente através de uma mistura de dois fluoróforos em diferentes concentrações, o que resulta em microesferas diferencialmente codificadas. Essa característica permite a análise simultânea de dezenas de analitos diferentes (reação multiplex). As microesferas servem de suporte para diversos tipos de moléculas (principalmente proteínas e ácidos nucleicos). Para o presente trabalho, um antígeno específico do agente etiológico da Sífilis (*Treponema pallidum*) foi acoplado na superfície das microesferas, mediante uma ligação covalente entre amina (antígenos) e carboxila (microesferas). Na primeira etapa do teste, os anticorpos presentes nas amostras positivas ligam-se ao antígeno acoplado às microesferas, criando um complexo antígeno-anticorpo. Após um período de incubação e sucessivas lavagens, é adicionado o sistema revelador, composto por um anticorpo anti-IgG humano conjugado com Ficoeritrina. A leitura dos resultados, expressos em valores da mediana da intensidade de fluorescência (MFI), foi realizada pelo equipamento Labscan 100 (Luminex). Para a análise, foram selecionadas 103 amostras positivas para Sífilis, e 10 amostras negativas. Todas as amostras foram previamente avaliadas com dois testes diagnósticos estabelecidos (VDRL e DPP).

Resultados: Com a exceção de duas amostras, os resultados obtidos com a nova metodologia corroboraram os resultados prévios dos testes considerados como base comparativa. Baseado nos dados obtidos, o novo ensaio apresentou uma sensibilidade de 98% e especificidade de 100%.

Conclusão: O ensaio baseado na plataforma de microarranjos líquidos mostrou-se uma boa ferramenta para o diagnóstico da Sífilis, principalmente para laboratórios que possuam alta capacidade de processamento de amostras. O teste apresenta potencial de redução de custos, volume de amostra necessário e tempo de dedicação do operador à realização do teste, uma vez que o ensaio pode ser totalmente automatizado. A melhoria na sensibilidade do teste pode ser atingida com a incorporação de outros antígenos do *T. pallidum* visando a detecção de outros epítomos que possam não ter sido identificados pelo antígeno utilizado neste estudo.

EVELOPMENT AND VALIDATION OF MULTIPLEX FOR MEASUREMENT OF ANTIBODIES AGAINST *C.DIPHTERIAE*, *C.TETANI* AND *H.INFLUENZAE* TIPE B

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

1. Laboratório de Tecnologia Imunológica, Vice Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico, Bio-Manguinhos, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil.

Objectives: Liquid microarray, a microsphere-based Multiplex assay is a method that is replacing immunosorbent assay (ELISA) in assessing the immunogenicity of multicomponent vaccines in preclinical and clinical trials. This technology utilizes fluorescent distinct microspheres as carriers for different molecules allowing the simultaneous detection of multiple reactions in a small volume of sample with high reproducibility and sensitivity. Therein, the aim of this study was to develop and validate a monoplex and subsequently the Multiplex assay to quantify IgG antibody against diphtheria, tetanus, and *H.influenzae* tipe B (Hib).

Methods: Purified diphtheria toxin, tetanus toxin and phosphoribosylribitol phosphate (PRRP) from Hib capsule, DTHib antigens, were coupled to microspheres according to manufactures instructions with different concentrations of those. To determine the best conditions for each antigen, standard curves were prepared using International Reference Serum from NIBSC. The concentration for tetanus and diphtheria ranged from 0.13UI/mL to 0.0002 and for PRRP ranged from 0.4 µg/mL to 0.0005µg/mL. Twenty sera from human pre and post immunized with DTP/Hib vaccine were analyzed by both ELISA and monoplex assays under conditions established. Concentrations of IgG antibodies were determined by 4-parameter logistic standard curve using the SoftMax® program. The values in Mean Fluorescence Intensity (MFI) were converted to IU/mL or µg/mL, also by interpolation for standard curve (4-parameter) for every microsphere region/standard. Values obtained by this assay were compared to those found by ELISA with Nonparametric Spearman analysis using the Graphpad Prisma®.

Results: By optimizing of the DTHib monoplexes the best results were obtained with coupled concentrations of 10 μ g/mL for diphtheria, 1 μ g/mL for tetanus and 400 μ g/mL for PRRP. Nonparametric Spearman analysis showed values statistical significant and good correlation between methods with coefficient of 0.608 (p=0.0045) for diphtheria, 0.775 (p=0.001) for tetanus. PRRP results are still being concluded.

Conclusion: The present study show promising results between ELISA and monoplex methods. From these results we proceed with the validation of Multiplex assay to evaluate the immunogenicity of the DTP/Hib vaccine.

IDENTIFICAÇÃO DE ANTÍGENOS IMUNODOMINANTES EM PACIENTES COM LEPTOSPIROSE ATRAVÉS DE MICROARRANJO DE PROTEÍNAS

Carolina Lessa-Aquino^{1*}, Jozelyn Pablo², Li Liang², Elsie A. Wunder Jr.³, Cristiane Pinheiro Pestana¹, Guilherme S. Ribeiro^{4,5}, Ricardo Galler¹, Mitermayer G. Reis⁴, Albert I. Ko³, Philip L. Felgner², Marco Alberto Medeiros¹.

¹Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, RJ, Brasil. ²Departamento de Medicina, Divisão de Doenças Infecciosas, Universidade da Califórnia Irvine, Irvine, CA, USA. ³Departamento de Epidemiologia de Doenças Microbianas, Universidade de Yale, New Haven, CT, USA. ⁴Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, Brasil, ⁵Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

INTRODUÇÃO: A tecnologia de microarranjo de proteínas é uma potente ferramenta de alto desempenho para identificar alvos candidatos a vacinas e marcadores diagnósticos para doenças infecciosas. Existe, hoje, uma ausência de medidas profiláticas e de testes diagnósticos eficazes para leptospirose, doença zoonótica causada por bactérias do gênero *Leptospira sp.*

OBJETIVO: Identificar novos alvos protéicos que possam ser empregados como candidatos à vacina e/ou marcadores diagnósticos para leptospirose, utilizando a plataforma de microarranjo de proteínas.

METODOLOGIA: O microarranjo foi construído compreendendo 2241 proteínas de *Leptospira interrogans* sorovar Copenhageni e investigou-se a resposta por anticorpos IgG de 274 indivíduos, sendo 80 pacientes em fase aguda da doença, 80 em fase convalescente e 114 indivíduos saudáveis provenientes de área com transmissão endêmica e não endêmica para doença.

RESULTADOS: Foram encontrados 16 antígenos capazes de identificar casos agudos de leptospirose e 18 capazes identificar casos convalescentes da doença. Antígenos como LipL32, Loa22, GroEL e os domínios das proteínas Lig foram previamente descritos como sendo reconhecidos por soros de pacientes humanos, atuando como prova de

conceito para a plataforma de microarranjo protéico. Novos antígenos também foram identificados no estudo, como a proteína hipotética LIC10215, que mostrou alta acurácia na identificação de casos agudos e convalescentes de leptospirose.

CONCLUSÃO: Os antígenos imunodominantes identificados demonstram potencial uso no desenvolvimento de vacinas e de novos ensaios diagnósticos, assim como no melhoramento dos testes disponíveis no mercado. Estudos complementares estão em andamento para avaliar o desempenho diagnóstico desses antígenos nos formatos de ELISA e/ou de teste rápido.

DEVELOPMENT OF A SENSITIVITY AND COST-EFFECTIVE REAL TIME PCR: MEASURING A WIDE RANGE OF HBV DNA CONCENTRATIONS

Alcione de Oliveira dos Santos^{1 2 3}, Luan Felipo Botelho de Souza^{2 3}, Lourdes Maria Borzacov^{2,3}, Juan Miguel Villalobos-Salcedo^{1 2 3}, Deusilene Souza Vieira^{1 2 3}.

1. Fundação Oswaldo Cruz Rondônia, Brazil – FIOCRUZ-RO; 2. Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia, Brazil – CEPEM; 3. Universidade Federal de Rondonia, Brazil – UNIR

Objectives: Several types of assays for detection and quantification are currently in use with a different effectiveness. The aim of this study was to develop an in house real-time PCR based method, which was both ultra-sensitive and efficient offering an alternative method for nucleic acid testing (NAT).

Methods: A precore fragment with 109 bp was cloned and serial diluted to standard curve construction. The calibration of the HBV - DNA values was performed against OptiQuant® HBV-DNA Quantification Panel, Acrometrix Europe B.V.). Specifically, serial dilutions of the standard ranging from 2×10^2 to 2×10^6 were tested. Based on a linear regression, a conversion formula was calculated for the in-house measurements (copies/mL) to the international standard units (IU/mL). The correlation between Acrometrix kit and in house assay was performed by Pearson's test, using GraphPad 5.0 to fit regression lines between IU/mL and copies/mL.

Results: Our method had an efficiency of 94.06% and showed good correlation with the leading international, WHO-approved test: AcroMetrix® HBV-DNA, $r = 0.998$, $p < 0.0001$. Our test proved to be 100 times more sensitive than the commercially available AcroMetrix® kit, allowing detection of as little as two copies per ml of serum from HBV-infected individuals. The limit of detection for the commercial WHO-approved kit is 200 IU/ml ($2.3 \log_{10}$ IU/ml) while our qHBVRO test detected 0.0010 IU ($-2.9 \log_{10}$ IU/ml), which equates to 2 copies/ml where 1 IU/ml = 2000 copies/ml. The qHBVRO assay was highly reproducible with intra- and inter-experimental

coefficients of variation of 0-1%. The analytical specificity of the test was investigated using samples from individuals that tested positive, negative and indeterminate for HBV surface antigen (HBsAg) by ELISA suggesting that qHBVRO PCR assay can detect HBV DNA in individuals with hepatitis B at any stage of the disease, qualifying it as an important alternative to other NATs.

Conclusion: The method proved to be efficient, sensitive, specific and reproducible detection of occult HBV, and could be used for nucleic acid testing (NAT).

