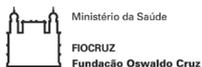


Anais do III Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos

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



III Seminário Anual
Científico e Tecnológico
de Bio-Manguinhos
Rj, 4 - 7 de maio de 2015



Anais do III Seminário Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos

Rio de Janeiro
2015

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos

Projeto Gráfico e Diagramação

Gisele Corrêa Miranda

Revisão Final

Cristina de Albuquerque Possas

Apoio Legal

Ana Paula Cossenza, Cíntia Reis Costa e Katia dos Reis – NITBio

Produção de

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos

Av. Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ

21040-360

Telefone: (021) 3882-3000

e-mail: sact@bio.fiocruz.br

ISBN 978-85-69231-00-4

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

F981

Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos.

Anais do 3º seminário científico e tecnológico de Bio-Manguinhos / Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – Bio-Manguinhos. – Rio de Janeiro : Bio-Manguinhos, 2015.

136 p.

ISBN 978-85-69231-00-4

1. Inovação tecnológica. 2. Vacinas. 3. Biofármacos. 4. Reativos para diagnósticos. 5. Resumos. I. Título.

CDD 303.483

CRÉDITOS

Ministro da Saúde

Arthur Chioro

Presidente da Fundação Oswaldo Cruz

Paulo Ernani Gadelha Vieira

Diretor de Bio-Manguinhos

Artur Roberto Couto

Vice-Diretora de Qualidade

Maria da Luz Fernandes Leal

Vice-Diretor de Produção

Antonio de Pádua Barbosa

Vice-Diretor de Desenvolvimento Tecnológico

Marcos da Silva Freire

Vice-Diretora de Gestão e Mercado

Lorena Dummond

Coordenação Científica e Tecnológica

Akira Homma e Reinaldo de Menezes Martins

Membros da Comissão Científica

Aline de Almeida Oliveira, Amicar Tanuri, Ana Paula Cossenza, Antonio G P Ferreira, Beatriz de Castro Fialho, Cristiane Frensch Pereira, Cristina de Albuquerque Possas, Isabella Lira Figueiredo, Ivna Alana Silveira, José Antonio Pinto Sá Ferreira, Jose Godinho da Silva Junior, Jose Procopio Moreno Senna, Linda Khalili Boukai, Luciane Pinto Gaspar, Marcos da Silva Freire, Maria de Lourdes Sousa Maia, Rodrigo Coelho Ventura Pinto

Comissão Julgadora de Prêmios

Cristina Brandileone, José Mauro Peralta, Marco Antonio Stephano, Martin Bonamino e Pedro Vasconcelos

Secretaria Executiva

Gisele Corrêa Miranda e Patrícia Pedroso Porto

CONTEÚDO

APRESENTAÇÃO	II
INTRODUÇÃO	12
VACINAS	15
V1 - Synthesis and Humoral immune response of the <i>S. pneumoniae</i> serotype 1 (PS1) and pneumococcal surface protein A (PspA) conjugate	16
V2 - Monitoramento genético como controle de qualidade da Vacina de Febre Amarela 17DD e de casos de eventos adversos	18
V3 - Tripsinização <i>in situ</i> de microcarregadores objetivando a passagem de células Vero e aumento do volume de cultivo (“scale-up”)	20
V4 - Análise de metodologias de 61 estudos clínicos com vacinas no âmbito das unidades da Fiocruz, 1938-2013	22
V5 - LC-MS/MS as a tool for analysis of underivatized glutamic and aspartic amino acids residues from <i>tetanus toxoid</i>	24
V6 - Characterization of native and deacylated Lipid A from lipooligosaccharide of <i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup B	26
V7 - Characterization of oligosaccharide of <i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup B.....	28
V8 - Desenvolvimento de um processo de purificação do vírus da Febre Amarela para aplicação na produção de uma vacina inativada	30
V9 - Avaliação da participação dos componentes vacinais na resposta imune da vacina brasileira contra <i>meningococo B</i> : Perspectivas de otimização da vacina	32
V10 - Estudo de segurança em adultos jovens da vacina meningocócica C conjugada produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz	34
V11 - Combinação de vacinas meningocócica C conjugada e vacina B para avaliação da resposta imune ao polissacarídeo C	36
V12 - Development of an alternative method for quantification of neutralizing antibody against yellow fever virus	38
V13 - Distribuição das bactérias isoladas do monitoramento ambiental e de águas de uma indústria biofarmacêutica, no período de 2010 a 2014	40
V14 - Adequação e melhorias no processo de limpeza e desinfecção de ovos spf utilizados na produção da vacina de febre amarela	42

BIOFÁRMACOS..... 45

- B1 - Avaliação da proteína recombinante rOmpA de *Acinetobacter baumannii* como alvo para imunoterapia..... 46
- B2 - Estudo clínico retrospectivo da alfatiglicerase no Hemorio 48
- B3 - Modulação da expressão de co-reguladores da via do receptor de androgênio pelo PCA3 em células de câncer de próstata..... 50
- B4 - Identificação do IFN- α -2b através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas 52
- B5 - Estratégia de otimização na triagem e recrutamento de participantes em estudo clínico com alfaeoptina 54
- B6 - Determinação dos aminoácidos alanina, glicina e ácido glutâmico na eritropoetina humana recombinante (epohr) formulado sem albumina soro humana por clae-uv..... 56
- B7 - Avaliação do desempenho do cultivo em suspensão de células CHO expressando a EPOhr em sete meios comerciais 58
- B8 - Avaliação de alternativas de filtros para clarificação da colheita do biorreator no processo produtivo da EPOhr 60
- B9 - Human Recombinant Oligomeric Endostatin for Inhibition and Regression of Pathological Angiogenesis 62

REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO..... 65

- R1 - Ferramentas proteômicas na identificação de novos alvos antigênicos na proteína M do *Histoplasma capsulatum* e aplicação em ensaios imunoenzimáticos..... 66
- R2 - Avaliação da utilização de ensaio imunocromatográfico para o diagnóstico e estudo de prevalência da hepatite A 68
- R3 - Avaliação de antígenos de sífilis para utilização em Testes Rápidos. 70
- R4 - Incorporação do 4º alvo, dengue, no Kit NAT HIV/HCV/HBV brasileiro produzido por Bio-Manguinhos..... 72
- R5 - Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos - Eficácia para detecção do alvo HBV em amostras em período de janela imunológica 74
- R6 - A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection and genotyping of Group A rotavirus. 76

R7 – Rapid Immunochromatographic test for serological diagnosis of Feline Immunodeficiency Virus in cats. 78

R8 - Análise comparativa do histórico da prestação de serviços e do desempenho do kit NAT HIV/HCV/HBV na Hemorede NAT brasileira. 80

R9 - Avaliação de proteínas recombinantes nacionalizadas como componentes de um multiteste para triagem sorológica de doadores de sangue. 82

GESTÃO 85

G1 - Inovação da gestão em pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz: quebrando paradigmas rumo à sustentabilidade organizacional 86

G2 - Avaliação da inovação na organização pública multipropósito de saúde: efetividade na atenção clínica com eficiência no uso de recursos..... 88

G3 - O uso da ferramenta de Comunidades de Prática (CoP) em Bio-Manguinhos para gerar ambiente propício à inovação 90

G4 - Avaliação Tecnológica das Tendências de Apresentações e Embalagens de Vacinas para Programas de Imunização indicadas pela OMS 92

G5 - Mapeamento de instituições acadêmicas, empresas e produtos em plataformas vegetais 94

G6 - Banco de Ideias e Sugestões: desafio da gestão da inovação no setor público - caso Bio-Manguinhos 96

G7 - Os Encontros Tecnológicos como uma ferramenta de Gestão do Conhecimento para promoção da inovação interna..... 98

G8 - Comparação entre os critérios adotados para seleção de projetos de inovação para fomento público e incorporação de tecnologias no SUS..... 100

G9 - Implementation of a *Cells Database System* – An efficient validated tool for management of biological materials 102

OUTROS TEMAS RELACIONADOS 105

OTR1 - Estabelecimento das condições de armazenamento de amostras biológicas provenientes de estudos clínicos desenvolvidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos / Fiocruz 106

OTR2 - Novo sistema automatizado de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde do INCQS/Fiocruz: SIGReSSaWeb..... 108

OTR3 - Validação de ensaio imunoenzimático (Western blot) para o diagnóstico da histoplasmoze	110
OTR4 - Comunidade de Práticas de Redes Colaborativas em Oncologia (CoP-Rede Onco) como estratégia para fomentar inovação em Bio-Manguinhos.....	112
OTR5 - Otimização da técnica de RT-PCR em tempo real para detecção do vírus da hepatite E em amostras positivas para HIV	114
OTR6 - A análise estatística como ferramenta para melhorar o processo de fabricação de medicamentos	116
OTR7 - Avaliação de eventos adversos recebidos pela farmacovigilância a partir do SAC de Bio-Manguinhos / Fiocruz.....	118
OTR8 - Multiple antigen immunization: a throughput platform for monoclonal antibody generation.	120
OTR9 - Identification of IgG epitopes to plasminogen in patients with dengue: absence of crossreactivity to dengue protein E	122
OTR10 - Diagnóstico diferencial para detecção de herpesvírus humanos em pacientes imunocomprometidos	124
OTR11 - Understanding the interaction effects between a monoclonal antibody and HBsAg by molecular dynamics aiming the affinity mAb improvement	126
OTR12 - Effects of L-alanyl-L-glutamine media supplementation on batch hybridoma growth and monoclonal antibody production	128
OTR13 - Detection of <i>Mycoplasma sp.</i> and <i>Acholeplasma laidlawii</i> in biological products and culture media by real time PCR	130
OTR14 - Padronização de uma metodologia de ensaio na plataforma de microarranjos líquidos utilizando sífilis como modelo	132



APRESENTAÇÃO

Caro participante,

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz) realiza o seu III Seminário Anual Científico e Tecnológico na semana de comemoração de nossos 39 anos de atividade, e somos tomados de satisfação por comemorar esse momento ao lado de especialistas, estudiosos e pesquisadores na área de imunobiológicos do país.

A III edição do Seminário mantém a credibilidade já consolidada do evento ao apresentar o panorama nacional do desenvolvimento de vacinas, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos, ao lado dos temas de gestão, para estimular a produção científica e tecnológica em Bio-Manguinhos e contribuir para a identificação de prioridades e de lacunas a serem superadas na atuação das instituições de pesquisa e dos produtores nacionais.

Concebido para criar um ambiente de incentivo ao debate de ideias, o III SACT certamente propiciará a troca de experiências e o estímulo a novas parcerias em redes colaborativas de pesquisa voltadas ao desenvolvimento de novos processos e produtos. Em seu temário, contempla assuntos cruciais para o processo de desenvolvimento tecnológico e produção, como a apresentação de estudos diversos voltados à gestão, logística, controle de qualidade e avaliação de serviços.

Aproveite ao máximo o III Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos!

Cordialmente,



Artur Roberto Couto

Diretor de Bio-Manguinhos

INTRODUÇÃO

O Seminário Anual Científico e Tecnológico em Imunobiológicos de Bio-Manguinhos (SACT-Bio) é um evento que foi idealizado em 2012 com a proposta de incentivar e motivar os pesquisadores de todas as instituições nacionais e internacionais da área, em especial os da Fiocruz e de Bio-Manguinhos, à inovação e ao desenvolvimento tecnológico de vacinas, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos.

Com esta perspectiva, o Instituto realizou, em 2013 e 2014, duas edições de sucesso. Foram aceitos e exibidos um total de 140 pôsteres, dos quais 42 foram selecionados para apresentação oral e 10 foram premiados. Ao todo, foram cerca de 750 participantes ouvintes. Além das apresentações de peritos em palestras, o evento conta com uma área para exposição de pôsteres, dos quais alguns são selecionados para apresentação em plenária e são conferidos prêmios para os melhores trabalhos. Desta forma, o seminário vem estimulando um ambiente favorável à inovação, com novos espaços e oportunidades para jovens talentos e para a interação entre profissionais de áreas afins.

A edição deste ano, o III SACT, que acontece de 4 a 7 de maio no campus da Fiocruz, faz parte das comemorações dos 39 anos de Bio-Manguinhos e contará com seis palestras e seis módulos de apresentações orais de pôsteres em plenária.

O formato do evento tem como foco principal dar oportunidades aos pesquisadores e colaboradores, tanto de Bio-Manguinhos quanto de outras instituições, para dar visibilidade a seus trabalhos científicos e apresentar resultados alcançados, assim como interagir com pares e profissionais complementares, para compartilhar ideias, conhecimentos e experiências.

Neste ano, a Comissão Científica, responsável pela programação do evento e pela seleção dos trabalhos participantes do evento, resolveu dar destaque para trabalhos na área de gestão, criando um módulo exclusivo a trabalhos classificados com esse tema, além dos módulos de vacinas, biofármacos, reativos para diagnóstico e outros temas relacionados.

Dando continuidade ao trabalho iniciado nas edições anteriores, no III SACT temos a satisfação de contar com mais de 400 inscritos e com a aprovação de 55 trabalhos inéditos para exposição, dos quais 23 foram selecionados para apresentação oral em plenária.

Uma comissão externa de avaliação de prêmios foi montada para selecionar os melhores trabalhos para receberem prêmios e homenagens conforme abaixo:

Prêmio Oswaldo Cruz (1º lugar) – R\$ 7.000,00 (sete mil reais)

Prêmio Carlos Chagas (2º lugar) – R\$ 5.000,00 (cinco mil reais)

Prêmio Alcides Godoy (3º lugar) – R\$ 3.000,00 (três mil reais)

E para os melhores trabalhos de Jovem Talento Científico (até 26 anos de idade) são 3 prêmios:

Prêmio Henrique de Azevedo Penna – R\$ 1.000,00 (hum mil reais)

Prêmio Evandro Chagas – R\$ 1.000,00 (hum mil reais)

Prêmio Sérgio Arouca – R\$ 1.000,00 (hum mil reais)

A comissão Científica do III SACT novamente agradece a participação dos pesquisadores e demais participantes internos e externos à Fiocruz, o importante apoio da Diretoria de Bio-Manguinhos e da Presidência da Fiocruz, e a atuação e dedicação da equipe organizadora deste evento.

Cordialmente,

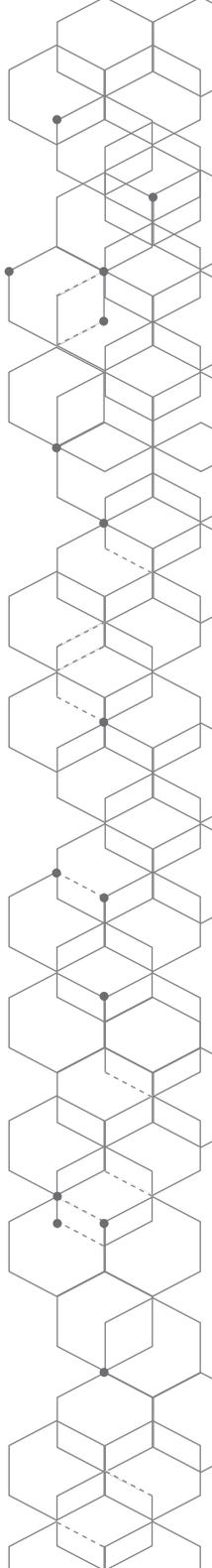


Akira Homma

Presidente do Conselho Político e Estratégico de Bio-Manguinhos

Presidente da Comissão Científica do III Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos.

VACINAS



VI - Synthesis and Humoral immune response of the *S. pneumoniae* serotype I (PSI) and pneumococcal surface protein A (PspA) conjugate

Luciene Oliveira Machado^{1*}; Giovana Cappio Barazzone²; Martha Massako Tanizaki².

1 - USP - Instituto Butantan;

2 - Instituto Butantan.

Introduction:

Streptococcus pneumoniae is a pathogenic encapsulated bacterium that causes infectious diseases such as pneumonia, meningitis, bacteremia, peritonitis, sepsis, osteomyelitis. The antigen of vaccines against *S. pneumoniae* are capsular polysaccharide (PS) free or conjugated to a carrier protein. The advantage of a conjugated vaccine is to change the PS from a T-cell independent antigen to a T-cell dependent antigen causing generation of memory cells.

Objective:

Synthesis and evaluation of the humoral immune response of the capsular polysaccharide of *S. pneumoniae* serotype 1 (PS1) and pneumococcal surface protein A (PspA) conjugate.

Methodology:

1) Conjugation. The conjugate was obtained in three steps: hydrolysis of the polysaccharide, carboxamide formation (PS1-AH) and conjugation reaction between PS1 - AH and PspA. The PS1-PspA conjugate was purified by size exclusion chromatography was performed in Sephacryl S-300 and eluted with 0.15MNaCl, 0.05MNa₂HPO₄, pH7.0 at flowrate of 1.0 ml/min. Polysaccharide and protein contents were measured by phenol-sulfuric and bicinchoninic acid (BCA) methods, respectively.

2) Immune response. Female BALB/c mice were immunized intraperitoneally with PS1-PspA conjugate and the controls (PS1 and PspA). The humoral immune response against both PS1 and PspA after three immunizations with PS1-PspA conjugate and PS1 and PspA co-administered was evaluated by ELISA.

Results:

The average molecular weight of the PS1 after hydrolysis decreased from 1,000 kDa to about 26 kDa. The carboxamide formation introduced 3 groups NH₂ per molecule of PS1. The group NH₂ of the PS1-AH reacted with the carboxyl group of PspA. The purification of the conjugates by size exclusion chromatography, Sephacryl S-300 resin, was efficient. PS1 conjugation to PspA increased the induction of anti-PS1 IgG after the third immunization, which indicated the change of immune response against PS from T cell independent to T cell dependent response. Conjugation did not alter the immune response induced against PspA.

Conclusion:

The results showed an efficient method of synthesis of PS1-PspA conjugate. Furthermore, our data revealed the capacity of PspA to be used as antigen and carrier protein to PS1.

Keywords: *S. pneumoniae*, Conjugated Vaccine, *S.pneumoniae* serotype 1

V2 - Monitoramento genético como controle de qualidade da Vacina de Febre Amarela 17DD e de casos de eventos adversos

Cristiane Pinheiro Pestana^{1*}; Rafael Lawson Ferreira²; Ricardo Galler¹; Marcos da Silva Freire¹; Marco Alberto Medeiros¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ;

2 - INCQS/FIOCRUZ

Introdução:

Atualmente disponibilizada por sete fornecedores, a vacina 17D de febre amarela (VFA) foi elaborada em 1937 e 20 a 60 milhões de doses são administradas por ano. Duas linhagens principais são utilizadas para a sua produção: 17D-204 e 17DD. A vacina produzida por Bio-Manguinhos contém a cepa 17DD, oriunda de passagens subsequentes do vírus 17D na 195ª subcultura. A vacina 17D é considerada uma das mais seguras e eficazes já produzidas, entretanto, raros eventos adversos neuro e viscerotrópicos são identificados. A variabilidade genética entre os vírus selvagens e vacinais é bem conhecida permitindo diferenciá-los molecularmente.

Objetivo:

Desenvolver um protocolo para identificação molecular do vírus 17D vacinal por sequenciamento do genoma completo e demonstrar o seu potencial como ferramenta no monitoramento genético do vírus vacinal e em casos de eventos adversos associados à vacinação antiamarilica.

Metodologia:

Entre 2012 e 2014, foram sequenciados 43 lotes vacinais, o lote-semente 993FB013Z (lote atual de produção), e o RNA viral oriundo de um caso de efeito adverso. Para o sequenciamento do genoma completo do vírus 17DD, 54 oligonucleotídeos foram desenhados, utilizando-se ferramentas *in silico*. Em seguida 9 reações utilizando alguns dos oligos descritos anteriormente, foram padronizadas para a amplificação do RNA viral por RT-PCR. O sequenciamento foi realizado com o Kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, e as eletroforeses capilares foram conduzidas no sequenciador automático *Genetic Analyzer 3500XL*. Para as análises *in silico* utilizamos o programa DNASTAR 5.05.

Resultados:

As sequências nucleotídicas dos genomas analisados foram completamente elucidadas em duas cadeias. Todos os RNAs avaliados apresentaram o número de nucleotídeos característico (10.862 pb). O genoma dos lotes vacinais e do material oriundo de efeito adverso exibiram 100% de identidade nucleotídica com o vírus semente, e consequentemente, o alinhamento da poliproteína não evidenciou troca de aminoácidos. Os dados gerados pela análise nucleotídica de 43 lotes VFA 17DD demonstram estabilidade genética da vacina e reprodutibilidade e robustez do protocolo desenvolvido pelo grupo. Em relação ao caso fatal de evento adverso os nossos resultados corroboram os dados da literatura, nos quais a ausência de mudanças nucleotídicas específicas sugere que fatores inerentes ao hospedeiro são os principais determinantes da gravidade do quadro clínico pós-vacinal.

Conclusão:

O método desenvolvido mostrou-se uma ferramenta para o monitoramento da variabilidade genética dos lotes da VFA 17DD e de casos de eventos adversos associados. A literatura vigente e nossos achados reforçam que a VFA é uma vacina segura e eficaz e com alta estabilidade genética durante o processo de produção e após administração *in vivo*. Adicionalmente, um estudo mais aprofundado e robusto poderia avaliar a troca dos ensaios de neurovirulência em macacos pelo sequenciamento viral para a validação de lotes sementes para a produção de vacina, corroborando as orientações atuais de substituir os ensaios em animais por testes *in vitro*.

Palavras-Chave: Vacina de Febre Amarela, Vírus 17DD, Evento Adverso, Sequenciamento nucleotídico

V3 - Tripsinização *in situ* de microcarregadores objetivando a passagem de células Vero e aumento do volume de cultivo (*scale-up*)

Luiz Gustavo Almeida Mendes¹; Diogo Araújo de Mattos^{1*}; José Henrique Rezende Linhares¹; Marlon Vicente da Silva¹; Marta Cristina de Oliveira Souza¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹; Luciane Pinto Gaspar¹; Elena Caride¹; Marcos da Silva Freire¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

Avanços na tecnologia de cultivos de células animais permitiram novas aplicações para produção de vacinas e biofármacos. As células animais empregadas em tais processos podem ser divididas pelo requerimento de um substrato para sua ancoragem ou pela capacidade de crescer em suspensão (independentes de ancoragem). A linhagem celular Vero é uma linhagem contínua, dependente de ancoragem, extensamente utilizada para produção de vacinas virais, com aceitação das Agências Regulatórias (nacional e internacional). A utilização de microcarregadores permitiu a realização de cultivos em solução de células dependentes de ancoragem, em frascos tipo *spinner* ou biorreatores. As células são usualmente inoculadas nos microcarregadores a partir de cultivos de frascos estacionários, e sua passagem representa uma importante limitação ao aumento de escala de cultivo celular e produção de vacinas de interesse.

Objetivo:

No trabalho atual, objetivamos estabelecer uma metodologia robusta de passagem das células Vero de microcarregadores a outros microcarregadores visando aumento de escala, mais precisamente, da escala laboratorial para a escala piloto de 50 Litros ou mais.

Metodologia:

Foram realizados experimentos de tripsinização *in situ* das células Vero em microcarregadores, que consistiu na incubação de soluções de tripsina em microcarregadores colonizados com células Vero. Foram também realizadas culturas utilizando-se frascos do tipo *spinner*. Células Vero oriundas de cultivos estacionários foram inoculadas em *spinners* contendo microcarregadores e levadas a cultivo por 72 horas até que chegassem à confluência. Antes

da tripsinização, propriamente dita, a agitação dos *spinners* foi desligada e os microcarregadores sedimentaram. O meio de cultivo foi retirado e foram realizadas duas lavagens com solução salina tampão fosfato antes da incubação com a tripsina. Inicialmente, foram testadas diversas condições das soluções de tripsina até que a melhor condição fosse identificada. Replicatas biológicas foram realizadas com as células Vero em outra passagem e em dias diferentes.

Resultados:

A passagem de células Vero foi bem sucedida a partir da tripsinização *in situ* de esferas de microcarregadores colonizadas. Foi possível realizar o aumento de quatro vezes do volume de cultivo dos *spinners*. Após 72 horas, os *spinners* com aproximadamente 106 células/mL foram tripsinizados e novos *spinners* inoculados, a densidade de células viáveis alcançou 106 células/mL depois de 4 dias de cultivo. Adicionalmente, resultados preliminares da passagem para inoculação de biorreator com 2,5 L de cultivo apontam para a viabilidade de produzir inóculo para biorreator a partir de cultivos em *spinners*.

