



Ministério de Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto de Tecnologia  
em Imunobiológicos  
**Bio-Manguinhos**

**V Seminário Anual**  
Científico e Tecnológico  
de Bio-Manguinhos  
RJ, 2 - 4 de maio de 2017



Anais do

# V Seminário Anual

Científico e Tecnológico  
de Bio-Manguinhos

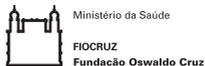
RJ, 2 - 4 de maio de 2017



Vacinas - Biofármacos - Reativos para Diagnóstico  
Gestão - Outros Temas Relacionados







V Seminário Anual  
Científico e Tecnológico  
de Bio-Manguinhos  
RJ, 2 - 4 de maio de 2017



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

Rio de Janeiro  
2017

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS

### **Projeto Gráfico e Diagramação**

Gisele Corrêa Miranda

### **Revisão Final**

Cristina de Albuquerque Possas

Reinaldo de Menezes Martins

### **Apoio Legal - NITBio**

Ana Paula Cossenza, Cíntia Reis Costa, Livia Rubatino de Faria, Katia dos Reis

Assessoria de Comunicação de Bio-Manguinhos

Renata Ribeiro Gómez de Souza (coordenação), Alessandra Lopes, Bernardo Portella, Danielle dos Santos, Danielle Guedes, Diego Destro, Gabriella Ponte, Isabela Pimentel, Livia Maldondo, Paulo Schueler, Rodrigo Pereira e Talita Wodtke.

### **Produção**

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos

Av Brasil, 4365 - Manguinhos

Rio de Janeiro, RJ - 21040-360

Telefone: (21) 3882.7182

e-mail: sact@bio.fiocruz.br

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

S471

Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos (5. : 2017 : Rio de Janeiro, RJ).

Anais do V seminário anual científico e tecnológico [recurso eletrônico] : 2-4 de maio de 2017 / Organização: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. – Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2017.

152 p.

Edição Digital.

ISBN: 978-85-69231-02-8

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

CDD 303.483

## **CRÉDITOS**

### **PRESIDENTE DE HONRA**

Nísia Trindade Lima, presidente da Fiocruz

### **DIRETORIA DE BIO-MANGUINHOS**

Artur Roberto Couto, diretor

Maria da Luz Fernandes Leal, vice-diretor de Qualidade

Antonio de Pádua Barbosa, vice-diretor de Produção

Marcos da Silva Freire, vice-diretor de Desenvolvimento Tecnológico

Lorena Dummond, vice-diretora de Gestão e Mercado

Cristiane Frensch Pereira, chefe de gabinete

### **COMITÊ EXECUTIVO**

Akira Homma, Artur Roberto Couto, Cristiane Frensch, Gisele Corrêa Miranda, Patrícia Pedroso Porto, Renata Ribeiro Gómez de Sousa

### **COORDENAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA**

Akira Homma, Reinaldo de Menezes Martins e Cristina de Albuquerque Possas

### **COMISSÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA**

Aline Oliveira, Ana Paula Cossenza, Antônio Barbosa, Antonio Gomes Pinto, Beatriz de Castro Fialho, Darcy Akemy Hokama, Elena Cristina Caride, Elezer Montebianco, Geraldo Pereira, Isabella Ballalai, Isabella Manjud Maluf, Ivna Alana Silveira, José Procópio, Luciane Pinto Gaspar, Marcia Arissawa, Marco Alberto Medeiros, Maria da Luz Fernandes Leal, Maria de Lourdes de Sousa Maia, Marilda Siqueira, Martin Bonamino, Martha Suárez-Mutis, Myrna Bonaldo, Patrícia Cristina da Costa Neves; Priscila Ferraz Soares, Rodrigo Coelho, Sotiris Missailidis, Tania Petraglia, Wania Renata dos Santos

### **COMISSÃO INDEPENDENTE DE AVALIAÇÃO DE PRÊMIOS**

Daniel Lacerda, João Baptista Risi Jr., Marco Antônio Stephano, Maria Cristina de Cunto Brandileone, Maria Notomi Sato, Paulo Lee Ho

**CONTEÚDO**

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>VACINAS.....</b>	<b>15</b>
VAC 01 - Estudo prospectivo de uma coorte de crianças até 2 anos de idade vacinadas com VORH (Rotarix®): avaliação da homogeneidade genômica.....	16
VAC 02 - Aplicabilidade do MAT como método alternativo ao uso de coelhos no ensaio de pirogenia no controle de qualidade da MenCC.....	18
VAC 03 - Challenges in Influenza B vaccination in Brazil: from vaccine mismatches to viral evolutionary dynamics .....	20
VAC 04 - Teste de ativação de monócitos para monitoramento da atividade pirogênica na vacina de febre amarela.....	22
VAC 05 - Avaliação das condições de inativação do vírus Zika por $\beta$ -Propiolactona e das metodologias do processo .....	24
VAC 06 - Avaliação da resposta celular e humoral induzida pela vacina Meningocócica C conjugada desenvolvida em Bio-Manguinhos.....	26
VAC 07 - Autonomia e redução de custo no controle do imunógeno da vacina inativada de poliomielite (IPV): teste de identidade do antígeno D.....	28
V 08 - Avaliação de alternativas para a abertura de ovos <i>spf</i> no DEVIR .....	30
VAC 09 - Avaliação do risco de biossegurança para a produção de vacina febre amarela de subunidade utilizando plataforma vegetal.....	32
VAC 10 - Proposta de revisão da RDC 69 8/12/2014, para a produção de vacina febre amarela de subunidade utilizando plataforma vegetal.....	34
VAC 11 - Avaliação da performance de secagem em diferentes frascos para produtos imunobiológicos em um processo de liofilização .....	36
VAC 12 - Padronização das reações de PCR em tempo real e microarranjo líquido para determinação do título da vacina tríplice viral .....	38
VAC 13 - Ensaios clínicos: como definir febre pela aferição da temperatura axilar? 40	
VAC 14 - Aumento da capacidade produtiva do insumo farmacêutico ativo da vacina febre amarela atenuada de Bio-Manguinhos .....	42

VAC 15 - Proposta de formulação intranasal para vacinas bacterianas .....44

VAC 16 - Aumento do volume de preparo do estabilizador da vacina febre amarela atenuada produzida por Bio-Manguinhos.....46

## **BIOFÁRMACOS..... 49**

BIO 01 - Avaliação de suplementos nutricionais no cultivo de células CHO recombinantes em suspensão .....50

BIO 02 - Modelagem, docking e dinâmica molecular de dois fragmentos de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B .....52

BIO 03 - Generation of a scFv antagonistic to VLA-4 integrin as potential therapeutic target in muscular dystrophies: *in silico* phase .....54

BIO 04 - Análise comparativa entre a expansão celular realizada em frascos tipo Roller e em biorreator de ondas .....56

BIO 05 - Clonagem, expressão e purificação do domínio externo da proteína de membrana externa A (OmpAExt) de *Acinetobacter baumannii*.....58

BIO 06 - Viabilidade do uso de 1,10 fenantrolina e aptâmeros anti-MUC1 como radiosensibilizadores em células de câncer de mama .....60

BIO 07 - Enhancement of ANTI-HSV-1 activities using liposomes with naphthoquinones .....62

BIO 08 - Avaliação de uma bomba centrífuga magnética e seu impacto na viabilidade de células CHO .....64

BIO 09 - Aplicação da citometria de fluxo no monitoramento de células CHO .....66

BIO 10 - Avaliação de diferentes sistemas de cultivo em escala de bancada para a expressão transiente de anticorpos monoclonais .....68

## **REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO ..... 71**

REA 01 - Identificação dos principais agentes etiológicos das meningites bacterianas por PCR em tempo real.....72

REA 02 - Biosensor-based epitope peptide screening to detect spotted fever.....74

REA 03 - Nanosensor para testes diagnósticos point-of-care empregando quantum dots de CdTe funcionalizados com epitopos sintéticos para dengue.....76

REA 04 - Avaliação da estabilidade de IgG de cabra anti-humano marcado com FITC por espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (W) .....78

REA 05 - Estudo imunológico da aspártico protease de <i>Angiostrongylus cantonensis</i> como potencial alvo de testes diagnósticos para a angiostrongilíase humana.....	80
REA 06 - Obtenção de aptâmeros para detecção do vírus Zika em testes diagnóstico – Estudos preliminares .....	82
REA 07 - Obtenção da proteína recombinante E2 do vírus Chikungunya como insumo para o desenvolvimento de um novo teste diagnóstico .....	84
REA 08 - Contribuição ao desenvolvimento e validação de um KIT-QPCR em tempo real para detecção de carbapenemases em sepsis por bacilos gram-negativos .....	86
REA 09 - Immunological mapping of the OMP H6PGA4 _RICRI and evaluation of an ELISA for early diagnosis of spotted fever .....	88
REA 10 - Evaluation of IgM and IgG chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in one outbreak in Brazil .....	90
REA 11 - Construção de proteínas quiméricas multi-epítomos para emprego em testes sorológicos para o diagnóstico da doença de Chagas .....	92
REA 12 - Desenvolvimento e padronização de ensaio molecular para a detecção de <i>Plasmodium sp.</i> em amostras de sangue total e plasma humano.....	94
REA 13 - Desenvolvimento e padronização de ensaio molecular para a detecção de vírus Mayaro.....	96
REA 14 - Desenvolvimento de um sistema molecular de detecção e tipagem do vírus da Dengue.....	98
REA 15 - Detecção de infecções fúngicas concomitantes em pacientes portadores de HIV por meio de técnicas moleculares e coloração específica para fungos .....	100
REA 16 - Epitoma do vírus mayaro e aplicação em novos métodos diagnósticos ..	102
<b>GESTÃO .....</b>	<b>105</b>
GES 01 - Profilaxia pós-exposição antirrábica humana em tempos de desabastecimento: reestruturação da rede de atendimentos com adoção de esquema intradérmico .....	106
GES 02 - Utilização de HAZOP em biorreator single-use em um processo de vacina viral .....	108
GES 03 - A experiência do FIO-CÂNCER para formação de redes temáticas na FIOCRUZ.....	110
GES 03 - Análise de tendências dos parâmetros físico-químicos no monitoramento dos sistemas de águas em Bio-Manguinhos.....	112

- GES 05 - Ferramenta de criticidade para o processo decisório da gestão de manutenção de equipamentos de controle de qualidade no caso Alfaepoetina. .... 114
- GES 06 - Assistência farmacêutica na internet: informação e acesso ao Componente Especializado da política pública de medicamentos ..... 116
- GES 07 - Otimização dos custos operacionais do CHP provenientes da avaliação de aderência do empreendimento as regulações vigentes ..... 118

## **OUTROS TEMAS RELACIONADOS ..... 121**

- OTR 01 - Mapeamento dos Epitopos B lineares da proteína ALT-2 de *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877)..... 122
- OTR 02 - Use of small interfering RNA (siRNA) as a viral replication inhibitor of Human Herpesvirus 1 in BALB/C mice with keratoconjunctivitis ..... 124
- OTR 03 - Identificação de protozoários empregando componentes principais e imagens hiperespectrais..... 126
- OTR 04 - Identification of targeted epitopes of yellow fever virus based on homology with other species of flavivirus ..... 128
- OTR 05 - Detection of antibodies anti horse albumin and anti horse IgG3 in a population of Rondonia state ..... 130
- OTR 06 - Atividade moluscicida de extrato butanólico e nanoformulação de *Sideroxylon obtusifolium*..... 132
- OTR 07 - Integração metabólica na interação micobactéria-hospedeiro: nova abordagem para intervenção terapêutica em doenças infecciosas ..... 134
- OTR 08 - Análises estratégicas para minimizar reação cruzada em Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise do vírus da ZIKA ..... 136
- OTR 09 - Partnerships for productive development as an instrument for promotion of industrial development and innovation capacity: the case of Bio-Manguinhos. 138
- OTR 10 - Desenho da qualidade com uso da técnica de espectroscopia RAMAN portátil para a inovação na indústria biotecnológica..... 140
- OTR 11 - Desenvolvimento de estratégia de purificação de Imunoglobulina M .... 142



# APRESENTAÇÃO

*Caro participante,*

*É com imensa satisfação que o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos realiza o V Seminário Anual Científico e Tecnológico. O evento reúne profissionais da Fiocruz e de entidades de referência, ensino, pesquisa e o governo, incluindo especialistas de instituições nacionais e internacionais. Constitui-se em momento ímpar para promover discussões em temas relevantes para a saúde pública brasileira e mundial, nas áreas de vacinas, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos.*

*Idealizado para propiciar o debate entre palestrantes e participantes, o seminário oferece oportunidade de divulgação de produção técnica e científica na área, troca de informações, estímulo à formação de novas parcerias e consolidação de redes colaborativas de pesquisa científica e tecnológica, criando um ambiente favorável à inovação.*

*O seminário contará com uma programação variada de palestras nacionais, internacionais, workshops e apresentação de pôsteres, englobando temas fundamentais como febre amarela, vacina para doenças respiratórias e gestão da inovação tecnológica.*

*Participe, discuta e aproveite ao máximo!*

*Cordialmente,*



*Artur Roberto Couto*

*Diretor de Bio-Manguinhos*

# INTRODUÇÃO

*Bio-Manguinhos, como parte das comemorações do seu aniversário de 41 anos, organiza este Seminário Anual Científico e Tecnológico. E vem organizando também, a cada 5 anos, um Simpósio Internacional. Ambos os eventos focalizam temas relacionados às áreas abrangidas pela instituição, ou seja, desenvolvimento e produção de vacinas, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos.*

*São palestras de especialistas de diferentes instituições do país e do mundo que nos trazem informações atualizadas e permitem antever o estado da arte, as tendências, o futuro desenvolvimento e os novos produtos para estas áreas. As apresentações de peritos são complementadas com apresentações de trabalhos selecionados pela Comissão Científica, dentre os resumos submetidos e aprovados para apresentação em formato de pôsteres. E inúmeras instituições e profissionais envolvidos nestas atividades são convidados para apresentarem os seus trabalhos.*

*Destacamos a premiação dos melhores trabalhos, selecionados que são pela Comissão de Premiação, com os prêmios Oswaldo Cruz, Carlos Chagas e Alcides Godoy e de Jovem Talento Científico, com os prêmios Henrique de Azevedo Penna, Evandro Chagas e Sérgio Arouca, e que são contemplados inclusive com premiação em dinheiro.*

*Este formato, especialmente a sessão de pôsteres e sua apresentação na plenária, foi idealizado buscando dar um espaço nobre e visibilidade aos resultados e às atividades realizadas pelos profissionais de Bio-Manguinhos e de outras instituições, seja em pesquisa básica, de desenvolvimento tecnológico, produção, controle de qualidade, garantia de qualidade, serviços e gestão das atividades. É também, um espaço para interação e troca de informações entre os profissionais envolvidos, buscando-se aprimorar o conhecimento e propiciar maior integração institucional.*

*Este Simpósio, com mais de 400 inscrições e com 60 resumos, mostra o interesse da sociedade e da comunidade de imunobiológicos em alcançar o desiderato maior: ampliar o acesso da população a imunobiológicos importantes para a Saúde Pública.*

*Agradecemos a todos que fizeram possível a organização deste evento, à Diretoria de Bio-Manguinhos, aos apresentadores das sessões, aos participantes estrangeiros e nacionais, aos patrocinadores e parabenizamos os premiados.*

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the end.