DEVELOPMENT OF A REVERSE TRANSCRIPTION QUANTITATIVE REAL-TIME PCR-BASED SYSTEM FOR RAPID DETECTION AND QUANTIFICATION OF HEPATITIS DELTA VIRUS

Luan Felipe Botelho de Souza^{1 2 3*}, Alcione de Oliveira dos Santos^{1 2 3}, Lourdes Maria Borzacov², Eduardo Resende Honda², Juan Miguel Villalobos-Salcedo^{1 2 3} and Deusilene Souza Vieira^{1 2 3}

1. Fundação Oswaldo Cruz Rondônia, Brazil–FIOCRUZ-RO; 2. Centro de Pesquisa em Medicina Tropical de Rondônia, Brazil – CEPEM and 3. Universidade Federal de Rondonia, Brazil – UNIR

Objectives: This study we developed an in-house assay capable of detecting and quantifying hepatitis delta virus using serum samples based on a reverse transcription quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR HDV).

Methods: The study included 100 serum samples from patients infected with HBV/HDV. To test the specificity, a control group of 30 blood donors was included. For HDV RNA extraction was performed with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany). HDV RNA was converted in cDNA using 200 units of M-MLV enzyme (Sigma Aldrich®, Saint Louis, USA). The primers and hydrolysis probe (TaqMan Probes) were designed based on known and complete HDV sequences that are deposited in GenBank. For determining the viral load were produced in-house two calibrators standard HDV, a cDNA cloned into the plasmid and another transcribed RNA. For the validation this assay were used 140 clinical samples of serum, constituted of 100 samples from patients Anti-HDV and HBsAg positive by ELISA, 30 samples of blood donors, 5 samples with monoinfection HBV and 5 with monoinfection HCV.

Results: The limits of detection were 1.3×10^2 and 8.4×10^1 copies/mL for the calibrator standard HDV cDNA and RNA. From 100 serum samples of HBsAg- and anti-HDV positive patients who were tested by performing HDV-qPCR, 54% were positive with a viral load greater than or equal to the detection limit and 46% were

considered to be negative because they were below the detection limit of the assay as seen by the standard calibrator HDV cDNA. All 30 samples from the blood donors were negative. The linearity of HDV-qPCR was evaluated by constructing a linear regression curve for each run of serial dilutions of 6- \log_{10} calibrator standard HDV cDNA and RNA, whereby we found a strong correlation between the dilutions (correlation coefficient $R^2 = 0.97$ and 0.99) for both standards. The amplification efficiency was calculated from the slope of -3325 (99.8%) and -2.92 (119%, unsatisfying) for calibrator standard HDV cDNA and RNA, respectively. Repeatability was measured by determining the standard deviation (SD) of the intra-assay where the SD varied from 0.27 to 0.71 and from 0.02 to 0.35 for calibrator standard HDV cDNA and RNA. The reproducibility of the HDV-qPCR assay was confirmed by the inter-assay where the HDV RNA was quantified in serum samples of 6×3 runs on consecutive days. The HDV-qPCR assay is highly capable of determining the viral load of serum samples with low variability between runs.

Conclusion: This study represents the first HDV RT-qPCR assay developed in the Western Amazon region and offers great potential for new clinical efficacy studies of therapeutic antiviral used in patients with hepatitis delta in this region.

ENSAIO REAL TRIPLEX PARA HBV E DENGUE, VISANDO AMPLIAÇÃO DE ALVOS DO KIT NAT HIV/HCV BIO-MANGUINHOS

Autores: Antonio G. P. Ferreira¹; Elisabete Andrade¹; Daniele Rocha¹; Marcela Fontana¹; Patrícia Alvarez¹

¹LATED/VDTEC/Bio-Manguinhos/Fiocruz;

Objetivo: Padronizar ensaio de diagnóstico molecular para detecção do vírus da Hepatite B (HBV) e Dengue na plataforma de PCR em Tempo Real. Atualmente, para triagem de doadores de sangue no Brasil, são realizados testes NAT para HIV e HCV. No entanto, visando ampliar a segurança transfusional, o teste para HBV e Dengue está sendo desenvolvido/padronizado, aproveitando as bases técnicas do modelo atual do Kit NAT de Bio-Manguinhos que contempla a detecção de HIV e HCV.

Metodologia: Os iniciadores e sondas usados na padronização dos ensaios foram das regiões S para HBV e 3'NCR para Dengue. Até o momento, para obtenção das provas de conceito, foram processadas amostras HBV, positivas em ensaios sorológicos (HBsAg) e ensaios de quantificação de carga viral. Para Dengue, utilizamos 3 subtipos de vírus, de culturas de Dengue. Os testes foram realizados, individualmente, para cada alvo, permitindo a padronização da concentração de sondas e iniciadores. Para padronização do ensaio triplex, os dois alvos e a partícula calibradora (PC), como controle interno de reação, estão sendo ajustados em uma mesma reação.

Resultados: Para cada alvo (HBV e Dengue) foram testadas as fluorescências FAM e VIC e para PC, DYE3 (já estabelecida para o KIT NAT). A fluorescência FAM foi a melhor para os dois alvos, e a VIC não apresentou resultados satisfatórios em alguns subtipos de Dengue. Desta forma, adotou-se o FAM para Dengue e o VIC para HBV. Entretanto, foi necessária a otimização de concentração de sondas e iniciadores, para o uso da fluorescência VIC em HBV.

Conclusão: Os testes realizados indicam que a reação triplex por PCR em tempo real, para Dengue e HBV é bastante promissora. Visando padronizar e validar a reação para Dengue, e uma vez que amostras de cultura não refletem a complexidade de se amplificar/detectar, existe a real necessidade de se buscar amostras clínicas de Dengue

(tipo 1 a 4). Serão necessários, também, estudos de avaliação da metodologia e plataforma de equipamentos frente a painéis internacionais, para confirmação das características técnicas do produto, e verificação da compatibilidade de aplicação nas rotinas de triagem de doadores nos Serviços de Hemoterapia. Dentre essas características técnicas serão determinados os níveis de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade, entre outros.

DESENVOLVIMENTO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BACIOS GRAM-NEGATIVOS PRODUTORES DAS CARBAPENEMASES MAIS PREVALENTES NO BRASIL

Daniele Rocha¹, Elisabete de Andrade¹, Marcela Fontana¹, Marise Asensi² e Thiago Chagas² Antonio G. P. Ferreira¹, Patricia Alvarez¹

1 Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

2 IOC/FIOCRUZ

Objetivo: A incidência de SEPSE tem aumentado ao longo das últimas décadas e, juntamente com suas sequelas, é a principal causa de morbimortalidade em UTIs gerais. No Brasil, estima-se que ocorram, pelo menos, 200 casos de sepse/ano, com mortalidade de 50%. O objetivo do presente trabalho é desenvolver um kit de diagnóstico molecular laboratorial, com base na plataforma tecnológica de PCR em tempo real, para detecção dos genes das principais carbapenemases existentes no Brasil (KPC, NDM, OXA-48, SPM-1, OXA-23, OXA-51).

Metodologia: O ensaio de PCR em tempo real foi padronizado com bactérias sonicadas, consideradas controle positivo (estabelecida na PCR convencional), e bactérias submetidas à lise térmica. Para lise térmica bacteriana foram utilizadas duas condições: a) previamente aquecidas 95°C/5' e b) colocadas diretamente na reação de PCR, obtendo-se a lise durante a ativação enzimática, (TAQ *hot start*) 95°C/10'. O controle interno utilizado foi o gene constitutivo 16SrRNA. Foram testadas duas ciclagens de PCR: Protocolo Bio-Manguinhos e Protocolo CDC. Para os experimentos foram utilizadas cepas KPC+, NDM+ e KPC-/NDM-, e realizados ensaios de PCR em Tempo Real realizados em “single” e em multiplex.

Resultados: Para os ensaios em “single” observou-se amplificação satisfatória para KPC+, NDM+ e 16SrRNA independente da lise térmica (prévia ou não) e/ou sonicação. O PCR multiplex obteve resultados muito satisfatórios, quando comparados com os resultados em “single” de cada cepa e em comparação com as amostras sonicadas. Não houve diferença de amplificação entre as duas ciclagens testadas.

Conclusão: Das condições avaliadas todas obtiveram êxito, sendo a coleta direta da placa de petri e a ciclagem adaptada do CDC, o modo mais simples e rápido para realização do teste. Pode-se concluir que a prova de conceito foi alcançada, por intermédio dos resultados preliminares obtidos que são altamente satisfatórios, podendo futuramente ser incorporado na rotina de testes para identificação e detecção de cepas bacterianas isoladas de pacientes com quadro clínico de SEPSE.

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE TESTE DE QUANTIFICAÇÃO DE CARGA VIRAL DE HCV DE BIO-MANGUINHOS

Elisabete Andrade¹; Daniele Rocha¹; Marcela Fontana¹; Marcelo Corrêa; William Pires; Antonio G. P. Ferreira¹; Patrícia Alvarez¹

¹ LATED/VDTEC/Bio-Manguinhos/Fiocruz;

² SEDES/VGEST/Bio-Manguinhos/Fiocruz;

Objetivo: Desenvolver e validar um teste molecular destinado à quantificação dos genótipos 1 a 6 do Vírus de Hepatite C (HCV). A quantificação da carga viral (QCV) do HCV circulante em plasma humano representa uma ferramenta importante para o prognóstico e acompanhamento clínico do paciente portador de HCV, auxiliando na administração, duração e monitoramento da terapia antiviral. Os ensaios comerciais destinados à quantificação de carga viral de HCV, no Brasil, são comercializados com custos abusivos e a obtenção de uma alternativa nacional possibilitará ampliar significativamente o acesso da população.