Conclusão:

A metodologia adotada neste trabalho é capaz de amplificar o volume de trabalho de 4 a 5 vezes, diminuindo, conseqüentemente, a quantidade inicial de células, possibilitando escalonar para 50 Litros ou mais.

Palavras-Chave: Vacina, Cultivo de Células, *Scale up*

V4 - Análise de metodologias de 61 estudos clínicos com vacinas no âmbito das unidades da Fiocruz, 1938-2013

Reinaldo de Menezes Martins^{1*}; Cristina de Albuquerque Possas¹; Akira Homma¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

As unidades científicas da Fiocruz têm uma longa experiência de estudos clínicos com vacinas, desde os primórdios da criação do Instituto Oswaldo Cruz. Consideramos relevante analisar esses estudos clínicos, do ponto de vista metodológico, numa perspectiva histórica, de maneira a ter uma compreensão mais clara da sua evolução, aperfeiçoamentos, constrangimentos, conquistas e perspectivas.

Objetivo:

Analisar os estudos clínicos no âmbito das unidades da Fiocruz, do ponto de vista de sua estrutura conceitual, desenho, estratégias metodológicas e resultados, buscando extrair ensinamentos e apontar caminhos para seu aperfeiçoamento.

Metodologia:

Adotamos os seguintes critérios de inclusão: estudos realizados em seres humanos, prospectivos, a intervenção básica é a vacinação, acompanhamento longitudinal e individual dos participantes, publicados em periódicos médicos de caráter científico, e realizados com a participação de pelo menos uma unidade ou de um profissional da Fiocruz. Foram utilizadas as bases de dados PubMed, Lilacs, Scielo, entre outras. Foram avaliados os seguintes quesitos: aprovação por Comitê de Ética, aplicação de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, registro internacional, tipo de estudo (randomizado, duplo-cego, simples cego), cálculo amostral, critérios de inclusão, uso de placebo, informações de suporte (Informações sobre “Checklist” CONSORT, Protocolo de estudo, dados suplementares *online*, etc.), declaração de conflito de interesse, informação sobre financiamento.

Resultados:

Sessenta e um estudos clínicos com vacinas, em todas as fases de estudos clínicos (1, 2 e 3), foram encontrados e revisados, de acordo com os critérios

pré- estabelecidos. O nº de estudos clínicos com vacinas por década foi: década de 30: 2; década de 40: 5; década de 50: 0; década de 60: 2; década de 70: 0; década de 80: 5; década de 90: 7; década de 2000: 23; 2010-2013: 17. A maioria das pesquisas foi publicada em revistas nacionais ou internacionais indexadas e de alto impacto. Os quesitos metodológicos analisados foram incorporados gradativamente ao desenho, análise e publicação dos estudos clínicos. Gradualmente, os artigos publicados se tornaram mais focados e estruturados, e introdução, objetivos, material e métodos, resultados, discussão, conclusões e referências bibliográficas tornaram-se um padrão de publicação dos estudos clínicos. As fontes de financiamento foram (alguns estudos tiveram múltiplas fontes): governo e agências federais: 48 (45%); estados e municípios: 11 (10%); agências internacionais: 9 (8%); outras fontes estrangeiras: 11 (10%); empresas privadas multinacionais 6 (6%); sem informação 22 (21%).

Conclusão:

Há um progresso na qualidade e quantidade de estudos clínicos com vacinas no âmbito das unidades da Fiocruz ao longo do tempo, que se reflete em suas publicações. A Fiocruz, inclusive Bio-Manguinhos, adquiriu competência para realizar estudos clínicos em todas as fases, de acordo com as exigências regulatórias. Os estudos clínicos deixaram de ser um gargalo para o desenvolvimento tecnológico. Ainda assim, há necessidade de racionalização dos procedimentos burocráticos e de financiamentos mais robustos.

Palavras-Chave: Estudos Clínicos, Vacinas, Análise Metodológica

V5 - LC-MS/MS as a tool for analysis of underivatized glutamic and aspartic amino acids residues from tetanus toxoid

Marilza Batista Corrêa^{1*}; Hilton Jorge Nascimento¹; Patrícia Barbosa Jurgilas¹; Renata Chagas Bastos¹; José Godinho da Silva Junior¹; Maria de Lourdes M. Leal¹; Ellen Jessouroun¹; Ivna Alana da Silveira¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introduction:

Bio-Manguinhos has developed a meningococcal serogroup C vaccine based on conjugation of meningococcal polysaccharide (PSC) with monomeric tetanus toxoid (MTT). The conjugation process is based on oxidation of PSC followed by reaction with hydrazine activated monomeric tetanus toxoid (MATT). The protein activation reaction occurs selectively in aspartic and glutamic residues. The quantification of these residues in MATT is essential to assure the quality of the produced conjugate. For this aim a sensitive methodology is required since there isn't a single method that deal with modified and non-modified residues. In this report, we showed preliminary data of the underivatized amino acids residues analysis by LC-MS/MS.

Objective:

The goal of this work is the development of a specific and sensitive method based on LC-MS/MS for quantification of underivatized glutamic and aspartic acid released after acidic hydrolyzed MTT.

Methodology:

Glutamic and aspartic acids standards were dissolved in 0.1% formic acid solution, and applied by either infusion or autosampler system. The mass spectrometer was operated in positive ion mode. ESI-MS/MS parameters Collision Energy (CE), Entrance Potential (EP) and Declustering Potential (DP) were optimized for each analyte taking into account its precursor ion intensity. CE and DP were tuned considering the complete fragmentation of precursor ion in MS/MS. Glutamic and aspartic acids fragmentation patterns were performed for SRM (Selected Reaction Monitoring) studies. The analytes were chromatographed onto HPLC-RP C-18 (Vydac, 100 x 4.6 mm, particle size 5µm) followed by ESI-MS/MS analysis in tuned conditions. The linearity was

monitored using different concentrations of glutamic acid ranging from 2.0 to 1.0 x10⁴ pmol/μL. All samples were analyzed in triplicate and the statistical parameters were evaluated.

Results:

The fragmentation patterns of the precursor ions were compatibles with amino acid cleavages [M+H-H₂O] + ; [M+H-NH₃] + ; [M+H-HCO₂H] + and [M+H-CH₃CO₂H]+. In order to perform SRM studies the transitions 148.1^o84.1 and 134.1^o74.0 were selected for glutamic and aspartic acids, respectively. The area obtained for the MS/MS peaks selected for glutamic acid was proportional to its concentration. The standard curve was linear in the interval of 2.0 – 100.0 pmol/ μL (R₂ > 0.99; SD <10; Bias % < 5).

Conclusion:

The results so far obtained suggest that LCMS/MS can be used to quantify amino acids targets with accuracy and precision. Subsequent experiments will be carried out with hydrolyzed MTT and its activated form.

Keywords: SRM, Amino Acids

V6 - Characterization of native and deacylated Lipid A from lipooligosaccharide of *Neisseria meningitidis* Serogroup B

Marilza B. Corrêa^{1*}; Maria de Lourdes M. Leal¹; Elza F. Scott¹; Adenilza Amanacio Bello¹; Eduardo Duarte¹; Ellen Jessouroun¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introduction:

The Brazilian vaccine against meningococcal disease *Neisseria meningitidis* serogroup B is composed by outer membrane vesicles (OMV) and chemically modified endotoxin. The last aiming to improve the efficiency of the vaccine. Lipooligosaccharide (LOS) is one of the major outer membrane constituents of all Gram-negative bacteria. It is formed by an oligosaccharide core covalently linked to Lipid A, which consists of a diglucosamine backbone carrying two diphosphorylethanolamine in 1 and 4' positions and hexa-acyl substituents. There is a straight relationship between Lipid A structure and its inflammatory activity. It is known that the removal of acyl chains and the hydrolysis of diphosphoryl-ethanolamine esters reduce drastically its inflammatory activity. Due to its high toxicity a safe protocol of kinetic detoxification is required, which involves a pyrogenic monitoring and LOS characterization.

Objective:

The aim of this study is to characterize native and deacylated Lipid A, from *Neisseria meningitidis* serogroup B using different analytical approach as mass spectrometry (ESI-MSⁿ and MALDI), NMR HMQC ¹H x ³¹P, CGAR and CG-MS.

Methodology:

The LOS was obtained from bacteria biomass, purified by hot phenol method. The native LOS was hydrolyzed in acetate buffer and native Lipid A was recovered by ultracentrifugation and its molecular weight was determined by MALDI/TOF and ESI-MSⁿ, operating in positive mode. To characterize the acyl chains, an alkaline hydrolysis was performed, the fatty acid esterified and analyzed by GC-MS. The kinetic detoxification of LOS in alkaline media was performed in different times and monitored by pyrogenic test and the structures analyzed by CE-MS and NMR HSQC ¹H x ³¹P.

Results:

Mass spectroscopy was used as an effective technique for analyzing lipid A and dLOS. The molar weight of the major lipid was characterized by MALDI-TOF; the analysis of ion $[M+H]^+$ at m/z 1960,98 that was correlated to a hexa-acylated 1,4'-diphosphoryl-ethanolamine and this result is in accordance to ESI MSⁿ analysis. The acyl chains were analyzed as fatty acid methyl esters by GC-MS (IE, 70ev), and the results were in accordance with Neisseriaceae family. The kinetic detoxification of LOS was carried out with NaOH at 30, 60, 90, 120 and 150 minutes. the dLOS molecular weight was analyzed by CE-MS and the majority deacylated lipid A comprised a diphosphorylated molecule with two amide-linked 3-hydroxytetradecanoic acids and phosphate groups in 1,4'. The HMQC $^1H \times ^{31}P$ showed cross resonance consistent with 5.6/-12.0; 5.4/2.0 and 3.7/4.9 ppm, indicating that there are two different phosphorous species in anomeric position and diphosphate in 4'.

Conclusion:

The results allowed us to identify the phosphorylation and acylation pattern of lipid A. These data are important for the use of dLOS as vaccinal antigen.

Keywords: LOS, *Neisseria meningitidis*, Lipid A

V7 - Characterization of oligosaccharide of *Neisseria meningitidis* Serogroup B

Marilza B. Corrêa^{1*}; Maria de Lourdes M. Leal¹; Elza F. Scott¹; Adenilza Amanacio Bello¹; Eduardo Duarte¹; Ellen Jessouroun¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introduction:

The Brazilian vaccine against meningococcal disease *Neisseria meningitidis* serogroup B is composed by outer membrane vesicles (OMV) and chemically modified endotoxin (dLOS); from prevalent strains in Brazil. The use of chemically modified endotoxin aims to improve the efficiency of the vaccine. Studies on the biosynthesis of LOS from *Neisseria meningitidis*, indicates the existence of 12 different immunotypes (L1 to L12). Their structural characterization is relevant for studies related to vaccine development. Lipooligosaccharides are composed by two distinct regions, the lipid that is connected to the central part of the molecule and the oligosaccharide core (OS), which is divided into an inner and outer region. The inner region is comprised of 3- deoxy-D-manno-ulosonic acid and L-glycero-D-manno heptoses (Hep). The outer region extends further from the bacterial surface and is composed predominately by hexoses and hexosamines. According to the literature, bactericidal activity of induced antibody can be increased by oligosaccharide core of LOS.

Objective:

The aim of this study is to perform the structural characterization of oligosaccharides by different analytical approaches as mass spectrometry (NMR 1H, gCOSY, TOCSY, ROESY, HSQC and HMQC 1H x 31P), CGAR, and CE-MS, to evaluate if it is preserved after chemical modification.

Methodology:

The OS was obtained by acid hydrolysis of LOS lyophilized and purified by exclusion chromatography using Biogel P-4 as stationary phase. The samples were decomposed by methanolysis, silanized and analyzed by GCMS (IE, 70 eV) to determinate the glycoside composition. The molecular weight and the core saccharide sequence were determined by CE-ESI/MSn. The NMR

(^1H NMR, gCOSY, TOCSY, ROESY, HSQC and HMBC) data were acquired on 500 MHz spectrometer, using deuterium oxide, as solvent, with acetone as internal reference.

Results:

The glycosidic composition comprises of galactose, N-acetylglucosamine, glucose; L-glycero-Dmanno-heptose; 3-deoxy-D-manno-ulosonic The CE-ESI/MSn analysis detected an ion at $[\text{M1} + \text{H}] + 1639.5$ its molecular weight and fragmentation pattern was related to L-7. The analysis of NMR data it was possible assign the hydrogens and carbon constituents of the OS structure and to establish, through the ROESY data the connectivity across glycosidic linkage. The. $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ P HMQC showed a phosphorylation at position (3) in heptose structure.

Conclusion:

In this study, we conclude that the major immunotype of the vaccinal LOS is L7 and that the core does not suffer alteration during the chemical detoxification stage.

Keywords: Oligosaccharide, *Neisseria meningitidis*

V8 - Desenvolvimento de um processo de purificação do vírus da Febre Amarela para aplicação na produção de uma vacina inativada

Tânia Pinheiro Pato Cunha^{1*}; Marta Cristina de OliveiraSouza¹; Luciane Pinto Gaspar¹; Elena Caride¹; Marcos da Silva Freire¹; Leda dos Reis Castilho¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

A febre amarela é uma doença infecciosa viral aguda, não contagiosa, com alto índice de morbidade e letalidade. No Brasil, é endêmica na região amazônica, com surtos esporádicos. A sua ocorrência em reservatório silvestre torna virtualmente impossível sua erradicação, sendo a vacinação o modo mais eficiente de evitar e controlar a doença. Uma vacina atenuada, produzida utilizando-se ovos embrionados, está disponível desde 1937. Apesar de altamente eficaz e segura, relatos de graves eventos adversos estimularam o desenvolvimento de uma vacina inativada. Bio-Manguinhos produz a vacina atenuada e, nos últimos anos, estabeleceu uma metodologia de produção do vírus em biorreatores utilizando células Vero, para posterior purificação e inativação. Pretende-se, assim, evitar a incidência de eventos adversos graves e possibilitar a imunização de indivíduos com alergia a proteínas do ovo, imunossuprimidos, mulheres grávidas, lactentes e crianças menores de nove meses.

Objetivo:

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um processo de purificação da suspensão viral amarílica produzida em células Vero, que forneça o vírus com os atributos de pureza atualmente requeridos pelas agências regulatórias para vacinas de uso humano e que resulte em uma tecnologia com viabilidade técnica, operacional e econômica para ser aplicada na manufatura da vacina inativada.

Metodologia:

Inicialmente, foi estudado o uso de membranas adsorptivas de troca aniônica (Sartobind® Q) para a etapa de captura do vírus a partir de sobrenadante de cultivo celular. Posteriormente, para reduzir os níveis de proteínas da célula hospedeira (HCP), uma segunda etapa (polimento) foi investigada, utilizan-

do-se a cromatografia multimodal (CaptoTMCore 700). O produto purificado foi quantificado por titulação viral e ELISA e caracterizado por SDS-PAGE e ensaios de Western blot (WB) anti-proteína E e anti-HCP.

Resultados:

O processo desenvolvido resultou em um rendimento global de 52,7%, com HCP residual de 345 ± 25 ppm ($0,04 \pm 0,01\%$) e $1,17 \pm 0,35$ ng de DNA/dose, de acordo com o preconizado pela Organização Mundial de Saúde (< 10 ng/dose). Para este cálculo, foi considerada a maior dose investigada em ensaios em camundongo. A análise eletroforética (SDS-PAGE) da amostra purificada apresentou uma banda com massa molar de 56 kDa, compatível com a proteína do envelope do vírus (E) e correspondendo a 96,7% das proteínas identificadas. O WB anti-proteína E revelou uma única banda, que confirmou a identidade da amostra. Nenhuma banda foi revelada no WB anti-HCP, confirmando os baixos níveis de HCP quantificados.

Conclusão:

A metodologia desenvolvida atende a quatro dos principais critérios utilizados para a definição de um processo de purificação de partículas virais: (i) capacidade de processamento de grandes volumes; (ii) preservação da estabilidade viral; (iii) facilidade de ampliação de escala e (iv) produto dentro das especificações para fins vacinais. Sendo assim, é promissora sua utilização em processos industriais que visem à obtenção de uma vacina amarílica inativada.

Palavras-Chave: Febre Amarela, Purificação de Partículas Virais, Vacina Inativada

V9 - Avaliação da participação dos componentes vacinais na resposta imune da vacina brasileira contra meningococo B: Perspectivas de otimização da vacina

Camila Lordello Xavier^{1*}; Verônica Nascimento Oliveira¹; Denise da Silva Gomes Pereira¹; Solange Aparecida Fernandes¹; Ellen Jessouron¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

A epidemiologia da doença meningocócica apresenta grande variação de acordo com a área geográfica e ao longo do tempo. Os anticorpos desempenham papel central na proteção desta doença, devido à capacidade lítica dos mesmos através da fixação do complemento. BioManguinhos, desde o início dos anos 2000, está envolvido no desenvolvimento da vacina brasileira contra o meningococo B, composta de vesículas de membrana externa (VME) das duas cepas de maior prevalência e LPS detoxificado (dLOS).

Objetivo:

Verificar o papel dos antígenos vacinais na indução da resposta imune em camundongos a fim de discutir uma potencial otimização da vacina teste.

Metodologia:

Neste trabalho, foram formuladas seis vacinas experimentais em hidróxido de alumínio: vacina meningocócica B, vacina meningocócica B combinada à vacina meningocócica C conjugada produzida em BioManguinhos, vacina de VME de N44/89, vacina de VME de N603/95, vacina de VME de N603/95 combinada a VME de N44/89 e vacina de dLOS. Camundongos suíços foram divididos em seis grupos e imunizados com as formulações acima, por via intramuscular, em esquema de três doses com intervalo de 15 dias entre elas. Os anticorpos obtidos a partir do soro dos camundongos vacinados com diferentes preparações tiveram a atividade bactericida avaliada antes e após a adsorção dos soros com os diferentes antígenos vacinais.

Resultados:

No ensaio bactericida realizado para as duas cepas vacinais, N44/89 e N603/95, todas as preparações testadas induziram soroconversão em título bactericida maior ou igual a quatro vezes em relação aos valores dos soros pré-ímmunes,

exceto no grupo que recebeu o dLOS separadamente, que não apresentou resposta protetora. Para todas as vacinas experimentais avaliadas, os títulos bactericidas para N44/89 foram maiores do que para N603/95. Essa indução preferencial de anticorpos para a N44/89 foi confirmada no ensaio de adsorção, no qual foi necessária a utilização de pelo menos três vezes a concentração de proteínas de VME dessa cepa em relação à concentração usada para N603/95. Após a adsorção, as formulações de vesículas separadas apresentaram títulos maiores que as formulações completas e a preparação de dLOS, formulada sem os antígenos proteicos, não apresentou redução de título indicativa de especificidade de anticorpos para esta molécula. No entanto, a combinação de antígenos proteicos com dLOS na adsorção aumentou a redução da queda dos títulos bactericida, principalmente para N44/89.

Conclusão:

Esses dados sugerem que a indução de resposta protetora da vacina meningocócica B brasileira está relacionada à combinação de antígenos como descrito na literatura. Resultados mais efetivos contra a cepa N603/95 ou outras cepas heterólogas podem ser mais bem avaliados através da mudança das proporções dos antígenos definidos inicialmente pela estratégia brasileira. Este trabalho sugere ainda que o LOS tem um papel importante no desempenho da vacina, parecendo contribuir para a indução de anticorpos bactericidas, capazes de aumentar o título protetor.

Palavras-Chave: Vacina Meningocócica B, Resposta Imune, Antígenos Vacinais

V10 - Estudo de segurança em adultos jovens da vacina meningocócica C conjugada produzida por Bio-Manguinhos/Fiocruz

Tatiana Guimarães de Noronha^{1*}; Janaina Reis Xavier¹; Eliane Matos dos Santos¹; Celia Menezes Cruz Marques¹; Maria das Graças Tavares Ribeiro¹; Elizabeth Maciel de Albuquerque¹; Robson Leite de Souza Cruz¹; Ivna Alana Silveira¹; Ellen Jessouroun¹; Maria de Lourdes de Sousa Maia¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

A doença meningocócica é importante causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento. Além de doença e morte, a doença meningocócica é responsável por sequelas graves, especialmente neurológicas, como retardo mental, deficiência auditiva, convulsões, incapacidade permanente, disfunção e amputações de membros. As opções para prevenção da doença meningocócica são limitadas. As possíveis medidas de controle dos fatores de risco são difíceis de implementar ou inexequíveis. A quimioprofilaxia dos contactantes de doença meningocócica pode evitar apenas uma pequena fração de casos, cerca de 2%, e é ineficaz em situações epidêmicas. O desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a doença meningocócica tem sido prioridade em Saúde Pública, inclusive, no Brasil. A vacina conjugada contra o meningococo C foi desenvolvida por BioManguinhos e tem o objetivo de evitar a doença causada por esse microrganismo, que é importante causa de doença e morte de crianças e jovens, com alto custo econômico e pronunciado impacto psicossocial.

Objetivo:

Avaliar a frequência/intensidade de eventos adversos ocorridos até 30 dias após a vacinação em adultos jovens saudáveis.

Metodologia:

Ensaio clínico de fase I, randomizado e simples cego, com 60 participantes de pesquisa, sadios, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 50 anos que preencheram os critérios de elegibilidade segundo o protocolo. Trinta participantes de pesquisa receberam a vacina experimental e 30 sujeitos receberam uma vacina meningocócica C conjugada ao toxóide tetânico já licenciada no Brasil.

O desfecho principal do estudo foi a avaliação do perfil de reatogenicidade da vacina em teste; os participantes de pesquisa foram monitorados quanto à ocorrência de eventos adversos nos 30 dias após a vacinação. Para manter o cegamento do estudo, os grupos vacinais foram identificados como A ou B.

Resultados:

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos vacinais para dados sócio-demográficos; 73,3% dos participantes apresentaram algum evento adverso solicitado, 70,0% para a vacina A e 76,7% para a vacina B ($p=0,341$); o evento adverso local mais frequente foi dor, grau I, 1 dia após a vacinação (35%), sendo 26,7% para vacina A e 43,3% para vacina B ($p=0,579$); entre os eventos adversos sistêmicos solicitados, cefaleia no dia da vacinação, grau I, foi o mais frequente (11,7%), 10,0% para vacina A e 13,3% para vacina B ($p=0,449$); menos de 5% dos participantes apresentaram febre após vacinação, com pico de frequência 12 horas após a vacinação (3,3% no total; $p=0,223$ para diferença entre grupos). Para todos os tipos de eventos adversos observados não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Não ocorreram eventos adversos graves ou relevantes nos 30 dias seguintes à vacinação.

Conclusão:

As vacinas apresentaram perfil de segurança aceitável, sem diferenças estatisticamente significativas quanto ao perfil de reatogenicidade entre os grupos vacinais.

Palavras-Chave: Ensaio Clínico, Segurança, Vacina Meningocócica C Conjugada

VII - Combinação de vacinas meningocócica C conjugada e vacina B para avaliação da resposta imune ao polissacarídeo C

Denise S. G. Pereira^{1*}; Denise Aparecida R. Nascimento¹; Ana Cristina F. Melo¹; Veronica Olneira¹; Ivna Alana F. B. da Silveira¹; Maria de Lourdes M. Leal¹; Ellen Jessouron¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

A doença meningocócica no Brasil tem hoje o sorogrupo C como prevalente (75%), seguido pelos sorogrupos B (17%), W135 (6%) e Y (2%). O correlato de proteção de vacinas para a doença meningocócica é a atividade bactericida dos anticorpos e a sua persistência ao longo do tempo. A literatura tem descrito os problemas de persistência de anticorpos ao longo do tempo, para vacinas conjugadas. Desta forma a combinação de antígenos e a pesquisa de estratégias que interfiram neste fenômeno tem grande importância e relevância especial no uso de vacinas contra meningites bacterianas.

Objetivo:

Verificar o efeito da combinação da vacina C conjugada com a vacina sorogrupo B de *N.meningitidis*, na indução da resposta imune em camundongos para o polissacarídeo C.