Akira Homma

*Pela Comissão Científica e Tecnológica do V SACT*



# VACINAS



## **VAC 01 - Estudo prospectivo de uma coorte de crianças até 2 anos de idade vacinadas com VORH (Rotarix®): avaliação da homogeneidade genômica**

Carina Cantelli Pacheco de Oliveira<sup>1\*</sup>; Alvaro Velloso<sup>1</sup>; Darcy Akemi Hokama<sup>1</sup>; Alexandre Fialho<sup>2</sup>; Sérgio Mouta<sup>2</sup>; Túlio Fumian<sup>2</sup>; Denise Cotrim<sup>3</sup>; Patrícia Brasil<sup>4</sup>; José Paulo Gagliardi Leite<sup>2</sup>; Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza<sup>2</sup>.

1Bio-Manguinhos / Fiocruz;

2Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

3Escola Nacional de Saúde Pública / Fiocruz;

4Instituto Nacional de Infectologia / Fiocruz.

### **Introdução:**

A gastroenterite aguda (GA) é a segunda causa de morbi/mortalidade em crianças  $\leq 5$  anos, sendo os rotavirus A (RVA) e os norovirus (NoV) os agentes etiológicos mais importantes. Os RVA são vírus geneticamente diversos, de genoma RNA fita dupla segmentado, e até o momento foram caracterizados 32G e 47Pgenótipos. Em 2006, o Brasil introduziu em seu Programa Nacional de Imunizações (PNI) a vacina oral rotavirus humano G1P[8] atenuada – VORH (Rotarix®). Bio-Manguinhos assinou com a GSK (Bélgica), em 2008, a transferência de tecnologia desta vacina. Devido à diversidade dos RVA é de extrema importância a vigilância molecular e a avaliação dos genótipos circulantes no período pós-vacinal.

### **Objetivo:**

Realizar a caracterização molecular dos RVA e NoV em uma coorte prospectiva de recém natos e lactentes (residentes em Manguinhos/RJ) acompanhados em consultas de rotina e durante episódios de GA pela ENSP/Fiocruz, antes, durante e depois da administração da VORH, no intuito de avaliar a homogeneidade genética da vacina (*shedding* vacinal) e a possibilidade de novas variantes genotípicas relacionados à evolução do RVA.

### **Metodologia:**

Detecção de genomas de RVA e NoV em fezes (coletadas quinze dias antes e após a administração da 1ª e 2ª doses da VORH e em episódios de GA), uti-

lizando-se protocolos padronizados pelo Laboratório de Referência Regional em Rotavírus do IOC/Fiocruz: RT-PCR quantitativo multiplex em tempo real, RT-PCR qualitativo e sequenciamento nucleotídico.

### **Resultado:**

Foram analisadas 455 amostras de 153 crianças assistidas de novembro/2014 a outubro/2015. Trinta e seis amostras (7,9%) foram RVA e 13 NoV (2,9%) positivas. Das 36 amostras RVA positivas, 33 foram coletadas de crianças após a 1ª dose da VORH (aproximadamente 92%), duas delas de crianças que apresentaram episódio de GA. Todas as amostras foram G1P[8] vacinal, caracterizando *shedding* vacinal. Os genes que codificam para as proteínas do capsídeo VP7(G) e VP8\*(P) e para a enterotoxina viral (NSP4) foram sequenciados e a sequência de aminoácidos (aa) deduzidas. As análises filogenéticas utilizando-se as sequências de aa das proteínas VP7, VP8\* e NSP4 comparadas com amostras padrões e com amostras de lotes da vacina VORH demonstraram perfis similares. No entanto algumas mutações de aa foram detectadas, como F167L em nove das 36 amostras caracterizadas como G1P[8] vacinal. Uma dessas 9 amostras (24.398) também apresentou mutação I45M na proteína NSP4. Uma única mutação de aa F44L na NSP4 foi encontrada na amostra (24.921). A análise da VP7 apresentou duas mutações nos aminoácidos I20N e N126D na amostra 24.920.

### **Conclusão:**

O perfil de *shedding* vacinal da coorte estudada foi similar ao que têm sido relatado em outros estudos. Embora mutações de aa nas três proteínas analisadas tenham sido detectadas, foi evidenciada a homogeneidade genética do *shedding* vacinal. São necessários mais estudos para avaliação do possível impacto das mutações detectadas para a resposta vacinal.

**Palavras-chave:** rotavirus A; monitoramento vacinal; Rotarix®

## **VAC 02 - Aplicabilidade do MAT como método alternativo ao uso de coelhos no ensaio de pirogenia no controle de qualidade da MenCC**

Vítor Fernandes Silva<sup>1\*</sup>; Alessandra Santos Almeida<sup>1</sup>; Cristiane Caldeira da Silva<sup>2</sup>; Octávio Augusto França Presgrave<sup>2</sup>; Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira<sup>1</sup>; Daniel Da Silva Guedes Junior<sup>1</sup>; Katherine Antunes de Mattos<sup>1</sup>.

1Bio-Manguinhos / Fiocruz;

2INCQS / Fiocruz.

### **Introdução:**

A detecção de pirogênios em produtos parenterais é mandatória pelas agências reguladoras. Atualmente, para avaliar o conteúdo de pirogênios, as principais farmacopeias preconizam o teste de pirogênio em coelhos (RPT), o lisado de amebócito de *Limulus* (LAL) e o teste de ativação de monócitos (MAT).

### **Objetivo:**

Atender ao recrutamento internacional de esforços para redução do uso de animais e refinar o controle de qualidade (CQ) na identificação de possíveis pirogênios em produtos do portfólio do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos). Avaliar a aplicabilidade do MAT ao CQ da vacina Meningocócica C conjugada (MenCC) como alternativa ao uso de coelhos no teste de pirogênia *in vivo* e ampliar a detecção de potenciais fontes de pirogênio não-endotoxina (NEP).

### **Metodologia:**

Os sistemas do MAT combinaram a utilização de matrizes monocíticas (sangue total fresco e criopreservado) e a detecção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) como parâmetros de leitura. Lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicoico (LTA) e zymozan A (ZA) foram utilizados como padrões moleculares associados à pirogênia de Gram-negativas, positivas e fungos, respectivamente. Foram avaliados 3 lotes de MenCC produzidos por Bio-Manguinhos. Estes foram incubados em contato com a matriz monocítica em estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C e após 16 horas foram quantificadas IL-1 $\beta$  e IL-6 pelo ensaio de ELISA (R&D Systems). Em paralelo, os lotes foram analisados frente aos métodos farmacopeicos clássicos de detecção de pirogênios, o LAL e o RPT.

**Resultado:**

A validação produto específica, MenCC frente ao MAT, não apresentou interferência, mostrando aplicabilidade do teste ao produto. Todas as diluições da vacina, bem como a presença do adjuvante não interferiram na detecção de IL-6 e IL-1 $\beta$ , induzido pelo padrão exógeno de LPS. O sistema foi capaz de identificar NEPs (LTA e ZA) exógenos na presença de MenCC. Análises estatísticas demonstraram uma boa correlação entre os sistemas de leituras (IL-1 $\beta$  e IL-6) para curvas de LPS em salina ( $r=0,9918$  e  $p=0,0001$ ) e em MenCC ( $r=0,9702$  e  $p=0,0028$ ). Os ensaios de linhas paralelas das curvas de LPS e LTA em salina *versus* MenCC demonstraram que o P-valor para o não-paralelismo não foi significativo para IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $p > 0,05$ ). Os ensaios quantitativos demonstraram que os 3 lotes foram considerados não pirogênicos, reforçando os resultados obtidos pelos métodos clássicos RPT e LAL.

**Conclusão:**

O presente estudo demonstrou a susceptibilidade da MenCC à análise pelo MAT, observando uma correlação positiva com os ensaios clássicos RPT e LAL, bem como a análise diferencial e quantitativa de NEPs, potenciais alvos de contaminação na indústria. Os resultados abrem uma avenida de oportunidades, atendendo ao recrutamento internacional de esforços para redução de animais, principalmente para fins industriais, dando início a uma missão preventiva às futuras regulamentações referentes ao uso de animais no Brasil.

**Palavras-chave:** Teste de Ativação de Monócitos; Vacina Meningocócica C Conjugada; Métodos Alternativos

## **VAC 03 - Challenges in Influenza B vaccination in Brazil: from vaccine mismatches to viral evolutionary dynamics**

Maria de Lourdes Aguiar Oliveira<sup>1\*</sup>; Fernando Couto Motta<sup>1</sup>; Jaline Alves Cabral<sup>1</sup>; Priscila Born<sup>1</sup>; Tatiana Gregianini<sup>2</sup>; Ana Luisa Furtado<sup>3</sup>; Sandra Bianchini Fernandes<sup>4</sup>; Maria do Carmo Rosa<sup>5</sup>; Leandro Ferraz<sup>6</sup>; Marilda Mendonça Siqueira<sup>1</sup>.

1Laboratório de Virus Respiratórios e do Sarampo, IOC / Fiocruz;

2LACEN-RS;

3LACEN-MG;

4LACEN SC;

5LACEN PR;

6LACEN BA.

### **Introduction**

Vaccination against influenza plays a key role in averting severe disease and reducing morbidity, mortality and the socioeconomic costs allied with primary and secondary infections. Since trivalent Influenza B vaccine comprises only a viral lineage, a successful intervention relies on the agreement between circulating viruses and vaccine-selected strains. Furthermore, available data show two yearly Influenza epidemic peaks in Brazil, whereas national vaccination campaigns are carried out in a single period, after the first epi-peak in the North and part of Northeast regions.

### **Objective:**

We investigated the distribution of influenza B lineages and their match with vaccine-strains in Brazil, along 2010-2016 influenza seasons. In addition, temporal and geographical patterns of viral circulation were explored and their putative impact on timely vaccination and vaccine composition are discussed

### **Methodology:**

Influenza B lineage was determined by CDC real time RT-PCR and/or DNA sequencing in 669 clinical samples from different Brazilian regions, distributed as follows: South, 246; Southeast, 210; Center, 35; Northeast, 125 and North, 83. Samples from the Southern states, Southeast (except Sao Paulo) and Northeast (Bahia, Alagoas, Sergipe) were sequenced at the WHO/National Influenza

Center (NIC), Rio de Janeiro. Sequences from other states were downloaded from GISAID database. Maximum likelihood phylogenetic trees were reconstructed using a Maximum Likelihood algorithm (PhyML), with a GTR+I+G nucleotide substitution model. Viral dynamics along time-space was explored using using GMRF Bayesian skyride coalescent model, with a relaxed clock (Beast 1.8.0).

### **Results:**

Key mismatches between the Southern Hemisphere vaccine and the most prevalent circulating viruses were identified in 2010 (except for the Northeast), 2013 and 2014 (Southeast and South), imposing a challenge for the trivalent vaccine usage. Our preliminary analyses suggest a strong spatial structure, with regional patterns of lineage distribution within the country. Although Yamagata and Victoria lineages present distinct evolutionary dynamics, different antigenic groups can be simultaneously observed. Moreover, viruses circulating in the South and Southeast regions were identified in the North only one year later, with putative implications for the use of a single vaccine composition within Brazil in the same influenza season.

### **Conclusion:**

Our findings corroborate the international literature on the poor concordance between vaccine and circulating Influenza B strains. The introduction of the quadrivalent vaccine in the Brazilian calendar would avoid challenging predictions and their respective public health consequences.

Future phylodynamics and phylogeographic studies, including a representative sample of the North and Northeast, are critical to confirm these initial findings. Understanding the viral and epidemiological dynamics within Brazil is pivotal to tailor the public preventive policies.

**Keywords:** Influenza B; vaccine mismatch; phylogeny

## VAC 04 - Teste de ativação de monócitos para monitoramento da atividade pirogênica na vacina de febre amarela

Vítor Fernandes Silva<sup>1</sup>; Alessandra Santos Almeida<sup>1\*</sup>; Elaine Cristina Azevedo Navega<sup>1</sup>; Cristiane Caldeira da Silva<sup>2</sup>; Octávio Augusto França Presgrave<sup>2</sup>; Isabella Fernandes Delgado<sup>2</sup>; Katherine Antunes de Mattos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz;

<sup>2</sup>INCQS / Fiocruz.