Metodologia: O teste de QCV em ensaio duplex para HCV (fluorescência FAM) e Calibrador Interno (fluorescência Dye3) tem como base a plataforma de PCR em tempo real utilizando uma curva padrão obtida com um VLP (*virus like partical*) que contem a inserção de parte do genoma do HCV (derivado de uma Patente da FIOCRUZ). Para a validação do teste foi realizada comparação com um kit comercial, COBAS Taqman HCV Test (v2.0), analisando-se precisão e exatidão entre os testes preconizados pela RDC n°27/2012 (ANVISA). Para a validação foi utilizada o coeficiente de variação (CV) não se admitindo valores superiores a 15%, exceto para o limite inferior de detecção, admitindo-se valores menores ou iguais a 20%. Foram processadas amostras HCV positivas e painéis internacionais de quantificação, além de interferentes.

Resultado: A QCV de HCV foi estabelecida utilizando-se um curva padrão de quantificação com 3 pontos com diferentes concentrações, obtida ao longo de um exaustivo processo de padronização. O cálculo da QCV é realizado, por intermédio de software desenvolvido pela equipe de TI de Bio-Manguinhos, comparando-se o CT

encontrado da amostra, com os CTs dos 3 pontos da curva padrão, gerando um resultado em UI/mL e Log. O limite de quantificação deste teste de QCV de HCV é de $2,0E+06$ a $6,0E+01$ IU/mL e o limite inferior de detecção é de $3,0E+01$ IU/mL. Na validação os valores encontrados de CV ficaram dentro da faixa estabelecida na RDC nº27. A diferença máxima de log encontrada entre o teste desenvolvido em Bio-Manguinhos e o comercial foi de 0,7 log na carga viral de $6,0E+01$ UI/mL e a média de variação foi inferior a 0,4 log.

Conclusão: Os resultados da validação mostraram que o teste de QCV de HCV desenvolvido em Bio-Manguinhos está dentro dos padrões estabelecidos na RDC nº 27/2012. A diferença de log encontrada entre o teste desenvolvido e o comercial para a carga viral de $6,0E+01$ UI/mL está diretamente relacionada à maior variação na faixa do limite de sensibilidade dos testes, não sendo relevante clinicamente. Com relação à reprodutibilidade entre replicatas de amostras, a metodologia de Bio-Manguinhos apresentou resultados mais robustos com menor nível de variação se comparado ao Kit comercial.

ESTABELECIMENTO DO BANCO DE CÉLULAS MESTRE PARA PRODUÇÃO DA TAQ DNA POLIMERASE PARA O KIT NAT HIV / HCV BIO-MANGUINHOS

Vanessa da Silveira dos Santos Pacheco¹, Elezer Monte Blanco Lemes²

1. Bio-Manguinhos, Fiocruz, Departamento de Garantia da Qualidade, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Bio-Manguinhos, Fiocruz, Vice Diretoria de Produção, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivos: O presente trabalho estabelece do banco de células mestre (BCM) para a produção da enzima Taq DNA polimerase, que compõe um dos insumos do kit NAT HIV / HCV de Bio-Manguinhos, alvo de transferência de tecnologia e avalia também a estabilidade do mesmo, por pelo 11 meses.

Metodologia: Previamente a confecção do BCM foram analisados separadamente o plasmídeo BioMTaq e a célula competente One Shot[®] InvαF' de forma a checar a presença do gene de interesse (Taq DNA polimerase de 2507 pb), bem como a capacidade de transformação da célula. Foi, então, realizada a transformação do plasmídeo BioMTaq na célula competente One Shot[®] InvαF', seguida de cultivo em meio LB com ampicilina. Após análise individual de diferentes clones obtidos quanto a crescimento, aspecto e nível de expressão, o melhor clone foi selecionado. Este foi cultivado e criopreservado em glicerol originando o BCM. Após seu estabelecimento, definiu-se uma matriz para o estudo de estabilidade, de forma a avaliar as condições microbiológicas, bioquímicas e moleculares com o tempo de preservação, através dos estudos de viabilidade, estabilidade plasmídica e nível de expressão da Taq DNA polimerase.

Resultados: A análise individual do plasmídeo e da célula competente mostrou que ambos se encontravam em perfeitas condições para a transformação e conseqüentemente para o estabelecimento do banco de células mestre. A partir dos resultados do estudo de estabilidade, os testes de viabilidade, estabilidade plasmídica e nível de expressão da Taq DNA polimerase foram satisfatórios frente aos critérios pré-

estabelecidos e o estudo de estabilidade demonstrou a reprodutibilidade dos ensaios propostos, bem como a estabilidade plasmídica após 11 meses de armazenamento a – 70°C.

Conclusão: Concluiu-se que foi estabelecido um banco de células mestre homogêneo para a produção da Taq DNA polimerase e o estudo de estabilidade mostrou que as condições adotadas foram eficientes em manter a estabilidade do banco de células mestre em até 11 meses. Além disso, o estudo permitiu atender os requisitos técnicos para registro de produtos biológicos e biotecnológicos demandados pela Conferência Internacional para Harmonização e a RDC 55 de 2010.

AVALIAÇÃO DOS RISCOS ASSOCIADOS AO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA PARTÍCULA CALIBRADORA E CONTROLE POSITIVO DO KIT NAT HIV/HCV DE BIO-MANGUINHOS

Dênis Millan Mendonça¹, Elezer Monte Blanco Lemes².

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Departamento de Garantia da Qualidade, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Vice-Diretoria de Produção, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivo: Este trabalho identifica e avalia os riscos do processo produtivo de obtenção da partícula calibradora (PC) e controle positivo (CP), dois importantes insumos do KIT NAT HIV/HCV de Bio-Manguinhos.

Metodologia: Os riscos identificados referem-se ao processo produtivo visando à qualidade dos insumos (PC e CP). Foram utilizadas de forma complementar duas ferramentas de análise de risco: PHA - *Preliminary Hazard Analysis* (Análise Preliminar de Perigos) e HACCP- *Hazard Analysis and Critical Control Points* (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle). A PHA foi utilizada em um primeiro momento para, a partir do fluxograma do processo produtivo, identificar eventos que possam influenciar negativamente a qualidade dos produtos. Estes eventos foram classificados em uma matriz de risco. Delimitamos na matriz de risco uma região associada aos riscos mais importantes. As etapas do processo produtivo onde encontramos os riscos mais importantes foram consideradas Pontos Críticos do Processo (PCC). Os PCC foram estudados mais detalhadamente através da segunda ferramenta, o HACCP. A utilização desta ferramenta permite estabelecer os limites críticos, um sistema de monitoramento e medidas de controle para todos os PCC. Desta forma, a qualidade destes produtos pode ser avaliada em tempo real, ou seja, durante o processo produtivo e antes da análise pelo controle de qualidade.

Resultado: Foi proposto e validado um fluxograma para o processo produtivo baseado em duas plataformas – a) plataforma procariótica (na qual são obtidos os plasmídeos que contem a informação genética dos produtos, concentrados e com alto grau de pureza através da transformação e cultivo de bactérias competentes) e b) plataforma eucariótica

(na qual são obtidos os produtos com qualidade e pureza adequados através da transfecção e cultivo de células aderentes). A análise do processo produtivo identificou um total de 108 riscos (63 na plataforma procariótica e 45 na eucariótica) 72 riscos foram classificados como PCC. Destes, 40 se encontram na plataforma procariótica e 32 na eucariótica.

Conclusão: Aplicação das metodologias de análise de riscos a processos produtivos em transferência de tecnologia demonstrou ser bastante útil na medida em que identifica de forma prospectiva os riscos e propõe medidas de controle destes riscos antes do processo estar efetivamente implantado em Bio-Manguinhos o que permite agir de forma proativa e evitar não conformidades antes que estas ocorram. Além disso, estabelece uma base documental importante para elaboração dos Documentos Internos e de treinamentos.

DETECÇÃO DE AMOSTRAS EM PERÍODO DE JANELA IMUNOLÓGICA COM KIT NAT HIV/HCV BIO-MANGUINHOS, VISANDO AMPLIAR A SEGURANÇA TRANSFUSIONAL NO BRASIL

Autores: Patrícia Alvarez¹; Elisabete Andrade¹; Daniele Rocha¹; Marcella Fontana¹; Caroline Ferezin²; Linda Khalili²; Antonio G. P. Ferreira¹

¹VDTEC/Bio-Manguinhos/Fiocruz; ²VGEST/Bio-Manguinhos/Fiocruz

Objetivo: O ensaio NAT Brasileiro para triagem de doadores visa complementar a rotina de ensaios sorológicos e não se propõe a substituí-la, uma vez que com a progressão da infecção a carga viral tende a ficar, em alguns momentos, indetectável. Esta alta sensibilidade dos ensaios moleculares, foi aperfeiçoada, diminuindo o período de janela de imunológica, ou seja, período onde os testes sorológicos não são capazes de detectar a resposta imune para estes vírus em doadores de sangue, levando então a diminuição do risco residual transfusional para estes patógenos.

Metodologia: O Kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos é um ensaio baseado na técnica de PCR em tempo real, triplex discriminatório, com alto grau de automação, alta capacidade de processamento e sensibilidade. Após 2 anos do registro do produto junto à ANVISA, foi incorporado um iniciador reverso adicional para o HCV, sem anelamento na estrutura secundária do RNA viral, ampliando ainda mais a sensibilidade do produto.

Resultados: Segundo a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados/MS, até o momento, foram processadas cerca de 2,5 milhões de bolsas com o Kit NAT Brasileiro, tendo sido detectado um total de 14 amostras em período de janela imunológica. Destas, 12 foram detectadas para HIV e 2 detectadas para HCV. Além destas amostras, o produto foi capaz de detectar duas amostras de “look back”, em período de janela imunológica para HIV, que estavam estocadas na soroteca dos Hemocentros, além de obter excelente desempenho frente a painéis de soro-conversão. Estes dados vêm comprovando a aplicabilidade e a sensibilidade atribuída ao Kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos com o valor de 300 UI/mL para HIV e para HCV, no processamento de amostras individualmente (“single”). No entanto, para ambos os vírus, é possível observar nos ensaios de LOD que o limite de sensibilidade do produto considerando os

painéis NIBSC utilizados, fica abaixo deste valor uma vez que o produto foi capaz de detectar 8 replicatas de HIV com 142UI/mL e 8 replicatas de HCV com 60 UI/mL.