Metodologia:

Grupos de 25 animais foram imunizados com vacina meningocócica C conjugada, vacina meningocócica B e a combinação das duas. Na combinação a vacina C, foi ressuspensa na vacina B. Todas as preparações teste foram usadas na concentração de 1/10 da dose humana em camundongos por via intramuscular. Os camundongos receberam 3 doses de vacinas com intervalo de 15 dias e dose reforço 30 dias após a última dose. A atividade bactericida dos soros dos animais vacinados foi avaliada frente às cepas vacinais e cepas heterólogas dos sorogrupos B e C. Os soros obtidos foram utilizados para avaliação de atividade bactericida, IgG total por ELISA, isotipos de IgG, e avidéz dos anticorpos induzidos.

Resultados:

Os títulos bactericida para as cepas vacinais na vacina monovalente B foram maiores para a cepa N44/89 do que para cepa N603/95 e mostraram-se equi-

valentes após a dose reforço. Para a vacina C conjugada monovalente, estes, após a imunização primária, mostraram-se bem acima do corte de proteção (1:8) da vacina para a cepa C11 testada. Não houve aumento significativo dos títulos após 3ª dose e também após dose reforço. Os títulos de IgG total por ELISA para polissacarídeo C no grupo imunizado com a combinação das duas vacinas apresentou valores maiores do que vacina conjugada C monovalente. Observou-se também, após 15 dias da última dose de vacina, queda menos acentuada nos títulos no grupo que recebeu a vacina combinada. A combinação dos dois imunógenos tem efeito sobre a concentração de anticorpos totais induzidos assim como sobre a sua especificidade traduzida pela diferença estatisticamente significativa de avidéz na formulação combinada. A análise de isotipos de IgG induzidos pelas preparações monovalentes e combinada mostra títulos maiores de isotipos fixadores de complemento no grupo que recebeu a vacina combinada para o polissacarídeo C.

Conclusão:

Os resultados indicam que a combinação destes dois imunógenos pode induzir melhorias na imunidade para o polissacarídeo C, com maior persistência de títulos protetores e aumento da indução de anticorpos fixadores de complemento.

Palavras-Chave: Vacina Meningocócia C Conjugada, Vacina Meningocócia B, Vacina Combinada B e C

VI2 - Development of an alternative method for quantification of neutralizing antibody against yellow fever virus

Andrea M V da Silva¹; Patricia C C Neves^{1*}; Maria Betânia S O Marchetti¹; Tamiris Azamor¹; Alessandro F de Souza¹; Camilla Bayma¹; Jane da Silva¹; Luciana N Tubarão¹; Luciane P Gaspar¹; Denise C S Matos¹.

1 - Bio-Manguinhos / Fiocruz;

Introduction:

Enzyme immunoassays have become the method of choice for quick evaluation of vaccine response by quantification of specific IgG antibodies. However, the plaque reduction neutralization test (PRNT) remains the gold standard for the detection of serologic immune responses to yellow fever (YF) virus. But due to the utilization of cell culture, PRNT is hard-working and time consuming, therefore difficulting its utilization in large scale. Furthermore, it does not characterize the immunoglobulin isotype.

Objective:

The aim of this study was to develop an alternative method for evaluation of antibodies response against YF virus.

Methodology:

Thirty sera of individuals before and 30 days after 17DD YF virus vaccination and ten sera from control groups were used (Research Ethics Committee of the Evandro Chagas Clinical Research Institute, n° 0038.0.009.000-08 and of the Oswaldo Cruz Foundation, n° 145/01). An ELISA inhibition, called as ViBI (Virus Binding Inhibition) method was developed based on an adaptation of the Toxin binding inhibition test principle. The PRNT was used as standard method to compare YF antibody titration. Statistical analysis of results was done using GraphPad Prism 5.

Results:

PRNT is generally regarded as the standard assay method, so we considered the success of the ViBI method against this reference. The result of standard curve indicated a high sensibility and reliability of ViBI from 8 to 1000 mUI/mL with quantification limit of 125 mUI/mL. All of results were compared by a non-parametric, paired-sample Wilcoxon test, which showed there was no

significant difference ($P = 0.296$) and was observed an excellent positive correlation (Spearman test, $R^2=0.822$, $P < 0.0001$) between two assay methods.

Conclusion:

It is known that PRNT presents many variables, such as virus passage, cell lines and remains timeconsuming, labor-intensive, with low throughput. To overcome these deficiencies, alternative tests assessing YF virus neutralizing may be invested. The ViBI shows a potential as alternative method for screening YF antibodies, prior to use PRNT confirmation.

Keywords: PRNT, 17DD Yellow Fever Vaccination, ELISA Inhibition Method - ViBI

V13 - Distribuição das bactérias isoladas do monitoramento ambiental e de águas de uma indústria biofarmacêutica no período de 2010 a 2014

Luciane Martins Medeiros¹; Lygia Maria Paulo da Silva Braga^{1*}; Cristhiane Moura Falavina dos Reis¹; Luciana Veloso da Costa¹; Adriana Marques Frazão¹; Josiane Machado Vieira Mattoso¹; Fernanda Ventura Cruz¹; Joyce Modesto de Andrade¹; Manuela da Silva²; Verônica Viana Vieira³.

1 - Seção de Esterilidade Processos e Insumos/ Laboratório de Controle Microbiológico/ Departamento de Controle de Qualidade/ Bio-Manguinhos/ FIOCRUZ;

2 - VPPLR/ Presidência/ FIOCRUZ; 3 IOC/FIOCRUZ.

Introdução:

Para a obtenção de produtos estéreis, o processo deve ser asséptico, impedindo a contaminação microbiana. Para tal, os laboratórios de produção (LP) são ajustados de acordo com a criticidade da etapa envolvida, sendo classificados de grau A a D. Com exceção do grau A, onde não é permitido presença de micro-organismo, os outros tipos de áreas classificadas permitem uma microbiota associada, que deve ser monitorada. O Controle de Qualidade (CQ) realiza o monitoramento da microbiota autóctone, por meio de identificação bacteriana, preservação (Bacterioteca) e tabulação dos dados associados em planilha de Excel, denominada banco de dados (BD) da Bacterioteca. O conhecimento da distribuição dos gêneros bacterianos em cada LP permite controle da diversidade envolvida, auxiliando na análise de risco dos processos e na elaboração de medidas preventivas e de controle específicas e eficazes.

Objetivo:

Mapear a distribuição das bactérias identificadas pelo CQ em diferentes LP, a partir dos dados extraídos do BD/Bacterioteca.

Metodologia:

A partir do BD, foram selecionados seis principais LP (LP1 a LP6). Em seguida, foram selecionadas as bactérias isoladas a partir de amostras de monitoramento de água (WFI e PW, denominado MAG) e de monitoramento ambiental (ar

e operadores, nos graus B e C, denominado MAM), nos seis LP selecionados, no período de 2010 a 2014.

Resultados:

Das 961.440 placas de MAM e das 100.575 placas de MAG analisadas no período estudado, foram encaminhadas para a identificação 19.590 (2,04%) do MAM e 5.975 (5,94%) do MAG. O gênero *Staphylococcus* foi o mais frequentemente identificado nos LP1 a 6. No LP1, pode-se evidenciar a emergência do gênero *Enterobacter* em 2012, no sistema de água deste LP, que foi sanitizado em seguida. Na avaliação deste gênero nos anos posteriores, pode-se verificar a eficácia da medida corretiva, com decréscimo da frequência. Nos LP2 e LP5, o principal gênero identificado em WFI foi *Staphylococcus*, distoando da microbiota comumente associada a água, que é de bactérias Gram negativo. Este resultado indica necessidade em sensibilizar os coletores de amostras de água em relação às técnicas assépticas de coleta. No LP3, evidenciou-se a emergência do gênero *Ralstonia* em WFI e PW. O LP4 apresentou a maior diversidade (40 gêneros). No LP5, o gênero *Enterobacter* foi evidenciado em amostras de MAM e a microbiota do sistema de água deste local foi predominantemente Gram positivo. Nos LP1, LP4, LP5 e LP6, foi observado o decréscimo dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus*.

Conclusão:

O uso do BD/Bacterioteca permitiu mapeamento dos principais LP, de forma rápida e precisa, possibilitando o acompanhamento de melhorias e de mudanças no perfil da microbiota de cada área com o passar dos anos. Esta análise permitiu evidenciar mais facilmente problemas e apontar suas soluções, além de avaliar se a intervenção foi bem sucedida.

Palavras-Chave: Bacterioteca, Monitoramento Ambiental, Indústria Biofarmacêutica

VI4 - Adequação e melhorias no processo de limpeza e desinfecção de ovos spf utilizados na produção da vacina de febre amarela

Ariane Guimarães Barcellos^{1*}; Jose Marcus Neves Malachias¹; Wania Renata dos Santos¹; Daniel da Silva Guedes Júnior¹; Jaline Coutinho Silvério¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

A Febre Amarela é uma doença aguda causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*. É uma enfermidade infecciosa sistêmica que causa mais comumente febre de início súbito e prostração. A forma mais grave pode causar lesão hepática, renal e do miocárdio e alta mortalidade. Por toda a complexidade envolvida no controle e na transmissão da doença, a vacinação torna-se a medida mais eficaz na prevenção da Febre Amarela. Atualmente, a produção da vacina ocorre a partir de ovos SPF, nos quais o lote-semente do vírus amarílico é inoculado para propagação. Por isso, a desinfecção eficiente dos ovos é fundamental, pois resulta em redução da penetração de microrganismos e minimiza a contaminação da vacina.

Objetivo:

Atualmente os ovos são sanitizados com álcool 70%, filtrado apenas no final do processo (após 12 dias de incubação, quando serão coletados), porque o álcool gera letalidade de embriões quando aplicado na etapa de inoculação (nono dia de incubação). Este estudo teve por objetivo avaliar diferentes protocolos de desinfecção de ovos SPF utilizados na vacina de Febre Amarela que resultem em redução da carga microbiana encontrada na superfície dos mesmos, sem afetar a viabilidade embrionária e a qualidade do IFA produzido.

Metodologia:

Foram selecionados para desinfecção dois agentes quaternários de amônio (AVT-F e AVT-40) e um composto fenólico (biophene). Os ovos foram pulverizados com os agentes selecionados em diferentes dias e combinações de dias ao longo do processo. Posteriormente a contagem de microrganismos ocorreu a partir de placas contendo meio de cultura para análise de superfí-

cies. Os ovos foram colocados em contato com as placas de forma que toda a superfície do ovo entrasse em contato com meio de cultura. Foram então avaliadas a redução de carga microbiana e a viabilidade embrionária.

Resultados:

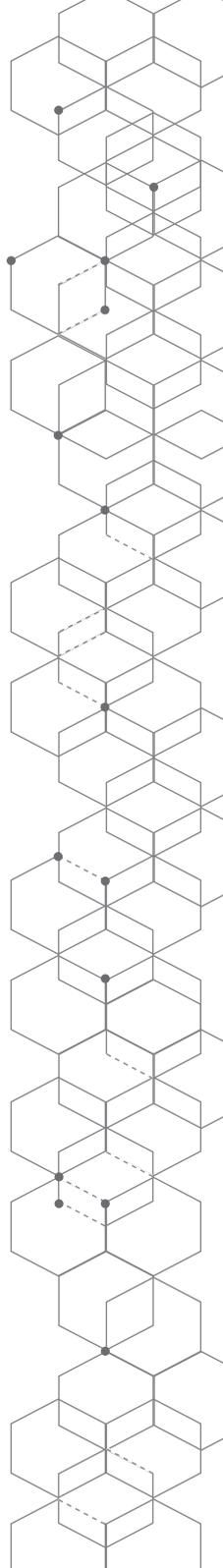
Os três agentes testados foram eficientes na redução de carga microbiana na superfície dos ovos e nenhum deles apresentou impacto sobre a viabilidade do embrião, com exceção do álcool a 70%, quando pulverizado na etapa de inoculação (dia nove). Para todos os agentes, a limpeza dos ovos na combinação dos dias nove e 12, quando ocorrem a inoculação do vírus e a coleta de embriões, respectivamente, apresentaram maiores reduções microbianas quando comparados ao controle não limpo. Devido à sua reduzida toxicidade, o AVT-F foi o agente eleito para ser testado na rotina de produção de um lote experimental e o produto gerado foi aprovado nos testes do controle de qualidade para o IFA de Febre Amarela

Conclusão:

Este estudo concluiu que o AVT-F foi eficiente na redução da carga microbiana, atendendo à determinação da ANVISA, permitindo a sanitização nos dias em que os ovos são utilizados na produção (nove e 12) , não resultando em impacto sobre a viabilidade do embrião e qualidade do produto final.

Palavras-Chave: Vacina de Febre Amarela, Limpeza de Ovos, Ovos SPF

BIOFÁRMACOS



BI - Avaliação da proteína recombinante rOmpA de *Acinetobacter baumannii* como alvo para imunoterapia

Anna Erika Vieira de Araújo^{1*}; Luis Vidal Conde¹; José Procópio Moreno Senna¹

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

Acinetobacter baumannii é um importante patógeno oportunista em escala global, com alta incidência em unidades de tratamento intensivo, acometendo principalmente pacientes imunossuprimidos. Recentemente foi relatado que, no Brasil, de 15 a 20% dos isolados desta bactéria apresenta resistência aos antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenems, o que dificulta o tratamento e abre espaço para a busca de terapias alternativas como as imunoterapias. Em trabalhos anteriores, foi identificada uma proteína com potencial imunogênico denominada OmpA e através da tecnologia do DNA recombinante foi possível obter esta proteína para avaliação de seu potencial imunogênico.

Objetivo:

Avaliar a imunogenicidade da proteína recombinante rOmpA de *Acinetobacter baumannii* em modelo murino.

Metodologia:

A proteína recombinante foi obtida por clonagem em vetor pET28a (Novagen®) e expressa por *Escherichia coli* BL21. A purificação foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. A partir deste passo, foram feitas imunizações em camundongos c57bl06 (n=5) com 25 μ g de rOmpA em Al(OH)₃ como adjuvante, seguindo o protocolo de duas doses imunizantes (priming e booster) com intervalos de 15 dias entre cada dose, tendo sido realizadas coletas de sangue via plexo retro orbital antes e depois das imunizações. Para avaliação da resposta imune, os soros obtidos pelas coletas foram analisados por ensaios imunoenzimáticos como ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) e Western blot. Para o ELISA as placas foram sensibilizadas com 5 μ g/mL de rOmpA e, como anticorpo primário, foram utilizados os soros nas diluições de 1:800 e 1:1600, como anticorpo secundário foi usado um anticorpo anti-IgG murina conjugado com HRP (horseradish peroxidase) sendo a revelação feita com o reagente TMB (3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina). No Western

blot, a proteína rOmpA e proteínas de lisado de *A. baumannii* foram transferidas para membranas de nitrocelulose, os soros foram utilizados na diluição de 1:400 e foi usado um anticorpo secundário anti-IgG murina conjugado com fosfatase alcalina, sendo a revelação feita com um substrato para fosfatase alcalina.

Resultados:

A rOmpA se apresenta com peso molecular aproximado de 45 kDa. Os ensaios de ELISA demonstraram que a imunização foi capaz de produzir títulos satisfatórios de anticorpos contra a rOmpA, quando analisados nas diluições de 1:800 e 1:1600. No Western blot foi possível visualizar a banda referente à rOmpA, mostrando que os anticorpos obtidos com a imunização foram capazes de reconhecer tanto a proteína imunizante, como a proteína OmpA no lisado bacteriano, sugerindo que esses anticorpos são capazes de se ligar à proteína de interesse na própria bactéria.

Conclusão:

Este estudo mostrou que é possível obter a proteína recombinante rOmpA de *A. baumannii* e que as imunizações são capazes de produzir anticorpos contra a proteína imunizante que reconhecem a proteína OmpA em lisado bacteriano, demonstrando que a proteína rOmpA é imunogênica, com potencial importante para ser utilizada como alvo imunoterápico.

Palavras-Chave: *Acinetobacter baumannii*, Proteína Recombinante rOmpA, Imunoterapias

B2 - Estudo clínico retrospectivo da alfatiglicerase no Hemorio

Vivian Rotman¹; Patrícia M. N. de Oliveira¹; Hugo Defendi¹; Tatiana Guimarães de Noronha¹; Deborah Araújo da Conceição¹; Janaína Reis Xavier¹; Maria de Lourdes de Sousa Maia¹; Renata de Souza Cravo².

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ;

2 - Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti /Hemorio.

Introdução:

O Hemorio é a unidade de referência no tratamento de doença de Gaucher (DG) no Rio de Janeiro/Brasil. Bio-Manguinhos vem liderando processos de desenvolvimento conjunto de medicamentos biológicos, incluindo a transferência de tecnologia do biofármaco alfatiglicerase. A alfatiglicerase é uma terapia de reposição enzimática (TRE), produzida por um método novo, baseado na cultura de células vegetais (cenoura) e tem sido utilizado no Brasil desde outubro de 2010, no tratamento da DG.

Objetivo:

Avaliação dos parâmetros clínicos e laboratoriais de eficácia e de segurança da alfatiglicerase.

Metodologia:

Estudo retrospectivo, com base na avaliação de prontuários de pacientes com DG tipo 1, tratados com alfatiglicerase no Hemorio. Os parâmetros foram avaliados antes e durante a utilização de alfatiglicerase. Para análise de eficácia, os pacientes foram divididos em 2 grupos: grupo A (n=13), dos que iniciaram alfatiglicerase em 2010 e utilizam até hoje e grupo B (n=18), de pacientes que usaram a alfatiglicerase mas não utilizam atualmente. Para o grupo B a eficácia foi avaliada apenas para aqueles que utilizaram o medicamento por um período mínimo de 12 meses (n=9). Avaliação de segurança foi feita em conjunto (grupos A+B).

Resultados:

No grupo A, o tempo médio de uso da alfatiglicerase por participante foi de 3,6 ($\pm 0,05$) anos. O genótipo mais comum foi o L444P/N370S, presente em 46% dos pacientes. Ao comparar a evolução pareada do fígado e baço, observou-se que 46% dos participantes mantiveram os dois parâmetros estáveis. A

média da hemoglobina na avaliação de 1 ano antes do início da alfataliglicerose foi de 14 g/dl (+/- 1,5) e a média da medida mais recente (2013-2014) durante o uso da alfataliglicerose foi de 13,4 g/dl (+/- 2,2). Não houve variação significativa entre os valores médios de plaquetas, antes e durante o uso de alfataliglicerose. No grupo B, o tempo médio de uso da alfataliglicerose por participante foi de 3,6 (\pm 0,05) anos. O genótipo mais comum foi o N370S presente em 39% dos pacientes. Com relação ao fígado, nos 9 pacientes com esta avaliação, 6 (67%) mantiveram estável o volume hepático à palpação, 2 (22%) apresentaram aumento e em 1 (11%) houve diminuição. Em relação ao baço, 4 pacientes (44%) eram esplenectomizados. Entre os 5 em que foi analisado o volume esplênico, 2 (40%) mantiveram este parâmetro estável, em 1 (20%) houve aumento e em 2 (40%) diminuição. No que concerne às medidas de Hb e plaquetas, não foram observadas alterações significativas nos valores antes e durante o uso de alfataliglicerose. Entre os eventos adversos esperados, os mais frequentes foram os musculoesqueléticos e de tecido conjuntivo. Em 3 pacientes (9,7%) houve necessidade de interrupção do tratamento por reação infusional.

Conclusão:

A alfataliglicerose apresentou perfis de eficácia e segurança favoráveis.

Palavras-Chave: Alfataliglicerose, Doença de Gaucher, Estudo Clínico Retrospectivo

B3 - Modulação da expressão de co-reguladores da via do receptor de androgênio pelo PCA3 em células de câncer de próstata

Paula Priscilla de Freitas^{1*}; Ana Emília Goulart²; Etel Rodrigues Pereira Gimba³

1 - Instituto Nacional de Câncer (INCa), Coordenação de Pesquisa e Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO);

2 - Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Laboratório de Tecnologia Recombinante, Programa de Biofármacos;

3 - Universidade Federal Fluminense (UFF), Instituto de Humanidades e Saúde, Departamento de Ciências da Natureza e Instituto Nacional de Câncer (INCa).

Introdução:

O RNA não codificante (RNAnc) PCA3 é expresso especificamente em tecidos prostáticos e superexpresso em tumores da próstata. A via de sinalização do receptor de androgênio (AR) apresenta importância para o desenvolvimento prostático, sendo também essencial para a tumorigênese e progressão do câncer de próstata (CaP). A ativação final do AR depende do recrutamento de proteínas co-reguladoras que podem aumentar (co-ativadores) ou reduzir (co-repressores) sua transativação. Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a expressão do PCA3 é regulada pela ativação da via do AR e que a diminuição da expressão deste RNAnc por RNA de interferência (RNAi) inibe de forma significativa a expressão de diversos genes alvos do AR, indicando que o PCA3 está envolvido no controle da sobrevivência de células de CaP, pelo menos em parte através da modulação da via do AR. Dessa forma, postulamos que o PCA3 pode ser capaz de alterar a capacidade dos co-reguladores interagirem com o AR ou de modular a expressão dos co-reguladores desta via, de modo a alterar a ação destas proteínas na ativação da expressão dos genes alvos do AR.

Objetivo:

Para melhor caracterizar por quais mecanismos moleculares o PCA3 controla a sobrevivência das células LNCaP, o presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil de expressão de co-reguladores da via do AR, após o silenciamento do PCA3 por RNAi.

Metodologia:

Selecionamos alguns dos co-reguladores positivos e negativos no contexto de suas ações sobre o controle da via do AR no CaP. Em seguida, desenhamos pares de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos co-reguladores por reação em cadeia polimerase (PCR). Após o estabelecimento das condições ideais de amplificação dos distintos co-reguladores, foram realizados ensaios de PCR em tempo real para avaliação do nível de expressão destes co-reguladores em amostras de RNA total de células interferidas ou não para o PCA3.

Resultados:

A avaliação do nível de expressão destes transcritos em células LNCaP interferidas para o PCA3 em comparação com amostras de células transfectadas com siRNA controle mostrou um aumento de 2.5 a 7.2 vezes na expressão da maioria dos transcritos dos co-reguladores da via do AR estudados.

Conclusão:

O silenciamento do PCA3 por RNAi promoveu um aumento na expressão da maioria dos transcritos codificadores de co-reguladores do AR avaliados, indicando que o PCA3 pode atuar como regulador negativo da expressão dos co-reguladores do AR.

Palavras-Chave: PCA3, Câncer de Próstata, Co-Reguladores, Via do Receptor de Androgênio

B4 - Identificação do IFN- α -2b através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas

Adherlene Viera Gouvêa^{1*}; Claudia Maria da Conceição¹; Anna Carolina Machado Marinho¹; Ozéias de Lima Leitão¹; Andreza Santos da Costa¹; Clarissa Fontes Lopes¹; Julio Cesar Queiroz Penha¹; Filipe Soares Quirino¹; Ana Beatriz de Oliveira Leite e Bragança¹; Juliana Estevão Porto¹.

1 - INCQS

Introdução:

Os interferons (IFNs) são citocinas e são utilizados como medida terapêutica contra a infecção de vírus e outras doenças devido tanto à sua atividade antiviral quanto imunomodulatória. A classificação dos IFNs é definida de acordo com suas propriedades físicas e funcionais e o IFN- α pertence à classe I. O IFN- α tem efeito contra algumas viroses importantes, principalmente hepatite A, B e C. Em relação ao IFN- α apenas um subtipo (IFN- α -2) é utilizado para terapias. Os IFN-hr- α -2a e IFN-hr- α -2b são proteínas bioterapêuticas não glicosiladas contendo 165 aminoácidos e diferindo apenas pela presença de uma lisina e arginina na posição 23, respectivamente. Possuem duas pontes de dissulfeto e massa molar de aproximadamente 19,3 kDa. Para garantir a qualidade desse produto é necessária a realização de ensaios de controle de qualidade. Os ensaios de controle de qualidade em produto final dos medicamentos biológicos ainda representam um desafio, já que a maior parte deles são formulados junto com alguns excipientes que acabam por interferir nas metodologias de caracterização proteica. Desta forma, na farmacopeia brasileira (FB) não existe monografia para este tipo de produto somente recomendações de ensaios gerais, por outro lado na farmacopeia europeia (FE) encontra-se monografia para o interferon, porém somente para matéria prima, sendo recomendado os seguintes ensaios físico-químicos: focalização isoelétrica, mapa de peptídeos e SDS-PAGE.