### Introdução:

O controle total da qualidade em produtos farmacêuticos encerra o esforço organizado de uma empresa com o escopo manter e assegurar as características específicas unitárias do produto distribuído para comercialização. Nesse contexto, é mandatório que os agentes parenterais de uso humano e animal tenham sua atividade pirogênica monitorada. Em consonância com a tendência mundial de substituição do uso de animais, o Teste de Ativação de Monócitos (MAT) foi aceito pela Farmacopeia Europeia como método *in vitro* que utiliza matriz monocítica humana para detecção de pirogênicos. O MAT supre limitações dos testes pirogênicos atuais: o Teste de Endotoxina Bacteriana (LAL) e o Teste de Pirogenia em coelhos.

### Objetivo:

Investigar fontes pirogênicas diversas não detectáveis pelo método descrito na monografia da vacina de febre amarela (VFA). Foram avaliados, pelo método do MAT, 3 lotes de VFA produzidos por Bio-Manguinhos.

### Metodologia:

Os sistemas do MAT combinaram a utilização de matrizes monocíticas (sangue total fresco e criopreservado) e a detecção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 $\beta$ ) como parâmetros de leitura. Lipopolissacarídeo (LPS), ácido lipoteicoico (LTA) e zymozan A (ZA) foram utilizados como padrões moleculares associados à pirogenia de Gram-negativas, positivas e fungos, respectivamente. Foram avaliados lotes de VFA-10 doses produzidos por Bio-Manguinhos. Estes foram incubados em contato com a matriz monocítica em estufa de CO<sub>2</sub> a 37° C e após 16 horas foram quantificadas IL-1 $\beta$  e IL-6 pelo ensaio de ELISA (R&D Systems). Em paralelo, os lotes foram analisados frente ao método farmacopeico que detecta apenas endotoxina, o LAL.

**Resultado:**

A validação produto específica, VFA frente ao MAT, mostra aplicabilidade do teste ao produto utilizando diluições 1:10. O sistema foi capaz de identificar NEPs (LTA e ZA) exógenos na presença de VFA. Análises estatísticas demonstraram uma boa correlação entre os sistemas de leituras (IL-1 $\beta$  e IL-6) para curvas de LPS em salina ( $r=0.9956$  and  $p<0.0001$ ) e em VFA ( $r=0.9972$  and  $p=0.0028$ ). Os ensaios de linhas paralelas das curvas de LPS e LTA em salina versus VFA demonstraram que o P-valor para o não-parallelismo não foi significativo para IL-1 $\beta$  e IL-6 ( $p > 0,05$ ). Os ensaios quantitativos demonstraram que os lotes foram considerados não-pirogênicos, reforçando os resultados obtidos pelo LAL, respeitando assim, os parâmetros específicos da monografia do produto.

**Conclusão:**

O presente estudo demonstrou a susceptibilidade da VFA à análise pelo MAT, observando uma correlação positiva com LAL e a análise diferencial e quantitativa de NEPs como potenciais alvos de contaminação na indústria. Os resultados reforçam a possibilidade da redução de animais para fins industriais, atendendo à tendência mundial, além de um controle investigativo e preventivo de contaminantes outros não identificados pelo método atual, oferecendo um controle adicional aos produtos do portfólio de Bio-Manguinhos.

**Palavras-chave:** Teste de Ativação de Monócitos; Vacina de Febre Amarela; Métodos Alternativos

## **VAC 05 - Avaliação das condições de inativação do vírus Zika por $\beta$ -Propiolactona e das metodologias do processo**

Marta Cristina de Oliveira Souza<sup>1\*</sup>; Mariana Pierre de Barros Gomes<sup>1</sup>; Liliâne Monteiro de Moraes<sup>1</sup>; Gisela Freitas Trindade<sup>1</sup>; André da Silva Tavares<sup>1</sup>; Luiz Gustavo Almeida Mendes<sup>1</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>; Elena Caride<sup>1</sup>; Marcia Archer da Motta<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

O Brasil esteve em estado de emergência internacional de fevereiro a novembro de 2016 em decorrência da epidemia de Zika que vem afetando o país desde 2015. A infecção pelo vírus Zika, em humanos, causa febre, exantema, dores musculares e nas articulações, mal-estar e cefaleia. Complicações desta infecção estão associadas a casos de microcefalia, síndrome de Guillain-Barré e outros distúrbios neurológicos. Atualmente, não existe vacina para evitar a doença. Neste contexto, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) tem direcionado esforços para o desenvolvimento de uma vacina inativada segura contra o vírus Zika e para o estabelecimento de metodologias confiáveis para análise deste processo.

### **Objetivo:**

Testar diferentes condições de inativação do vírus Zika e avaliar a eficácia do conjunto de metodologias aplicado para confirmação da inativação.

### **Metodologia:**

Sobrenadantes virais provenientes do cultivo de células Vero em meio livre de soro, com diferentes graus de purificação (clarificado, primeira e segunda etapas) e na presença ou não de estabilizante, foram submetidos à inativação química. As condições de inativação incluíram a concentração do agente inativante  $\beta$ -Propiolactona e o tempo de incubação. Amostras foram coletadas para avaliação da inativação por titulação viral, imunofocus, passagens cegas em cultura celular e PCR em tempo real. As passagens cegas foram realizadas inoculando-se o material inativado em células Vero por 3-4 dias e nesse período, observou-se a ocorrência de efeito citopático na monocamada celular. Cinco passagens cegas foram realizadas, além da

quantificação do vírus zika no sobrenadante de pelo menos 3 dessas culturas por PCR em tempo real.

### **Resultado:**

O grau de pureza do vírus e a presença do estabilizante influenciam as condições de inativação. As cinéticas de inativação realizadas utilizando material clarificado (sem estabilizante) mostraram que na menor concentração de  $\beta$ -Propiolactona o vírus foi inativado em 24h. Por outro lado, amostras mais puras, ou na presença do estabilizante, exigiram maior tempo de inativação ou maior concentração do agente inativante. A cinética de inativação do material com 2 etapas de purificação (com estabilizante) exigiu, além de maior concentração de  $\beta$ -Propiolactona, incubação de 72h para inativação. As metodologias empregadas para avaliar os resultados mostraram maior confiabilidade quando analisadas conjuntamente. Nas passagens cegas, além da ausência do efeito citopático (visual), a constatação da não replicação viral por PCR conferiu maior segurança na análise dos resultados. Além disso, a reação específica envolvendo interação antígeno/anticorpo empregada na revelação por imunofocus, mostrou maior confiança na avaliação dos resultados quando comparada à quantificação utilizando revelação tradicional com cristal violeta.

### **Conclusão:**

Através dos testes de inativação realizados, será possível selecionar um protocolo de inativação para testes de uma futura vacina contra o vírus Zika. As metodologias selecionadas nos permitiram avaliar com segurança a eficiência do processo de inativação para os diferentes graus de pureza do vírus Zika.

**Palavras-chave:** Zika vírus; inativação;  $\beta$ -Propiolactona

## **VAC 06 - Avaliação da resposta celular e humoral induzida pela vacina Meningocócica C conjugada desenvolvida em Bio-Manguinhos**

Etiene Moreira Gabriel<sup>1\*</sup>; Denise Pereira<sup>1</sup>; Fernanda Martins<sup>1</sup>; Maria de Lourdes Leal<sup>1</sup>; Patrícia Neves<sup>1</sup>; Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira<sup>1</sup>; Ana Paula dos Santos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

Bio-Manguinhos está desenvolvendo uma vacina meningocócica C conjugada (MenCBio), utilizando a proteína tetânica como carreadora, pelo método de aminação redutiva modificado, que foi capaz de induzir altos títulos de anticorpos com elevada atividade bactericida nos testes clínicos de Fase I e II já realizados. Entretanto, o processo de produção da vacina foi otimizado para obtenção de melhores taxas de conjugação antes de ser escalonado para obtenção de lotes industriais e realização de estudos clínicos de FaseII/III em 2017.

### **Objetivo:**

Ampliar o estudo da imunogenicidade da MenCBio, avaliando a resposta celular e humoral obtida em camundongos com a vacina obtida em escala industrial, em comparação com a vacina comercial NeisVac-C®.

### **Metodologia:**

Grupos de camundongos suíços foram imunizados com 3 doses i.m. e uma dose reforço com 1 µg/dose/imunógeno, com 15 dias de intervalo. Foram avaliados: títulos totais de anticorpos (IgG) e índice de avidéz (IA) por ELISA; funcionalidade dos anticorpos pelos ensaios bactericidas (SBA); existência de células de memória e plasmócitos de curta e longa duração em baço e medula e além da produção de citocinas (IL-2), pelos ensaios de ELISPOT; resposta linfocitária, utilizando anticorpos monoclonais para análise fenotípica por citometria de fluxo.

### **Resultado:**

Foram elevados títulos de IgG para ambas as vacinas, no T45 dias (299 EU/mL MenCBio; 147 EU/mL NeisVac-C®) e após reforço (629 EU/mL para MenCBio e 984 EU/mL NeisVac-C®), onde estas doses aumentaram gradativamente a

avidez dos mesmos (IA= 0,15 e IA = 0,21M, para MenCBio e IA = 0,17 e IA 0,22 para NeisVac-C®). Os elevados títulos bactericidas comprovaram a funcionalidade destes anticorpos em promover lise bacteriana no T45 e pós-reforço ( $2^{10}$  e  $2^{11}$  para MenCBio e  $2^{11}$  e  $2^{12}$  para NeisVac-C®). Nos ensaios de ELISPOT, foi observada a presença de células produtoras de citocinas (IL-2: MenCBio 7 spots/ $10^6$  células e NeisVac-C® 2 spots/ $10^6$  células), e de células produtoras de anticorpos IgG específicos no baço (MenCBio  $10^8$  spots/ $10^6$  células e NeisVac-C® 12 spots/ $10^6$  células) e na medula (MenCBio 260 spots/ $10^6$  células e NeisVac-C® 38 spots/ $10^6$  células) 5 meses após a 1ª dose.

### **Conclusão:**

A vacina desenvolvida por Bio-Manguinhos é imunogênica, os camundongos imunizados apresentaram altos títulos de anticorpos IgG específicos, com avidez, e funcionalidade bactericida desejada (>22), e produção de citocinas (IL-2), demonstrando a capacidade de ativação da resposta T-dependente da vacina. A presença de células produtoras de anticorpos específicos na medula demonstra que a vacina é capaz de estimular plasmócitos de longa duração, que funcionam como células de memória, produzindo anticorpos com alta afinidade e conferindo proteção persistente, necessária ao reencontro com o patógeno para conter o início súbito da doença.

**Palavras-chave:** *Neisseria meningitidis*; Vacinas conjugadas; Resposta imunológica

## **VAC 07 - Autonomia e redução de custo no controle do imunógeno da vacina inativada de poliomielite (IPV): teste de identidade do antígeno D.**

Priscila Ramos Coimbra Martins<sup>1\*</sup>; Joyce Brito de Carvalho Coelho<sup>1</sup>; Beatriz Cyranka<sup>1</sup>; Greice Maria Silva da Conceição<sup>2</sup>; Maria Teresa Dias Ferreira<sup>4</sup>; Luiz Augusto Pinto Lima<sup>5</sup>; Erica Louro da Fonseca<sup>1</sup>; Patrick Guyot<sup>3</sup>; Pedro Augusto Alves<sup>6</sup>.

1 Bio-Manguinhos - Seção de Técnicas Biomoleculares e Imunocitoquímica/SETBI.

2 Bio-Manguinhos - Seção de Documentação/SEDOC.

3 Sanofi-Pasteur – Global Tech Transfer Project.

4 Bio-Manguinhos – Seção de Meios de Cultura/SEMEC.

5 Bio-Manguinhos - Seção de Validação Analítica/SEVAN.

6 Centro de Pesquisa René Rachou - Laboratório de Imunologia de Doenças Virais.

### **Introdução:**

No Brasil, o último caso de poliomielite pelo poliovírus selvagem ocorreu em 1989. Cinco anos depois, a doença foi considerada erradicada no país pela Organização Pan-Americana de Saúde, fruto da participação efetiva do Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos). Atualmente, nos países livres da doença, a Organização Mundial de Saúde recomenda que o programa de imunizações contemple a vacina de poliomielite inativada (IPV), a fim de eliminar o efeito adverso da paralisia associada à vacinação com OPV (vacina de poliomielite oral) e a reintrodução do vírus. Além disso, os países onde a poliomielite é endêmica devem desenvolver um plano para a introdução da IPV. A vacina é produzida com os três sorotipos do vírus selvagem (tipos 1, 2 e 3), inativados com formalina. A vacinação confere imunidade tipo-específica contra a porção imunogênica, denominada antígeno D. Em agosto de 2012, Bio-Manguinhos (BM) assinou um acordo com a empresa Sanofi-Pasteur (SP) para a transferência de tecnologia da produção da vacina, que inclui os testes de controle de qualidade. Entre eles, está o imunoensaio de identidade do antígeno D de cada um dos três sorotipos, realizado pela Seção de Testes Biomoleculares e Imunocitoquímica (SETBI). A execução do teste está vinculada à necessidade de importação de três insumos franceses: água, leite em pó

e solução tampão salina-fosfato (PBS), representando dependência técnica e custo perenes.

### **Objetivo:**

A fim de solucionar essa questão, os analistas da qualidade da SETBI propuseram à detentora da tecnologia a substituição dos insumos importados por nacionais, mediante a comprovação de equivalência.

### **Metodologia:**

Assim, quatro etapas foram definidas para os testes comparativos, utilizando-se 10 resultados por etapa: água (importada SP X água para injetáveis BM); leite em pó (importado SP X Itambé semidesnatado); PBS (importado SP X BM); e a substituição concomitante dos três insumos. Para o controle dos ensaios, foram utilizados um controle interno e uma vacina referência. Na análise de equivalência, foi empregado o programa estatístico R para os testes de hipótese, Valor Extremo (X2), de Normalidade de dados (Anderson-Darling), Teste F para a comparação de duas variâncias e o Teste-t para a comparação de duas médias. O nível de significância estipulado foi de 5%.

### **Resultado:**

Como resultado, os testes retornaram uma probabilidade  $p > 0,05$  em todas as etapas comparativas, indicando que os resultados obedeciam a uma distribuição Normal, e que as variâncias amostrais e médias eram equivalentes.