Conclusão: Atualmente considera-se um consenso mundial que a utilização dos ensaios NAT amplia a segurança transfusional e, através das ações e articulações no âmbito deste Projeto sob a liderança de Bio-Manguinhos e da CGSH/SAS/MS, a Hemorede e a população brasileira vem sendo beneficiada. O Kit NAT HIV/HCV Bio-Manguinhos é um produto diferenciado sob os aspectos científico e tecnológico, sendo um dos principais exemplos da política afirmativa do Ministério da Saúde que vem investindo em capacitação e acumulo de competências técnicas, nacionalização de insumos e produtos estratégicos, sobretudo, no fortalecimento do complexo industrial da Saúde.

CONSTRUÇÃO DE UM VETOR PARA RECOMBINAÇÃO DE INTEGRASES DO HIV-1

Bianca Duarte¹, Michelli de Oliveira¹, Bernard Piñeiro¹, Amilcar Tanuri¹

1. Universidade Federal do Rio de Janeiro/Laboratório de Virologia Molecular Aplicada

Objetivo: Este trabalho visou desenvolver uma ferramenta molecular para a produção de HIV-1 recombinantes de Integrase através da construção de um vetor plasmidial contendo o genoma completo do vírus, para recombinação com Integrases (INs) geneticamente diversas de vírus circulantes na população. O vetor recombinante gerado permite o desenvolvimento de ensaio fenotípico clínico de Integrases de pacientes para análise de vírus susceptíveis/resistentes aos Inibidores de Integrase, como o atualmente utilizado para terapia de resgate – Raltegravir (FDA, 2007), uma vez que a análise fenotípica do padrão de resistência clínica frente à diversidade genética das Integrases (INs) demonstra possuir impacto clínico no tratamento de pacientes em falha terapêutica aos medicamentos de primeira linha.

Métodos: O vetor pNL4-3Luc foi utilizado por possuir o genoma completo do HIV-1 e conter o gene repórter de luciferase no lugar do gene nef. Foi realizada a deleção do gene de Integrase, gerando o vetor recombinação de Integrases, pNL4-3LucΔInt. Para estudar a capacidade de produção de vírus integrase recombinantes, realizou-se dois ensaios de transfecção em células 293-T. No primeiro ensaio utilizou-se o vetor pNL4-3LucΔInt linear e co-transfectou-se com amplicons do gene de integrase subtipo B ou C. No segundo ensaio de transfecção foi realizada recombinação homóloga *in vitro* (GIBSON, 2009) e estes vetores integrase específicos foram transfectados. Além disso, foi realizada a extração de RNA de vírus subtipos B, C e F susceptíveis e resistentes aos inibidores de Integrase em cultura para realização de RT-PCR. Os amplicons de Integrases gerados foram recombinados com o vetor pNL4-3LucΔInt linear por recombinação homóloga *in vitro*.

Resultados: Os vírus integrase recombinantes gerados, puderam ser avaliados quanto à eficiência de infecção após leitura de luminescência pós infecção em células MT-4

susceptíveis. Apenas o segundo ensaio foi capaz de produzir vírus recombinantes de Integrase infecciosos, gerando o equivalente à 10^6 Sinais de Luz para os vírus recombinantes com Integrase do subtipo C e 10^5 Sinais de Luz para os do subtipo B. Diante da eficiente infecção pelos vírus recombinantes do segundo ensaio, foram realizadas reações de recombinação homóloga *in vitro* utilizando amplicons de Integrase de vírus susceptíveis e resistentes aos INIs subtipos B, C e F produzidos em cultura. Como resultado, obteve-se uma eficiência de produção de vetores corretamente recombinados de mínimo 15% e máximo de 85% com o uso da técnica.

Conclusões:

Diante do exposto, a observação da alta emissão de luz de células infectadas por vírus integrase recombinantes com gene repórter luciferase pode ser um método eficiente para avaliar a susceptibilidade destes vírus em presença de inibidores. Portanto, a recombinação homóloga *in vitro* demonstrou-se eficiente para a produção de vetores Integrase recombinantes com o objetivo de serem utilizados para produção viral em testes fenotípicos frente aos INIs.

Resumos dos pôsteres

Outros temas



AVALIAÇÃO DE UM SISTEMA DE INFORMAÇÃO *ONLINE* PARA GERENCIAMENTO DE ESTUDOS CLÍNICOS

Maria de Lourdes de Sousa Maia¹, Vanessa dos Reis von Doellinger¹, Paulo Roberto Gomes dos Santos¹, Suelen Renata Estácio Marques¹, Elizabeth Maciel de Albuquerque¹, Luiz Antonio Bastos Camacho², Marília Santini³.

1 - Bio-Manguinhos / Fiocruz

2- Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz

3- Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/Fiocruz

OBJETIVO

Avaliar o desempenho de um sistema de informação *online* para gerenciamento de estudos clínicos (Geclin).

METODOLOGIA: O Geclin foi avaliado durante a condução de três estudos clínicos: um de Fase II com a vacina meningocócica C (conjugada), um de Fase II/III com a vacina meningocócica B (polissacarídica) e outro de Fase IV com a vacina sarampo, caxumba e rubéola, realizados na unidade de ensaio clínico da Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos/Fiocruz e em centros municipais de saúde do Rio de Janeiro, em 2012 e 2013.

RESULTADOS: Após a introdução do Geclin, verificaram-se melhorias na transmissão e segurança da informação junto ao patrocinador. O acesso *online* ao sistema permitiu armazenar e atualizar dados em tempo real e com proteção de confidencialidade sobre os sujeitos de pesquisa e o cronograma de acompanhamento de atividades relacionadas aos estudos clínicos. Com o ambiente virtual, pode-se observar a agilidade no andamento do estudo, identificando e interagindo com os profissionais de pesquisa, nos centros colaboradores e na unidade da Asclin, para corrigir problemas em tempo oportuno, reduzindo gastos com infraestrutura, materiais, horas-homem e horas-carro.

Com a implementação do sistema, o tempo mínimo para disponibilizar as informações para tomada de decisões caiu de uma semana para o momento em que a informação era registrada no sistema, ou seja, em tempo real. Desta forma, o tempo de trabalho de

campo pôde ser reduzido à metade e o tempo para monitoria a um terço, aproximadamente.

CONCLUSÃO

O Geclin se mostrou um instrumento valioso para acompanhamento do trabalho de campo em pesquisa clínica, permitindo avaliar cenários e detectar necessidades de ajustes durante o desenvolvimento dos estudos, dando aos gestores a possibilidade de tomada de decisão em tempo oportuno. Verificou-se que o sistema atende ao objetivo de apoiar as atividades relacionadas à gestão de pesquisa clínica, tais como: planejamento, recrutamento de sujeitos de pesquisa, desenvolvimento de trabalho de campo, gerenciamento de dados para tomada de decisão e elaboração de relatórios, tornando possível o acompanhamento de vários estudos clínicos, ao mesmo tempo e em locais diferentes, de acordo com as Boas Práticas Clínicas estabelecidas pelo Documento das Américas e exigidas pela Anvisa.

PRODUTOS PARA A SAÚDE: DESAFIOS PARA AMPLIAÇÃO DO ACESSO

Mariana Rebello Pereira¹, Clarice Melamed²

1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, Brasil

2. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Osvaldo Cruz, Fiocruz, Brasília, DF, Brasil

Objetivo: O objetivo deste trabalho é traçar um panorama do mercado de produtos para a saúde no Brasil, na perspectiva da vigilância sanitária, e propor algumas intervenções para a ampliação da oferta.

Metodologia: Para elaboração desta pesquisa foi realizado um levantamento bibliográfico em fontes secundárias: artigos atuais, legislação, normas sanitárias e sítios eletrônicos de entidades e órgãos públicos.

O artigo faz uma pequena revisão de conceitos relativos à regulação econômica, que sustentam a argumentação apresentada no texto e aborda o histórico da regulação do mercado de produtos de saúde no Brasil, seu processo de inovação e a caracterização desse mercado no Brasil e no resto do mundo. Conclui-se com algumas propostas de intervenção.

Discussão: A demanda por produtos para a saúde vem crescendo no Brasil em decorrência da mudança no perfil demográfico e epidemiológico, e da ampliação da incidência de doenças crônico-degenerativas, que exigem tratamentos intensivos e cada vez mais caros. Tais mudanças associadas à dinâmica de inovação pressionam os gastos públicos e privados com produtos para a saúde.

Não há aqui a pretensão de esgotar o tema. As principais questões discutidas ao longo do texto e as propostas correspondentes para compensar falhas de mercado e ampliar a oferta estão relacionadas a seguir:

1) a harmonização de nomenclatura, permitirá compensar assimetrias informacionais e seria desejável, para executar compras públicas sob o regime de licitação definido pela Lei nº 8666/1993 e mesmo para formular um modelo de regulação de preços, ao modo da regulação de preços de medicamentos;

- 2) modificar a estrutura de gastos do sistema de saúde no Brasil, remunerando médicos e hospitais de forma a não induzir o uso excessivo de procedimentos e produtos de saúde;
- 3) desenvolvimento de ferramentas de análise de custo para incorporação de novos produtos, como é feito com os medicamentos, possibilitaria o direcionamento da pesquisa e da inovação para bens de maior relevância social;
- 4) ampliação da oferta de produtos para saúde, com política industrial e fomento a inovação e pesquisa, a fim de reduzir preços e diminuir a dependência externa;
- 5) uso de medidas de defesa da concorrência para reduzir barreiras a entrada e coibir atos de concentração a fim de limitar o poder de mercado de grandes grupos formados por hospitais e planos de saúde, que podem fixar preços finais elevados
- 6) desoneração dos produtos de saúde, que se repassada aos consumidores finais, poderia reduzir os preços, em cerca de 30%, de acordo com a Confederação Nacional da Indústria (CNI).