Objetivo

O objetivo deste trabalho foi identificar IFN- α -2b (produto final) por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

Metodologia

Para a realização das análises foi utilizado um cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massas do fabricante Waters® Corporation. Modelo SY-

NAPT G2-S HDMS. Esse modelo é um equipamento híbrido com um analisador tipo quadrupolo, uma câmara de mobilidade iônica e um detector tempo de voo (“time-of-flight – TOF”). O ensaio para avaliação da proteína intacta foi realizado com a injeção de cinco amostras em uma coluna de dessalinização e analisadas no espectrômetro de massas no modo MS.

Resultados

Foram identificadas em todas as amostras o IFN- α -2b mesmo com a presença da albumina na formulação. Os íons formados pela albumina, na fonte de ionização, poderiam interferir no conjunto de íons provenientes do IFN- α -2b. No entanto foi possível diferenciar ambos os sinais e identificar ambas as moléculas com erros de 13,5 a -13,7 ppm na definição da massa molar experimental. Os resultados em massa molar encontrada variaram de 19265.8633 Da a 19265.8945 Da (massa molar teórica 19265.0098 Da). A duração do ensaio foi de apenas 10 minutos com a injeção da amostra sem tratamento.

Conclusão

Com a utilização da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi possível confirmar a identidade de todas as amostras de IFN- α -2b na presença da albumina mediante ferramentas de bioinformática. Desta forma a vantagem de utilização da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas é tanto para a definição da massa molar do IFN- α -2b quanto para a caracterização de isoformas no produto final sem um tratamento prévio em apenas uma análise. Estes resultados demonstraram a potencialidade da técnica, como uma importante ferramenta na análise de medicamentos biológicos podendo futuramente ser sugerida a Farmacopeia Brasileira como uma potencial metodologia de identificação não só de interferon, mas também de outros medicamentos biológicos.

Palavras-Chave: Interferon, Espectrometria de Massas

B5 - Estratégia de otimização na triagem e recrutamento de participantes em estudo clínico com alfaepoetina

Rafael de Marchi¹; Hugo Defendi^{1*}; Vivian Rotman¹; Patricia Mouta¹; Beatriz Kaippert¹; Maria de Lourdes Sousa Maia¹.

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introdução:

A aplasia eritróide pura (AEP) é um evento adverso raro que pode ocorrer a partir do uso contínuo de alfaepoetina (EPO) em pacientes com insuficiência renal crônica (IRC) e em hemodiálise. A AEP caracteriza-se principalmente por um quadro de anemia grave e hiporresponsividade à EPO. Frente a demanda da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos (ASCLIN)/Fiocruz desenvolveu um estudo para avaliar a incidência de AEP em pacientes tratados com a alfaepoetina fabricada por Bio-Manguinhos (EPO-Bio).

Objetivo:

Apresentar a estratégia de recrutamento utilizada para o estudo supracitado e a otimização do processo de triagem de participantes.

Metodologia:

Com base em estudo com desenho semelhante, estimou-se avaliar aproximadamente 10.000 participantes diagnosticados com IRC, em hemodiálise e em uso de EPO, para encontrar um número representativo de casos de AEP. Como estratégia de recrutamento, buscou-se a cooperação da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), através da qual se viabilizou uma parceria com a Fresenius Medical Care (FMC), empresa especializada em prover terapia de substituição renal. Através dessa parceria, a FMC disponibilizou o banco de dados de 7.349 pacientes, distribuídos em aproximadamente 30 clínicas conveniadas, em 8 estados brasileiros. Para acesso e manuseio desse banco, foi solicitada ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da instituição a isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Uma vez autorizado, foram selecionados os pacientes que faziam uso de EPO, reduzindo assim o número para 6.069. e neste grupo, aplicou-se os critérios de hiporresponsividade à EPO, chegando a apenas 678 pacientes com suspeita de AEP. Em uma próxima etapa, será ofere-

cida aos pacientes pré-selecionados a participação no estudo, e os participantes com consentimento terão seu prontuário clínico avaliado para diagnóstico clínico de AEP. Ao final, os pacientes que atenderem todos os critérios serão submetidos a uma confirmação de diagnóstico através da pesquisa de anticorpos anti-EPO.

Resultados:

A partir do banco de dados utilizado como fonte primária da triagem, alcançou-se 60,7 % dos participantes estimados para o recrutamento firmando-se apenas 1 acordo de cooperação. A partir da metodologia de análise do banco de dados, foi possível reduzir a quantidade de aplicações de TCLE e de avaliações individuais de prontuários em 88,83 %, reduzindo proporcionalmente custo, alocação de recursos e tempo de execução do estudo.

Conclusão:

A participação de sociedades de classe e estabelecimento de parcerias durante a elaboração do protocolo clínico traz não só resultados qualitativos, devido ao conhecimento clínico e científico, mas também resultados práticos, quantificáveis, que podem impactar diretamente na redução de custo, tempo e recursos, como observado neste estudo clínico. A manutenção das redes de cooperação formadas são também importantes para manter a credibilidade e influência da instituição.

Palavras-Chave: Alfaepoetina, Triagem, Recrutamento

B6 – Determinação dos aminoácidos alanina, glicina e ácido glutâmico na eritropoetina humana recombinante (EPOhr) formulada sem albumina soro humana por clae-uv

Melissa Chamon Alves¹; Eduardo da Silva Gomes de Castro¹; Annibal Duarte Pereira Netto¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução

A Eritropoetina Humana Recombinante (EPOhr) produto biológico utilizado no tratamento de anemias severas, tem sido produzida utilizando-se a tecnologia de DNA recombinante e preparações farmacêuticas da EPOhr estão sendo mundialmente fornecidas por diversos fabricantes. Algumas destas preparações farmacêuticas utilizam grandes quantidades de albumina de soro humano (HSA) como excipiente, cuja finalidade é evitar a adsorção da proteína nas paredes de vidro dos frascos, além de aumentar a sua estabilidade durante o armazenamento. Um inconveniente na utilização de HSA é o fato desta proteína ser extraída do sangue humano e, por esta razão, requerer cuidadoso controle a fim de se prevenir a disseminação de doenças importantes

Como alternativa à utilização da HSA, a formulação em questão utiliza três aminoácidos, alanina, glicina e ácido glutâmico, sendo necessário o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação dos aminoácidos presentes.

Objetivos

Determinação dos aminoácidos alanina, glicina e ácido glutâmico no produto final Alfaepoetina sem albumina de soro humano por cromatografia a líquido de alta eficiência.

Metodologia

Durante o desenvolvimento da metodologia, utilizou-se amostras de diferentes lotes experimentais de eritropoietina sem albumina humana nas 3 apresentações 2000, 4000 e 10000 UI, além de padrões USP de alanina, glicina e ácido glutâmico para a construção da curva analítica. O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo a Líquido de Alta Eficiência (Waters, Alliance), equipado com um detector de UV, modelo 2996. Empregou-se coluna analítica do tipo C18, marca J.T. Baker, 4,6 x 100nm, 5 mm. Fase móvel "A": Ácido Triflu-

oracético 0,1% em água Milli-Q e fase móvel “B”: Ácido Trifluoracético 0,1% em Acetonitrila, modo gradiente, vazão 1,5 mL/min. Para a derivatização das amostras e padrões utilizou-se o 1-flúor-2-4-dinitrobenzeno, também conhecido como reagente de Sanger, marca Sigma, lote BCBK7708V.

Inicialmente realizou-se a reação de derivatização pré-coluna da mistura de aminoácidos com o reagente de Sanger (2,4-dinitro-1-flúor-benzeno ou FDNB) em meio tamponado, utilizando-se solvente adequado, à temperatura controlada e ao abrigo da luminosidade por tempo determinado, para a adição de um grupamento, o 2,4-dinitrofenil, que absorve radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (190 - 400 nm) e consequente formação de um derivatizado estável e detectável. Posteriormente realizou-se a separação por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa. Determinou-se a concentração de cada aminoácido através da preparação de uma curva analítica.

Resultados

A metodologia proposta apresentou boa resolução cromatográfica entre os picos dos aminoácidos e mostrou-se linear na faixa de 0,5 a 1,5 mg/mL para alanina e 1,0 a 3,0 mg/mL para glicina e ácido glutâmico, com coeficientes de correlação iguais ou maiores que 0,99 para os três aminoácidos.

Conclusão

O método mostrou-se adequado para a determinação das substâncias de interesse e poderá ser utilizado na rotina de controle de qualidade de Bio-Manguinhos.

Palavras-Chave: Eritropoetina, Aminoácidos, Cromatografia

B7 - Avaliação do desempenho do cultivo em suspensão de células CHO expressando a EPOhr em sete meios comerciais

Alexandre Borges Murad^{1*}; Tiago Pereira dos Santos¹; Esther Vinhais Gutierrez¹; Máira Peixoto Pellegrini¹; Marina Vergne de Almeida¹; Álvaro Paiva Braga de Sousa¹; Rodrigo Coelho Ventura Pinto¹.

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introdução:

O avanço das técnicas de biologia molecular possibilitou o emprego de cultivos celulares como importante plataforma para a produção, através de processos biotecnológicos, de proteínas recombinantes terapêuticas (biofármacos). A manutenção das condições ideais de cultivo é de grande importância para a obtenção do produto conforme especificações de qualidade e requisitos de segurança. Desta forma, os meios de cultivo promovem o ambiente e fornecimento de nutrientes ideais às células, garantindo o funcionamento normal do metabolismo, do crescimento celular e a correta síntese do produto de interesse. Em um processo produtivo, este insumo deve ser tratado de forma criteriosa, cuidando que o seu fornecimento seja constante e invariável do ponto de vista da sua composição. A disponibilidade de alternativas validadas que garantam a manutenção das especificações de qualidade do produto torna-se então uma estratégia essencial para evitar o desabastecimento.

Objetivo:

Comparar diferentes meios de cultivo comerciais, livres de soro fetal bovino e componentes animais, com o meio de cultivo controle atualmente utilizado para o cultivo em suspensão de células CHO secretoras de EPOhr, analisando a promoção de crescimento celular, produção de EPOhr e metabolismo.

Metodologia:

Os experimentos foram realizados com células CHO secretoras de EPOhr, a partir do descongelamento de criotubos de um banco de células de trabalho. As células foram adaptadas em diferentes meios de cultivo, utilizando frascos estáticos e garrafas rotatórias. Ao final da etapa de adaptação, foram realizadas cinéticas comparativas dos meios testados em comparação ao meio controle. As cinéticas foram comparadas mediante fatores metabólicos e proliferativos do cultivo observados.

Resultados:

Dos sete meios testados, somente 2 meios (HyCell™ e TransFxC) não responderam bem à adaptação direta, impossibilitando a avaliação cinética. Entre os meios que responderam satisfatoriamente à adaptação, 3 apresentaram condições melhores ou iguais ao do meio controle: SFM4CHO™ - Utility. Os meios SFM4CHO™ e Cellvento™ CHO-110 apresentaram melhores capacidades de promoção de crescimento ($2,42 \times 10^6$ células/mL e $4,6 \times 10^6$ células/mL, respectivamente), enquanto o meio CPCHO™ foi capaz de promover uma maior produtividade e taxa específica média de formação de EPOhr ($P = 12,16 \mu\text{g}/\text{dia}$ e $q\text{EPOhr} = 7,3 \mu\text{g}/10^6$ células/dia, respectivamente). Os meios de cultivo SFM4CHO™ e Cellvento™ CHO-110 apresentaram boa capacidade de promover crescimento celular com concentração máxima de células viáveis/mL superior ao meio controle, indicando possuir melhor crescimento celular. O meio CPCHO™ apresentou melhor produção de EPOhr, em comparação ao meio de cultivo controle.

Conclusão:

Os resultados mostraram que 3 meios apresentaram condições melhores ou semelhantes ao meio controle. Sugere-se que o meio SFM4CHO, que apresentou resultados mais semelhantes ao meio controle, apresentaria também menor alteração do perfil bioquímico do produto. No entanto, esta teoria somente poderá ser comprovada mediante análise aprofundada da molécula de EPOhr purificada.

Palavras-Chave: Células CHO Secretoras de EPOhr, Eritropoetina, Meio de Cultivo

B8 - Avaliação de alternativas de filtros para clarificação da colheita do biorreator no processo produtivo da EPOhr

Alvio Figueredo Cardero^{1*}; Victor Gabriel Abramant de Sousa²; Maíra Peixoto Pellegrini³; Tiago Pereira dos Santos³; Marina Vergne de Almeida³; Esther Vinhais Gutierrez³; Rodrigo Coelho Ventura Pinto³.

1 - Centro de Imunologia Molecular;

2 - Merck Millipore;

3 - Bio-Manguinhos/Fiocruz.

Introdução:

A produção da eritropoietina humana recombinante (EPOhr), foco da transferência de tecnologia entre Bio-Manguinhos/Fiocruz e o CIM (Cuba), é baseada no cultivo de células (CHO) em biorreator de tanque agitado de grande escala em perfusão. Neste processo, há uma etapa de clarificação de 2000L diários de colheita, objetivando a redução de particulados, resguardando o processo de purificação. Esta clarificação é feita mediante filtros de profundidade, seguida por filtração de membrana para controle da carga microbiológica.

Objetivo:

Avaliar diferentes especificações e configurações de filtros de profundidade para a clarificação da colheita do cultivo de células em suspensão para a produção da EPOhr.

Metodologia:

Três tipos de filtros de profundidade foram testados: camada simples; camada simples com adjuvante de filtração; e múltiplas camadas. As combinações testadas foram: CE20+CE30 (controle); D0HC+A1HC; 20MS; C0HC. Filtros de membranas foram colocados à jusante dos filtros de profundidade (Durapore 0.45+0.22 ou SHC). Os filtros de profundidade foram testados a uma vazão constante (P_{max}), enquanto os de membrana, testados a uma pressão constante (V_{max}). Cada cascata de filtração foi testada utilizando 500mL de suspensão celular proveniente de um biorreator de 2L, mimetizando características de uma corrente de colheita em escala industrial. Durante o experimento, foram monitoradas a pressão (transdutor de pressão) e a vazão (balanças) para avaliar a capacidade de filtração e dimensionamento dos filtros. Além disso, foram

avaliados grau de clarificação, pela análise da turbidez e distribuição de partículas (Scepter), e adsorção do produto de interesse às membranas (ELISA).

Resultados:

As maiores capacidades de filtração foram observadas nos filtros C0HC e 20MS que, após extrapolação dos resultados para um volume de colheita de 2000L, necessitariam de 7m², seguido da combinação D0HC+A1HC, com 14m². Todas superaram o controle que apresentou necessidade de 20m² de superfície filtrante. Contudo, estes resultados são preliminares, pois nenhum dos casos testados alcançou o valor de pressão máxima no experimento, o que demonstraria que os filtros atingiram sua capacidade máxima, permitindo avaliar com maior precisão o seu dimensionamento. Todos os filtros de profundidade alcançaram grau de clarificação apropriado para a aplicação desejada (<10NTU), corroborado pela análise de distribuição de partículas nos clarificados. A avaliação da adsorção indesejada de EPOhr à membrana demonstrou que a combinação D0HC+A1HC obteve comportamento similar ao controle, com 35% de perda do produto (versus 38% do controle), enquanto a menor perda ocorreu no filtro 20MS, com 21%. Finalmente, o uso do filtro de membrana Express SHC permitiu reduzir a uma só etapa a filtração de redução de carga microbiológica sem perda significativa da capacidade de filtração.

Conclusão:

Verificou-se que, em termos de capacidade de filtração, clarificação e adsorção de EPOhr, as variantes D0HC+A1HC e 20MS constituem alternativas viáveis para substituir a cascata de filtros utilizada atualmente no processo produtivo (padrão).

Palavras-Chave: Eritropoetina Humana Recombinante (EPOhr), Clarificação, Filtração

B9 - Human Recombinant Oligomeric Endostatin for Inhibition and Regression of Pathological Angiogenesis

Gabriel Limaverde-Sousa^{1*}; Ana Carolina Giordani-Duarte²; Bruno Kaufmann Robbs³; Leonardo Paes Cinelli⁴; João Paulo de Biaso Viola³; Pedro Geraldo Pascutti⁵; Tatiana Coelho Sampaio².

1 - Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ);

2 - Instituto de Ciências Biomédicas (ICB/UFRJ);

3 - Instituto Nacional de Câncer (INCA);

4 - Instituto de Bioquímica Médica (IBqM/UFRJ);

5 - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF/UFRJ)

Introduction:

Endostatin is a potent endogenous angiogenesis inhibitor, fully suppressing and regressing tumor growth in mouse models, showing no signs of toxicity and lack of resistance on cyclic treatment. In clinical trials, however, tumor regression was not achieved. Crystallographic studies have shown that endostatin binds a zinc ion through histidine coordination at its N-terminal region possibly forming dimers, although they were never observed in solution. Artificially induced endostatin dimers, but not monomers, have been shown to promote endothelial tubes disassembly in vitro, which suggests modulation of antiangiogenic activity by oligomerization.

Objective:

Investigate zinc-induced structural modifications in endostatin that may correlate to its biological function.

Methodology:

Molecular dynamics computer simulations were performed with endostatin (PDB 1BNL) using GROMACS software package and GROMOS96 force field. Cut-off radius for non-bonded interactions was set to 1.8 nm and 1.2 nm for Coulomb and Lennard-Jones potentials, respectively. Recombinant human endostatin was expressed in *P. pastoris* in two different conditions of controlled pH (pH 6.0 and 7.5). Size exclusion chromatography was performed using GPC 100 HPLC column. Biological activity in vitro was accessed by Matrigel tube regression assays.

Results:

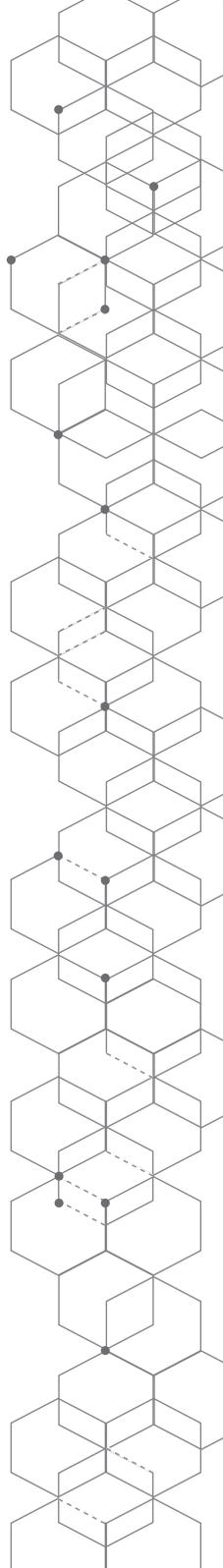
Molecular dynamics simulations performed in the absence of zinc showed significant unfolding of the Nterminal loop of endostatin, leading to dimer dissociation. When zinc was present, on the other hand, dimers were stable through the entire time of the simulation. When recombinant human endostatin was expressed at controlled pH in *Pichia pastoris*, endostatin dimers were observed in solution at pH 7.5, while no dimer formation was detected in endostatin preparation at pH 6.0. Endostatin produced at pH 7.5 has biological activity in Matrigel tube regression assay in nanomolar range, whereas the preparation at pH 6.0 and the clinical formulation (endostatin in citrate buffer, pH 6.2) were inactive.

Conclusion:

The patent application PI0605212-6, here presented, is related to a preparation of oligomerizable endostatin, characterized by the non-covalent association between monomers, presented in a soluble form and compatible with clinical administration. In order to obtain tumor regression with antiangiogenic therapy, stopping tumor vasculature from growing may not be enough; it needs also to be disassembled. Abundant evidence in the literature demonstrates that monomeric endostatin can inhibit angiogenesis by blocking de novo formation of capillaries. On the other hand, disassembly of pre-established tubes was reported exclusively by artificially oligomerized endostatin. Based on these data, we propose that the lack of activity in clinical trials could be due to the fact that the endostatin produced for human therapy was exclusively monomeric, produced and administered at acidic pH. Our work shows that producing recombinant human endostatin in *P. pastoris* at a pH compatible with zinc coordination by histidines preserves the dimeric structure of endostatin and its full biological activity, perhaps leading to a better therapeutic outcome.

Keywords: Endostatin, Human Recombinant Oligomeric, Angiogenesis, Cancer

REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO



RI - Ferramentas proteômicas na identificação de novos alvos antigênicos na proteína M do *Histoplasma capsulatum* e aplicação em ensaios imunoenzimáticos

Claudia Vera Pizzini¹

1 - Fiocruz

Introdução:

A histoplasmose é uma infecção que apresenta amplo espectro clínico, variando desde forma leves, a graves e disseminadas. O diagnóstico da histoplasmose baseia-se nos aspectos clínicos, radiológicos e epidemiológicos. A confirmação se dá pelo isolamento e identificação do *Histoplasma capsulatum* através de procedimentos microbiológicos. Diferentes metodologias já foram descritas no diagnóstico sorológico da histoplasmose, porém limitações relacionadas a reações cruzadas e limiar de detecção das técnicas empregadas podem dificultar o diagnóstico. O antígeno M obtido do extrato antigênico histoplasmina é considerado um antígeno imunodominante para produção de anticorpos, sendo reconhecido em cerca de 90% dos soros dos pacientes com histoplasmose. O nosso grupo vem trabalhando a vários anos em estudos para um melhor conhecimento desta molécula e aplicação no diagnóstico. Um modelo molecular do antígeno M foi desenvolvido através de sua sequência, tendo então confirmada sua natureza biológica como catalase. Observa-se também que esta molécula apresentava regiões comuns bem como específicas quando comparadas a catalases de organismos eucariotas.

Objetivo:

No presente estudo procuramos determinar a presença de possíveis epitopos antigênicos na proteína M empregando ferramentas proteômicas, para posterior emprego em ensaios imunoenzimáticos

Metodologia:

Foi utilizada a combinação da técnica de coimunoprecipitação com espectrometria de massas e posteriormente a técnica de Spot synthesis

Resultados:

Com o emprego do anticorpo monoclonal (mAb 1A7) produzido contra a proteína M recombinante foi possível detectar uma sequência que foi comum às

duas metodologias empregadas (PTKIIPEELVPFTP). Esta sequência encontra-se localizada numa região onde estudos anteriores, por análise *in silico*, apontaram como a região mais antigênica desta molécula.

Conclusão:

Nossa proposta é realizar a síntese desta sequência com diferentes desenhos: extensão de resíduos de lisina e adição da molécula de biotina em ambas as extremidades, carboxi e amino terminal; a síntese da sequência sem adição de outras moléculas, para posterior análise em ensaios imunoenzimáticos frente a soros de pacientes com histoplasmose com outras infecções fúngicas, pacientes com tuberculose e frente a indivíduos hígidos.

Palavras-Chave: Histoplasmose, Diagnóstico com Ferramentas Proteômicas, Imunoensaios

R2 - Avaliação da utilização de ensaio imunocromatográfico para o diagnóstico e estudo de prevalência da hepatite A

Camilla Rodrigues de Almeida Ribeiro^{1*}; Luciane Almeida Amado¹; Renata Tourinho Santos¹; Lyana Rodrigues Lima¹; Juliana Melgaço¹; Adilson José De Almeida²; Lia Laura Lewis Ximenez³; Vanessa Salete de Paula¹.

1 - Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz;

2 - Ambulatório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil e Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Setor de Hematologia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro;

3 - Ambulatório de Hepatites Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz.

Introdução:

A hepatite A é uma doença infecciosa aguda e embora seja auto-limitada é uma significativa causa de morbidade e perdas socioeconômicas em muitas partes do mundo. Em países em desenvolvimento, o acentuado declínio na taxa de incidência, resultante das melhorias nas condições sanitárias, contribuiu para a redução da exposição ao vírus da hepatite A (HAV) durante a infância e o aumento da incidência em idades mais avançadas aumentando o risco de morbidade e mortalidade pela doença. Com base nesses dados epidemiológicos e na importância mundial da hepatite A, ensaios rápidos e práticos devem ser avaliados (sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e valores preditivo) para facilitar o diagnóstico dessa patologia, possibilitando o tratamento precoce e evitando a sua transmissão.