### **Conclusão:**

As análises estatísticas foram encaminhadas à Sanofi-Pasteur, que aprovou a substituição dos insumos, minimizando custos com importações, ratificando a qualidade dos reagentes e utilidades produzidos em Bio-Manguinhos e, não somente assegurando a autonomia no uso dos insumos nacionais a este Instituto, mas também, em consequência ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz), para o controle da qualidade dos lotes distribuídos da vacina.

**Palavras-chave:** redução de custo; antígeno D; IPV

## **V 08 - Avaliação de alternativas para a abertura de ovos *spf* no DEVIR**

Cíntia Cardoso da Costa<sup>1\*</sup>; Carla Mônica Pinheiro<sup>1</sup>; Claudia Maria Lopes Leibel<sup>1</sup>; Wania Renata dos Santos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

A produção em Bio-Manguinhos do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) da vacina febre amarela atenuada e dos IFA de sarampo e caxumba, componentes da vacina TVV (contra sarampo, caxumba e rubéola) envolve a multiplicação viral em plataforma de embriões de galinha SPF (livres de agentes patogênicos) ou derivados (fibroblastos).

Os métodos utilizados atualmente para a abertura das cascas dos ovos e coleta dos embriões apresentam um potencial de geração de partículas totais no monitoramento ambiental o que não é desejável em ambientes classificados.

### **Objetivo:**

Esse trabalho propõe a busca por novas tecnologias para melhoria no processo de abertura de ovos SPF utilizados na produção do IFA de febre amarela e dos IFA de sarampo e caxumba, componentes da vacina TVV.

### **Metodologia:**

Foram testados cortadores a laser e cortadores pneumáticos no processo de abertura de ovos.

### **Resultado:**

O protótipo de cortador a laser demonstrou um corte preciso das cascas dos ovos. Entretanto, o tempo necessário para abertura de cada ovo foi inicialmente alto e após aperfeiçoamento pela empresa obteve-se um tempo médio de 4s para cada ovo, mas com aumento no custo para aquisição do equipamento. Houve também evidente geração de particulado durante o processo e mesmo com o posicionamento do exaustor próximo aos ovos, o monitoramento de partículas mostrou valores muito acima dos limites especificados para áreas de grau A. Os cortadores pneumáticos permitiram agilidade compatível ao processo de abertura de ovos para produção dos IFA de caxumba e sarampo, além do custo mais acessível do equipamento. Os níveis de partículas totais alcança-

dos nesses testes foram satisfatórios para áreas de grau A.

**Conclusão:**

O cortador pneumático apresentou os melhores resultados, sendo mais leve e prático, conferindo também, mais flexibilidade e agilidade no seu manuseio o que otimizou o tempo de processo de abertura de ovos. O processo foi visivelmente mais limpo (sem extravasamento da clara), percebido também através da contagem de partículas totais. Houve a manutenção da integridade da membrana alantoide, levando a um maior rendimento dos embriões coletados. Além disso a logística envolvendo os materiais utilizados nos processos foi ainda reduzida com o uso deste equipamento.

**Palavras-chave:** Processos de produção de IFA; febre amarela, sarampo, caxumba; Ovos spf.

## **VAC 09 - Avaliação do risco de biossegurança para a produção de vacina febre amarela de subunidade utilizando plataforma vegetal**

Rosane Cuber Guimarães<sup>1\*</sup>; Marcos da Silva Freire<sup>1</sup>; Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz;

<sup>2</sup>INCQS / Fiocruz.

### **Introdução:**

O uso de células vegetais e plantas inteiras para sintetizar proteínas que são posteriormente processadas, reguladas e vendidas como medicamentos já é uma realidade mundial. Todavia, o uso de culturas alimentares para a produção de proteínas recombinantes tem sido associado mundialmente a um sentimento negativo entre grupos de consumidores e a indústria alimentícia, o que levou a agência regulatória americana FDA a adotar uma política de “tolerância zero” com relação a liberação de transgenes de plantas produtoras de biológicos e contaminação de plantações de culturas alimentares (FDA, 2002). Uma extensa revisão sobre o assunto foi publicada, demonstrando a necessidade de se realizar uma avaliação do risco para se determinar o impacto da planta geneticamente modificada na saúde humana e animal e no meio-ambiente.

### **Objetivo:**

Este trabalho teve como objetivo avaliar o risco de biossegurança da produção do antígeno de febre amarela em plantas.

### **Metodologia:**

A avaliação do risco de biossegurança no desenvolvimento da vacina de Febre Amarela na plataforma de expressão transiente em *Nicotiana benthamiana*, foi realizada através do uso do software BioRAM.exe versão 1.0. A avaliação foi realizada nas áreas onde se tem a presença de OGM no processo produtivo da vacina de Febre Amarela. Foram avaliadas separadamente as áreas de: pré-inóculo/fermentação; agroinfiltração; crescimento de plantas pós infiltração; colheita/homogeneização e clarificação e o agente biológico avaliado foi o *Agrobacterium tumefaciens*. O processo de avaliação foi realizado através do preenchimento de tabelas existentes no software que são divididas em componentes, para avaliar os agentes biológicos que existem na área/instalação;

avaliar os processos e procedimentos da área/ instalação; avaliar as medidas de mitigação risco biológico em prática. Dentro de cada componente existem vários critérios e subcritérios que são pontuados de forma independente. Estas pontuações foram ponderadas e depois compiladas para fornecer uma pontuação geral de consequência e probabilidade.

**Resultado:**

Nossos resultados demonstram um risco de biossegurança muito baixo para este processo. Os valores variaram de 0,5 a 1 no eixo consequência e de 0,5 a 1,5 no eixo da probabilidade, numa escala que vai de 0 a 4, e que é classificada como risco muito baixo, baixo, moderado, alto e muito alto. Estes dados podem ser explicados pelo fato da agrobactéria ser considerada um agente biológico de classe de risco 1 por não causar doenças em seres humanos e animais. Esses resultados são influenciados pela via de exposição, mas também pelas medidas de mitigação em biossegurança, que nesta plataforma de produção vegetal refletiu-se na contenção e no nível de automação dos processos avaliados.

**Conclusão:**

Este resultado de risco de biossegurança muito baixo corrobora vários trabalhos publicados, onde as instalações para a produção do produto derivado de planta em contenção, foram classificadas como nível de biossegurança 1.

**Palavras-chave:** Plantas Produtoras de Biológicos; Vacina de Febre Amarela de Subunidade; Análise de Risco de Biossegurança

## **VAC 10 - Proposta de revisão da RDC 69 8/12/2014, para a produção de vacina de febre amarela de subunidade utilizando plataforma vegetal**

Rosane Cuber Guimarães<sup>1\*</sup>; Marcos da Silva Freire<sup>1</sup>; Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

Embora progressos significativos tenham sido feitos em plataforma vegetal, a produção comercial de proteínas farmacêuticas foi impedida, até recentemente, pela ausência de um quadro regulamentar coerente. Legislações desenvolvidas em conjunto pelo Departamento Americano de Agricultura (USDA) e a Agência Regulatória Americana (FDA) em 2002/2003, são flexíveis em termos das plataformas envolvidas e da interpretação de guias de BPF. A Agência Europeia de Medicamentos (EMA) baseou em 2009 as suas diretrizes em modelos existentes para células de mamíferos, o que é ineficiente quando aplicado a plantas transgênicas. Uma nova diretriz para estudos clínicos foi publicada em 2012, na União Européia, estipulando que todos os produtos biofarmacêuticos destinados a estudos clínicos de fase I devem ser fabricados de acordo com as BPF. A importância de conformidade com as BPF é agora relevante desde o momento inicial do desenvolvimento clínico. O êxito no desenvolvimento de diretrizes de BPF é sem dúvida o avanço mais importante no desenvolvimento comercial da plataforma vegetal.

### **Objetivo:**

Avaliar os riscos à qualidade da produção do antígeno de Febre Amarela em plantas usando a ferramenta HACCP para verificar a aderência da plataforma vegetal às BPF vigentes no Brasil.

### **Metodologia:**

Para a aplicação de HACCP neste trabalho foi elaborado um fluxograma de todas as etapas do processo e a descrição detalhada do mesmo. O fluxograma foi comparado com as respectivas operações através do acompanhamento *in loco* dos processos realizados em três visitas a planta piloto da Fraunhofer. Foram listados todos os pontos críticos de controle (PCC), parâmetros de controle

e os limites críticos foram especificados. Estes valores foram obtidos por determinação previa para produtos biológicos e considerados mandatórios pelo FDA, EMA e OMS; referências bibliográficas de processos similares; e reprodutibilidade do processo após a produção de 3 lotes de 5 kg do antígeno da vacina de febre amarela de subunidade.

**Resultado:**

O processo de fabricação foi dividido em três fases principais. Na fase de manutenção do estoque, os pontos críticos identificados foram a planta hospedeira e a bactéria contendo o vetor de expressão para o antígeno. Com relação à planta hospedeira, temos como PCC as sementes. Na fase “upstream” foram identificados 7 PCC com o estabelecimento de 9 controles em processo e 16 parâmetros operacionais críticos. Na fase “downstream” foram identificados 5 PCC com o estabelecimento de 9 controles em processo e 14 parâmetros operacionais críticos. Estes pontos foram confrontados com o que está estabelecido na RDC 69 e revisões foram propostas ao longo do documento, mais especificamente no capítulo XVIII.

**Conclusão:**

Este trabalho levantou, através de análise de risco à qualidade, quais pontos devem ser inspecionados e inseridos em uma RDC de BPF para produtos produzidos em plataforma vegetal, que orientem produtores e Agências Regulatórias nas inspeções de registros de produtos desta natureza.

**Palavras-chave:** Plantas Produtoras de Biológicos; Regulação; Análise de Risco à Qualidade

## **VAC II - Avaliação da performance de secagem em diferentes frascos para produtos imunobiológicos em um processo de liofilização**

Patricia Alvarenga Agra<sup>1\*</sup>; Sérgio Luiz de Lima Assumpção<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

A liofilização é um processo de preservação largamente utilizado em processos biotecnológicos onde a água (solvente) contida em soluções farmacêuticas após o congelamento é removida de maneira controlada, primeiramente por sublimação (secagem primária) e em seguida por dessorção (secagem secundária).

### **Objetivo:**

Estudar a performance de diferentes tipos de frascos produzidos em vidros borossilicato (tipo 1) quanto à cinética de perda de massa de água durante as fases primária e secundária de um processo de liofilização.

### **Metodologia:**

O trabalho consistiu em utilizar um ciclo único de liofilização para o processamento de 16 lotes experimentais de formulação vacinal envasada na faixa de 0,50 a 0,55ml nos seguintes tipos de frasco: 4,0 ml-Bio (1), DIN 2R (2), 4,0ml-Schott ((frasco com menor raio de fundo com maior contato superfície/prateleira (3) e 6,5 ml (4). Para o processamento de cada lote, foram avaliados cerca de 100 frascos, previamente pesados e identificados quando do envase dos mesmos, de um total máximo de 865 frascos alocados em uma bandeja do liofilizador piloto Lyoflex. Ao longo das fases primárias e secundárias, esses frascos foram colhidos da câmara de liofilização em intervalo de uma hora para imediata pesagem, titulação coulométrica e registro de dados em planilha. Os dados experimentais registrados foram tratados matematicamente, com a utilização do Origin 8.5Pro e posterior obtenção das curvas representativas da perda de massa de água da formulação vacinal, em função do tipo de frasco utilizado para o processamento.

### **Resultado:**

O monitoramento da fase primária mostrou que, para uma perda de massa de água da ordem de 95%, os lotes alcançavam esse nível de redução após cerca de

5 horas (frasco 6,5ml-Bio), 13h (frascos 4.0ml-Schott e Bio) e 15 horas (frasco DIN 2R). Já na fase secundária, os resultados mostraram que após cerca de 10h, os lotes processados com diferentes tipos de frascos já alcançam reduções da ordem de 99%.

### **Conclusão:**

O trabalho proposto (ganho 30%), mostra a correlação entre a embalagem primária (tipo de frasco) com a velocidade do processo (cinética de secagem) e consequentemente com o tempo total do ciclo de liofilização. O conhecimento destas correlações, auxilia na definição das condições de processamento mais adequadas ao design de processos novos ou mesmo no gerenciamento de processos de liofilização já estabelecidos. Entretanto, a escolha do frasco é apenas uma das variáveis a ser considerada no enorme leque de vínculos que uma formulação liofilizada possui quando questões de aumento de capacidade, redução de custos e otimizações são avaliadas.

**Palavras-chave:** frascos farmaceuticos tipo 1(vidro em borossilicato); liofilização; massa reduzida

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

Jéssica Malherios<sup>1\*</sup>; Gisela Freitas Trindade<sup>1</sup>; Denise Cristina de Souza Matos<sup>1</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>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 mono-plex e bi-plex 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 reproduzível, o que facilita a tomada de decisões durante o processo.

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

## **VAC 13 - Ensaios clínicos: como definir febre pela aferição da temperatura axilar?**

Reinaldo de Menezes Martins<sup>1</sup>; Eliane Matos dos Santos<sup>1</sup>; Janaina Reis Xavier<sup>1</sup>; Thalita da Matta de Castro<sup>1</sup>; Patricia Mouta Nunes de Oliveira<sup>1\*</sup>; Paulo Roberto Gomes dos Santos<sup>1</sup>; Maria de Lourdes de Sousa Maia<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

Em ensaios clínicos, uma das melhores maneiras de avaliar a segurança das vacinas é por meio da aferição da temperatura, mas a definição de febre tem sido uma questão embaraçosa. A Brighton Collaboration propôs  $\geq 38^\circ\text{C}$  como ponto de corte, independentemente do método de aferição. Como no Brasil o método culturalmente aceito para aferir a temperatura é o axilar, esse ponto de corte é controverso, e a maioria dos estudos clínicos adota limites menores, mas faltam dados sólidos que permitam uma recomendação fundamentada. Os estudos que adotaram ponto de corte para febre temperatura axilar (Tax)  $\geq 38^\circ\text{C}$  podem dar uma ideia errada da frequência deste evento e não ser comparáveis aqueles com mesmo ponto de corte nos quais as temperaturas tenham sido aferidas por termômetro oral ou retal.