Resultado: Observa-se que as intervenções propostas podem gerar impactos em áreas diversas, uma vez que a transversalidade é uma característica da área da saúde. O desafio das políticas públicas é compatibilizar o bem estar social e o crescimento econômico.

NEW APPROACHES FOR STANDARDIZATION AND VALIDATION OF QRT – PCR ASSAYS FOR QUANTITATION OF YELLOW FEVER ON CLINICAL SAMPLES WITH HIGH QUALITY PARAMETERS

Alice G. Fernandes^{1,2}, Gisela F. Trindade², Anna M. Yoshida², Constança Britto¹, Sheila Maria B. Lima².

1 Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil.

2 Bio-manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Technological development, Rio de Janeiro, Brazil.

Objectives: The development and production of viral vaccines involves several steps that need the monitoring of viral load throughout the process (antigen production, purification, inactivation). Currently, these steps are monitored by plaque lysis titration assay, whose results take about seven to ten days to come out. With the advent of real time RT-PCR, we have a faster approach available to this issue. In this context, the development, standardization and validation of a technique to quickly and efficiently quantify the yellow fever (YF) virus in the aforementioned stages is extremely important.

Methods: To accomplish that, we constructed a plasmidial standard curve and validation parameters were evaluated. Furthermore, we defined the limits of detection and quantification of the test. To ensure high quality, internal controls were established in order to avoid false negative results.

Results: The statistical analysis revealed an excellent correlation between the results obtained in RNA copies/mL quantified by qRT-PCR and the viral titer calculated by lysis plaques tests ($R=0.96$). In addition, a correlation factor for conversion of the real time PCR data to plaque assays was generated. The results analysis showed that the validation experiments sufficed all parameters defined by the quality control sector.

Conclusion: The technique herein standardized proved to be effective for determining YF viral load both *in vivo* and *in vitro*, thus becoming a very important tool in all projects developed in LATEV, and may eventually be adopted as the gold standard laboratory analysis and quality control for vaccine production.

ANÁLISE E CONTROLE DE RISCOS ASSOCIADOS AO SISTEMA EMBALAGEM DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Gisele Corrêa Miranda¹

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivos: O objetivo desse trabalho é entender os perigos, riscos, e impacto potencial referentes ao processo de desenvolvimento de embalagem de produtos farmacêuticos, com enfoque ampliado em todos os processos relacionados a essa atividade, que envolvem desde o projeto estrutural e gráfico, passando especificação e compra dos materiais, pelo processamento do produto, armazenagem, distribuição e uso pelo consumidor, o que pode ser considerado como Sistema Embalagem, e propor mecanismos de atuação e controle para redução ou eliminação desses perigos.

Métodos: Métodos tradicionais na indústria de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC ou HACCP em inglês) e a Análise de Efeitos e Modos de Falha (FMEA) podem ser utilizados para a análise e controle de riscos no Sistema embalagem. Esses métodos indicam como ponto de partida a identificação dos perigos, a avaliação da sua probabilidade de ocorrer e impacto dos danos à saúde pública em termos de extensão e gravidade. Para adaptação desses métodos de análise de risco para o Sistema Embalagem de produtos farmacêuticos, é necessário primeiro entender e registrar quais são as funções primárias (contenção, proteção e viabilizadora do transporte) e secundárias (econômica, tecnológica, de marketing, de comunicação, conceitual, sociocultural e de meio-ambiente) das embalagens. Dessa forma são considerados perigos os fatores que podem afetar a qualquer uma dessas funções da embalagem.

Resultados: Perigos de quatro naturezas são encontrados no processo de desenvolvimento de embalagem de produtos farmacêuticos, estéreis e termo sensíveis, sendo eles: (1) perigos físicos (vazamento de produto, problemas na estanqueidade da embalagem primária, presença de substâncias estranhas, dificuldade ergonômica associada ao armazenamento, transporte, manipulação ou uso, inadequação aos equipamentos e processos de embalagem, volume e dimensões incompatíveis com os equipamentos refrigerados ou que dificultem a armazenagem e transporte); (2) perigos químicos (contaminação química na embalagem primária, material de embalagem reage

com o produto, embalagem não garante a estabilidade química do produto); (3) perigos biológicos (material de embalagem contaminado, contaminação no processo de embalagem, embalagem que não garante esterilidade durante a vida útil do produto, embalagem que permite proliferação de microrganismos); e (4) perigos cognitivos (informação incorreta ou contraditória indicada na embalagem; inadequação à legislação atual, confusão na identificação do produto, falha de comunicação sobre condições de transporte e estocagem do produto).

Conclusão: Existem muitos perigos relacionados ao desenvolvimento de embalagem, que podem afetar a qualidade de produtos farmacêuticos. O uso de ferramentas de análise de riscos tradicionais na indústria, tais como a Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e a Análise Efeitos e Modos de Falha (FMEA), associadas ao Sistema Embalagem, podem ser efetivas na análise e controle de perigos e riscos no desenvolvimento das embalagens e definição de processos de embalagem desses produtos farmacêuticos.

ANÁLISE DA PROPOSTA DE PROCESSO PRODUTIVO DO L-PAC TENDO COMO BASE A RDC 17

Camila Eleoterio Lopes Soares¹, Elezer Monte Blanco Lemes¹, Priscila Amaral²

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Vice Diretoria de Produção, Rio de Janeiro

2. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro

Objetivo: Transpor a visão da rotina de produção industrial para dar suporte no desenvolvimento tecnológico de um produto, o L-Fenil-acetil-carbinol (L-PAC), que é um intermediário para a síntese do fármaco Efedrina visando uma maior flexibilidade, otimizando etapas e minimizando os impactos regulatórios no desenvolvimento farmacêutico.

Métodos: A partir de um estudo de caso de uma metodologia aplicada a produção laboratorial do L-PAC por intermédio de um fluxograma das etapas produtivas e através dessas informações implementar uma visão de rotina de produção industrial elencando os principais pontos para controle e otimização da etapas.

Resultado: Realização de uma proposta de *sacale up* da produção de L-PAC e a implementação de parâmetros de controles em processo, tais como, quantificação de suspensão celular através de leitura de absorvância a 570nm após a produção do pré-inoculo, analisar o quantitativo de glicose, de benzaldeído, de oxigênio e de CO₂ durante o processo fermentativo, logo após ocorre um processo de centrifugação e coleta-se o sobrenadante para analisar a concentração de L-PAC através de cromatografia de alta eficiência (HPLC) utilizando na fase móvel acetonitrila e tampão de fosfato numa proporção de 70:30 (v / v), a vazão de 1 ml / min com detecção UV a 283 nm. Sob estas condições, os tempos de retenção do ácido benzoico e do L-PAC e benzaldeído, são, respectivamente 6,5 min e 11,2 min. Após essa análise avaliar o quantitativo de L-PAC produzido em uma fermentação para atender a produção de efedrina em escala industrial.

Conclusão: A partir do *scale up* da produção e das análises descritas no trabalho concluiu-se que, será necessária a adoção de melhorias no desenho e desempenho do processo produtivo atual do L-PAC, bem como a confecção de um sistema de banco de células pra que o mesmo atenda as prerrogativas do marco regulatório de boas praticas de fabricação a RDC 17/2010, como a homogeneidades dos lotes produtivos.

FLUORESCENCE ANALYSIS USED AS QUALITY CONTROL OF MONOCLONAL ANTIBODIES

Ana Paula Dinis Ano Bom¹, Patricia Barbosa Jurgilas¹, Hilton Jorge Nascimento¹, Ana Paula Araújo¹, José Procópio Moreno Senna¹, Marcia Arissawa¹, José Godinho da Silva Junior¹

¹ Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Technological Development, Rio de Janeiro, Brazil

Objectives: Proteins often need to be stored for an extended period of time and this fact can lead to loss of their biological activity. Particularly IgG monoclonal antibody shelf life can vary from a few days to more than a year depending of storage conditions. In this context the present work was done aiming to study the stability of an antibody produced against Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) using fluorescence analysis.

Methods: The stability of the anti-MRSA was monitored monthly by tryptophan fluorescence emission spectrum. In this sense, the anti-MRSA was incubated at different concentrations (0.2 mg/mL, 0.6 mg/mL and 1.0 mg/mL), temperatures (-70°C, -20°C and 30°C) and pH (6.0, 7.0 and 8.0). The kinetic thermal denaturation of the antibody was also determined in a temperature range interval (25°C-85°C). The excitation wavelength used was 280 nm and the emission wavelength was scanned from 295 nm to 415 nm. Sieving exclusion chromatography was used to evaluate possible aggregation or degradation.

Results: The anti-MRSA samples at pH 6.0 (30°C and -70°C) showed an increase of fluorescence spectra intensity, whereas the samples at pH 8.0 showed a small reduction of fluorescence spectra intensity at 30°C. No differences of fluorescence spectra intensity was observed in the samples at pH 8.0 and -70°C. Fluorescence intensity spectra of samples stored at pH 7.0 and - 20°C did not present alterations. All obtained results did not show shift on maximum emission wavelength or a wide variation in the spectrum area that might indicate a significant conformational change. This observation was confirmed by size exclusion chromatography. The thermal denaturation kinetics of

the samples at pH 6.0, 7.0 and 8.0 were seeded. Preliminary studies indicated changes in fluorescence intensity spectra when the antibody was subjected to extreme pH ($9 \leq \text{pH} \leq 4$) and high temperature (≥ 50 °C).

Conclusion: According to spectrum fluorescence analysis of anti-MRSA we concluded that anti-MRSA protein was more stable at pH 7.0 (-20°C).

ANÁLISE DE RISCOS PARA PRIORIZAR AUDITORIAS EM FORNECEDORES DE MATERIAL DE EMBALAGEM SECUNDÁRIA: O ESTUDO DE CASO BIO-MANGUINHOS

Jorge Ricardo Silva Moreira¹, José Manuel Santos de Varge Maldonado², Elezer Monte Blanco Lemes³.