Objetivo:

Avaliar a eficiência e eficácia de um ensaio imunocromatográfico comercial (teste rápido) para a diagnóstico da hepatite A e estudo de prevalência em diferentes grupos de estudo.

Metodologia:

Foram avaliados parâmetros como a sensibilidade, especificidade, valores preditivo positivo e negativo, reprodutibilidade e repetitividade do teste rápido para detecção de anti-HAV IgM e anti-HAV IgG em amostras de soro previa-

mente identificadas como reagentes e não reagentes. Amostras de pacientes (n total= 342) de diferentes grupos foram coletadas e submetidas ao teste rápido SD BIOLINE HAV IgG/IgM (*Standard Diagnostics*, Coreia). Todos os resultados do teste rápido foram comparados com os resultados do teste imunoenzimático (Elisa) ETI-AB-HAVK PLUS (Diasorin, Itália) e Biokit (Biokit, S.A. Barcelona, Espanha), que é o padrão ouro para o diagnóstico sorológico da hepatite A.

Resultados:

O limite de detecção do teste rápido para anticorpos Anti-HAV IgG foi de 10⁻² e do teste padrão-ouro (Elisa) foi de 10⁻¹⁰ e para anticorpos Anti-HAV IgM o teste rápido demonstrou limites de detecção iguais ou superiores ao padrão-ouro. O teste rápido não demonstrou reatividade cruzada com anticorpos provenientes de outros agentes infecciosos e demonstrou ter uma taxa de detecção menor comparada ao Elisa em todos os grupos, para ambos os marcadores. Para a detecção do anti-HAV IgG o teste não apresentou boa repetibilidade e reprodutibilidade. Os níveis de concordância utilizando o índice Kappa (k) foram considerados de fracos a bons nos grupos testados para o marcador IgG e de excelentes a bons para os grupos testados com marcador IgM e a sensibilidade e a especificidade do teste rápido para detecção de anti-HAV IgM foi de 94,74 (IC 95%; 88,14-98,27) e 99,05 (IC 95%; 94,81- 99,98) e para anti-HAV IgG foi de 69,61 (IC 95%; 62,80- 75,84) e 66,30 (IC 95%; 55,70-75,83), respectivamente.

Conclusão:

Comprovamos que o teste mostrou ser adequado para o diagnóstico da hepatite A em casos de surtos e casos esporádicos para detecção de anticorpos IgM. No entanto, para detecção de infecção passada e resposta vacinal, o teste precisa ser aprimorado.

Palavras-Chave: Hepatite A, Teste Rápido

R3 - Avaliação de antígenos de sífilis para utilização em testes rápidos

Michel Vergne Sucupira^{1*}; Rafaela Lopes Diniz¹; Aline Rodrigues Bernardo¹; Edimilson Domingos da Silva¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

O diagnóstico rápido para Sífilis na saúde pública é uma necessidade urgente diante da escalada alarmante da doença na população brasileira. O atendimento e encaminhamento do paciente junto com seu (a) parceiro (a) diante de um diagnóstico positivo passa a ser imediato, impedindo a disseminação e agravamento da doença. Antígenos de origem nacional estão sendo desenvolvidos para a utilização em testes rápidos, com vistas à viabilização econômica do teste, com a diminuição do custo total e da dependência de fornecedores externos.

Objetivo:

Avaliar o desempenho de antígenos produzidos no Brasil para a detecção de anticorpos treponêmicos para sífilis e padronizar o teste às amostras brasileiras.

Metodologia:

Foi montado um algoritmo com diferentes concentrações de antígenos, diferentes membranas de nitrocelulose e diferentes formulações de tampões de corrida para execução dos testes. Os antígenos foram impregnados nas membranas 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. Amostras positivas para outras doenças também foram utilizadas para verificação de possíveis reações cruzadas. Nesta plataforma apenas 5µl são necessários para a detecção dos anticorpos, seguidos de 2 gotas de tampão de corrida. A revelação da reação foi feita através do carreamento do conjugado Ouro/Ptn A por 4 gotas do tampão.

Resultados:

Resultados preliminares demonstraram que 1 entre as 4 proteínas avaliadas apresentou maior potencial para utilização em teste rápido de fluxo lateral em plataforma de duplo percurso. A avaliação dos resultados mostrou grande concordância com os resultados obtidos com testes de referência comerciais.

Conclusão:

Proteínas desenvolvidas para diagnóstico de Sífilis no país apresentaram um grande potencial para utilização em teste rápido em plataforma de duplo percurso. A avaliação em plataformas mais simples será considerada posteriormente como forma de diminuir ainda mais o custo total de fabricação destes testes.

Palavras-Chave: Teste Rápido, Sífilis

R4 - Incorporação do 4º alvo, dengue, no Kit NAT HIV/HCV/ HBV brasileiro produzido por Bio-Manguinhos

Patricia Alvarez^{1*}; Elaine Costa¹; Elisabete Andrade¹; Daniele Rocha¹; Marcela Fontana¹; Roberta Bruno¹; Marisa Ribeiro¹; Antonio G. P. Ferreira¹

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

Para triagem de doadores de sangue no Brasil, atualmente são realizados ensaios NAT para HIV, HCV e HBV. Visando ampliar ainda mais a segurança transfusional, o Kit NAT esta sendo aperfeiçoado para detectar, adicionalmente, amostras com o vírus da Dengue (DEN).

Objetivo:

Padronizar ensaio de diagnóstico molecular para detecção dos vírus da Dengue na plataforma de PCR em Tempo Real, visando sua potencial incorporação como 4º alvo de detecção no Kit NAT HIV/HCV/HBV Brasileiro, produzido por Bio-Manguinhos. Para ampliar a segurança transfusional, o teste para detecção de Dengue está sendo ajustado e aproveitando as bases técnicas do modelo atual do Kit NAT Brasileiro, poderá ser incorporado como um alvo adicional.

Metodologia:

Os iniciadores e sonda utilizados na padronização do ensaio estão localizados na região 3'NCR. Esta região é conservada, permitindo, assim, amplificar/detectar os quatro tipos de vírus DEN em uma única reação/detecção molecular. Em toda reação é utilizada uma partícula calibradora (PC), como controle interno do sistema. Até o momento, para a padronização da concentração de sonda e iniciadores, e para obtenção das provas de conceito, foram processadas amostras de cultura desse vírus de diferentes cepas, dos tipos 1, 2, 3 e 4. Para a inclusão do alvo Dengue no modelo atual do Kit NAT HIV/HCV/HBV Brasileiro, será padronizado e utilizado um segundo ensaio triplex discriminatório: DEN, HBV e PC.

Resultados:

O processamento das amostras de cultivo dos diferentes tipos de Dengue demonstrou resultados bastante significativos, apresentando um bom desempe-

nho das curvas de amplificação de DEN e da PC, em uma mesma reação. Os testes de especificidade foram realizados com amostras verdadeiras negativas e demonstraram 100% de concordância. Em testes preliminares, obtivemos DEN VIC, HBV FAM e PC DYE3, como a melhor combinação das fluorescências. A extração das diferentes cepas de vírus foi feita em um sistema automatizado de extração de coluna de sílica usada no modelo atual do Kit NAT Brasileiro, além de outros sistemas de partículas magnéticas, automatizados.

Conclusão:

Os testes realizados mostraram que a reação duplex, por PCR em tempo real, para DEN e PC é satisfatória. A padronização do ensaio descrito foi realizada com amostras de cultura. Entretanto, para a validação do sistema há necessidade de testes frente a amostras clínicas positivas dos quatro tipos de vírus dengue. Estão em andamento experimentos para análise da reação triplex Dengue, HBV e PC, e estudos de avaliação da metodologia, o qual definirá as características técnicas, como os níveis de sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade entre outros. Atualmente, considerando a relevância epidemiológica da dengue, no Brasil, a incorporação deste novo alvo na triagem de doadores de sangue da Hemorede Pública permitirá ampliar ainda mais a segurança transfusional.

Palavras-Chave: Kit NAT, Dengue, RT-PCR

R5 - Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos - Eficácia para detecção do alvo HBV em amostras em período de janela imunológica

Patricia Alvarez^{1*}; Elisabete Andrade¹; Daniele Rocha¹; Marcela Fontana¹; Elaine Costa¹; Marisa Ribeiro¹; Antonio G.P. Ferreira¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

O ensaio NAT Brasileiro para triagem de doadores visa complementar a rotina de ensaios sorológicos, 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.

Objetivo:

Ampliar ainda mais a segurança transfusional no Brasil, através da implantação da nova versão do Kit NAT Brasileiro, produzido por Bio-Manguinhos, que incorpora o novo alvo HBV, adicionalmente. A detecção do alvo HBV em amostras no período de janela imunológica confirma a aplicabilidade e eficácia do produto.

Metodologia:

Em espaço de tempo muito curto foram superados os desafios científicos, técnicos e operacionais para incorporar o novo alvo HBV ao produto, para o qual se obteve a alteração do registro junto a ANVISA, em novembro de 2014. O novo modelo de produto foi incorporado gradualmente às rotinas dos Serviços de Hemoterapia, para triagem de doadores de sangue. O Kit NAT HIV/HCV/ HBV brasileiro é um ensaio baseado na técnica de PCR em tempo real, contemplando um ensaio triplex discriminatório (HIV, HCV e PC) e um duplex discriminatório (HBV e PC) com alto grau de automação, alta capacidade de processamento e sensibilidade.

Resultados:

Segundo a Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados/MS, desde dezembro de 2014, foram processadas com o Módulo de amplificação de HBV do Kit NAT Brasileiro, cerca de 400 mil amostras de doadores de sangue. Até o

momento, foram notificadas 3 amostras HBV detectáveis no Kit NAT e não reagentes na sorologia, caracterizando o período de janela imunológica. Destas, 2 foram detectadas no Hemocentro de Minas Gerais e 1 no Hemocentro de Pernambuco. Além destas amostras, o produto foi capaz de obter excelente desempenho frente a painéis de soro-conversão para HBV. Nos ensaios de LOD utilizando os painéis NIBSC, o Kit foi capaz de detectar replicatas com até 3UI/mL. Estes dados vêm comprovando a aplicabilidade e desempenho esperado para o Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos.

Conclusão:

O Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos e sua aplicação nas rotinas de triagem de doadores de sangue no Brasil geraram aumento na segurança transfusional sem significativos impactos operacionais e de custo, constituindo um exemplo de produto inovador para o Complexo Industrial da Saúde. Contribui ainda para consolidar competências tecnológicas na área de imunobiológicos e diagnóstico molecular na FIOCRUZ, atendendo à demanda de produtos estratégicos do Ministério da Saúde para o SUS.

Palavras-Chave: Diagnóstico Molecular, Kit NAT, Detecção de Janela Imunológica

R6 - A laboratory-developed TaqMan Array Card for simultaneous detection and genotyping of Group A rotavirus.

Irene T. Araujo^{1*}; Alexandre M. Fialho¹; Rosane M. S. Assis¹; Eduardo M. Volotão¹; Darwin J. Operario²; Eric R. Houpt²; Duncan Steele³; Fatima Serhan⁴; Gloria Rey-Benito⁵; Jose Paulo G. Leite¹.

1 - IOC/Fiocruz;

2 - University of Virginia;

3 - CDC;

4 - WHO;

5 - PAHO/WHO.

Introduction:

Group A Rotaviruses (RVA) represent the main cause of acute gastroenteritis in children under five years old worldwide. A sensitive molecular technique is important to ensure reliable results for epidemiological surveys. The TaqMan Array Card (TAC) system is a 384-well singleplex real-time PCR format that allows detection of multiple infection targets. Here we used a TAC that has been developed for detection of 19 enteropathogens, including characterization of eight G genotypes (VP7 gene) and six P genotypes (VP4 gene) of RVA

Objective:

Evaluate the rotavirus detection and genotyping results obtained with the TAC method comparing with the previous results obtained by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), enzyme immunoassay (EIA) for RVA detection (Ridascreen, R-Biopharm) and RT-PCR for RVA genotyping.

Metodologia:

One-hundred and thirty-nine samples were processed by TAC out of a three-hundred total selection. All samples were previously tested by PAGE, EIA and RVA genotyping by RT-PCR. A modified extraction procedure was performed to isolate both DNA and RNA from stool samples using the QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit. Extrinsic controls PhHV (*Phocine Herpesvirus*) and MS2 (bacteriophage) were added to samples during the lysate preparation to evaluate extraction and amplification efficiencies. TaqMan Array Cards were used to amplify nucleic acid. RVA detection and genotyping below a quanti-

fication cycle (Cq) of 35 and 40, respectively, were used as a uniform cutoff for test positivity based on a limit of detection.

Results:

Six samples were previously diagnosed as RVA positive by PAGE, EIA and genotyped by RT-PCR as G2P4 (n=3), G?P8 (n=1), G3P8 (n=1) and G1P8 (n=1). Our TAC preliminary results confirmed RVA detection in all six samples and genotyping by TAC confirmed G1P8, G3P8 and G2P4 strains (n=1 each). The other G2P4 strains (n=2) were characterized as mixed infection with P8 and the G?P8 strain (n=1) was characterized as G12.

Conclusion:

The TAC method is a specific and rapid method for simultaneous detection of nucleic acids from viruses, bacteria, protozoa and helminthes, as well as genotyping RVA, in the same test. The specificity of the TAC method compared to RT-PCR for RVA genotyping is suitable, once one non-typed G sample was characterized. To date, few samples were tested for RVA by TAC method yet, but more samples will be processed to allow a reliable evaluation of specificity and sensitivity of TAC results.

Keywords: Rotavirus, Real-Time PCR

R7 – Rapid Immunochromatographic test for serological diagnosis of Feline Immunodeficiency Virus in cats

Marli Sidoni^{1*}; Aline Rodrigues Bernardo¹; Edmilson Domingos da Silva¹; Maria Luiza Borges de Azevedo¹; Patricia Barbosa Jurgilas¹; Ana Paula Araújo¹; Hilton Jorge Nascimento¹; Jose Godinho da Silva Junior¹; Carlos Mazur²; Maria das Graças Miranda Danelli².

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz;

2 - UFRRJ.

Introdução:

Feline immunodeficiency Virus (FIV) is one of the most important and common infectious diseases of cats. FIV is a retroviruses that belongs to the lentivirus subgroup and it is responsible for a severe acquired chronic immunodeficiency in cats leading to death of infected animals. The standard method for FIV diagnosis is based on isolation of infective virus from peripheral blood lymphocytes. Such assay is longstanding and expensive for routine laboratory practice. Previous studies showed that infected cats present high levels of anti-P24 protein. This protein can be used as a target for diagnosis of Feline immunodeficiency. In this work we describe our preliminary results to achieve a dual path immunochromatography kit for FIV.

Objetivo:

Development of a rapid diagnostic test for feline immunodeficiency virus infection.

Metodologia:

The recombinant protein p24 was over-expressed in the selected recombinant bacterial clone induced with 1M IPTG (isopropyl-D- thiogalactopyranoside). The purification based on the poly-histidine tail added to the recombinant protein was performed by immobilized metal affinity in nickel-charged resin (IMAC). The purified r-p24 was characterized by polyacrylamide gel electrophoresis (SDSPAGE), by Western Blot and ELISA. The r-p24 was immobilized on a nitrocellulose membrane (MDI, India) as test line zone. A protein A-gold conjugated was used as the conjugate pad. A FIV Sera panel from cats was used to test the immunochromatographic strips.

Resultados:

Recombinant protein p24 preparation isolated from the pool of affinity chromatographic fractions showed homogeneous by electrophoretic techniques. The previous results in Rapid Immunochromatographic test showed reactivity with positives and negatives samples for FIV. There were no false positive on the samples used.

Conclusão:

The results obtained so far suggest that the antigen r p24 along with the complex Feline anti-p24 -Protein A-gold can be used as a Rapid Immunochromatographic assay. Further analysis must be performed to assure sensibility and specificity of the proposed assay.

Palavras-Chave: FIV, Immunochromatographic Test, P24

R8 - Análise comparativa do histórico da prestação de serviços e do desempenho do kit NAT HIV/HCV/HBV na Hemorede NAT brasileira

Linda Khalili Boukai^{1*}; Caroline Ferezin Pinto¹; Priscilla Caroline Almeida dos Santos¹; Ludmila Nascimento Rocha Villar Bezerra¹; Marilúcia Sobrado Pina¹; Joyce Lemos Lima¹; Adriana Rodrigues Pedro¹; Vivian Rabello Areias¹; Tatiana Rose Pizzani Trindade¹.

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introdução:

A prestação de suporte técnico/científico aos usuários do kit NAT é centralizada na Divisão de Atendimento ao Cliente e Pós-Marketing (DIACM) em Bio-Manguinhos.

Objetivo:

Realizar um histórico comparativo sobre a atuação da DIACM na prestação de serviços de suporte técnico/científico à Hemorede NAT, no período de 2011 a 2014, com ênfase na evolução da satisfação dos usuários em relação ao kit NAT HIV/HCV/HBV e à prestação dos serviços agregados.

Metodologia:

O atendimento à Hemorede é um trabalho proativo, executado por uma equipe de oito assessoras científicas que trabalham sanando dúvidas e acompanhando, em tempo real, os problemas incidentes na plataforma de equipamentos. As ocorrências são recebidas, principalmente, pelos seguintes canais de comunicação: discagem gratuita, correio eletrônico e aplicativos de comunicação. Os atendimentos são classificados e registrados em sistema informatizado conferindo rastreabilidade, padronização e fidelidade às informações fornecidas pelos usuários. A equipe também realiza monitoramento da entrega do produto por meio de aplicação de pesquisas de avaliação. Todos os registros são contabilizados e geraram os quantitativos apresentados no presente trabalho.

Resultados:

A análise dos números revela um perfil de crescimento e evolução do kit NAT no mercado brasileiro. Desde o lançamento oficial em 2011 até 2014 contabilizamos um aumento de 318% no quantitativo de kits enviados, possibilitando a

execução de mais de 7 milhões e 200 mil ensaios nos sítios testadores. Ao longo desses anos, o número de ocorrências aumentou em 118%. Foram registradas mais de 8700 ocorrências notificadas por mais de 394 usuários treinados/retreinados. A base instalada acompanhou essa evolução. Atualmente, a base instalada é composta por 121 equipamentos tendo aumentado 203% nesse período. Este crescimento gerou um impacto positivo na Hemorede que vem aumentando o número de rotinas processadas anualmente e incorporando novas tecnologias como a detecção do alvo HBV. O prazo de atendimento de 20 horas comerciais para as manutenções corretivas é atendido plenamente, garantindo equipamentos operacionais em tempo integral, sem paradas críticas no seu funcionamento. Assim, já foram encontradas 39 janelas imunológicas, sendo 31 para HIV e 08 para HCV. Todo este cenário impacta diretamente no grau de satisfação do usuário, que vem aumentando a cada ano. Em 2014, 82,9% dos usuários consideraram-se satisfeitos com o desempenho do kit (evolução de 21%), enquanto 94,3% consideraram-se satisfeitos com a prestação dos serviços (evolução de 23%).

Conclusão:

Os números apontam para evolução no grau de satisfação com o kit e com os serviços prestados. Bio-Manguinhos empenhou esforços para implementação de melhorias no desempenho e na sensibilidade do kit. A equipe de atendimento construiu um canal de comunicação aberto com os usuários, favorecendo a prestação de um serviço eficiente, ágil e resolutivo. A análise comparativa dos quantitativos anuais informados neste trabalho confirma o crescimento e a consolidação do kit NAT HIV/HCV/HBV no mercado brasileiro.

Palavras-Chave: NAT, Atendimento Suporte Técnico/Científico

R9 - Avaliação de proteínas recombinantes nacionalizadas como componentes de um multiteste para triagem sorológica de doadores de sangue

Christiane de Fátima Silva Marques^{1*}; Bernardo Oliveira Loureiro¹; Leila Botelho Rodrigues da Silva¹; Marcelle Bral de Mello¹; Edimilson Domingos da Silva¹; Leonardo Foti²; Marco Krieger³; Nilson Ivo Tonin Zanchin⁴.

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz;

2 - IBMP;

3 - IBMP e ICC/Fiocruz;

4 - ICC/Fiocruz.

Introdução:

A nacionalização de insumos é uma iniciativa alinhada com a política nacional de ciência e tecnologia e com as ações para o fortalecimento do Complexo Econômico-Industrial da Saúde, cujos resultados positivos incluem a capacitação técnica das instituições brasileiras e a incorporação de conhecimento relevante aos laboratórios produtores nacionais. Uma das vertentes do projeto de desenvolvimento de um ensaio múltiplo para a triagem sorológica de doadores de sangue, impulsionado pelas equipes de Bio-Manguinhos, ICC/Fiocruz e IBMP, inclui a nacionalização de proteínas recombinantes (antígenos) que possam ser utilizadas em imunoenaios destinados à detecção de anticorpos em amostras de plasma e soro humano. Uma vez comprovado o seu desempenho e valor preditivo, estas moléculas poderiam ser incorporadas a conjuntos diagnósticos (kits), substituindo opções comerciais importadas. Em última instância, essa incorporação de insumos nacionais pode gerar economia de divisas, contribuindo para a redução do déficit na balança comercial do setor saúde, bem como reduzindo a dependência externa e consolidando *expertise* nos grupos da Fiocruz.

Objetivo:

O presente trabalho tem como objetivo avaliar, de forma comparativa, o desempenho de proteínas recombinantes nacionalizadas diante de antígenos comercialmente disponíveis, usando um ensaio múltiplo baseado na plataforma de microarranjos líquidos como modelo de estudo.

Metodologia:

21 proteínas recombinantes desenvolvidas e produzidas no IBMP e no ICC/Fiocruz foram acopladas a microesferas paramagnéticas e utilizadas como moléculas de captura em um imunoenensaio múltiplo, utilizando um painel interno de amostras de referência, a fim de que fosse determinado seu valor preditivo na detecção de anticorpos anti-HBV, anti-HCV, anti-HIV, anti-HTLV, anti-*Treponema pallidum* e anti-*Trypanosoma cruzi*. Em seguida, os resultados obtidos com os antígenos nacionalizados foram comparados àqueles alcançados com insumos comerciais, adotados como componentes do protótipo de multiteste em desenvolvimento. Todos os resultados foram analisados por meio da curva ROC e, a partir dela, calculados os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo.

Resultados:

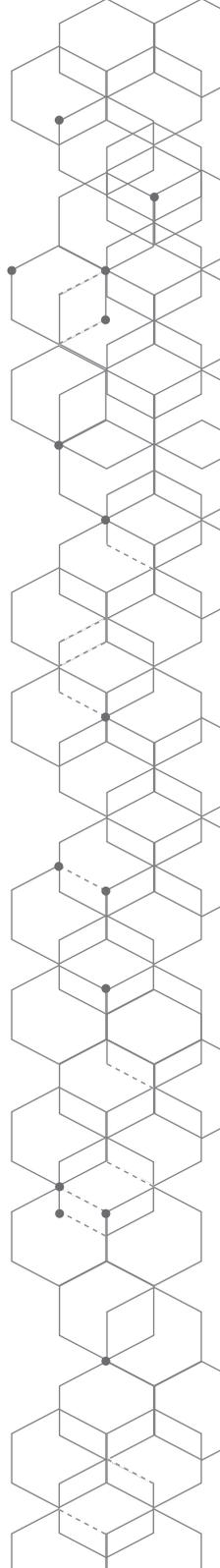
Esta avaliação indicou que seis antígenos nacionalizados (dois de *T.pallidum*, dois de *T. cruzi*, um de HCV e um de HTLV) apresentaram desempenho igual ou superior aos correspondentes comerciais, permitindo a substituição de 1/3 dos insumos importados neste imunoenensaio. Os antígenos que não apresentaram a eficiência necessária serão otimizados com relação à purificação e às condições dos ensaios imunológicos. Além disso, outras proteínas estão em fase final de desenvolvimento e poderão ser avaliadas em um segundo momento, com o objetivo de aumentar a representatividade dos insumos nacionalizados no produto final.

Conclusão:

A incorporação de proteínas recombinantes nacionalizadas tem o potencial de reduzir custos e ampliar o domínio sobre a cadeia de suprimentos deste e de outros reativos para diagnóstico produzidos em Bio-Manguinhos.