### **Objetivo:**

Propor uma definição de febre a partir da temperatura axilar em ensaios clínicos.

### **Metodologia:**

Nos ensaios clínicos realizados pela Assessoria Clínica/Bio-Manguinhos/Fiocruz, a Tax dos participantes da pesquisa é aferida antes e após a vacinação em horários regulares. A aferição antes da vacinação é realizada por um enfermeiro, normalmente pela manhã, utilizando termômetro de mercúrio, durante três minutos. Cada indivíduo tem apenas uma Tax registrada antes da vacinação. Para esta análise foram selecionados 4 ensaios clínicos que incluíram diferentes faixas etárias: 2 meses de idade (n=891), de 12 a 15 meses de idade (n=581), 4 a 11 anos de idade (n=280), adultos jovens adultos saudáveis (n=894). Todos os ensaios foram realizados no Rio de Janeiro, cidade de verões quentes e invernos suaves. As temperaturas foram obtidas em diferentes épocas do ano, incluindo

meses frios e quentes. A análise estatística e os gráficos foram realizados no Medcalc, versão 17.1, 201

**Resultado:**

Os percentis 5 e 95 para a Tax permaneceram na faixa de 35,6°C a 37°C em todos os grupos etários antes da vacinação e os intervalos de confiança do percentil 95 permaneceram entre 36,7°C e 37°C. Os histogramas de frequência das temperaturas mostraram distribuição normal ou aproximadamente normal. Assim, as temperaturas axilares foram notavelmente estáveis. É provável que tenha ocorrido algum arredondamento das temperaturas, mas isso não afeta a sua avaliação geral, principalmente das temperaturas máximas.

**Conclusão:**

Parece razoável estabelecer 37°C como limite superior de aceitação da Tax normal, ou seja, o limite superior do intervalo de confiança de 95% das temperaturas axilares de lactentes saudáveis, crianças e adultos jovens. No entanto, alguns participantes saudáveis atingiram temperaturas entre 37°C e 37,5°C. Além disso, a maioria dos participantes tinha temperaturas aferidas pela manhã, e no final da tarde as temperaturas poderiam aumentar em cerca de 0,5°C. Concluindo, 37,5°C poderia ser o ponto de corte para febre em estudos clínicos. De fato, para a maioria de nossos estudos clínicos estabelecemos esse critério, que nos tem atendido satisfatoriamente.

**Palavras-chave:** Definição de febre; Ensaio clínico; Temperatura axilar

## **VAC 14 - Aumento da capacidade produtiva do insumo farmacêutico ativo da vacina febre amarela atenuada de Bio-Manguinhos**

Caroline Moura Ramirez<sup>1\*</sup>; Julio Cesar Rodrigues Coelho<sup>1</sup>; Renato Becho Moura<sup>1</sup>; Luiz Gustavo Almeida Mendes<sup>2</sup>; Marisa Xavier Souza<sup>3</sup>; Vanessa Alvaro Diniz<sup>4</sup>; Anderson Peclat Rodrigues<sup>4</sup>; Wania Renata dos Santos<sup>5</sup>; Celso Farias Crespo<sup>6</sup>; Daniele Alves de Oliveira<sup>7</sup>.

1Bio-Manguinhos / Fiocruz, Laboratório de Febre Amarela;

2Bio-Manguinhos / Fiocruz, Laboratorio de Tecnologia Virologica;

3Bio-Manguinhos / Fiocruz, Programa de Vacinas Virais;

4Bio-Manguinhos / Fiocruz, Seção de Potência;

5Bio-Manguinhos / Fiocruz, Departamento de Vacinas Virais;

6Bio-Manguinhos / Fiocruz, Núcleo de Liofilização Experimental;

7Bio-Manguinhos / Fiocruz, Divisão de Formulação/ Departamento de Processamento Final.

### **Introdução:**

Segundo a OMS a reserva mundial da vacina febre amarela atenuada é limitada e o seu uso deve ser priorizado para as populações de maior risco. Em 2016 houve na África um surto com cerca de 400 óbitos que demandou um esforço para vacinação em massa no continente. Segundo o Ministério da Saúde, entre dez/2016 e março/2017 foram registrados no Brasil 127 óbitos confirmados e 1500 casos suspeitos notificados. Baseado nisto Bio-Manguinhos inseriu em seu Projeto de Melhorias da Vacina Febre Amarela alternativas para ampliar o seu potencial produtivo. Uma das melhorias priorizadas é a de otimização da produção do insumo farmacêutico ativo (IFA) na etapa de trituração.

### **Objetivo:**

Aumentar a capacidade produtiva do IFA da Vacina Febre Amarela Atenuada no Laboratório de Febre amarela (LAFAM) focando na etapa de trituração.

### **Metodologia:**

A produção do IFA consiste na inoculação do vírus cepa 17DD em embriões de galinha. Após a replicação viral, os embriões são coletados e triturados juntamente com água para injetáveis (WFI), em seguida são centrifugados e

o sobrenadante é estabilizado. Nesse estudo foram analisadas diferentes proporções entre os volumes de embriões e WFI e o seu respectivo impacto na potência do IFA. Foram testadas as seguintes proporções embrião : WFI (em volume) - Controle (6:1); Grupo A (5:2); Grupo B (4:3); Grupo C (3:4) e Grupo D (2:5). O grupo controle corresponde à proporção atualmente utilizada no processo produtivo.

### **Resultado:**

Foram analisados os resultados de potência e ovoalbumina residual dos IFAs produzidos nos grupos para selecionar aqueles que permanecessem dentro das especificações estabelecidas para IFA conforme processo atual. No parâmetro potência os grupos experimentais A, B e C se mantiveram dentro das especificações, enquanto o grupo D não seria aprovado. A repetição do teste para os grupos C e D corroboraram o resultado anterior e o IFA do grupo C foi selecionado para a produção de uma vacina experimental que foi aprovada em todos os controles de qualidade, incluindo o teste de termoestabilidade acelerada.

### **Conclusão:**

Este estudo indica que a proporção embriões/ WFI hoje utilizada poderá ser otimizada, obtendo-se volumes de produção maiores do IFA com a mesma quantidade de ovos. Além disso, todos os grupos experimentais testados apresentaram concentrações de ovoalbumina residual bem menores que as obtidas no processo atual, o que aumenta a pureza do produto agregando qualidade. Temos assim a possibilidade ampliação de produção do IFA com um baixo investimento logístico e financeiro. O próximo passo será a utilização da proporção embriões/ WFI otimizada na produção de um lote de vacina piloto em escala industrial que avaliará os impactos da nova proporção no processo produtivo da Vacina Febre Amarela.

**Palavras-chave:** Febre Amarela Atenuada; Aumento da Capacidade Produtiva; Insumo Farmacêutico Ativo

## VAC 15 - Proposta de formulação intranasal para vacinas bacterianas

Isabelly Santos Pereira<sup>1\*</sup>; Mariana Miguez<sup>1</sup>; Ana Paula Argondizzo<sup>1</sup>; Ana Maria Pereira dos Santos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### Introdução:

Pneumonia pneumocócica e meningite bacteriana são importantes causas de infecção, afetando crianças e jovens sendo adquiridas pelo trato respiratório. A pneumonia pneumocócica é responsável mundialmente por 15% dos óbitos em crianças. Meningites bacterianas, mais especificamente a meningite meningocócica C, são as principais responsáveis pelos surtos de meningite do Brasil, com elevados índices de sequelas nos sobreviventes.

Todas as vacinas contra infecções bacterianas presentes no calendário de vacinação possuem via de administração intramuscular, entretanto a via de mucosa pode ser uma opção relevante, uma vez que o primeiro contato com o sistema imune para estas enfermidades ocorre pela via respiratória. A produção de vacinas de mucosa pode ser menos dispendiosa que a produção de vacinas injetáveis, além de ser uma via de administração não invasiva e sem utilização de agulhas, o que eleva a aceitação e adesão à imunização, principalmente em crianças, o principal alvo na imunização contra estas infecções.

### Objetivo:

Propor uma plataforma de formulação a ser aplicada às vacinas bacterianas, tendo por base a tecnologia de encapsulamento do princípio ativo com uso de polímero, bem como realizar a caracterização e avaliar a eficácia potencial das formulações obtidas.

### Metodologia:

O insumo farmacêutico ativo para a meningite meningocócica C, foi obtido no Laboratório de Tecnologia Bacteriana (LATEB) e para a vacina pneumocócica foi produzido por expressão heretóloga em *Escherichia coli* no Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER). As formulações foram realizadas pelo processo de precipitação, empregando diferentes concentrações do polímero quitosana (de A até D) e diferentes sais para cada insumo: sulfato de sódio para

a formulação de pneumonia pneumocócica e citrato de sódio para meningite meningocócica. A eficiência de encapsulamento foi avaliada por quantificação proteica (metodologia BCA). O tamanho das partículas obtidas foi avaliado pela técnica de laser *light scattering* dinâmico e a estabilidade das formulações foi avaliada pela medição do potencial zeta. A identidade do antígeno nas formulações foi avaliada por *dot blot* e *western blot*.

### **Resultado:**

Foram obtidas promissoras taxas de carregamento, aproximadamente 50% para formulação pneumocócica a 80% para a formulação meningocócica, em função das concentrações de quitosana. Para tamanho de partículas, obteve-se 80% das partículas menores que 1  $\mu\text{m}$  para a formulação pneumocócica e 99,5% das partículas menores que 1  $\mu\text{m}$  para a meningocócica. Potencial zeta para as formulações com quitosana na condição D revelou partículas estáveis para a formulação meningocócica (40 mV), quanto à formulação pneumocócica. A estabilidade ainda não alcançou resultados satisfatórios pois a menor taxa de carregamento promoveu heterogeneidade e instabilidade. Ambas as formulações apresentaram identidade positiva para os ensaios de imunoblotting.

### **Conclusão:**

A proposta de formulação apresentada pode ser considerada promissora e ser aplicada como base para novos estudos a fim de viabilizar a imunização de mucosa como uma alternativa futuras abordagens em vacinas bacterianas.

**Palavras-chave:** vacinas bacterianas; mucosa; quitosana

## **VAC 16 - Aumento do volume de preparo do estabilizador da vacina febre amarela atenuada produzida por Bio-Manguinhos**

Fred Luiz Furriel de Oliveira<sup>1\*</sup>; Livia Queiroz Ferreira<sup>1</sup>; Vanessa Barreto de Brittes<sup>1</sup>; Marcos Antonio Rodrigues Gomes<sup>1</sup>; Anderson Alex da Silva<sup>1</sup>; Andre Luiz Pires<sup>1</sup>; Marisa Xavier Souza<sup>1</sup>; Wania Renata dos Santos<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

O Ministério da Saúde divulgou recentemente que, entre dez/2016 e fevereiro/2017 foram confirmados no Brasil 127 óbitos por febre amarela e 1500 casos suspeitos notificados. Diante deste quadro, Bio-Manguinhos inseriu em seu Projeto de Melhorias da Vacina Febre Amarela alternativas para ampliar o seu potencial produtivo. Uma das melhorias tem o propósito de aumentar a disponibilidade do estabilizador usado na formulação da vacina. A Vacina Febre Amarela atenuada consiste basicamente na mistura do insumo farmacêutico ativo (vírus de febre amarela cepa 17DD) mais o estabilizador, que é um componente indispensável, por manter a estabilidade/integridade das partículas virais. O processo produtivo do estabilizador é complexo e laborioso, compreendendo etapas de preparo e de esterilização e diversos testes de controle de qualidade.

### **Objetivo:**

Otimizar a produção do estabilizador da Vacina Febre Amarela atenuada, assegurando a maior disponibilidade de produto em menor prazo, o que é impreterível em situações emergenciais de saúde pública.

### **Metodologia:**

No estudo foi avaliada a mudança na etapa de preparo do estabilizador, permanecendo inalterada a etapa de esterilização do produto. Lotes foram produzidos na Seção de Meios e Soluções e testados pelo Laboratório de Controle de Qualidade atendendo os requisitos de Boas Práticas de Fabricação. Testes de homogeneização e ajustes em procedimentos de preparo em tanque de 100 litros foram realizados e avaliados. Foi aberta a Solicitação de Mudança (SM), requisito regulatório obrigatório, para avaliação da conformidade do estudo.

**Resultado:**

Todos os lotes apresentaram resultados satisfatórios nos testes de controle de qualidade (aspecto, pH, viscosidade, densidade e concentração de componentes), mostrando homogeneidade e consistência da nova metodologia de preparo. A proposta do estudo foi avaliada com parecer favorável após avaliação dos representantes da Produção, Assuntos Regulatórios, Controle e Garantia da Qualidade. O aumento do volume de preparo do estabilizador da Vacina Febre Amarela atenuada possibilitou a otimização do processo e a redução de custos nas análises necessárias para aprovação de lotes.

**Conclusão:**

Após parecer favorável da SM, os procedimentos foram revisados e a nova metodologia implementada na rotina da produção. Atualmente, a nova metodologia é estratégica para garantir o atendimento do aumento da demanda de vacina de febre amarela.