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Divisão de Auditorias e Treinamentos, Departamento de Garantia da Qualidade, Rio de Janeiro, Brasil.
2. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.
3. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Vice Diretoria de Produção, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivo: Este trabalho apresenta a análise da qualificação de fornecedores de material de embalagem secundária (bulas, cartuchos e rótulos) de Bio-Manguinhos, frente às necessidades técnicas, regulatórias, normativas e operacionais bem como dos riscos associados à qualidade final dos produtos.

Metodologia: Um estudo de caso conduzido por pesquisa bibliográfica e documental, onde foram levantados dados para análise dos processos de pré-qualificação, qualificação de fornecedores de embalagem secundária e históricos das análises do controle de qualidade. Este estudo avaliou a lista de verificação utilizada por Bio-Manguinhos como ferramenta para Pré-Qualificação de Fornecedores desses materiais, estabeleceu critérios para classificação de graus de criticidade, de forma a estabelecer classificação e pontuação para cada item da lista de verificação e ainda apresentou ferramenta de gestão de risco *Risk Ranking and Filtering (RRF)* para definição de periodicidades das auditorias e das ações de acompanhamento do processo de Qualificação de Fornecedores.

Resultados: Uma proposta da lista de verificação com pontuação para classificação por grau de criticidade ao produto/processo e proposta de critérios de priorização das auditorias de Qualificação de Fornecedores de material de embalagem e das ações de acompanhamento, a partir da aplicação de ferramenta de gestão de risco *RRF* definindo os casos de auditoria anual, bianual, formas de planejamento e execução. A avaliação

dos fornecedores proporcionou um racional estruturado para a tomada de decisão quanto priorização e alocação de recursos, tendo como resultado a definição da execução de três auditorias bianuais completas (dois de bulas e um de cartucho), quatro anuais de adequação (três de rótulos e um de cartucho), priorizando os processos de avaliação da conformidade que envolvem reclamações, investigação de desvios e duas auditorias anuais completas (dois de cartuchos) para os mais críticos dos estudados.

Conclusão: O estudo de caso demonstrou a importância de trabalhar os critérios utilizados para avaliação da conformidade nos processos de aquisição, importância das análises de controle de qualidade e da utilização da ferramenta *RRF* para a priorização de auditorias em fornecedores, propondo como recomendações ampliação deste trabalho aos demais fornecedores e integração dos processos de aquisição e qualificação para avaliação da conformidade de fornecedores.

METABOLÔMICA APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DE POTENCIAIS ALVOS DE INTERVENÇÃO TERAPÊUTICA NAS DOENÇAS MICOBACTERIANAS

Katherine Antunes de Mattos^{1,2}, Viviane Carneiro Gonçalves Oliveira¹, Luiz Caetano Martha Antunes³, Euzenir Nunes Sarno⁴, Patricia Torres Bozza⁶, Georgia Correa Atella⁷ e Maria Cristina Vidal Pessolani¹.

¹ Laboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

² Laboratório de Controle de Qualidade, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos-BioManguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

³ Michael Smith Laboratories, The University of British Columbia, Vancouver, Canada;

⁴ Laboratório de Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

⁵ Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro

⁶ Laboratório de Bioquímica de Lipídeos e Lipoproteínas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Objetivos: Mapear o perfil metabólico modulado pela infecção micobacteriana, usando a abordagem metabolômica. Esta estratégia metodológica visa o entendimento contemporâneo da integração metabólica entre patógeno-hospedeiro, possibilitando a utilização desta ferramenta investigativa para identificar potenciais alvos para estratégias terapêuticas no tratamento de doenças metabólico-infecciosas, como hanseníase e tuberculose.

Metodologia: O perfil metabólico disparado durante a infecção foi analisado por DI-FTICR-MS. O perfil lipídico das células de pacientes e infectadas *in vitro* foi traçado por análises de HPTLC, DI-FTICR-MS e citometria de fluxo. A expressão dos níveis de enzimas e receptores envolvidos na homeostase do colesterol foi investigada por RT-PCR e/ou Western Blot. Estudos funcionais de enzimas da síntese *de novo* de colesterol foram realizados utilizando a abordagem de incorporação de acetato e análise por cintilografia e a funcionalidade dos receptores de colesterol exógeno foi monitorada por

microscopia confocal utilizando LDL-colesterol fluorescente. Microscopia em tempo real e confocal de células isoladas de pacientes e infectadas *in vitro* foram utilizadas para identificar os locais de acúmulo de colesterol no interior das células infectadas. A importância do colesterol na viabilidade micobacteriana foi investigada utilizando drogas que interferem nesta via, como estatinas, sendo a viabilidade determinada pelo LIVE/DEAD Bactlight Bacterial viability Kit por citometria de fluxo.

Resultados: A abordagem metabolômica nos permitiu identificar várias vias metabólicas alteradas durante a infecção micobacteriana, destacando-se as vias do metabolismo lipídico. A análise lipidômica desta interação identificou a via do colesterol como predominantemente modulada durante a infecção. As implicações funcionais previstas pela avaliação gênica e protéica de enzimas e receptores envolvidos na homeostase do colesterol demonstram a capacidade da micobactéria em induzir a síntese *de novo* e incorporação de colesterol, estando estes localizados no fagossoma contendo bactérias. Embora não se tenha a completa apreciação das fontes de carbono utilizadas pelas micobactérias durante a infecção, existem evidências genéticas que a micobactéria pode utilizar o colesterol como fonte nutricional. Assim, utilizamos a estratégia de inibir a via de síntese e captação do colesterol pela intervenção terapêutica com lovastatina, resultando em uma ação bactericida, nos modelos de infecção para micobactérias, hanseníase e tuberculose.

Conclusão: O mapeamento metabólico nos permitiu identificar uma importante via metabólica modulada durante a infecção micobacteriana, a via do colesterol. O conhecimento deste perfil metabólico nos permitiu propor uma estratégia racional de utilização de drogas baseado na enzima chave da via de síntese do colesterol, a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR). Assim, a abordagem metabolômica tornar-se um método importante para determinar a condição metabólica de uma doença, podendo mapear biomarcadores que sirvam de impressão digital da infecção, auxiliando no desenvolvimento de kits diagnósticos mais específicos além de contribuir nas estratégias de desenvolvimento racional de medicamentos baseado em alvos identificados como cruciais para a patofisiológica das infecções bacterianas.

STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF PNEUMOCOCCAL SURFACE ANTIGEN A (PsaA) OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE

Izabella Sodré Buty da Silva¹, Ana Paula Dinis Ano Bom¹, Ana Paula Correa Argondizzo¹, Ariane Leite Larentis¹, Marco Alberto Medeiros¹, José Godinho da Silva Junior¹

¹ Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation, Technological Development, Rio de Janeiro, Brazil

Objectives: *Streptococcus pneumoniae* bacteria is responsible for many severe diseases in humans. Pneumococcal surface antigen A (PsaA) is a virulence factor of *S. pneumoniae* and a potential candidate for development of a protein-based vaccine against this pathogen. In this context the present work was done aiming to study PsaA stability in presence of denaturing agents such as urea, guanidine hydrochloride (GdmCl), different temperatures and pH in the presence or absence of Zinc.

Methods: Recombinant PsaA crude preparation was submitted to ion-exchange chromatography in Hitrap DEAE Sepharose FF. The isolated PsaA fraction was analyzed by SDS-PAGE-12%, Fluorimetry and Circular Dichroism. Fluorescence measurements were carried out using the excitation wavelength fixed at 280 nm, and the emission spectrum was recorded from 295 nm to 415 nm. The Circular Dichroism (CD) spectra were monitored from 200 nm to 260 nm, averaged over 3 scans at a speed of 50 nm / min. If not mentioned, all experiments were performed at pH 8.0.

Results: Protein homogeneity was confirmed by denaturing gel electrophoresis (MW 37,500). Circular Dichroism data showed a partial reduction of secondary structure in 1 M. urea. Decrease of fluorescence spectral area was already observed in 0.25 M urea. Partial loss of protein secondary structure and conformational changes were detected at concentrations of 0.75 M GdmCl and 0.50 M urea. PsaA thermal denaturing process showed changes in secondary and tertiary structures at 45°C, despite the partial secondary structure to be still maintained at temperatures until 85°C. PsaA fluorescence

intensity decreasing was more observed in acid pH than neutral and basic pH. On the hand the protein solution in presence of Zinc showed conformational changes since 5 μM until 50 μM metal concentration. It was demonstrated by light scattering that PsaA aggregation is inhibited by 0.25 μM – 500 μM Zinc concentrations.

Conclusion: All data related to PsaA conformational analysis here obtained are significant in the aim to improve the structural understanding of this protein as a potential vaccine antigenic target.

CÉLULAS-TRONCO ADULTAS HUMANAS PARA ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE: UMA ALTERNATIVA AOS ENSAIOS ANIMAIS

Alessandra Melo de Aguiar¹, Crisciele Kuligovski¹, Elizabeth de Moraes¹, Ana Paula Abud¹, Jaiesa Zych¹, Thamile Reus¹, Bruno Dallagiovanna¹

¹Instituto Carlos Chagas, FIOCRUZ-PR

Objetivos: O objetivo deste estudo é desenvolver ensaios alternativos ao uso de animais e que tenham correlação com os efeitos tóxicos em humanos com o uso de células-tronco mesenquimais adultas humanas. Pretende-se assim investigar o uso de células-tronco em biotecnologia, ao testar sua aplicação em ensaios de citotoxicidade.