Palavras-Chave: Imunoensaios, Diagnóstico Multitestes

GESTÃO



GI - Inovação da gestão em pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz: quebrando paradigmas rumo à sustentabilidade organizacional

Ana Margarida Ribeiro do Amaral^{1*}; Ângela Lúcia de Carvalho¹; Camila Dutra e Mello Ribeiro¹; Iliane Araújo¹; Marcela Aparecida da Silva¹; Paula Coutinho da Silva¹; Patrícia Gonçalves Eliseu¹; Rosilene Silva de Jesus Fernandes¹; Vitor Hugo da Silva Martins¹; Tereza Cristina dos Santos¹.

1 - IOC

Introdução:

Apresentamos um modelo bem sucedido de gestão inovadora na Plataforma de Apoio à Pesquisa e Inovação (PAPI) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), com a intenção de disseminar estratégias similares em outras Instituições Públicas de Pesquisa (IPPs). A multidisciplinaridade do IOC é transcrita na sinergia da Plataforma segundo um *design* flexível, interativo, amigável, ágil, horizontalizado e democrático. Gerenciar um Instituto de tradição e diversidade requer um modelo consistente, que concilie a fluidez e a velocidade necessárias para as inúmeras demandas que se apresentam. Os resultados obtidos são indispensáveis para execução de uma pesquisa de qualidade, além de fomentar a inovação na instituição e permitir informar com transparência os investimentos realizados e os benefícios oriundos para a sociedade.

Objetivo:

A Plataforma tem o objetivo de desonerar os pesquisadores das burocracias que emperram suas atividades, reduzindo tempo, insumos e recursos e, se destaca por oferecer apoio à pesquisa, de forma ampla e integrada.

Metodologia:

Através de uma comunicação efetiva com as interfaces do IOC, a PAPI atua na formulação de políticas de incentivo à inovação até o mapeamento de expertises, inovações e produtos do IOC. Também apoia a elaboração de relatórios e portfólios; a organização de eventos científicos; a estruturação de redes; a formalização de parcerias; a transferência de tecnologias; o estudo do estado da arte de temáticas (tendências, dispersão, emergência e obsolescência de linhas de pesquisa e desenvolvimento tecnológico); a identificação: das principais revistas de uma temática; da produção científica de autores individuais, organiza-

ções e países; de competências, grupos e lideranças; de padrões de colaboração; de parcerias ou concorrentes; além de estudos de prospecção e atividades referentes ao Núcleo de Inovação Tecnológica. As análises de dados são realizadas com ferramentas de *data/text mining* extraindo informações disponíveis em diversas bases de dados. Ainda atua na busca de Editais, onde utiliza um Sistema de Prospecção de Agentes Financiadores em PD&I.

Resultados:

Desde 2007 já foram apoiados 55 eventos nacionais e internacionais, a submissão de 53 editais, e cerca de 100 projetos foram gerenciados até sua finalização; 46 estudos de mapeamento sobre linhas de pesquisa emergentes, identificação de potenciais instituições parceiras e órgãos de fomento e, das principais revistas científicas por área de conhecimento com análise dos Fatores de Impacto, além da formalização de parcerias, inclusive internacionais.

Conclusão:

O IOC é um dos pioneiros na remodelagem da gestão da Pesquisa visando maior eficiência e competitividade. A PAPI incentiva a Inovação da gestão e da pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz e quebra paradigmas quanto a sustentabilidade organizacional rumo ao novo milênio.

Palavras-Chave: Gestão da Inovação, Plataforma de Apoio

G2 - Avaliação da inovação na organização pública multipropósito de saúde: efetividade na atenção clínica com eficiência no uso de recursos

Marcelino José Jorge^{1*}; Maria Inês Fernandes Pimentel¹; Alexandre Monken Avellar¹; Cristina Monken Avellar¹; Daniela de Souza Ferreira¹; Patrícia Santos Cavalheiro Silva¹.

1- Fiocruz/INI

Introdução:

Para consolidar a inovação nas organizações públicas multipropósito de saúde, a eficiência no uso de recursos complementa a efetividade na atenção clínica. O Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas da Fundação Oswaldo Cruz (INI), por exemplo, organiza a assistência associada à pesquisa clínica de várias doenças infecciosas segundo o Modelo de Atenção Integral. Hoje, as Ações Integradas (PAI) do Instituto incluem todos os tipos de atividades de pesquisa, ensino, laboratório e atenção clínica do INI. Entre as nosologias focalizadas, a de LTA, incluindo a Leishmaniose Cutânea (LC), ocorre de forma endêmica em várias regiões das Américas. O Brasil e outros seis países do continente concentram cerca de 90% dos casos de LC. No Brasil, o antimoniato de meglumina (AM) é utilizado como fármaco de primeira linha para o tratamento da LTA e a dose recomendada é de 10-20 mg de antimônio (Sb) /kg de peso corporal/dia durante 20 dias, até o máximo de 3 ampolas/dia. Por seu turno, um esquema com dose baixa (5 mg Sb⁵⁺/kg peso corporal/dia) durante 30 dias seguidos ou intermitentes tem sido eficaz e bem tolerado no tratamento da LTA no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do INI (Lab-Vigileish). A necessidade de se comparar efetividade e segurança entre tais esquemas terapêuticos motivou a realização de um ensaio clínico de fase III para verificação da equivalência entre o esquema padrão e esquemas alternativos de tratamento para LTA com doses baixas de AM no Lab-Vigileish a partir de 2009. Além das conseqüências para a efetividade do tratamento, a experiência acumulada com a adoção desses esquemas alternativos de combinação dos recursos especializados de horas-médicos, material hospitalar, reagentes e medicamentos usados no Lab-Vigileish trouxe indícios de redução das despesas de tratamento da LC.

Objetivo:

Avaliar esquemas alternativos no tratamento de LC do ponto de vista da incorporação da dimensão organizacional e da Análise de Eficiência à Análise Custo-Efetividade da inovação na organização pública mutipropósito de saúde.

Metodologia:

Foi realizada uma avaliação de custo-efetividade com os primeiros 59 pacientes com LC desse ensaio, utilizando o modelo Análise Envoltória de Dados (DEA).

Resultados:

Ao comparar as intervenções para cada paciente com a sua referência (*benchmark*) na fronteira de eficiência calculada com o modelo DEA, observou-se que havia mais pacientes dos grupos de tratamento com dose baixa de AM do que pacientes dos grupos de dose alta na fronteira eficiente.

Conclusão:

O grupo de tratamento com dose baixa foi mais eficiente do que o grupo de dose alta. A análise com o modelo DEA destaca os ganhos de desempenho associados à inovação no tratamento de LC no Lab-Vigileish como compatível com uma estratégia pró-eficiência na produção simultânea de serviços de saúde, conhecimento científico e recursos humanos para a pesquisa clínica em doenças infecciosas.

Palavras-Chave: Inovação, Leishmaniose Cutânea, Avaliação Tecnológica

G3 - O uso da ferramenta de Comunidades de Prática (CoP) em Bio-Manguinhos para gerar ambiente propício à inovação

Gisele Corrêa Miranda^{1*}; Ana Paula Carvalho da Silva¹.

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introdução:

Ideias são diferentes de maçãs - se eu tenho uma maçã e compartilho com alguém, saio sem a maçã. Mas se tenho uma ideia e compartilho com alguém, essa ideia cresce e saímos, os dois, com muito mais ideias. É com esta filosofia que as Comunidades de Práticas (CoP) vem gerando conhecimento em rede desde 2013, quando foram lançadas pelo projeto de Gestão do Conhecimento (CG) em BioManguinhos. Comunidades de Práticas são grupos de pessoas que compartilham interesse ou paixão por alguma coisa que fazem e aprendem como fazer melhor à medida que interagem regularmente.

Objetivo:

Criar ambiente propício à colaboração em rede, viabilizando a absorção e análise dos estímulos cada vez mais complexos e frequentes do mundo atual, em contrapartida à necessidade de especialização do profissional. Estes são dilemas que caracterizam o desafio do profissional moderno em acompanhar a crescente complexidade dinâmica dos ambientes corporativos atuais e estar apto a gerar resultados efetivos e inovar.

Metodologia:

Para dar suporte à criação de CoP sustentáveis e consistentes em Bio-Manguinhos, e orientar aos colaboradores interessados em utilizar essa prática para mobilizar o conhecimento sobre temas específicos, foi desenvolvida a metodologia institucional de criação, organização e avaliação de comunidades. Esta metodologia orienta os líderes das CoPs na criação e estruturação de novas comunidades, passando pelo planejamento estratégico e as ferramentas de análise e sustentação das atividades. Essas atividades estão distribuídas em quatro grandes blocos: Potencial, Coalisção, Operação e Maturidade.

As atividades das CoPs são feitas através de:

- reuniões presenciais, para apresentação de ideias, experiências, conhecimentos, sempre acompanhadas de espaço para discussão livre ou direcionada (po-

dendo ter convidados externos para proferir palestras ou participar das discussões);

- compartilhamento de documentos, notícias, comentários, oportunidades e dúvidas por via digital;

- trabalhos em grupo para geração de novos conhecimentos específicos na área da CoP.

Resultados:

Em dois anos de testes da ferramenta, foram criadas quatro CoPs em Bio-Manguinhos: de Embalagem e Logística (CoP-PackLog), de Nanotecnologia (CoP-Nanotec), de Plataformas Vegetais (CoP-PVeg) e de Redes Colaborativas em Oncologia (CoP-Rede Onco). Através da realização de encontros presenciais, de debates construtivos para geração de novos conhecimentos e de compartilhamentos de artigos, notícias e experiências, os grupos abordaram temas variados, atuais, complexos e de grande utilidade para o trabalho dos participantes.

Conclusão:

As CoPs se tornaram ambientes ricos e de grande utilidade para cada participante, mas também para a instituição como um todo, à medida que estimula a troca, o desenvolvimento e a consolidação de conhecimentos difíceis de serem alcançados individualmente. A diversidade de personalidades, experiências e conhecimentos, junto com o comprometimento com a participação colaborativa foram fatores que fizeram a diferença para gerar valor ao grupo e possibilitar o sucesso da ferramenta de CoP em BioManguinhos.

Palavras-Chave: Comunidades de Práticas, Gestão do Conhecimento, Inovação

G4 - Avaliação tecnológica das tendências de apresentações e embalagens de vacinas para programas de imunização indicadas pela OMS

Gisele Corrêa Miranda¹; Luiz Fernando Carvalho^{1*}; IsabellaManjud Maluf¹; Celso Farias Crespo¹; Paulo Roberto Gomes dos Santos¹.

1- Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introdução:

As vacinas ofertadas mundialmente estão passando por acelerada inovação alterando a quantidade de produtos ofertados e utilizados nos Programas Nacionais de Imunização, modificando as características de apresentação e os valores destes produtos por dose. Estas mudanças levaram à necessidade de alteração nas características, controles e investimento em rede de frio dos Programas de Imunização para armazenar e distribuir esses imunobiológicos em segurança. A Organização Mundial de Saúde (OMS), ciente desses novos desafios relacionados à logística de vacinas, criou um grupo consultivo que desenvolveu um estudo sobre harmonização de embalagem e que serviu de base para recomendações de Harmonização das Embalagens indicadas no documento “generic Preferred Product Profile” (gPPP) para pré-qualificação de vacinas. Estas recomendações foram estudadas pela Comunidade de Prática de Embalagem e Logística (CoP-PackLog) de BioManguinhos, que se encontra em reuniões regulares para analisar desafios e soluções relacionadas à embalagem e logística no âmbito de Bio-Manguinhos.

Objetivo:

O objetivo do estudo foi fazer uma avaliação tecnológica multidisciplinar dos impactos positivos e negativos das recomendações de embalagem do gPPP e do trabalho de harmonização de embalagem da OMS.

Metodologia:

O grupo fez uma análise de revisão bibliográfica, utilizando como base as recomendações de harmonização das embalagens indicadas nas características gerais de apresentação dos produtos (“generic Preferred Product Profile” – gPPP) para pré-qualificação de vacinas na OMS. A partir desta revisão inicial, o grupo realizou entrevistas não estruturadas a fornecedores de materiais de

embalagem, equipamentos e usuários das vacinas, que serviram de base para as discussões e *brainstorming* conduzidas na Comunidade de Prática de Embalagem e Logística (CoP-PackLog), que gerou um documento único com todas as informações compiladas e analisadas.

Resultados:

Para cada um dos tópicos do gPPP foram identificadas tanto as restrições e desafios, como as vantagens e oportunidades do atendimento às recomendações, separando em dois cenários possíveis: adequação das instalações atuais do campus de Manguinhos (DEPFI) ou adoção apenas para o novo site de produção de Santa Cruz, conhecido como CIBS, atual Projeto NCPFI. O relatório gerado pelo grupo é um compilado de pareceres, comentários e opiniões dos participantes da PackLog sobre as recomendações de harmonização de embalagem da OMS, considerando-se a experiência e a multidisciplinaridade do grupo.

Conclusão:

O grupo chegou à conclusão de que as recomendações de harmonização das embalagens de vacinas propostas pela OMS são, em geral úteis tanto para os fabricantes de vacinas quanto para os compradores e usuários delas, apesar de gerar mais esforços das indústrias para viabilizar a adequação. Os principais desafios para adequação estão nas indústrias que ainda não utilizam os frascos DIN, como é o caso de Bio-Manguinhos.

Palavras-Chave: Embalagem, Apresentação de Vacinas, Programas de Imunização

G5 - Mapeamento de instituições acadêmicas, empresas e produtos em plataformas vegetais

Daniel A. Ribeiro^{1*}; Rosane C. Guimarães¹; Denise C. S. Matos¹; Júlio Cesar S. Rosa¹; Diana P.B. Freire¹; Gisele C. Miranda¹.

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introdução:

A maioria dos biofármacos e vacinas disponíveis atualmente é produzida em células de mamíferos, insetos, ou células microbianas. Contudo, a produção em plataformas vegetais (expressão em plantas ou em células) possui algumas vantagens em relação aos sistemas convencionais: não abrigam patógenos humanos e geralmente são processos mais baratos de operar e escalonar, devido à natureza robusta e exigências mais simples em relação às condições de cultura.

Bio-Manguinhos, de forma inovadora, pretende incorporar a tecnologia de produção em plataformas vegetais através de alianças estratégicas: um acordo de co-desenvolvimento de uma vacina de subunidade para Febre Amarela; e um acordo de transferência de tecnologia do biofármaco alfataliglucerase. Estas duas plataformas serão implantadas em um novo campus que será construído em Eusébio-CE. Este novo campus, escopo do Projeto Bio-Ceará, consiste na instalação de plantas de produção de proteínas recombinantes em folhas de tabaco e em células vegetais, além de um prédio de desenvolvimento tecnológico em plataformas vegetais.

Visando agregar conhecimento sobre o tema e aproximar instituições que possam colaborar com Bio-Manguinhos, foi criada, em 2014, a Comunidade de Prática de Plataformas Vegetais (CoP-PVEG). A CoP-PVEG consiste em discussões periódicas sobre as plataformas vegetais, palestras de profissionais da área, visitas técnicas. A possibilidade de formação de redes de colaboração a partir de iniciativas da CoP-PVEG incentivou a produção deste trabalho.

Objetivo:

O objetivo do trabalho consiste em identificar e mapear as instituições acadêmicas e empresas que trabalham em plataformas vegetais e quais produtos estão em fase de desenvolvimento.

Metodologia:

Para a identificação dos principais centros acadêmicos foi realizada uma pesquisa bibliográfica em artigos científicos em base de dados como, “ISI Web of Knowledge”; Scopus, Scirus, “Web of Science” “Carrot 2”, através do uso das seguintes palavras chaves: “Molecular Pharming” “Plant Made Pharmaceuticals”, “Plant Made Drugs”, “Plant Made Biologicals”. Também foi consultado o *website* do Congresso Plant-Based Vaccines and Antibodies dos anos de 2013/2015. Para a identificação das empresas distribuídas pelo mundo e produtos em fase de desenvolvimento, além da busca por artigos científicos foram realizadas pesquisas nos sites das empresas e no site <https://clinicaltrials.gov> e também análise de comunicações pessoais das empresas.

Resultados:

Após o levantamento de dados, a equipe criou tabelas onde foram mapeados os alvos, a tecnologia empregada, a fase de desenvolvimento, os principais autores e instituições e os países de origem. As informações foram organizadas e discutidas em termos de relevância em reuniões periódicas. Foram elencados os principais centros de pesquisa, universidades e empresas a nível nacional e internacional que podem possuir ou já possuem relação de colaboração com Bio-Manguinhos, sendo os dados apresentados em forma de mapas de rede e tabelas.

Conclusão:

Esse mapeamento será importante para a identificação de alianças estratégicas em potencial para introdução de novos produtos nestas plataformas.

Palavras-Chave: Plataformas Vegetais, Mapeamento de Redes

G6 - Banco de Ideias e Sugestões: desafio da gestão da inovação no setor público - caso Bio-Manguinhos

Tatiana Sanjuan Ganem Prado^{1*}

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introdução:

Para responder aos desafios atuais de transformação organizacional de Bio-Manguinhos, dado o crescimento institucional, expansão geográfica, e mudança de modelo jurídico, é imprescindível modernizar a Administração Pública. Na gestão pública, objeto deste trabalho, sua modernização passará pela criação e a circulação de ideias, insumo básico para compreensão dos problemas, que promovam a inovação, motivação e comprometimento de seus colaboradores. O Banco de Ideias e Sugestões (BIS) é um dos diversos instrumentos utilizados para a construção de um ambiente inovador nas organizações. Trata-se de canal formal para que as pessoas possam apresentar ideias, criar e compartilhar conhecimento, favorecendo a adesão e apropriação dos processos institucionais por parte dos colaboradores, verdadeiros agentes de mudança e promovedores de inovação.

Objetivo:

Estimular a geração de ideias vinculadas aos objetivos estratégicos e fortalecer o trabalho em redes de colaboração, essenciais ao sucesso das inovações. Promover o comprometimento, motivação para inovação contínua, contribuindo para geração de ideias com foco em novos produtos, processos ou serviços. Desenvolver e implementar processos inovadores (gerenciais, técnicos ou tecnológicos), a fim de direcionar esforços para a resolução de problemas ou desafios institucionais.

Metodologia:

O BIS-Bio no seu primeiro ano de existência (2014) pós fase piloto (2013), utilizou as etapas iniciais da Curva de Maturidade da Inovação (CMI), iniciada pela sensibilização sobre o tema, entendimento das ferramentas e estruturação do processo.

Resultados:

Em 1 ano de vida do BIS-Bio, pudemos observar o crescimento da participação dos colaboradores, atingindo 127 ideias no período de 2014. Foi fundamental a

estratégia de utilização de informes para todos os níveis de colaboradores, com orientação e divulgação do BIS. Esta estratégia foi responsável pelo crescimento substancial de ideias lançadas e reconhecimento pelos colaboradores como meio para proposição de sugestões à unidade.

Conclusão:

O BIS apresentou importantes avanços em relação à fase piloto, elevando significativamente o número de ideias e de colaboradores participantes. Contudo, embora a implementação das ideias seja fundamental para consolidação do BIS, ainda existem dificuldades com relação ao reconhecimento do banco pelos gestores na avaliação das ideias. Neste segundo ano (2015) busca-se superar os desafios identificados para, desta forma, construir o novo percurso da maturidade, no qual a qualidade inovativa das ideias será trabalhada.

Palavras-Chave: Banco de Ideias e Sugestões, Gestão Pública, Inovação

G7 - Os Encontros Tecnológicos como uma ferramenta de Gestão do Conhecimento para promoção da Inovação interna

Ana Paula da Silva Carvalho^{1*}; Sergio Gerletti¹; Tatiana Sanjuan¹.

1 - Bio-Manguinhos / Fiocruz

Introdução:

Os Encontros Tecnológicos constituem um fórum institucional de compartilhamento e disseminação de conhecimentos, por meio de palestras, relacionados à indústria farmacêutica e à biotecnologia. Entende-se que fomentando oportunidades de aprendizagem, contribuímos para a ampliação do conhecimento, o qual se desdobra na capacidade de geração de resultados em termos de inovações, qualidade de serviços ou produtos e produtividade no trabalho. O formato do fórum inclui três grupos com a abordagem de temas estratégicos e operacionais: adjuvantes, nanotecnologia e a conexão tecnológica, sendo que esse último inclui diversos assuntos relacionadas às atividades finalísticas de Bio-Manguinhos.

Objetivo:

Estimular a disseminação e absorção do conhecimento científico e tecnológico de acordo com o formato estabelecido para os Encontros Tecnológicos de forma a auxiliar o desempenho da organização e gerar um ambiente de inovação. Com a velocidade de informações atualizadas sobre as indústrias biofarmacêuticas e suas tendências tecnológicas, se torna cada vez mais importante formar massa crítica sobre as novidades da área.

Metodologia:

Para consolidar a prática dos Encontros Tecnológicos foram estabelecidos encontros presenciais aberto ao público de colaboradores de Bio e da Fiocruz com a periodicidade de 1 (uma) ou 2 (duas) vezes ao mês. A Gestão do Conhecimento identifica os temas estratégicos e atuais para serem apresentados com o auxílio de um corpo técnico e utiliza as redes de comunicação institucional para divulgar as palestras ministradas por especialistas da área.

Resultados:

Desde a sua institucionalização, em 2013, foram feitos relatórios consolidando as informações referentes às áreas de trabalho dos presentes e qual a linha de

assunto que foi mais procurada. Durante esse tempo houve 20 Encontros com o total de 554 participantes. O grupo de assunto Nanotecnologia teve duas palestras, onde tivemos uma grande representatividade com 158 (cento e cinquenta e oito) presentes. O número de presentes foi elevado em comparação com o grupo Adjuvantes que teve 50 (quarenta e nove) participantes e os colaboradores da Vice-Diretoria de Desenvolvimento Tecnológico foi o público que mais participou dos Encontros com mais de 64 (Sessenta e quatro) pessoas.

Conclusão:

A partir desse cenário, foi possível ter uma visão de envolvimento dos colaboradores de Bio nos Encontros Tecnológicos, nos mostrando que o propósito está sendo atingido o que nos faz pensar em algumas ações para os próximos eventos. Uma delas, seria envolver os colaboradores que têm mostrado mais interesse, na organização dos próximos Encontros, sugerindo temas e/ou palestrantes e motivando os colegas a participar, formando assim uma rede interna de colaboração dessa prática.

Palavras-Chave: Gestão do Conhecimento, Inovação Interna

G8 - Comparação entre os critérios adotados para seleção de projetos de inovação para fomento público e incorporação de tecnologias no SUS

Luiza Pinheiro Alves da Silva^{1*}

1 - UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais / Biominas Brasil

Introdução:

Em um sistema de inovação diversas instituições interagem para que novas tecnologias sejam desenvolvidas e introduzidas com sucesso no mercado. No sistema de inovação em saúde o Estado tem papel fundamental, não só de fomento econômico, através de financiamento às atividades inovativas, mas também de regulador e consumidor. Neste sistema setorial de inovação, o governo tem a obrigação de garantir a eficácia e a segurança das tecnologias para saúde utilizadas pela sociedade, mas também de garantir o acesso a estas tecnologias, através do Sistema Único de Saúde. Idealmente os projetos de inovação aprovados para receber financiamento público deveriam ser passíveis de incorporação pelo SUS. No Brasil, a FINEP – Inovação e Pesquisa atua como agência de fomento à inovação, ao disponibilizar recursos para projetos desta natureza, enquanto a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no SUS – Conitec, tem o papel de avaliar as tecnologias que serão incorporadas ao sistema público de saúde.

Objetivo:

O objetivo deste trabalho é analisar se os critérios utilizados pela FINEP para a seleção de projetos de desenvolvimento de novas tecnologias na área de saúde a serem financiados estão alinhados com os adotados pela Conitec para recomendação de incorporação das tecnologias.

Metodologia:

A metodologia adotada foi a análise qualitativa dos relatórios e decisões da Conitec e os critérios de seleção de projetos nos editais Subvenção Econômica Finep de 2006 a 2010.

Resultados:

Pode-se perceber que há pontos de convergência entre os critérios adotados pela Conitec e pela FINEP. Ambos consideram os impactos no mercado da

nova tecnologia e exigem a comparação de seus benefícios com outras semelhantes já disponíveis.