**Palavras-chave:** Vacina de Febre Amarela Atenuada; Estabilizador; Projeto de Melhorias da Vacina Febre Amarela



# BIOFÁRMACOS



## **BIO 01 - Avaliação de suplementos nutricionais no cultivo de células CHO recombinantes em suspensão**

Ethiene da Silva Corrêa Rocha<sup>1\*</sup>; Tiago Pereira dos Santos<sup>1</sup>; Rodrigo Coelho Ventura Pinto<sup>1</sup>; Álvaro Paiva Braga de Sousa<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

Com o avanço das técnicas de biologia molecular, os cultivos celulares passaram a ser uma importante plataforma para a produção de proteínas recombinantes com fins terapêuticos, como os biofármacos. A Eritropoetina humana recombinante (EPOhr) obtida por processos biotecnológicos é um biofármaco utilizado principalmente no tratamento da anemia associada à insuficiência renal crônica. A EPOhr é produzida em sistemas de cultivo de células animais, utilizando principalmente a linhagem celular CHO (*Chinese Hamster Ovary*). Estratégias de suplementação do meio de cultivo com componentes-chaves para o metabolismo das células estão associadas ao incremento de taxas específicas de crescimento e síntese de produto, além de garantir atributos necessários para a qualidade do produto. Os suplementos estudados foram avaliados a partir de planejamento experimental fornecendo ferramentas que favoreçam a compreensão dos dados experimentais.

### **Objetivo:**

Comparar a performance dos cultivos de células CHO expressando EPOhr suplementados com diferentes formulações nutricionais utilizando suplementos nutricionais (*Cell Boost*) e, identificar quais *Cell Boost* poderão contribuir na obtenção de maior concentração de células viáveis/mL e de EPOhr produzida.

### **Metodologia:**

Foram estudados seis suplementos nutricionais comerciais adicionados a 10% (v/v) no primeiro dia de cultivo (dia zero) ao meio de cultivo base, SFM4CHO-Utility, observando a influência sobre a proliferação celular e a produção da EPOhr. Inicialmente, utilizando planejamento fatorial fracionado  $2^{6-2}$  foram identificados três suplementos que influenciaram positivamente os cultivos. Foi realizado o cálculo da integral de células viáveis (ICV) e, a dosagem de EPOhr ( $\mu\text{g/mL}$ ) por ELISA. Os dados experimentais foram analisados empre-

gando o programa Statistica. O planejamento fatorial completo não propôs um modelo matemático esperado, então realizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) que possibilitou melhor avaliação dos efeitos dos suplementos. Os cultivos celulares foram realizados em frascos T25 cm<sup>2</sup>, mantidos a 37°C, sem CO<sub>2</sub>.

### **Resultado:**

A combinação dos suplementos (CB2, CB4 e CB5) melhorou o desempenho do cultivo celular e alcançou maior concentração de EPOhr. A partir do delineamento experimental, foi possível identificar as concentrações ideais dos suplementos CB2 (37,5g/L) e CB5 (12,5 g/L), que favoreceram o aumento da proliferação celular e da secreção da proteína EPOhr. A maior concentração foi de  $3,27 \times 10^7$  células.dia/mL para a formulação (F11) no planejamento fatorial fracionado, e a maior concentração de EPOhr foi de 119,65 µg/mL para a formulação (F2) no DCCR.

### **Conclusão:**

A técnica de planejamento experimental atendeu satisfatoriamente ao processo de seleção dentre os seis suplementos estudados (CB1, CB2, CB3, CB4, CB5 e CB6), fornecendo ferramentas que favoreceram a compreensão dos dados experimentais. As técnicas estatísticas utilizadas permitiram quantificar os efeitos das variáveis de processo resultando em significativo aumento de 103,11% na integral de células viáveis e de 207,98% na produção de EPOhr, selecionando, desta forma, os suplementos (CB2, CB4 e CB5).

**Palavras-chave:** Planejamento experimental; suplementos nutricionais; CHO

## **BIO 02 - Modelagem, docking e dinâmica molecular de dois fragmentos de anticorpos contra o antígeno de superfície do vírus da Hepatite B**

Artur Hermano Sampaio Dias<sup>1\*</sup>; Aline de Oliveira Albuquerque<sup>1</sup>; Alexandre Bezerra Conde Figueiredo<sup>2</sup>; João Hermínio Martins da Silva<sup>1</sup>; Márcia Arissawa<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Fiocruz / Ceará;

<sup>2</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz, Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais.

### **Introdução:**

A hepatite B, um dos grandes problemas de saúde pública atuais, pode levar pacientes crônicos a um transplante de fígado seguido de tratamento com imunossuppressores administrados conjuntamente a anticorpos monoclonais. Fragmentos variáveis de cadeia única (*scFv*) são produtos de anticorpos adequados para esse tipo de tratamento. Desta forma, este trabalho apresenta o início do processo de humanização de dois clones de anticorpos monoclonais murinos, 19DD1AE3 e 19CC6CG2, obtidos pelo Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais da Fundação Oswaldo Cruz.

### **Objetivo:**

O objetivo desse estudo foi obter as estruturas tridimensionais para cada clone, elucidar seu modo de ligação através de *docking* contra o antígeno de superfície do vírus da hepatite B e simular *in silico* seu comportamento dinâmico contra esse antígeno em um meio aquoso.

### **Metodologia:**

A obtenção dos modelos tridimensionais dos dois clones foi feita por meio de modelagem comparativa usando o programa *Modeller*, que usa um algoritmo de redução das restrições espaciais sobre o alinhamento entre as sequências dos clones e modelos tridimensionais obtidos a partir do *Brookhaven Protein Data Bank*. Para cada clone, modelou-se três *scFv* distintos no tamanho dos peptídeos ligantes entre as cadeias leve e pesada: peptídeos ligantes de oito, dez e quinze resíduos foram modelados, gerando, portanto, seis diferentes modelos, os quais foram validados através do servidor *MolProbity*. Para o *docking*, utilizou-se o servidor HADDOCK 2.2; e os seis complexos *scFv*-antígeno ge-

rados foram então submetidos a simulações de Dinâmica Molecular (DM) em campo de força GROMOS 53a6 durante 200 nanossegundos. Ao fim de cada simulação, o sistema foi analisado quanto ao desvio e flutuação quadráticos médios, quanto à formação e extinção de pontes salinas e ligações hidrogênio e quanto à variação da área acessível ao solvente de cada complexo.

**Resultado:**

Foram modelados três diferentes scFv para cada clone, 19DD1AE3 e 19CC-6CG2. Os complexos formados por estes seis fragmentos de anticorpos docados ao seu antígeno, HBsAg, exibiram performances distintas em simulações de dinâmica molecular, com uma diferença dramática na complementaridade estrutural e no número de interações polares intermoleculares.

**Conclusão:**

Finalmente, observou-se forte influência do peptídeo ligante sobre a performance de cada modelo nas simulações realizadas. Observou-se ainda que o complexo antígeno-anticorpo é mantido coeso através de ligações hidrogênio intermoleculares, mas não foram encontradas pontes salinas intermoleculares, o que sinaliza para projetos futuros de mutação sítio-dirigida visando aumentar a afinidade dos anticorpos modelados pelo seu antígeno através de interações iônicas dessa natureza.

**Palavras-chave:** Hepatite B; Modelagem Molecular; Dinâmica Molecular

## **BIO 03 - Generation of a scFv antagonistic to VLA-4 integrin as potential therapeutic target in muscular dystrophies: *in silico* phase**

Beatriz Chaves<sup>1\*</sup>; João Hermínio Martins da Silva<sup>2</sup>.

1Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

2Fiocruz - CE.

### **Introduction:**

$\alpha 4\beta 1$  integrins or VLA-4 are found in membranes of monocytes and T lymphocytes. Its participation in leukocyte migration is crucial for inflammatory diseases. Moreover, these proteins are also found in myoblasts and participate in the muscular regeneration process. Therefore, VLA-4 is an important therapeutic target for diseases such as muscular dystrophies, which are associated to the inflammatory process. ScFvs, Single Chain Fragment Variable, are fragments of antibodies which conserve the hypervariable regions of light and heavy chains, preserving their specificity. Currently, the only antibody commercially available, which interacts with  $\alpha 4\beta 1$  integrins, is Natalizumab. However, Natalizumab is not specific for  $\alpha 4\beta 1$ . It also recognizes  $\alpha 4\beta 7$  integrins. Beside this, its application is not totally safe. In this context, this work aimed to build a scFv specific for  $\alpha 4\beta 1$  integrins through *in silico* tools and, later, *in vitro* tools.

### **Objective:**

To design a scFv specific for VLA-4 through computational tools.

### **Methodology:**

A search of monoclonal antibodies which recognize subunits  $\alpha 4$  or  $\beta 1$  of integrins was done. From the selected sequences, the comparative modeling of antibodies' chains was done through Modeller program. Two types of scFv, using short and long linker, were made using the modeled chains. A molecular docking of all scFvs and  $\alpha 4\beta 1$  was performed through Haddock server. The best complexes obtained, according to Haddock parameters (Haddock score, Cluster size and RMSD) were submitted to Robetta Alanine Scanning for hotspot identification. From these results, mutations in strategic residues for interaction with  $\alpha 4\beta 1$  were done, using Coot program. Other dockings rounds using the modified scFvs and  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins were performed. The

best scFv was selected and new mutations were done to ensure the antibody specificity for  $\alpha 4\beta 1$  comparing to the others integrins. In addition, Molecular Dynamics simulations were done to confirm the docking results and to analyze the main interactions between the scFv and VLA-4.

### Results:

Three sequences were obtained from Integrity under 257898, 670484 and 725144 codes. The modeled chains were obtained and valuated. All modified scFvs showed a better Haddock Score for  $\alpha 4\beta 1$  integrin docking comparing to the originals antibodies. However, the best scFv was the modified 257898 one with short linker due to better Haddock score, Cluster size, and RMSD values. After the new mutations, this scFv also presented better docking parameters for  $\alpha 4\beta 1$  comparing to  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 7$ . Molecular Dynamics results ratified docking results about the scFv specificity and showed that salt bridges, electrostatic and Van der Waals interactions are determinant for the VLA-4 recognition by the scFv.

### Conclusion:

A specific scFv for VLA-4 was obtained through computational tools and it can discern among  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 7$  and  $\alpha 4\beta 1$  integrins. As perspective, *in vitro* assays will be performed to authenticate the recognition and specificity properties of the scFv.

**Keywords:** scFv; Integrin; VLA-4

## **BIO 04 - Análise comparativa entre a expansão celular realizada em frascos tipo Roller e em biorreator de ondas**

Esther Vinhais Gutierrez<sup>1\*</sup>; Tiago Pereira dos Santos<sup>1</sup>; Rodrigo Coelho Ventura Pinto<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

No processo produtivo de Alfaeopetina (EPO), alvo de uma transferência de tecnologia, a etapa de expansão celular é realizada em frascos do tipo T e roller. Este processo de expansão se estende por cerca de 20 dias e envolve a manipulação simultânea de até 15 frascos de cultivo, que deverão ser monitorados e quantificados para a confecção do inóculo de um biorreator de 50 litros. Sistemas abertos como este são mais suscetíveis a falhas, pois expõem o cultivo durante o manuseio dos operadores. Sendo assim, com a nacionalização da produção da EPO, sugeriu-se uma estratégia alternativa de expansão celular em sistema fechado (biorreator de ondas), visando a redução da manipulação e a consequente redução dos riscos, tornando o processo mais seguro e robusto.

### **Objetivo:**

Estudo comparativo entre a expansão realizada em frascos do tipo T e *roller* e a expansão empregando um biorreator de ondas, verificando a viabilidade técnica desta alteração.

### **Metodologia:**

Foram testados dois volumes de inóculo distintos no biorreator de ondas (0,5 L e 1,0 L) e duas estratégias de alimentação de meio de cultivo por batelada alimentada, a fim de garantir o suprimento de glicose e permitir a expansão celular até que a bolsa alcançasse o seu volume máximo (5 litros). Os cultivos foram monitorados através da análise de viabilidade e concentração celular em hemocitômetro. Adicionalmente foram analisados o consumo de glicose e a produção da proteína de interesse.

### **Resultado:**

Os resultados indicam que a expansão pode ser realizada de forma eficiente com a utilização do biorreator de ondas e, independentemente do volume ini-

cial empregado e da estratégia de alimentação utilizada, não há qualquer prejuízo no tempo decorrido de expansão celular. O processo envolvendo o biorreator de ondas se mostrou capaz de atingir densidades celulares muito superiores às atingidas no cultivo em frascos do tipo roller, com o aumento variando entre 50% e 80%, dependendo da estratégia de cultivo utilizada. Além disso, a utilização do cultivo em batelada alimentada permite uma economia de cerca de 50% na quantidade de meio empregado na etapa de expansão celular.

### **Conclusão:**

A substituição do sistema de cultivo a ser utilizado na etapa de expansão celular se apresentou como uma alternativa tecnicamente viável, agregando segurança e praticidade a esta etapa do processo, uma vez que diminui significativamente o tempo de operação dedicado à manipulação das culturas e eventuais riscos de contaminação inerentes a processos abertos de cultivo. É importante observar que se trata de uma metodologia mais moderna e que tem sido cada vez mais empregada nos atuais processos de expansão celular. Além disso, vale destacar que a sua implementação, neste caso, não acarreta aumento dos custos estimados para esta etapa do processo produtivo.

**Palavras-chave:** Biorreator de ondas; Células CHO; Cultivo em suspensão

## **BIO 05 - Clonagem, expressão e purificação do domínio externo da proteína de membrana externa A (OmpAExt) de *Acinetobacter baumannii***

Anna Erika Vieira de Araújo<sup>1\*</sup>; Geiseane da Conceição Corrêa<sup>1</sup>; Marcele da Silva Tamara<sup>1</sup>; Haroldo Cid da Silva Junior<sup>1</sup>; José Procópio Moreno Senna<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

*Acinetobacter baumannii* é um patógeno nosocomial oportunista presente mundialmente, com alta incidência em unidades de tratamento intensivo e de difícil eliminação do ambiente hospitalar. A crescente multirresistência deste patógeno limita a terapêutica e abre espaço para a busca de novos tratamentos. Trabalhos anteriores mostram que a proteína de membrana externa A (OmpA) possui alta imunogenicidade, porém dada a sua natureza estrutural, apenas uma parte desta proteína está acessível externamente. Ao direcionar a resposta imune a um alvo mais específico é esperado um aumento na eficiência desta resposta, já que todos os anticorpos gerados serão direcionados para epítomos presentes na porção exposta da proteína, aprimorando a resposta imune para o uso em imunoterapias.