Métodos: Foi utilizada a metodologia de captação de vermelho neutro (“ICCVAM-Recommended Test Method Protocol BALB/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test Method,” 2006). O ensaio de captação do vermelho neutro é um ensaio quantitativo da viabilidade celular que utiliza culturas primárias ou linhagens celulares estabelecidas. O efeito tóxico da substância teste é correlacionado com o decaimento da captação do vermelho neutro pelas células (ECCVAM). Este teste é recomendado pela OECD (OECD no 129, 2010 para estimativa de determinação das doses iniciais para teste de toxicidade oral aguda, entre outros. Este teste permite o cálculo do IC50 (dose de inibição do crescimento 50%) utilizado para o cálculo da predição da DL50 (Dose Letal para 50% dos animais).

Foram utilizadas células 3T3 como controle, em comparação com células-tronco mesenquimais de tecido adiposo e foram testadas 3 drogas, com diferentes graus de toxicidade, dada pela DL50: arsenito de sódio (classe 2, $5 < DL50 \leq 5 \text{ mg/kg}$), SDS (classe 4, $300 \text{ mg} < DL50 \leq 2000 \text{ mg/kg}$) e glicerol (classe 6, $DL50 > 5000 \text{ mg/kg}$).

Resultados: A partir dos dados de IC50 obtidos para os diferentes substratos celulares avaliados, foi feita a extrapolação para o valor de LD50. Ao avaliar a predição dos valores de DL50 para as drogas avaliadas, houve concordância com a classificação de toxicidade para SDS e Glicerol e a classe de toxicidade foi subestimada em 1 classe para arsenito, onde foram classificadas como classe 3, para ambos os substratos

celulares utilizados. Desta forma, as células-tronco mesenquimais apresentam capacidade de predição da toxicidade semelhante a 3T3 para as drogas avaliadas.

Conclusão: As células-tronco mesenquimais apresentam capacidade de predição da toxicidade semelhante a 3T3 para as drogas avaliadas. É necessário realizar ensaio com um maior número de drogas de diferentes classes de toxicidade a fim de confirmar esses resultados. Os métodos desenvolvidos neste estudo tem grande potencial de aplicação para a indústria, pois podem ser utilizados para a avaliação de citotoxicidade de compostos químicos e de produtos já estabelecidos ou em desenvolvimento, com a redução ou substituição do uso de animais de laboratório e grande sensibilidade para predição da toxicidade em humanos.

DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁREAS LIMPAS RELACIONADAS A ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

Lívia Maria Rubem Vidal², João Flávio Carneiro Veras², Mariana Oliveira Souza², Elisa Martins Ladeira², Paulo Victor Pereira Baio^{2,3}, Verônica Viana Vieira¹

1. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Genética de Microrganismos, Rio de Janeiro, Brasil
2. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Setor de Identificação Bacteriana, Rio de Janeiro, Brasil
3. Laboratório Químico-Farmacêutico do Exército, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivos: Este estudo teve como objetivo determinar a diversidade das bactérias provenientes de áreas limpas e avaliar a identificação bacteriana realizada com o sistema fenotípico automatizado VITEK2 (BioMerieux) e pela análise de sequências do gene 16S rRNA.

Metodologia: Um total de 208 amostras bacterianas oriundas de áreas limpas (ISO 5, 7 e 8) foram analisadas utilizando o VITEK2 e/ou análise de sequências do gene 16S rRNA. A metodologia molecular foi utilizada como referência para avaliar o VITEK2 quando ambas as metodologias puderam ser realizadas.

Resultados: As amostras bacterianas foram identificadas como pertencentes aos seguintes grupos: bastonetes Gram positivos irregulares (BGPI) (6,66%), bastonetes Gram positivos formadores de endosporos (BGPE) (26,67%), bastonetes Gram negativos (BGN) (8,33%) e cocos Gram positivos fermentadores (CGPF) (23,33%) e não fermentadores da glicose (CGPNF) (26,67%). Segundo a identificação utilizando o VITEK2, os CGPF pertenceram a diferentes espécies de *Staphylococcus* (*S. caprae*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. xylosum* e *S. warneri*), *Streptococcus parasanguinis* e *Granulicatella adjacens*. A análise das sequências do gene 16S rRNA mostrou que 93% das amostras de *Staphylococcus* foram identificadas corretamente. BGN pertenciam às espécies *Sphingomonas paucimobilis*, *Pseudomonas oryzae* e ao grupo *Moraxella*. BGPE e CGPNF foram caracterizados utilizando o

VITEK2 e análise da sequência do gene 16S rRNA. CGPNF apresentaram os seguintes gêneros: *Arthrobacter*, *Barrientosiimonas*, *Brachybacterium*, *Janibacter*, *Kocuria*, *Macrococcus* e *Micrococcus*. Estes gêneros foram identificados pelo VITEK2 como pertencentes ao gênero *Micrococcus* ou *Kocuria* ou não foram identificados. Entre os BGPE foram observados os seguintes gêneros: *Bacillus*, *Cohnella*, *Paenibacillus*, *Terribacillus*, *Lysinibacillus*, *Oceanobacillus* e *Paenisporosarcina*. Os gêneros mais encontrados foram *Bacillus* e *Paenibacillus* que são compostos por 168 e 144 espécies válidas descritas respectivamente. Esta diversidade justifica a dificuldade da identificação fenotípica dos BGPE. O VITEK2 apresentou 21,28% de identificações equivocadas de BGPE e 34,04% de amostras não identificadas. Os BGPI não puderam ser avaliadas pelo VITEK2 principalmente devido a característica de insolubilidade. A metodologia molecular mostrou a presença dos gêneros: *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Dermabacter*, *Corynebacterium*, *Agromyces*, *Nocardioides*, *Brevibacterium*, *Curtobacterium*, *Exiguobacterium*, *Rhodococcus*, *Dietzia* e *Gordonia*.

Conclusão: Análises microbiológicas de produtos farmacêuticos estéreis devem ser realizadas em áreas limpas para garantir a qualidade e evitar resultados falso-positivos. A identificação de micro-organismos provenientes de áreas limpas é recomendada pela legislação e tem o intuito de promover investigações mais eficazes das possíveis fontes de contaminação microbiana e avaliar a eficácia dos procedimentos de limpeza. Este estudo mostrou que o VITEK2 não é indicado para a identificação de alguns grupos bacterianos encontrados em áreas limpas devido principalmente à ausência de perfis bioquímicos no banco de dados deste sistema. A ampla diversidade das bactérias isoladas de áreas limpas justifica a implantação de metodologias moleculares para a correta identificação de bactérias comumente encontradas neste ambiente.

GESTÃO DA MUDANÇA EM ÁREAS DE SUPORTE ÀS INSTITUIÇÕES DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Jorge de Oliveira Teixeira Junior¹

1. Bio-Manguinhos, Fundação Osvaldo Cruz, Gestão, Rio de Janeiro, Brasil

Objetivo: Apresentar metodologia para gestão da mudança em áreas basais de suporte às organizações.

Metodologia: Estudo de caso da reestruturação da Seção de Apoio de Bio-Manguinhos. Gestão da mudança nesse setor possibilitou o desenvolvimento de metodologia aplicável a áreas basais da Administração Pública carentes de razoável nível de entrega de serviços. Ficou evidenciada a baixa aderência da efetividade da Seção aos objetivos organizacionais, constatando-se o descumprimento de critérios como agilidade, presteza, compromisso, assiduidade. Diagnóstico demonstrou necessidade de planos de ação leves e sucintos, com etapas breves e facilmente replicáveis em períodos de curta duração. Estruturação desses planos envolveu levantamentos para o profundo conhecimento sobre os funcionários e seu posicionamento como proprietários dos processos. Foram realizados *benchmarkings* com *stakeholders*, buscando referências para: adoção de melhores práticas; levantamento dos custos de cada atividade; estabelecimento de SLA; criação de Guia de Serviços; melhora na avaliação por parte dos clientes.

Resultados: Reforço da importância da validação dos novos gestores pela alta administração e demonstração da relevância da utilização de ferramentas e tecnologias de informação para responder rapidamente ao ritmo vertiginoso das mudanças organizacionais. Destaque do grande valor da comunicação constante entre gestor e equipe para alinhar expectativas e atuações aos objetivos organizacionais. Evidência da necessidade de manutenção das equipes em contínua atividade, em nível adequado de orientação para resultados. Envolvimento dos colaboradores no planejamento da área, desenvolvendo análise ambiental de maneira a permitir a identificação de fatores críticos, a proposição de ações para a reestruturação. Atualização das descrições das atividades de cada processo de trabalho; elaboração de instruções de trabalho que

formalizaram rotinas da área. Ambiente e processos de trabalho aprimorados através técnicas de eliminação de papéis, diminuição do volume de documentos, digitalização. Descrição da missão da área; discriminação dos principais fornecedores e clientes; arrolamento de estruturas, recursos, equipamentos, materiais necessários ao trabalho; construção de indicadores para a medição dos processos de trabalho; desenho dos fluxos das rotinas de trabalho. Lacunas em conhecimentos, habilidades e atitudes minimizadas; equipe treinada e desenvolvida por meio de oportunidades internas e gratuitas de treinamento, parcerias com outras unidades, instituições e órgãos, públicos ou privados, além de opções *online*. Foco em RH levou à melhoria dos processos, permitindo a apresentação de proposta para redução de gastos; alteração da estrutura de cargos e salários para o exercício seguinte, processos de trabalho escritos e desenhados; melhora na avaliação dos *stakeholders*; Acordos de Nível de Serviço estabelecidos com os principais clientes; Guia de Serviços oficializado; Plano de Cargos e Salários estruturado; Centros de Custos determinados.

Conclusão: A metodologia, construída como um guia para novos gestores implantarem a gestão da mudança em seis meses em áreas basais do serviço público, demonstra-se prática e aplicável também em instituições de Ciência e Tecnologia.

PERSPECTIVAS DE DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO EM MANGUINHOS: CONCEPÇÕES DE CIÊNCIA, DELINEAMENTO

Carlos Fidelis da Ponte¹

¹ Casa de Oswaldo Cruz/Fiocruz – Instituto de Economia da UFRJ/ Programa de Pós-graduação em Políticas Públicas, Estratégias e Desenvolvimento

Objetivo: Análise da configuração do hiato entre as áreas de pesquisa e produção na trajetória de Manguinhos e os problemas daí decorrentes, examinando as concepções de ciência e tecnologia interferiram no desempenho da Instituição e na sua relação com o Estado e com a sociedade.

