

VAC 12 - Padronização das reações de PCR em tempo real e microarranjo líquido para determinação do título da vacina tríplice viral

Jéssica Malherios^{1*}; Gisela Freitas Trindade¹; Denise Cristina de Souza Matos¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹.

¹ Bio-Manguinhos / Fiocruz.

Introdução:

A prevenção contra sarampo, caxumba e rubéola no Brasil vem sendo realizada com a aplicação da vacina trivalente, composta de vírus vivos atenuados do sarampo (cepa Schwarz), da rubéola (cepa Wistar RA27/3) e da caxumba (cepa RIT 4385 derivada da cepa Jeryl-Lynn), produzidos em substratos celulares e células diploides. Estudos clínicos demonstraram que esta vacina é altamente imunogênica e anticorpos contra a rubéola foram detectados em 99,3%, contra o sarampo em 98,0%, e contra a caxumba em 96,1% dos primovacinados. A determinação da potência da vacina é realizada por ensaios de placas de lise, que medem a quantidade de partículas infecciosas. Esses testes convencionais dependem da observação da lise celular provocada pela infecção viral. Embora este método seja considerado o padrão ouro para titulação viral, é laborioso e demanda 7 dias pós infecção para ser revelado. Atualmente, estão sendo avaliadas a utilização de técnicas modernas como qPCR e micorarranjo líquido como alternativas no controle de qualidade de vacinas.

Objetivo:

Padronizar as metodologias de microarranjo líquido e qPCR como ensaios alternativos para aferir o título dos vírus que compõem a vacina trivalente durante o processo produtivo em Bio-Manguinhos.

Metodologia:

Vacinas nas diferentes etapas de formulação (Bulk, vacina formulada e liofilizada) foram utilizadas nos ensaios. O ensaio de microarranjo líquido foi padronizado para avaliar o componente sarampo e para determinação da curva padrão foi utilizado anticorpo IgG (soro) específico. Neste trabalho foi feita a otimização da concentração dos oligonucleotídeos usados para cada alvo e condições de reação para qPCR, assim como a aplicação da curva padrão sintética (GBlock) para quantificação das preparações vacinais.

A replicação dos vírus da caxumba e sarampo foi avaliada utilizando duas multiplicidades de infecção MOI 0,01 e 0,001. Foram coletadas amostras em intervalos de 24 h, que foram quantificadas por qPCR (cópias/mL) por ensaios de placas de lise (PFU/mL).

Resultado:

A padronização realizada para o qPCR demonstrou que foi possível a quantificação dos três vírus pela técnica. Os resultados obtidos com os ensaios monoplex e biplex do qPCR quantificando as diferentes preparações vacinais foram satisfatórios, porém outras análises deverão ser realizadas para o refinamento do método. Foi iniciada a padronização do microarranjo líquido no LATIM para o vírus do sarampo que também demonstrou ser factível a utilização do ensaio, entretanto, anticorpos monoclonais específicos para cada antígeno deverão ser testados.

Conclusão:

Os dados deste estudo sugerem que a metodologia de qPCR pode ser utilizada como uma alternativa para estimar a concentração viral durante as etapas da produção e desenvolvimento da vacina, por ser um método rápido e reprodutível, o que facilita a tomada de decisões durante o processo.

Palavras-chave: Vacina trivalente; pcr em tempo real; microarranjo líquido