### **Objetivo:**

Clonar, expressar e purificar o domínio externo da OmpA (rOmpAExt).

### **Metodologia:**

A partir da análise computacional da estrutura da OmpA foi isolada uma sequência parcial de 303 bp, correspondente a estruturas externas à membrana. Este gene foi amplificado por PCR utilizando o DNA genômico da cepa de *A. baumannii* ATCC 19606 e clonada no vetor pET28a. Após a análise de sequenciamento dos clones obtidos, os plasmídeos recombinantes foram usados para transformar cepas de *Escherichia coli* BL-21 (DE3). Para expressão, as células foram cultivadas em meio LB a 37 °C, diminuindo a temperatura para 30 °C durante a indução com IPTG na fase exponencial de cultivo. As células foram recuperadas, lisadas por sonicação e a proteína recombinante purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel. Ensaios de ELISA e Western Blot foram realizados a fim de analisar a antigenicidade de

rOmpAext frente ao soro policlonal anti-rOmpA produzido anteriormente em camundongos.

### **Resultado:**

As análises por SDS-PAGE mostraram a expressão de uma proteína com massa molecular de aproximadamente 14 kDa, sendo que boa parte desta foi expressa na forma solúvel. Após a etapa de purificação, foi possível obter uma fração da proteína de interesse com homogeneidade aceitável. Os imunoenaios demonstraram que o fragmento rOmpAExt foi reconhecido por anticorpos anti-rOmpA.

### **Conclusão:**

Este estudo mostrou que foi possível obter a proteína recombinante referente à parte externa da OmpA de *A. baumannii*. A rOmpAExt foi obtida de forma solúvel a partir da expressão em *Escherichia coli* e ainda foi identificada pelos anticorpos policlonais anti-rOmpA, demonstrando que essa região deve possuir epítomos imunogênicos. Anticorpos capazes de se ligar a essa proteína rOmpAExt devem ter a habilidade de reconhecer o patógeno de forma íntegra, pois significa que se ligarão à superfície bacteriana, diferentemente de sua forma não modificada (rOmpA) que possui diversos epítomos imunogênicos que não estão expostos. Esta proteína pode servir como ferramenta para a obtenção de anticorpos monoclonais, ou no desenvolvimento de vacinas contra este patógeno.

**Palavras-chave:** *Acinetobacter baumannii*; proteína recombinante; imunoterapias

## **BIO 06 - Viabilidade do uso de 1,10 fenantrolina e aptâmeros anti-MUC1 como radiosensibilizadores em células de câncer de mama**

Laís Nascimento Alves<sup>1\*</sup>; Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida<sup>1</sup>; Claudia de Alencar Santos Lage<sup>2</sup>; Sotiris Missailidis<sup>3</sup>.

1Instituto de Radioproteção e Dosimetria;

2Universidade Federal do Rio de Janeiro;

3Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

Com o crescimento da incidência de câncer na população brasileira, existe uma necessidade alarmante para estudo de novas terapias anti tumorais alvo direcionadas e portanto menos tóxicas para o paciente. O desenvolvimento de agentes terapêuticos direcionados e mais eficazes baseia-se na expressão de proteínas específicas de tecidos malignos, ou seja marcadores tumorais. Seguindo esta premissa, a glicoproteína MUC1 foi selecionada como alvo para experimentação de um ligante de MUC1 como vetor de distribuição de um radiosensibilizador (1,10 fenantrolina) para células de câncer de mama.

### **Objetivo:**

Avaliação do potencial do aptâmero anti-MUC1 (aptA) como vetor de distribuição do complexo 1,10 fenantrolina (phen) conjugada com ferro (Fe), *in vitro* utilizando células de adenocarcinoma de mama.

### **Metodologia:**

- 1) Determinação do grau de afinidade da associação do complexo phen+Fe ao DNA através da análise de dicroísmo circular.
- 2) Marcação do aptâmero aptA com a molécula fluorescente rodamina 123 (aptA+rho) para estudos de localização celular e afinidade com o alvo em células MCF-7 (MUC1-positivas).
- 3) Determinação da cinética da ligação do complexo phen\_Fe+aptA\_rho em alvos celulares usando a linhagem MCF-7 (MUC1-positivas), através de citometria de fluxo.
- 4) Localização do complexo phen\_Fe+aptA\_rho em alvos celulares usando a linhagem MCF-7 (MUC1-positivas), através de microscopia confocal.

**Resultado:**

Nos espectros dicróicos foi avaliado aptA livre e misturado com as soluções de titulação com diferentes concentrações de phen+Fe. Na ausência de Fe, a phen não se liga ao DNA, porém na presença, liga-se em uma proporção de 1 molécula de Fe para cada 3 de phen. A conformação do aptA foi preservada, pois a especificidade ao alvo se manteve, o que foi confirmado através do ensaio com FACS.

**Conclusão:**

Nossos resultados indicam que o aptA pode ser usado como vetor de carreamento de moléculas radiosensibilizadoras como a phen, por intercalação. O próximo passo será testar este complexo quanto ao seu potencial de radiosensibilização *in vitro* sob diversas formas de uso, antes durante e depois da irradiação.

**Palavras-chave:** Aptâmeros anti-MUC1; 1,10 Fenantrolina; Radiosensibilização

## **BIO 07 - Enhancement of ANTI-HSV-I activities using liposomes with naphthoquinones**

Viveca Giongo<sup>1</sup>, Gabriel Vasconcelos<sup>1</sup>, Annarita Falanga<sup>2</sup>, Luciana Palomba<sup>2</sup>, Maria Vargas<sup>3</sup>, Izabel Paixão<sup>3</sup>, Stefania Galdiero<sup>2</sup>, Salvatore Giovanni De-Simone<sup>1</sup>

1. Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde / Fiocruz;
2. Università Degli Studi di Napoli, Napoli, Italia;
3. Universidade Federal Fluminense.

### **Introduction:**

Today almost 67% of individuals with age up to 49 years are infected with HSV-1 and 50% of them, with age between 15-49, are infected with genital HSV-1. Naphthoquinones derivatives synthesized by Mannich base derived possess an efficient ability to control *in vitro* herpesvirus replication. Liposomes are drug delivery systems able to lower the concentrations in order to reduce the toxicity.

### **Objective:**

Reduce the concentration of 2-aminomethyl-3-hydroxy-1,4-naphthoquinones up to 10  $\mu$ M coupled to PC-liposomes to be analyzed in pre and post-treatment antiherpetic assays.

### **Methodology:**

2-aminomethyl-3-hydroxy-1,4-naphthoquinones (0, 5; 1; 5 and 10 $\mu$ M) were incubated in Vero cells for 48 hours to obtain the CC<sub>50</sub> values. For all antiviral assays HSV-1 was used at MOI of 1 to infect Vero cells at 10<sup>5</sup> cells/well. Lipid stock solutions of PC (0,1 mM) were prepared in chloroform containing 30% vol methanol. Mixtures of appropriate amounts of PC and aminomethylnaphthoquinones (0,5 to 10 mM) were prepared and chloroform was evaporated under a gentle stream of nitrogen. The lipid films were kept in vacuum overnight and hydrated with PBS buffer at pH 7.4 for 1 hour. Then the lipid suspension was freeze-thawed 6 times, LUV were passed 10 cycles through a 100 nm pore size according extrusion method, (Lipex<sup>TM</sup>, Avanti Polar Lipid Inc.). Dynamic light scattering measurements were made to check the size of the vesicles after the extrusion protocol.

**Results:**

The presence of benzyl in the primary amine of naphthoquinone derivatives gives to compound 2 the more toxic structure of the derivatives ( $11 \pm 0,57$  mM). Following less toxic are the compound 3 with nitrobenzene substituent and acyclovir, both with the same values of CC50 ( $13 \pm 1,54$  and  $13 \pm 0,88$  mM, respectively) and the butyl substituent presented minimum harmful effect ( $15 \pm 0,88$  mM). The yield reduction assay showed that nitrobenzene (compound 3) and benzyl (compound 2) substituents conferred  $0,36 \pm 0,037$  mM and  $0,56 \pm 0,023$  mM, more stable than acyclovir ( $3,16 \pm 0,091$  mM). Even compound 1 with the lowest antiviral activity of the derivatives ( $1,73 \pm 0,079$  mM). The selective index (SI) value of compounds presented higher values than acyclovir (SI = 4,11 mM) with nitrobenzene derivative (compound 3) the most effective antiviral of the series (SI = 36,1 mM), followed by compound 2 (benzene) with SI value of 19,64 mM and compound 1 (n-butyl) with 8,67 mM.

**Conclusion:**

The efficacy of compound 3 was evident (85%), followed by compound 1 (70%) and compound 2 (78%). To note is the fact that we have used neutral liposome without any peptide able to maximize the fusion peptide interaction on the membrane of the cell. We concluded with this preliminary study that neutral liposome could carry anti-HSV-1 compounds of naphthoquinone origin.

**Keywords:** Nanodrogas; Lipossomos; Antivirais

## **BIO 08 - Avaliação de uma bomba centrífuga magnética e seu impacto na viabilidade de células CHO**

Marina Vergne de Almeida<sup>1\*</sup>; Tiago Pereira dos Santos<sup>1</sup>; Esther Vinhais Guitierrez<sup>1</sup>; Máira Peixoto Pellegrini<sup>1</sup>; Rodrigo Coelho Ventura Pinto<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

A produção de biofármacos utilizando a plataforma de células de animais é normalmente realizada em biorreatores de tanque agitado, onde células são mantidas em suspensão, garantindo uma distribuição celular homogênea e também dos principais componentes presentes no meio, como nutrientes, metabólitos e o produto. Além de facilitar o *scale-up*, esta característica permite melhor monitoramento das condições de cultivo, resultando em maior produtividade e assegurando a qualidade do produto. Biorreatores operados em modo contínuo com retenção celular (perfusão) necessitam de um sistema de recirculação do cultivo em suspensão por bombeamento que não afete a viabilidade celular, o que pode impactar no perfil do produto. As bombas mais utilizadas na indústria biotecnológica são bombas peristálticas, no entanto apresentam vazão relativamente baixa, perfil de fluxo e pressão intermitente e podem gerar tensões cisalhantes que afetam o cultivo. Recentemente, bombas centrífugas com rotor de acoplamento magnético começaram a ser aplicadas em processos biotecnológicos, proporcionando um perfil de fluxo e vazão constante e, principalmente, gerando um ambiente hidrodinâmico mais compatível com a sensibilidade das linhagens empregadas, devido à ausência de um eixo mecânico.

### **Objetivo:**

Avaliar o impacto de uma bomba centrífuga, com impelidor magnético, sobre a fisiologia e viabilidade do cultivo de células CHO recombinantes em diferentes condições operacionais.

### **Metodologia:**

A bomba foi conectada a uma linha de recirculação em um biorreator de 2L e diferentes velocidades de rotação do rotor da bomba e tempos de exposição ao ambiente hidrodinâmico da câmara de bombeamento foram testados. A

viabilidade e concentração celular foram monitoradas durante os cultivos por metodologia de quantificação em hemocitômetro com azul de tripan. O consumo de glicose e a produção da proteína de interesse (ELISA) também foram avaliados durante este período.

### **Resultado:**

Nos testes iniciais com as velocidades de 1000, 2000 e 3000 RPM, por tempo suficiente para promover a recirculação de 20 vezes o volume do cultivo (20 VVD), a concentração celular foi mantida em níveis equivalentes ao cultivo controle e sem queda significativa na viabilidade celular (mantida acima de 80%). Em experimentos subsequentes, o cultivo foi desafiado à exposição contínua ao estresse mecânico da câmara de bombeamento (> 10 dias), com a recirculação de até 1380 vezes o volume do biorreator diariamente, sem impacto na capacidade proliferativa, viabilidade celular, metabolismo energético (consumo de glicose) e produção da proteína de interesse, quando comparado ao cultivo sem o uso da bomba.

### **Conclusão:**

Os testes com a bomba centrífuga Levitronix demonstraram resultados satisfatórios considerando a influência da recirculação sobre a fisiologia do cultivo da linhagem CHO avaliada, sem afetar características importantes como viabilidade celular e proliferação, mesmo com taxas de recirculação superiores à normalmente utilizada em um processo industrial. Estes resultados sugerem que o dispositivo pode ser empregado em processos industriais envolvendo linhagens sensíveis a tensões hidrodinâmicas.

**Palavras-chave:** Biorreator; Bomba centrífuga; Célula CHO

## **BIO 09 - Aplicação da citometria de fluxo no monitoramento de células CHO**

Maíra Peixoto Pellegrini<sup>1\*</sup>; Marina Vergne de Almeida<sup>1</sup>; Tiago Pereira dos Santos<sup>1</sup>; Esther Vinhais Gutierrez<sup>1</sup>; Raquel Ferraz Nogueira<sup>2</sup>; Rodrigo Coelho Ventura Pinto<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz;

<sup>2</sup>Beckman Coulter.

### **Introdução:**

A produção de biofármacos em células animais depende intimamente das condições de cultivo e da fisiologia celular, onde o monitoramento de importantes parâmetros, como a concentração e viabilidade celular, torna-se crucial para garantir a qualidade da molécula. Processos produtivos normalmente utilizam a técnica de exclusão do corante vital azul de tripan para a quantificação da concentração celular e da viabilidade. Porém, algumas linhagens celulares empregadas em processos produtivos se caracterizam pelo crescimento em suspensão, mas formando agregados celulares. Este fenômeno pode dificultar a contagem, pois grumos de maior tamanho não conseguem acessar os quadrantes de contagem e as células mais internas em grumos menores não entram em contato com o corante e não são facilmente identificadas, resultando em potencial erro de quantificação. A contagem dos núcleos pela coloração com cristal violeta é uma alternativa, no entanto, a presença de células polinucleadas em linhagens como a CHO pode, também, interferir na avaliação.

### **Objetivo:**

Avaliar a implementação do citômetro de fluxo CytoFlex no monitoramento do cultivo celular em um processo produtivo com células CHO recombinantes (CHO-EPOhr).