Metodologia: Admitindo que a visão sobre ciência e de como ela se organiza orienta a movimentação dos cientistas; o trabalho levantou e analisou as concepções de ciência de parte expressiva dos cientistas de Manguinhos, enfocando também a missão e os desenhos institucionais almejados por esses pesquisadores. Tais concepções foram cotejadas com os processos de reconfiguração internacional dos estudos envolvendo o fazer ciência e suas dinâmicas evolutivas e com os quadros políticos sanitários experimentados pelo país. Igualmente, foram confrontados os delineamentos institucionais e as formas organizacionais idealizadas por esses pesquisadores com aquelas observadas nas trajetórias dos países líderes em ciência e tecnologia.

Resultados: Autônomo administrativa e financeiramente, Manguinhos nos primeiros tempos, além de não reconhecer uma divisão clara entre pesquisa e suas aplicações, apresentava uma agenda de trabalho fortemente comprometida com as urgentes e pesadas questões da saúde pública. Atencipava-se às demandas, investigando o quadro sanitário nacional, ao mesmo tempo em que se apresentava como parte da solução dos problemas por ele descobertos.

Após a perda da autonomia imposta pela revolução de 1930, a missão e a localização da Instituição na máquina estatal dividiram opiniões, opondo as áreas da pesquisa e da produção. A primeira, capitaneada por adeptos do modelo linear de desenvolvimento científico e tecnológico, contrária à manutenção das áreas de produção na instituição e à subordinação de Manguinhos ao âmbito do Ministério da Saúde. A segunda, defendendo maior proximidade com a Saúde Pública.

A adesão ao modelo linear, associada ao distanciamento dos problemas nacionais daí derivado, contribuiu para o quadro de decadência experimentado por Manguinhos entre as décadas de 1940 e meados de 1970, quando a Fiocruz retomou sua trajetória ascendente. Apesar dos novos rumos, as concepções restritas de ciência e de missão institucional retardaram o ritmo e o alcance do processo de ascensão institucional, dificultando o desenvolvimento tecnológico local.

Conclusões: Ponto de interseção entre a saúde, a ciência e a tecnologia, a instituição tem um papel socialmente relevante e politicamente estratégico na superação do atraso e da dependência tecnológica. É preciso fortalecer os vínculos entre a saúde pública, o desenvolvimento econômico socialmente responsável. É preciso fortalecer ainda a capacidade institucional de se adaptar e manter a competitividade, bem como de dar respostas aos problemas nacionais. A superação do atraso tecnológico passa pelo estreitamento dos elos entre ciência e tecnologia e também pela constituição de um ambiente organizacional e institucional mais propício ao desenvolvimento tecnológico e ao atendimento das demandas sociais exigidos pelo país.

EXPERIÊNCIA DA DIVISÃO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE E PÓS-MARKETING NO RELACIONAMENTO COM EMPRESAS PRESTADORAS DE SERVIÇOS

Linda Khalili Boukai, Caroline Ferezin Pinto, Flávia Fontenelle Muylaert, Vanessa Martins da Silva, Ludmila Nascimento Rocha Villar Bezerra, Marilúcia Sobrado Pina, Priscila Caroline Almeida dos Santos.

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

Objetivo: Este trabalho visa compartilhar a experiência da Divisão de Atendimento ao Cliente e Pós- Marketing, DIACM, no que se refere ao relacionamento entre Bio-Manguinhos e as empresas parceiras contratadas que prestam serviços de assistência técnica à plataforma de equipamentos do kit NAT HIV/HCV em diversos níveis de atendimento.

Metodologia: A DIACM participou ativamente das diversas etapas da construção da relação contratual entre Bio-Manguinhos e três empresas privadas de caráter nacional/internacional fornecedoras dos equipamentos da plataforma NAT HIV/HCV. Sua atuação foi importante no alinhamento dos requisitos de atendimento de acordo com as demandas da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados/ Ministério da Saúde. Uma vez estabelecidos os critérios, a DIACM teve uma postura determinada na elaboração, discussão e negociação das cláusulas contratuais e contou, também, com o apoio da gerência do Departamento de Relações com o Mercado, do Laboratório de Tecnologia Diagnóstica e do Núcleo de Assessoria Processual– que forneceu as diretrizes legais contempladas na Lei 8.666/93, subsidiando o diálogo entre as partes. Para atender aos requisitos da IN02, que na época regeu as orientações do Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão (MPOG) para contratos de terceirização de serviços, a DIACM elaborou os documentos necessários para esta modalidade contratação: Projeto Básico, Plano de Trabalho, Justificativa e Planilha de Custos da execução dos serviços. A DIACM trabalhou na construção dos requisitos para o desenvolvimento e implantação de um Sistema Operacional CRM (Customer Relationship Management) para gerenciar o relacionamento entre Bio-Manguinhos, empresas parceiras e os

usuários no campo, tornando possível rastrear, acompanhar e compartilhar a resolução das ocorrências com fidelidade, em tempo real.

Resultado: O processo tramitou na Procuradoria/FIOCRUZ e, em dezembro de 2010, os contratos foram firmados com vigência de 60 meses. Houve uma intencional padronização entre as contratações de forma a harmonizar a regência e a fiscalização do contrato pelo servidor nomeado. Foram estabelecidos fluxos de comunicação interna e externa de forma a cumprir com os requisitos estabelecidos. Internamente, os fluxos foram desenhados para as diversas áreas envolvidas no processo de atendimento ao produto. Externamente, Bio-Manguinhos configurou-se como nível 1 de atendimento, sendo o primeiro canal de comunicação com os usuários. As empresas contratadas configuraram-se como nível 2. Os dados estatísticos da relação com as empresas parceiras revelam que, em 2012, foram registradas 1738 ocorrências e, destas, 61% foram resolvidas por Bio-Manguinhos e 39% resolvidas pelas empresas contratadas. Importante ressaltar que 77% das ocorrências foram resolvidas dentro do prazo estabelecido no POP da Divisão (DI 1232) que é de 20 horas comerciais em todo o Brasil.

Conclusão: A relação entre Bio-Manguinhos e as parceiras contratadas se estabeleceu de forma consensual e estruturada, com interação permanente, contribuindo para o sucesso da relação. As ocorrências foram resolvidas satisfatoriamente, em tempo oportuno, e continuamos buscando a melhoria contínua na prestação dos nossos serviços.

PRÁTICAS DE GESTÃO DO CONHECIMENTO PARA CRIAÇÃO DE AMBIENTE PROPÍCIO À INOVAÇÃO E À FORMAÇÃO DE REDES EM BIO-MANGUINHOS

Gisele Corrêa Miranda¹, Ana Paula da Silva Carvalho¹, Sergio Gerleti¹, Alexander Soares Nunes¹, Isabella Lira Figueiredo¹.

1. Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil.

Objetivos: O objetivo deste trabalho é propor práticas de Gestão do Conhecimento (GC) como forma de estimular a inovação em Bio-Manguinhos, através da criação de um ambiente propício à interação, ao compartilhamento do conhecimento e à transformação do conhecimento tácito em explícito.

Sendo Bio-Manguinhos um laboratório público do Ministério da Saúde, responsável pelo fornecimento de vacinas, reativos para diagnóstico e biofármacos aos programas públicos nacionais, bem como às demandas de solidariedade internacional, a capacidade de inovar é fundamental para sua sobrevivência, sustentabilidade e, principalmente, para garantir à população brasileira o acesso a produtos de alto valor agregado e o atendimento às demandas do quadro epidemiológico do País.

Métodos: O método utilizado como proposta de criação de ambiente propício à inovação está relacionado à espiral do conhecimento de Nonaka E Takeuchi, que caracteriza o processo de transformação do conhecimento tácito em explícito, e é o fundamento base das práticas e ferramentas de GC. Considerando que o conhecimento tácito é particular do indivíduo e está diretamente relacionado às suas experiências pessoais, seus valores e à forma de interpretação própria dos estímulos externos, como a educação, informação, cultura e relacionamentos, sua efetiva valorização para as empresas somente passa a ser mensurável através da sua explicitação em forma de ações, registros, resultados, e compartilhamento do conhecimento, caracterizando o processo de inovação. Todo o trabalho é feito a partir de uma abordagem participativa e colaborativa com foco em formação de redes.

Resultados: A partir de uma pesquisa inicial, para identificação de práticas de GC já existentes em Bio-Manguinhos e definição de novas práticas a serem implementadas ou estimuladas, foi proposto um modelo próprio de GC para a instituição, baseado na

espiral do conhecimento. Foram elencadas 14 novas práticas para contribuir na construção de um ambiente propício para inovação, e foram agrupadas em três eixos: (1) Inteligência Colaborativa, (2) Aprendizagem Organizacional e (3) Mapeamento do Conhecimento. O conceito desse modelo é que, através dessas práticas de GC, os colaboradores tenham condições de absorver maior quantidade de informação e com mais qualidade, registrar esse conhecimento, compartilhar suas experiências, e por fim gerar novos conhecimentos, soluções e produtos.

Conclusão: O diferencial de empresas “que aprendem” ou inovadoras está na capacidade de analisar a complexidade dinâmica das estruturas em meio a uma riqueza de detalhes, seja pelas informações cada vez mais acessíveis, pela velocidade em que as mudanças acontecem ou pela facilidade de criar novos inter-relacionamentos e gerar novos conhecimentos. Gestão do Conhecimento é um método para mobilizar o conhecimento com a finalidade de alcançar os objetivos da organização e melhorar seu desempenho. Por isso, o uso de ferramentas e práticas de GC cria um ambiente favorável a essas trocas, diálogos e associações e conseqüentemente à inovação.