Conclusão:

A análise exigida pela Finep do impacto do produto/serviço no mercado e/ou importância estratégica para a sociedade deve ser realizada sob o ponto de vista do SUS, e não apenas do mercado privado. Além disto, uma análise farmacoeconômica é indispensável, pois não basta que a tecnologia seja inovadora com relação a seus concorrentes, mas ela deve apresentar avanços terapêuticos significativos e não apenas marginais, além de uma maior eficiência em termos de custos e garantia de qualidade de vida do paciente.

Palavras-Chave: Inovação, Financiamento, Incorporação de Tecnologias, Saúde

G9 - Implementation of a Cells Database System – An efficient validated tool for management of biological materials

Milena Mouta Verdan França Carvalho^{1*}; Rodolpho Silva de Paula²; Fernanda Mota Borges²; André Queiroz da Silveira²; Renato Ferreira Dib³; Márcia Arisawa¹.

1 - Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais / ViceDiretoria de Desenvolvimento - Bio-Manguinhos / FIOCRUZ;

2 - Seção de Desenvolvimento de Sistemas / Divisão de Tecnologia da Informação - Bio-Manguinhos / FIOCRUZ;

3 - Laboratório de Metrologia e Validação/BioManguinhos/FIOCRUZ.

Introduction:

Detailed information related to a biological materials bank constitutes the main source of information about the laboratory activities and development over the time. Throughout its existence, the Monoclonal Antibodies Laboratory developed more than five hundred clones, totaling more than five thousand cells currently stored. Based on this fact and in the search for innovation and continuous improvement of internal processes, it has become imperative to develop a tool that could provide access to information quickly, ensuring the storage and traceability of the samples in a consistent and secure manner. In this work, the system development and implementation was based on cell storage, but can also be applied to other biological materials. In addition, this tool was validated according to the current regulatory requirements in order to avoid nonconformities in audit processes.

Objective:

System validation and implementation for the management of biological materials, according to the requirements of Good Manufacturing Practices.

Methodology:

This system was developed using requirements engineering with prototyping in a network environment, allowing multi-user access on web server. The validations steps were done in accordance with ANVISA RDC 17, consisting on risk analysis, installation qualification, operational qualification and performance qualification. Features and specifications were previously established.

Results:

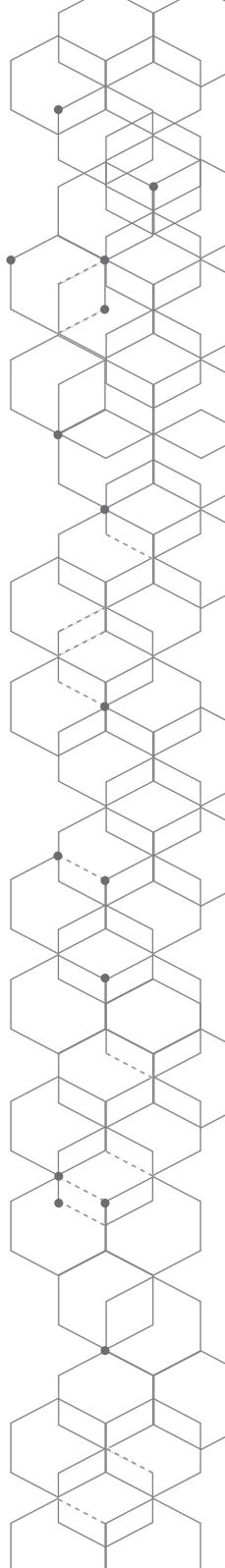
All cell data contained in our archives was manually inserted in system, with a total of 1.217 frozen lots and 5.562 cryogenic vials stored. The system supported all the details of the processes that gave rise to every cell and the characterization of the antibodies expressed by each strain. Moreover, the organization of the deposits in matrix form, makes it easier to find the biological materials location. In addition, the system provides a range of reports, with moves and consumption data, quantitative volumes obtained, supporting the recovery of information.

Conclusion:

Based on the validation process, the system leads to the expected results, providing traceability and reliability in information storage, being prepared to suit the storage of other biological materials, in addition to cells. It represents a valuable time consumption reduction and reliability of storage information that will certainly assist laboratories that need to meet regulatory requirements.

Keywords: Cell Bank, Management System, Validation, Traceability, Security

OUTRO SISTEMAS RELACIONADOS



OTRI - Estabelecimento das condições de armazenamento de amostras biológicas provenientes de estudos clínicos desenvolvidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos / Fiocruz

Mayra Martho Moura de Oliveira^{1*}; Ricardo Cristiano de Souza Brum¹; Leonardo Secundino¹; Clara Lucy de Vasconcellos Ferrocó¹; Miriam Marano de Souza Cotrin¹; Beatriz Rangel da Costa¹; Ana Paula Souza da Silva¹; Denise Cristina de Souza Matos¹.

1 - Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Introdução:

O Conselho Nacional de Saúde, a partir da Resolução nº 441, de 12 de maio de 2011, e o Ministério da Saúde, a partir da Portaria nº 2.201, de 14 de setembro de 2011, determinaram que o armazenamento das amostras biológicas é de responsabilidade do Patrocinador/Pesquisador Responsável e só poderiam ocorrer quando este responsável tivesse regularizado sua área de armazenamento de amostras biológicas, sendo ela biorrepositório ou biobanco, para preservar os direitos do participante de pesquisa bem como as informações associadas às amostras biológicas. Em 2013, a CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) publicou uma carta aos CEPs (Comitê de Ética em Pesquisa) orientando-os que não avaliassem nenhum protocolo clínico de Instituições que ainda não tivessem o armazenamento de amostras biológicas regularizadas de acordo com a Resolução e Portaria citadas anteriormente. Portanto, fez-se necessário estabelecer as condições de armazenamento das amostras biológicas garantindo a qualidade das mesmas e atendendo os preceitos éticos e legais.

Objetivo:

Este trabalho teve como objetivo estabelecer as condições de armazenamento das amostras biológicas provenientes de estudos clínicos realizados por Bio-Manguinhos, considerando-se diretrizes e normas de funcionamento bem como padrões éticos e legais aplicáveis ao armazenamento e segurança das amostras.

Metodologia:

Para execução deste projeto, primeiramente, foi realizado um levantamento de normas, legislações e diretrizes de diversos países. Posteriormente, foi avaliada

a experiência de Instituições nacionais que possuem uma área de armazenamento de amostras biológicas de acordo com as exigências brasileiras a partir de uma entrevista semiestruturada. Ao lado disto, utilizou-se a ferramenta “E se?” (“What if?”) para a análise de risco à qualidade norteando a avaliação das atividades realizadas na área.

Resultados:

Verificaram-se 17 normas e guias; entrevistou-se 2 Instituições nacionais de renome em pesquisa clínica e baseado nesse levantamento estruturou-se fisicamente a área de armazenamento de amostras biológicas nomeada como Plataforma de Biorrepositórios. Toda a parte de infraestrutura foi planejada conforme as Boas Práticas de Repositórios. Seis POPs foram elaborados especificamente para atender às atividades da área e outros já existentes na Unidade foram utilizados para compor todos os procedimentos realizados na área. Um modelo de regulamento foi desenvolvido para regularizar este armazenamento, atendendo a legislação e possibilitando a análise do projeto pelos CEPs. Com essa estruturação e regularização é possível armazenar amostras biológicas e retestes ou reanálises necessárias para avaliação dos resultados dos estudos passam a ser possíveis.

Conclusão:

Baseando-se nas regulações éticas, nas experiências de outras Instituições e na Boas Práticas de Repositórios, estruturou-se uma área para armazenamento de amostras biológicas de forma a atender as Resoluções, possibilitando que os protocolos clínicos dos estudos realizados por Bio-Manguinhos atendessem a resolução normativa em vigência e pudessem ser avaliados pelos CEPs e conduzidos como planejados.

Palavras-Chave: Biorrepositório, Amostra Biológica, Pesquisa Clínica

OTR2 - Novo sistema automatizado de gerenciamento de resíduos de serviços de saúde do INCQS/Fiocruz: SIGReSSaWeb

Fernanda Peres Sabagh¹; Anna Christina Guimarães^{1*}; Leonardo de Souza Lopes¹; Alexandre Ferreira Junqueira²; Adalberto Lamin Silva².

1 - CIBio - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz;

2 - Seção de Sistemas - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde/Fiocruz.

Introdução:

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) é uma unidade da Fiocruz que atua em áreas de ensino, de pesquisa e de tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. A Comissão Interna de Biossegurança do INCQS (CIBio/INCQS) tem como uma de suas atribuições capacitar recursos humanos para o correto descarte dos resíduos, bem como controlar o Gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde (GRSS) do Instituto.

Objetivo:

Este trabalho tem o intuito de avaliar o novo Sistema Informatizado de Gerenciamento de Resíduos de Saúde (SIGReSSaWeb), em relação ao atendimento da resolução RDC nº 306/204 que dispõe sobre o regulamento técnicos para o GRSS. Além disso, realizar a avaliação dos dados sobre a quantidade e o tipo de resíduos produzidos no INCQS para elaboração de indicador estratégico.

Metodologia:

Em outubro de 2013, teve início o desenvolvimento do SIGReSSaWeb, sendo necessária a elaboração de procedimentos técnicos e condutas que garantissem a segurança digital das informações criptografadas. A etapa de desenvolvimento foi dividida em quatro fases: levantamento de requisitos; desenvolvimentos e programação; implantação e treinamento. Considerando que no INCQS, as ações devem estar articuladas com o seu Sistema de Gestão da Qualidade, todas as fases foram documentadas. Para as informações quantitativas foram analisados os relatórios do ano de 2014 gerados pelo sistema.

Resultados:

O SIGReSSaWeb permitiu o controle de acesso por perfil de usuário, o registro de todas as atividades e emissão de relatórios em tempo real. O novo sistema foi projetado com critérios de usabilidade e customizado para diferentes perfis e etapas do GRSS. O Instituto gerou um total 3048 Kg de resíduos no ano de 2014, sendo 1402 Kg (46%) de resíduos químicos.

Conclusão:

O SIGReSSa atende a RDC nº 306/2004 contemplando aspectos referentes à geração, segregação, acondicionamento, coleta, armazenamento, transporte, tratamento e disposição final. Pode-se observar que o SIGReSSaWeb possibilita melhor identificação dos resíduos e os laboratórios de origem, contribuindo muito para diminuição do tempo e o custo do gerenciamento. O SIGReSSa pode ser utilizado por qualquer instituição que gere resíduos inclusive outras Unidades da Fiocruz.

Palavras-Chave: Gerenciamento de Resíduos, Processamento Automatizado de Dados

OTR3 - Validação de ensaio imunoenzimático (Western blot) para o diagnóstico da histoplasmose

Marcos de Abreu Almeida^{1*}; Cláudia Vera Pizzini¹; Regina Helena Saramago Peralta²; José Mauro Peralta³; Raquel de Vasconcelos Carvalhaes Oliveira³; Carla Lourenço Tavares de Andrade⁴; Rosely Maria Zancopé Oliveira¹.

1 - INI/Fiocruz;

2 - Universidade Federal Fluminense;

3 - Universidade Federal do Rio de Janeiro;

4 - ENSP/Fiocruz.

Introdução:

A histoplasmose é uma micose cosmopolita causada pelo fungo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, cujo *habitat* é o solo rico em excretas de aves e morcegos. Esta infecção ocorre a partir da inalação de propágulos de *H. capsulatum* e apresenta um amplo espectro clínico, variando de formas leves a disseminadas, a depender do inóculo infectante, do *status* imunológico do hospedeiro e da virulência da cepa. O diagnóstico da histoplasmose é baseado em aspectos clínicos, epidemiológicos, radiológicos e laboratoriais, embora alguns sintomas possam ser confundidos com outras doenças, tais como a tuberculose e outras micoses. O teste de referência para a confirmação do diagnóstico é o isolamento e identificação de *H. capsulatum* em cultivo. Entretanto, na ausência dos mesmos, a sorologia tem sido utilizada para o diagnóstico presuntivo da histoplasmose através da detecção de anticorpos. O principal complexo antigênico utilizado para a detecção de anticorpos anti-*H. capsulatum* é a histoplasmina, constituída principalmente pelos antígenos C, H e M. Estes últimos, em sua forma nativa, são glicoproteínas contendo epítomos protéicos específicos e glicosídicos inespecíficos. Deglicosilações químicas pelo metaperiodato de sódio (NaIO₄) provaram aumentar a sensibilidade e especificidade em métodos imunoenzimáticos, tais como *Western blot* e ELISA, reduzindo a reatividade cruzada com outros fungos.

Objetivo:

O principal objetivo do presente estudo foi validar o método imunoenzimático (*Western blot*) para a detecção de anticorpos no diagnóstico da histoplasmose.

Metodologia:

Desta forma, foi realizado um estudo caso-controle, utilizando 118 amostras de soro de pacientes com histoplasmose e 118 amostras de soro de indivíduos com história clínico-epidemiológica compatível com micose sistêmica, saudáveis ou acometidos por outra micose ou tuberculose, residentes no estado do Rio de Janeiro. As amostras foram coletadas no período de 2000 a 2013 e encaminhadas ao Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas. Os parâmetros de validação diagnóstica foram calculados considerando a categorização dos resultados obtidos em uma tabela 2 X 2 e analisados pelo SPSS 17.0.

Resultados:

O *Western blot* demonstrou uma sensibilidade de 94,9%, especificidade de 94,1%, acurácia de 94,5% e uma precisão quase perfeita. As fitas demonstraram-se viáveis para utilização por até cinco anos após a sensibilização com o antígeno HMIN-PT. Estes resultados comprovam a validade do ensaio imunoenzimático (*Western blot*) para detecção de anticorpos anti-*H. capsulatum* utilizando HMIN-PT como uma ferramenta de boa acurácia no diagnóstico da histoplasmose e reprodutível.

Conclusão:

O ensaio imunoenzimático *Western blot* contribuirá para o melhoramento do diagnóstico desta micose, uma vez que esta técnica permitirá a obtenção de resultados em menos de 24 horas, o que constitui um grande avanço em relação às técnicas existentes na atualidade e poderá vir a ser disponibilizada em outros centros do Sistema Único de Saúde.

Palavras-Chave: Histoplasmose, Imunodiagnóstico, *Western blot*

OTR4 - Comunidade de Práticas de Redes Colaborativas em Oncologia (CoP-Rede Onco) como estratégia para fomentar inovação em Bio-Manguinhos

Patrícia Cristina da Costa Neves^{1*}; Ana Paula Dinis Ano Bom²; Daniela de Oliveira Ribeiro³; Gisele Corrêa Miranda⁴; Aline deAlmeida Oliveira⁵.

1 - Laboratório de Tecnologia Imunológica/ VDTEC / Bio-Manguinhos;

2 - Laboratório de Macromoléculas/ VDTEC / Bio-Manguinhos;

3 - Divisão de Novos Negócios/ DEREM/ VGEST / Bio-Manguinhos;

4 - Assessoria do Conselho Político e Estratégico/ DIBIO / Bio-Manguinhos;

5 - Programa de Biofármacos/ VDTEC / Bio-Manguinhos.

Introdução:

O plano estratégico de Bio-Manguinhos prevê que o Instituto deve “ser a base tecnológica do Estado Brasileiro para as políticas do setor, e protagonizar a oferta de produtos e serviços de interesse epidemiológico, biomédico e sanitário”. Também consta que para cumprir as metas institucionais e consolidar-se como empresa inovadora, deverá estabelecer parcerias, para acelerar o desenvolvimento de novos produtos. Neste contexto, o câncer tem se destacado, devido à alta morbidade e mortalidade, necessitando da aplicação de produtos biotecnológicos inovadores e gerando custo elevado para o SUS.

Objetivo:

Iniciar a discussão em torno da temática de rede de colaboração com foco em oncologia, gerando conhecimentos sólidos nesta área e estimulando a inovação radical em Bio-Manguinhos.

Metodologia:

O grupo propôs a criação de uma Comunidade de Prática (CoP) para a discussão de temas na área de oncologia, para a busca e troca de informações, para o compartilhamento de experiências, e o estímulo à estruturação de parcerias que resultassem em redes de colaboração sob a coordenação direta de Bio-Manguinhos. Essa ferramenta se utiliza de: reuniões presenciais mensais para discutir os temas; compartilhamentos de notícias, documentos, revisões e avisos por meio eletrônico; estímulo à elaboração de

documentos colaborativos; e estímulo à representatividade dos membros do grupo em fóruns externos.

Resultados:

O grupo é composto de 54 participantes das diferentes áreas de Bio-Manguinhos, consolidando-se como um grupo multidisciplinar, com diferentes experiências e conhecimentos no campo da Oncologia. Os principais temas discutidos pelo grupo foram: Parcerias para Desenvolvimento Produtivo (PDP); uso de plataformas vegetais na produção de oncológicos; e novos alvos terapêuticos para o câncer. Os principais resultados do grupo foram:

- A geração de um documento com propostas de como aproveitar as PDPs para capacitação e estímulo à inovação, apresentado à diretoria;
- Interação entre os membros do grupo e pesquisadores externos resultando no estabelecimento de parcerias com diversas instituições, visando o desenvolvimento de novos produtos, a orientação de alunos e para estudos clínicos;
- A criação de uma disciplina de Oncobiologia para o Mestrado Profissional de Tecnologia em Imunobiológicos;
- A proposta de elaboração de um Fórum para consolidação de parcerias em Oncologia; e
- A proposta de criação de um mecanismo ágil de apoio à projetos inovadores.

Conclusão:

A CoP Rede Onco vem se consolidando por meio de resultados concretos obtidos em menos de um ano de funcionamento. O conhecimento registrado e absorvido pelos membros do grupo facilita a definição de tendências em P & D na área de oncológicos, auxilia na resolução de problemas técnicos de projetos internos ou com parceiros tecnológicos, incentiva a troca de ideias objetivando sempre a inovação, e, por fim, viabiliza o desenvolvimento de profissionais capazes de enfrentar os novos desafios de Bio-Manguinhos.

Palavras-Chave: Comunidades de Prática, Parcerias, Oncologia, Inovação

OTR5 - Otimização da técnica de RT-PCR em tempo real para detecção do vírus da hepatite E em amostras positivas para HIV

Andreza Salvio Lemos^{1*}; Adilson José de Almeida²; Amanda de Oliveira Lopes¹; Renata Tourinho Santos¹; Noemi Rovaris Gardinali¹; Marcelo Alves Pinto¹; Vanessa Salete de Paula¹.

1 - Laboratório de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil;

2 - Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Setor de Hematologia / Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro/Unirio, Rio de Janeiro, Brasil.

Introdução:

O vírus da hepatite E (HEV) é um vírus emergente, com transmissão via feecal-oral ou por ingestão de alimentos derivados de animais infectados, sendo assim difícil a determinação da fonte ou rota da infecção, principalmente devido às dificuldades no diagnóstico de hepatite E. Dentre os genótipos de HEV, o genótipo 3 – único encontrado no Brasil até o momento – tem sido associado a infecções crônicas em pacientes imunocomprometidos, como portadores de HIV. Devido aos baixos títulos de RNA do HEV que podem ser encontrados no soro, podendo se tornar indetectáveis, é difícil o diagnóstico da doença e a confirmação de resultados falso-negativos. Desta forma, apenas o uso de testes sorológicos não é suficiente para a detecção de HEV, sendo necessária a aplicação de testes moleculares mais específicos como o RT-PCR em tempo real, com maior sensibilidade e especificidade. Assim, a otimização da detecção do HEV pelo RT-PCR em tempo real pode levar a um importante método de diagnóstico em pacientes coinfectados com HIV.

Objetivo:

Para tanto, o objetivo do estudo foi otimizar e avaliar a técnica de PCR em tempo real para detecção e quantificação do RNA de HEV e a sua utilização como diagnóstico molecular de HEV em portadores de HIV.

Metodologia:

Para tanto, foram realizados ensaios de RTPCR em tempo real com a substituição da curva plasmidial por uma curva sintética, utilização de controle interno (IPC), testes de limite de detecção e de detecção de coinfeção. Após

a otimização do PCR em tempo real, 231 amostras de pacientes HIV positivos foram testadas para HEV.

Resultados:

A curva sintética apresentou parâmetros adequados para ser utilizada, com valores de $slope = 3,20$, $R^2 = 0,98$ e $E = 99,8\%$, e o teste apresentou sensibilidade e especificidade $< 99\%$. Além disso, o controle interno foi detectado em todas as amostras e o limite de detecção foi estabelecido para 50 cópias/mL. Entre as 231 amostras testadas 9 (3,8%) foram reagentes para HEV.

Conclusão:

A utilização da curva sintética em substituição à plasmidial e a utilização de IPC permitem a detecção de coinfeção pelo HEV em amostras HIV positivas excluindo resultados falso-negativos pelo método sensível de RT-PCR em tempo real. As amostras serão sequenciadas para confirmar a co-infecção HEV/HIV.

Palavras-Chave: PCR em Tempo Real, HEV, HIV

OTR6 - A análise estatística como ferramenta para melhorar o processo de fabricação de medicamentos

Margareth Borges Coutinho Gallo^{1*}

1 - Farmanguinhos

Introdução:

Em junho de 2012, a ANVISA publicou um guia sobre Revisão Periódica de Produto (RPP), que é uma ferramenta de qualidade adotada pela FDA desde 1979, recomendando, entre outros itens, a realização da avaliação estatística (AE) dos resultados como um meio de se obter informações que indiquem as tendências do processo, anormalidades no conjunto de dados e para se confirmar que o processo permanece conforme validado. Quando Farmanguinhos iniciou a confecção dos relatórios anuais de RPP, foi observado que repetitivas justificativas eram dadas para se explicar rendimentos obtidos fora das faixas especificadas. Estas, acreditava-se, foram determinadas de acordo com dados teóricos de processo e, por este motivo, não refletiam a realidade da planta.

Objetivo:

Avaliar estatisticamente o processo de fabricação de todos os medicamentos produzidos por Farmanguinhos para se determinar as faixas de variação de rendimento mais apropriadas para cada etapa da produção e a influência das perdas e peso médio no rendimento, visto serem as causas mais frequentes para se explicar rendimentos fora do especificado.

Metodologia:

Os resultados de rendimento de cada etapa do processo foram coletados nos dossiês dos lotes produzidos para cada medicamento durante um período de 5 anos. Posteriormente, os resultados referentes a cada ano foram submetidos à análise de normalidade, estabilidade e capacidade do processo por meio do programa Minitab 16. Foram considerados normais os dados cujos gráficos de papel probabilístico geraram um valor de p maior que 0,05. O processo foi considerado estável quando o conjunto de dados se manteve dentro dos limites controle calculados, visto que as faixas especificadas na monografia estavam sendo questionadas. O processo foi considerado capaz quando os índices de capacidade e de desempenho obtidos foram iguais ou maiores que 1. As perdas

ocorridas em cada etapa do processo foram registradas, assim como o peso médio do produto. Foram realizados gráficos de correlação entre os fatores analisados e o rendimento da etapa avaliada.

Resultados:

Após a AE dos dados, foi constatado que as médias anuais obtidas para cada rendimento se encontravam dentro das faixas especificadas. No entanto, as médias de cada lote nem sempre. O limite de perdas ocorridas no processo que não influenciavam no rendimento foi determinado e incorporado às médias anuais de rendimento, assim como a porcentagem de variação do peso médio fixada pela Farmacopeia Brasileira. Além disto, os histogramas do estudo de capacidade revelaram que as diferenças técnicas entre os operadores e analistas e a calibração/qualificação dos equipamentos envolvidos também estavam influenciando nos resultados.

Conclusão:

Por meio da AE, foram estabelecidos valores para os fatores que mais impactavam no processo, os quais foram incorporados às novas faixas de rendimento que estão sendo implementadas em Farmanguinhos.

Palavras-Chave: Índice de Capacidade, Índice de Desempenho, Revisão Periódica de Produto

OTR7 - Avaliação de eventos adversos recebidos pela farmacovigilância a partir do SAC de Bio-Manguinhos / Fiocruz

Paulo Roberto Gomes dos Santos¹; Patrícia Mouta Nunes de Oliveira^{1*}; Maria de Lourdes de Sousa Maia¹; Linda Khalili Boukai¹; Adriana dos Santos Duarte¹; Monique Amorim Pimenta¹; Alessandra Bógio¹; Beatriz Kaippert¹; Isis Alves Vieira¹.

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introdução:

Informações sobre eventos adversos são frequentemente incompletas ou indisponíveis por conta de limitações das fases pré-comercialização da Pesquisa Clínica. A Farmacovigilância preocupa-se, portanto, em complementar estes dados, a partir da identificação de reações adversas e interações desconhecidas, e em disseminar informações necessárias para o aprimoramento da regulação. Destaca-se entre as estratégias de farmacovigilância a detecção de eventos adversos por notificação espontânea de casos ao Serviço de Atendimento ao Cliente (SAC). Esta atividade encontra-se estruturada na Divisão de Atendimento ao Cliente e Pós *Marketing* (DIACM) e relaciona-se à Farmacovigilância / Assessoria Clínica a partir de Procedimentos Operacionais Padronizados.

Objetivo:

- Traçar os perfis dos chamados recebidos e dos clientes do SAC;
- Analisar os encaminhamentos dos eventos adversos;
- Comparar os percentuais de eventos adversos recebidos entre as diferentes estratégias de detecção.

Metodologia:

Realizou-se uma pesquisa descritiva a partir de dados extraídos do software *Oracle Siebel Customer Relationship Management*, ferramenta de gerenciamento de relação com o cliente compartilhada pelas unidades organizacionais (UO) supracitadas, e compilados em planilha Microsoft Excel previamente definida. Utilizando-se os filtros 'tipo', 'subtipo' e 'UO responsável', inicialmente verificou-se os perfis de chamados e usuários. Posteriormente os encaminhamentos dados aos eventos adversos. E, por fim, promoveu-se uma comparação com outras estratégias de detecção de eventos adversos: troca de informações sobre eficácia e

segurança com agências de saúde e parceiros comerciais. Limitou-se o período de busca em cinco anos (2010 a 2014) para as linhas de biofármacos e vacinas.

Resultados:

Do total de 5.355 chamados à DIACM, 301 estavam relacionados à ASCLIN. Destes, 26% se referenciavam a biofármacos, enquanto 74% a vacinas; 39% compreendiam notificações (eventos adversos e queixas técnicas) e 61% solicitações de informação. Quanto ao perfil de usuários, 54% dos chamados se originaram de cidadãos (usuários e não usuários), 38% profissionais de saúde e 8% outros. Os prazos de atendimento e notificação à agência regulatória, e encaminhamentos, os chamados de eventos adversos, foram corretamente cumpridos e direcionados. Os eventos adversos recebidos pelo SAC representaram cerca de 2% do total de 7.650 detectados junto a agências de saúde e parceiros comerciais. Entretanto, são os únicos que colocam a instituição em contato direto com o cliente e, devem ser devidamente apreciados. Apesar de pequena a percentagem, os dados refletem uma tendência internacional e corroboram em mostrar um índice elevado de subnotificação.

Conclusão:

O acompanhamento de eventos adversos é uma atividade de pós-*marketing* extremamente importante, que reflete o compromisso de Bio-Manguinhos/Fiocruz em oferecer à população produtos eficazes e seguros. Os eventos adversos foram avaliados e direcionados em tempo oportuno pela ASCLIN e DIACM, elevando-se a confiança e evitando-se rumores sobre os produtos e os programas de saúde.

Palavras-Chave: Eventos Adversos, Farmacovigilância, Serviço de Atendimento ao Cliente

OTR8 - Multiple antigen immunization: a throughput platform for monoclonal antibody generation.

Raquel de Souza Martins^{1*}; Fernando de Paiva Conte¹; Márcia Arissawa¹.

1 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introduction:

For several decades, mouse monoclonal antibodies (mAb) were isolated using the hybridoma technology. This technique has produced numerous antibodies with high-specificity and affinity of antigen recognition over the years but it has the disadvantages of requiring high antigen quantities and being time-consuming. Multiple antigen immunization is a throughput technique described for its increased speed of mAb generation in order to attend the increased demand for antibodies in research.

Objective:

To develop a throughput method for mAb generation, focusing on reduced development time and reduced amount of antigen.

Methodology:

Four purified proteins - VP1 Hepatite A (VP1;Abcam), Hepatite B surface antigen (HBsAg; USBiologicals), dengue NS1 (NS1;ProSpec) and dengue ST2 (ST2;ProSpec) - were mixed together (10 µg each) and emulsified in Freund's complete adjuvant before intraperitoneal (i.p.) injection into female 6 week Balb/C mice. After 7 and 14 days of first immunization, mice were boosted (i.p.) with a mixture of antigens (5 µg of each) emulsified in Freund's incomplete adjuvant. Three days after booster injections, mice sera were assayed by specific ELISA for each protein individually. Twenty one days after immunization, spleen cells were homogenized and fused with SP2/0 myeloma cells (2:1), using PEG 3000-3700 (Sigma). Hybridomas were selected in HAT (hypoxanthineaminopterin-thymidine)-containing medium for 15 days and the supernatants from growing hybrids were screened by ELISA, using mixed antigens. ELISA positive wells with optic density (O.D.), at 450 nm, twice as the blank wells were considered reactive. Selected polyclonal hybridomas were grown and subcloned by limiting dilution. Each monoclonal hybridoma was assayed by specific ELISA against individual antigen. The po-

sitive monoclonal hybridomas against each protein were identified and were cryopreserved using DMSO 7.5%/SFB 42.5%/DMEM50%.

Results:

Mice pre-immune/immunized serum O.D. values after the first booster injection were VP1: 0.029/0.029; HBsAg: 0.018/0.048; NS1: 0.025/0.047; ST2: 0.024/0.120. O.D. values for the second boosting were VP1: 0.010/0.045; HBsAg: 0.010/0.325; NS1: 0.000/0.421; ST2: 0.002/0.684. After fusion and HAT selection, 185 polyclonal hybridomas were grown and the best 30 clones with O.D.> 0.5 were selected for cellular expansion. Nineteen clones were expanded in 24/6-well plates. When the polyclonals were re-tested individually in specific ELISA, we found 1 clone mono-specific for VP1 (EG7), 1 clone mono-specific for HBsAg (IB10), 1 clone that reacted against both VP1 and HBsAg (IE8), and 2 clones that reacted against both NS1 and ST2 (IF7 and GE8). Interestingly, after subcloning, we found a monoclonal hybridoma bi-specific (GE8/JB2), which reacted against NS1 and ST2, and a monoclonal hybridoma mono-specific that recognizes HBsAg (IE8/CB11).

Conclusion:

Multiple antigen immunization provided mAbs against different antigens in a shorter period of time and using less antigen, especially if compared to LATAM mAb development standard protocol (reduction of 53% in the immunization period and 82% in antigen mass; data not shown).

Keywords: Antibody, Immunization, Multiple Antigens

OTR9 - Identification of IgG epitopes to plasminogen in patients with dengue: absence of crossreactivity to dengue protein E

Salvatore G De-Simone^{1*}; Luciano P Gomes²; Katia Felisbino²; Thatiane Santos De-Simone²

1 - CDTS/Fiocruz;

2 - IOC/Fiocruz

Introduction:

Plasminogen has been hypothesised as one cross-reactive factor involved in the pathogenic mechanism of dengue hemorrhagic fever (DHF). Its amino acid sequence has only 4% homology with dengue viruses (DENV) envelope protein (E), a viral attachment protein with hemagglutination and fusion activity.

Objective:

The objective of the present study was to determine the percentage of plasminogen positive patients in a Brazilian population with dengue and identify the crossreactive epitopes.

Methodology:

The presence of antibodies anti-plasminogen in 51 patients with dengue and 30 blood bank donor was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay. Those positive were pooled and used to identify the plasminogen protein E cross-epitopes by the SPOT synthesis microarray peptides and bioinformatics tools.

Results:

IgG anti-plasminogen were positive in 16% of the dengue-positive sera and none of blood bank donor was positive. Sixteen epitopes were detected in the plasminogen by SPOT synthesis but none of them correlated with protein E or any other DENV protein sequences.

Conclusion:

We conclude and corroborate previous works that a small but significant percentage of patients with dengue presented antibodies anti-plasminogen. In addition, we showed that this response does not appear due to crossreactivity

with DENV proteins as hypothesized and therefore is not the reason of DHF. The presence of these antibodies antiplasminogen in patients with dengue is fortuit and might result from other autoimmune disease.

Keywords: Dengue, Pathogenicity, Epitopes, Plasminogen

OTRI0 - Diagnóstico diferencial para detecção de herpesvírus humanos em pacientes imunocomprometidos

Amanda de Oliveira Lopes^{1*}; Adilson José de Almeida²; Fernando Samuel Sion²; Carlos Alberto Morais-de-Sá²; Vanessa Salete de Paula¹

1 - Lab. de Desenvolvimento Tecnológico em Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz;

2 - Hospital Universitário Gaffrée e Guinle, Unirio.

Introdução:

Os herpesvírus humanos (herpes simples tipo 1 e 2, varicela-zoster, Epstein-Barr, citomegalovírus humano, bem como herpesvírus humanos dos tipos 6A/B, 7 e 8) são responsáveis por causar uma variedade de doenças. Porém os quadros de infecção grave ocorrem, geralmente, em indivíduos imunocomprometidos, como os portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Com isso, são necessários métodos de diagnóstico rápido, proporcionando a informação para o tratamento do paciente e o controle da infecção. Entretanto os métodos utilizados para detecção dos herpesvírus humanos (HHV) devem ser reproduzidos diversas vezes para a diferente detecção dos nove vírus, podendo ocasionar uma demora no diagnóstico.

Objetivo:

Avaliar a co-infecção herpesvírus humanos/HIV através de um diagnóstico diferencial por PCR que permite a detecção simultânea dos nove vírus da família *Herpesviridae* que infectam humanos e avaliar fatores associados com a prevalência dessas co-infecções, como sexo, idade e taxas de CD4/CD8.

Metodologia:

Foi realizado um estudo retrospectivo que compreendeu 112 amostras de soro de pacientes HIV reagentes coletadas durante o ano de 2012 provenientes do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle/HUGG - Rio de Janeiro. As amostras foram testadas por PCR qualitativo, através de um PCR convencional seguido por um nested PCR, a partir da amplificação da região genômica conservada da DNA polimerase (dPOL/ 160-181 pares de bases). As amostras que amplificaram a região dPOL dos herpesvírus no PCR qualitativo foram submetidas ao sequenciamento do DNA viral para determinar a sequência dessa região e, assim, identificar o herpesvírus humanos que foi detectado.

Resultados:

Neste estudo foi encontrada uma prevalência da co-infecção HHV/HIV de 29% (32/112), sendo que entre as amostras positivas 91% (29/32) estavam relacionadas a coinfeção HSV-1/HIV e 9% (3/32) estavam relacionadas a coinfeção HHV-6/HIV. Logo, foi identificada uma prevalência da co-infecção de HSV-1/HIV de 26% (29/112) e uma coinfeção de HHV-6/HIV de 3% (3/112). A média da taxa de CD4 foi menor nos pacientes co-infectados (498,63) comparada aos pacientes sem co-infecção (597,36). As variáveis sexo, idade, taxas de CD4/CD8 não tiveram associação com a detecção de herpesvírus humanos nas amostras de soro dos pacientes HIV reagentes.

Conclusão:

A utilização do PCR para a detecção simultânea dos herpesvírus foi relevante para diagnosticar a infecção do HSV-1 e HHV-6 em pacientes portadores do vírus HIV no Rio de Janeiro, permitindo monitorar o quadro clínico do paciente, além de colaborar para determinação da prevalência de infecções causadas pelos herpesvírus humanos no Brasil.

Palavras-Chave: Herpesvírus humanos, Diagnóstico Diferencial, Prevalência, Pacientes HIV Reagentes

OTRII - Understanding the interaction effects between a monoclonal antibody and HBsAg by molecular dynamics aiming the affinity mAb improvement

João Hermínio Martins da Silva^{1*}; Alexandre Bezerra Conde Figueiredo²; Márcia Arissawa².

1 - Fiocruz Ceará;

2 - Bio-Manguinhos/Fiocruz

Introduction:

Currently, hepatitis B virus (HBV) infection is one of the major health problems worldwide and the most serious type of viral hepatitis. The diagnosis of the infection is made by detecting the hepatitis B surface antigen (HBsAg) by the use of monoclonal antibodies (mAbs). In this work, we report the investigation of the dynamical features of a complex formed between an Fv fragment developed by the use of hybridoma technology and HBsAg. After evaluation of the binding mode, the molecular dynamics (MD) of the complex was performed, in order to analyze the maintenance of polar contacts, hydrogen bonds, salt bridges and other structural alterations in the region close to the contact interface. The *Homology Modeling* methodology was used to build the 3D model of Fv, followed by Docking with HbsAg and MD of the formed complex.

Objective:

Computational structural and molecular characterization of mAb and HBsAg complex aiming at the understanding of the dynamical behavior in order to establish a structure-activity correlation and to improve the affinity of the mAb.

Methodology:

In order to build the structure of the mAb, the Modeller v.9.14 software was used. The structure of HBsAg was obtained using the Robetta server. The docking with HBsAg was performed with Haddock software. MD simulations was made with GROMACS software.

Results:

In order to understand how the conformational and electrostatic changes in the binding site can interfere in the formation of this complex, a molecular dynamics of 25 ns was performed. The RMSD, ranging from 0.3 to 0.7 Å, showed

that both proteins are stable along the simulation. Interestingly, a loop from HBsAg contact directly the CDR3 from both light and heavy chains, as well as the CDR2 from light chain stabilize the region close to this same loop. An average number of 7 hydrogen bonds was found in the interface between mAb and HBsAg. The total surface area of the complex is 11742 Å², while only 843 Å² encompass the area of the interface. The region between the CDR3 from heavy and light chains is predominantly negative, while the loop from HBsAg is almost completely positive.

Conclusion:

The analysis of molecular dynamics showed the structural features responsible for the interaction in the complex mAb-HBsAg. Particularly, the electrostatic profile seems to have an important role in the recognition between both, mainly due to the recognition loop found in HBsAg. It is also remarkable the evidence of a strong stability of CDR3 from both light and heavy chains when bound to the antigen. Based on these results, site direct mutagenesis will be performed in order to improve the affinity between the mAb and HBsAg surface antigen.

Keywords: Monoclonal Antibody, HBsAg, Molecular Dynamics

OTR12 - Effects of L-alanyl-L-glutamine media supplementation on batch hybridoma growth and monoclonal antibody production

Guillermo Marini¹; Fernando de Paiva Conte^{1*}; Marcia Arissawa¹.

1 - Bio-Manguinhos, Fiocruz.

Introduction:

As the demand for monoclonal antibodies (mAb) is increasing, there is a significant interest in developing optimized cell culture processes for hybridoma. Optimization process comprises a number of variables, including the selection of better producer hybridomas, culture media and bioreactor culture conditions. L-glutamine is an unstable essential amino acid involved in hybridoma energy production, cell growth and antibody synthesis. However, L-glutamine breaks down to ammonium that can, at least, lower hybridoma growth and mAb production. Dipeptides of L-glutamine with L-alanine or L-glycine are stable forms, which can be used in cell culture media to avoid its negative effects.

Objective:

Evaluate the effects of L-alanyl-L-glutamine on hybridoma growth kinetics and mAb productivity.

Methodology:

The murine hybridoma cell line 90DA5/CB5/AA3, which produces mouse immunoglobulin (Ig) G1K against PBP2a protein, was used in a series of batch experiments performed in roller bottles during 7 days. The medium utilized was DMEM high glucose (4.5g/L; LONZA) supplemented with glutamine or L-alanyl-L-glutamine (6.4mM; Gibco) and 10% v/v fetal calf serum (FCS). Cell counts were performed in Neubauer chamber, under optical microscope, after dilution in Trypan Blue 0,4%. After cell counting, each sample was centrifuged (200g, 10min) and the supernatant frozen for further analysis. Murine IgG (Mouse-IgG ELISA, Roche), L-glutamine (YSI2700 analyzer) concentrations were determined. Specific cell growth rate (μ) and doubling time (dt) were calculated using the differential method, during the exponential growth phase. Specific Lglutamine consumption rate (qSglu) and IgG production rate [qP(I-

gG)] were estimated by plotting total cell concentration, cumulative substrate consumption or production, versus the integral of viable cells (IVC) and fitting the plots with a regression coefficient of close to one.

Results:

L-alanyl-L-glutamine compared to L-glutamin- -supplemented media increased hybridoma cell growth, after 7 days, as measured by IVC (212390000 and 169267500 cell.h/mL, respectively) and extended the stationary phase ($2.05+0.13$ and $0.87+0.08 \times 10^6$ cell/mL at 96h, respectively). Interestingly, it did not affect the maximum viable cell concentration ($2.70+0.17$ and $2.60+0.06 \times 10^6$ cells/mL at 72h, respectively), μ (0.023 and 0.023h^{-1} , respectively) and dt (30 and 30h, respectively). In addition, free glutamine concentration during hybridoma cultivation with L-alanylL-glutamine-supplemented medium differed from glutaminesupplemented medium since it started with low levels (0.035 versus 1.180g/L), peaked at 24h (0.844 versus 0.853g/L) remained above control (0.523 versus 0.320g/L) and both returned to basal levels at 72h. Of note, spontaneous release of glutamine from L-alanyl-L-glutamine was observed in cellfree medium supplemented with FBS at 4 and 37°C. After 7 days of hybridoma cultivation in batch mode, L-alanylL-glutamine-supplemented medium presented an increase of 55% in antibody volumetric productivity when compared to glutamine-supplemented medium (70.7 and 45.4 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and an increased qP(IgG) at exponential phase (6.0 versus $4.5 \times 10^{-7}\mu\text{g/cell.h}$).

Conclusio:

L-alanyl-L-glutamine supplementation increased the hybridoma cell growth and significantly increased antibody volumetric productivity.

Keywords: Hybridoma, IgG Production, L-alanylL-glutamine Supplementation

OTR13 - Detection of *Mycoplasma sp.* and *Acholeplasma laidlawii* in biological products and culture media by real time PCR

Natália Pedra Gonçalves^{1*}; Pedro Augusto Alves¹; Érica Louro da Fonseca¹; Darcy Akemi Okama¹; Jaline Coutinho Silvério¹; Daniel da Silva Guedes Júnior¹.

1 - Bio-Manguinhos/ Fiocruz

Introduction:

Mycoplasma is the smallest less-wall prokaryotic organism and can that cause pneumonia and urogenital diseases in humans. Moreover, they frequently contaminate research and commercial laboratories involved in development and production of biological and pharmaceutical cell-derived products, enabling unreliable experimental results and unsafe biological products. The detection of *Mycoplasma sp.* and *Acholeplasma laidlawii* in biological products is a quality control test required by the European Pharmacopoeia (Eur. Ph.) and carried out by industries.

Objective:

To develop an in house real time PCR (qPCR) protocol for assessing *Mycoplasma sp.* and *A. laidlawii* in biological products and culture media for pharmaceutical industry. Metodologia: The genome of eight species required by Eur. Ph. were selected in GenBank[®] for the 16S ribosomal locus and aligned using the online tool ClustalOmega in order to select a common region for primer design. To achieve the specificity criteria, were excluded the regions shared with other phylogenetic related bacteria as *Streptococcus*, *lostridium* and *Lactobacillus* genera. The primer design was analyzed through the online tool IDT OligoAnalyzer[®] 3.1, and the PrepSEQ[®] kit was used for DNA extraction of ATCC pure cultures and biological products spiked with *Mycoplasma* and *Streptococcus bovis*, *Clostridium sporogenes* and *Lactobacillus acidophilus*, that are phylogenetically related to *Mycoplasma sp.* and *A. laidlawii*. The specificity and detection limit assays were made using SYBR[®] Green dye and the results were compared with the commercial kit for *Mycoplasma* detection MycoSEQ[™] and convencional PCR.

Results:

Four pairs of primers were designed and BLAST research revealed homology to 40 *Mycoplasma* species, including the species required by Eur. Ph. with

100% of identity. The qPCR tests using in house protocol demonstrated that the primers are specific for *Mycoplasma genus* and *A. laidlawii*, and the detection limit was less than 1UFC/mL using pure culture of *Mycoplasma*. These results were similar to the obtained with the MycoSEQ™ and more sensitive than conventional PCR. Preliminary qPCR tests with biological products spiked with *Mycoplasma* has shown that in-house protocol are also suitable and specific for this bacterial detection.

Conclusion:

The in house protocol for detection of *Mycoplasma sp.* and *A. laidlawii* by qPCR has shown to be as specific as the commercial kit MycoSEQ™, with the ability to detect less than 1 UFC/mL of *Mycoplasma*. This represents lower costs and an alternative to the conventional PCR already established at the Quality Control Department – BioManguinhos, since qPCR presents advantages as higher sensitivity, reduced time process, greatest biosafety and robustness.

Keywords: *Mycoplasma*, Real Time PCR, SYBR Green

OTRI4 - Padronização de uma metodologia de ensaio na plataforma de microarranjos líquidos utilizando sífilis como modelo

Periela da Silva Vasconcelos Sousa^{1*}; Christiane de Fátima Silva Marques¹; Bruna de Paula Fonseca e Fonseca¹; Bernardo Oliveira Loureiro¹; Marcelle Bral de Mello¹; Leila Botelho Rodrigues da Silva¹; Nara Mazarakis Rubim¹; Rosa Teixeira de Pinho².

1 - Bio-Manguinhos/ Fiocruz;

2 – IOC.

Introdução:

O ensaio de microarranjos líquidos baseados em microesferas é uma tecnologia recente (difundida a partir do final da década de 1990) e que apresenta certas vantagens em relação às outras, como a análise simultânea de analitos de diversas doenças e logo, uma redução de custo e tempo. Nos três últimos anos observou-se a crescente demanda de diferentes laboratórios da Fiocruz por essa metodologia, disponível no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATED). Considerando esta demanda, avaliamos alguns dos principais parâmetros no ensaio de microarranjos líquidos desde o processo de seleção de proteínas, neste caso, proteínas recombinantes do *Treponema pallidum*, até a configuração do ensaio final e, comparamos o ensaio padrão utilizado no LATED com o ensaio otimizado.

Objetivo:

Utilizar a metodologia desenvolvida para seleção e avaliação de potenciais antígenos para fundamentar a elaboração de um documento interno de Bio-Manguinhos – Instrução de Trabalho (IT) – que possa ser utilizado por profissionais e/ou estudantes que pretendam utilizar a plataforma de microarranjos líquidos para a detecção de agentes patogênicos.

Metodologia:

Foram realizados ensaios de microarranjos líquidos para seleção de proteínas recombinantes. Em seguida, foram avaliados alguns dos principais parâmetros envolvidos na reação. Os parâmetros avaliados foram: velocidade de rotação das microesferas acopladas durante a reação, a temperatura e tempo de incubação durante a reação, o tampão utilizado no ensaio, a diluição das amostras

e do conjugado, bem como conjugado de dois fabricantes, o tempo de assentamento das microesferas ao fundo do poço durante a etapa de lavagem (tempo de *soak*) e o volume de aspiração durante a leitura das microesferas. Ao final, foram comparados o ensaio padrão utilizado no LATED com o ensaio otimizado.

Resultados:

Testando as proteínas p17, p47, TmpA e quimera verificamos que as p17 e TmpA apresentaram melhor desempenho, ambas com 5 µg de massa de acoplamento às microesferas magnéticas. Alguns parâmetros relacionados à reação foram modificados, tais como o tempo de incubação (de 15 minutos para 40 minutos), o conjugado (a diluição e o fabricante), a diluição da amostra, o tempo de *soak* e o volume de aspiração na leitura uma vez que apresentaram melhores resultados. Para o protótipo de multiteste padronizado no presente trabalho (utilizando a sífilis como modelo), o formato otimizado (ensaio 2) apresentou maior sensibilidade e especificidade, ou seja, resultados melhores quando comparado ao protocolo padrão (ensaio 1).

Conclusão:

Mesmo com toda a complexidade de padronização de um ensaio múltiplo, conseguimos avaliar alguns dos principais parâmetros e estabelecer as melhores condições para as proteínas selecionadas. Para o protótipo de multiteste padronizado no presente trabalho (utilizando a sífilis como modelo), o formato otimizado (ensaio 2) apresentou resultados melhores quando comparado ao protocolo padrão (ensaio 1).

Palavras-Chave: Microarranjos Líquidos, Sífilis, Diagnóstico