### **Metodologia:**

Dois cultivos de células CHO-EPOhr foram propagados em biorreator do tipo *wave* e monitorados por diferentes metodologias de quantificação: coloração de células mortas pelo azul de tripan e análise por microscopia (padrão); coloração dos núcleos pelo corante cristal violeta e análise por microscopia; análise morfológica por citometria de fluxo com e sem desagregação celular; coloração

de células mortas pelo iodeto de propídeo (PI) e análise por citometria; coloração de núcleos pelo PI e análise por citometria.

### **Resultado:**

As quantificações de células viáveis e totais pelo azul de tripan e cristal violeta apresentaram resultados discrepantes, alcançando diferença de 1,57X. A desagregação dos grumos é importante para a precisa quantificação por citometria, evitando também o entupimento do equipamento. As quantificações de células mortas por citometria, avaliando morfologia celular ou marcação pelo PI, apresentaram resultados semelhantes para viabilidade mas com pequenas diferenças na concentração celular. Isto indica que a análise de células mortas e viabilidade pode ser realizada sem PI, reduzindo uma etapa da metodologia. As quantificações por citometria, em geral, se assemelharam às quantificações pelo cristal violeta, exceto nos dois últimos dias da avaliação de células viáveis, e apresentaram variabilidade reduzida (DP <5%). As contagens de núcleos por citometria resultaram em contagens abaixo do esperado, mas esta técnica é capaz de analisar ciclo celular, importante para caracterização de cultivos.

### **Conclusão:**

O CytoFlex se mostrou uma excelente alternativa para o monitoramento de células durante um processo produtivo. Apesar da necessidade da etapa de desagregação celular, as leituras são rápidas, permitindo a realização de réplicas da mesma amostra e aumentando a confiabilidade do resultado. Além disso, o equipamento permite outras análises, como ciclo celular e apoptose, importantes para o monitoramento da fisiologia celular.

**Palavras-chave:** Célula CHO; Citometria de Fluxo; Monitoramento

## **BIO 10 - Avaliação de diferentes sistemas de cultivo em escala de bancada para a expressão transiente de anticorpos monoclonais**

Úrsula Fernanda Tavares Rodrigues da Silva<sup>1\*</sup>; Ana Caroline Cavalcante de Araújo<sup>1</sup>; Guillermo Marini<sup>1</sup>; José Procópio Moreno Senna<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

A expressão de anticorpos monoclonais em escala de bancada é uma etapa importante para a geração de quantidades suficientes de anticorpos, para a realização de ensaios visando estabelecer prova de princípio. Isto é fundamental, visto que o desenvolvimento de sistemas de expressão estável com o propósito de produção em larga escala, pode levar tempo, e caso os estudos de prova de conceito não proporcionem o resultado desejado, um grande investimento de tempo e recursos terão sido gastos.

### **Objetivo:**

Avaliar o aumento da produtividade de anticorpos monoclonais recombinantes anti-PBP2a de MRSA, através da expressão transiente utilizando diferentes sistemas de cultivo, modo de operação, e analisando também a influência do fator operacional temperatura. E em seguida, estabelecer as melhores condições de rendimento e cultivo.

### **Metodologia:**

Para avaliação do sistema de cultivo serão utilizados: erlemeyers, frascos spinner e garrafas roller. Será estudado, o modo de operação batelada e semi-perfusão. Além disto, será avaliada a influência do fator operacional temperatura em condições de hipotermia. Os parâmetros de caracterização da produção do anticorpo incluem ensaios por SDS-Page, ponto isoelétrico, isoformas, formação de agregado e atividade neutralizante, avaliação do crescimento, viabilidade celular e concentração de anticorpos monoclonais pós transfecção. Na expressão transitória de proteínas terapêuticas, será empregado o sistema EXPI-293 (*Thermo Fischer Scientific*), para geração de anticorpos monoclonais terapêuticos com a finalidade de realização de ensaios preliminares de demonstração de prova de princípio.

**Resultados:**

Ensaio preliminares empregando a expressão transiente no modo de operação batelada e cultivo em triplicata de erlenmeyers, utilizando também células controle, além do branco de reagentes (células e reagentes de transfecção) revelaram que as células não transfectadas (células controle) continuaram crescendo após o tempo de início. O mesmo não foi observado nas triplicatas e nem no branco. Após a transfecção das células e cultivo, os sobrenadantes das triplicatas foram purificados. O rendimento observado no cromatograma de purificação foi baixo, como observado em ensaios anteriores.

**Conclusão:**

Os resultados preliminares indicam que foram obtidos resultados de baixo rendimento no protocolo indicado pelo fabricante. Isso faz com que seja necessário avaliar outros sistemas de cultivos e modo de operação (como a troca de meio a cada 48 horas / semi-perfusão) para tentar obter uma melhora na produtividade do anticorpo monoclonal. As perspectivas incluem o término da caracterização do processo iniciado em erlenmeyers e nas próximas etapas, avaliar a experimentação no sistema Roller e Spinner. A partir, disto selecionar o sistema de maior produtividade e avaliar os diferentes modos de operação (batelada e semi-perfusão) e o fator operacional temperatura em condições de hipotermia no rendimento do anticorpo monoclonal produzido.

**Palavras-Chave:** Anticorpos monoclonais; Expressão transiente; Sistemas de cultivo



# REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO



## **REA 01 - Identificação dos principais agentes etiológicos das meningites bacterianas por PCR em tempo real**

Aline Carvalho de Azevedo<sup>1\*</sup>; Claudia Ferreira Andrade<sup>1</sup>; Ivano de Filippis<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>INCQS / Fiocruz.

### **Introdução:**

As meningites bacterianas são caracterizadas como doenças infectocontagiosas de rápida evolução e altas taxas de mortalidade. Os principais agentes etiológicos são a *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* e o *Streptococcus pneumoniae*, que podem causar outras doenças invasivas como septicemia e pneumonia. Apresentam distribuição mundial com predomínio no inverno, o que facilita a transmissão devido à aglomeração populacional em locais fechados. A transmissão ocorre pelo contato direto por via respiratória entre portadores e acomete principalmente crianças e adultos jovens. Por ser definida como doença aguda de evolução rápida, é essencial o uso de métodos de identificação rápidos e sensíveis. Métodos moleculares baseados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) são amplamente utilizados no diagnóstico de doenças infecciosas, como a PCR em Tempo Real (qPCR), que permite o monitoramento da amplificação gerada durante a corrida através de fluoróforos intercalantes ou sondas marcadas com fluorescência. Essas modificações tornam a qPCR um método mais sensível e específico quando comparado à PCR convencional.

### **Objetivo:**

Identificar os principais agentes etiológicos das meningites bacterianas por PCR em tempo real pelos sistemas Taqman e *High Resolution Melting* (HRM) como método de diagnóstico com menor custo, tempo de análise e maior sensibilidade.

### **Metodologia:**

Foram utilizados microrganismos de referência e amostras clínicas do período de 2012 a 2015, da Coleção de Pesquisa do INCQS, em dois sistemas qualitativos. O sistema Taqman é caracterizado pela atividade 5' exonuclease da Taq DNA polimerase e sondas marcadas com corantes fluorescentes. Os iniciadores utilizados foram nspA, p6 e ply marcados na extremidade 5' com corantes fluo-

rescentes FAM, HEX e Cy5, respectivamente para detecção de *N. meningitidis*, *H. influenzae* e *S. pneumoniae*. O sistema HRM identifica SNP nas sequências dos genes-alvo, caracterizando as amostras pelo comportamento de dissociação e transição da dupla fita para fita simples pelo aumento da temperatura. O corante fluorescente Evagreen foi utilizado como corante intercalante. Após a extração e dosagem do DNA, foram realizadas diluições seriadas para a determinação do limite de detecção.

### **Resultado:**

Testes com sistema Taqman uniplex e HRM uniplex revelaram limites de detecção (LD) similares (200 fg/ $\mu$ L). Taqman multiplex revelou LD na faixa de 1-2 pg/ $\mu$ L. Ambos os métodos foram capazes de detectar os três agentes etiológicos. Trinta por cento das amostras com resultados negativos por PCR convencional mostraram-se positivas por qPCR (Taqman e HRM). O método de diagnóstico por HRM provou ser tão sensível quanto o Taqman, porém mais barato, pois não há necessidade de usar sondas.

### **Conclusão:**

Pela efetividade dos resultados, o HRM poderia ser utilizado como uma ferramenta nova para o diagnóstico de doenças invasivas, melhorando o prognóstico dos pacientes, podendo ser adotado por laboratórios públicos de países em desenvolvimento para fins de diagnóstico.

**Palavras-chave:** Meningites bacterianas; PCR em Tempo Real; Diagnóstico molecular

## REA 02 - Biosensor-based epitope peptide screening to detect spotted fever

Isis Campos Prado<sup>1</sup>; Mônica Elizabeth Tatiana Alcón Chino<sup>2</sup>; Elba Regina Lemos<sup>3</sup>; André Luis Almeida Souza<sup>2</sup>; Raiane Borges Gomes<sup>1\*</sup>; Salvatore Giovanni De Simone<sup>4</sup>.

1CDTS / Fiocruz; INCT-IDN;

2IOC / Fiocruz, Laboratory of Experimental and Computational Biochemistry of Pharmaceuticals;

3IOC / Fiocruz, Hantavirus and Rickettsia Laboratory;

4CDTS / Fiocruz; INCT-IDN; UFF, Biology Institute, Department of Cell.

### Introduction:

Brazilian spotted fever caused by *Rickettsia rickettsii* is the most important rickettsiosis and the only reportable tick-borne disease in Brazil. Its diagnosis is often treated based on clinical diagnosis and/or indirect immunofluorescence.

### Objective:

The aim of this study was to using high affinity epitope peptide from the OMP H6PGA4\_ RICRI, previously identified by our group, to develop a cyclic voltammetry-peptide based immunosensor for the diagnosis of the human disease.

### Methodology:

The construction of an immunosensor from the use of ultra-specific epitopes identified by peptide microarray receiving elements used as capture antibody, was developed successfully. The electrochemical technique of cyclic voltammetry was performed on the detection signal generated by interaction between the peptide and the antibody circulating in blood samples. Printed electrodes of carbon and glutaraldehyde solution were used for fixing the electrode epitopes. Amperometric responses were generated by applying a potential of -0.6 to 0.6 V, speed of 0.025 V/s, using 20 cycles of scans.

### Results:

A detection limit of 10 ng mL<sup>-1</sup> and sensitivity 2.59  $\mu$ A were obtained, allowing proper clinical diagnosis. The performance of the assay was evaluated using human serum samples from infected and healthy patients. The accuracy was demonstrated by the analysis of 20 cycles of scanning and the performance

against sera of healthy individuals. The peptide-immunosensor chip was reproducible with a coefficient of variation  $\leq 10,1\%$ . The sensitivity of serum dilution was 1: 100.

**Conclusion:**

The IgG biosensor-peptide test has high sensitivity, and, because it is quick and easy to perform, would be good screening test for acute spotted fever infection. IgG peptide-biosensor has good specificity, and is comparable with the ELISA-peptide and is able to identify in real time circulating antibodies. The construction of this immunosensor, able to identify in real time specific antibodies can be applied in the diagnosis of other infectious and parasitic diseases.

**Keywords: Spotted fever; Epitopes; Immunosensor amperometric**

## **REA 03 - Nanosensor para testes diagnósticos *point-of-care* empregando *quantum dots* de CdTe funcionalizados com epitopos sintéticos para dengue**

Isis Campos Prado<sup>1\*</sup>; Salvatore Giovanni De Simone<sup>2</sup>; Célia Machado Ronconi<sup>3</sup>; Ricardo Jorgensen Cassella<sup>3</sup>.

1CDTS / FIOCRUZ; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação em Doenças Negligenciadas (INCT-IDN);

2CDTS / FIOCRUZ; Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação em Doenças Negligenciadas (INCT-IDN); UFF, Instituto de Biologia, Departamento de biologia celular e molecular;

3UFF, Instituto de Química.

### **Introdução:**

*Quantum Dots* (QDs), são monocristais semicondutores que variam de 1 a 15 nm. A partir do processo de foto-excitação dos QDs, pares elétron-buraco são gerados e sua recombinação provoca a emissão de luz. Em aplicações fluorescentes, a frequência da emissão da luz aumenta com a redução do tamanho dos quantum dots. Ligantes como íons ou moléculas podem ser acoplados à superfície dos QDs como aceitadores de elétrons, influenciando no processo de recombinação eletrônica e permitindo, assim, a utilização desse nanomaterial como sensor fluorescente. A busca por métodos práticos, seguros e econômicos na área de diagnóstico clínico, impõe-se novos desafios no desenvolvimento de plataforma sensoras tipo “point-of-care”, não para sistemas enzimáticos, mas voltadas para imunodiagnóstico direto.

### **Objetivo:**

O presente trabalho consistiu na construção de um nanodispositivo, a partir da síntese dos QDs de CdTe conjugados a peptídeos sintéticos - epitopos, utilizados como elementos receptores na captura de anticorpos circulantes no soro humano para pacientes positivos ao vírus da dengue.

### **Metodologia:**

Os QDs de CdTe funcionalizados com os peptídeos foram preparados empregando uma metodologia one-pot. A propriedade de detecção dos QDs de Cd-Te-PepDENV para diagnóstico point-of-care de dengue foi testada a partir da

supressão na intensidade da emissão fluorescente. Foram avaliados os efeitos do pH e do tempo de interação entre os QDs-CdTe-PepDENV e os anticorpos circulantes no soro humano. O estudo do pH, foi realizado no intervalo de 2 a 10, utilizando os tampões Britton-Robinson e fosfato salino. Os QDs sintetizados neste trabalho foram aplicados para a avaliação da resposta anti-dengue a epitopos antigênicos; soros de 40 pacientes foram testados, de acordo com a prévia caracterização sorológica provenientes da soroteca do laboratório de *Flavivirus* / FIOCRUZ, obtidos no período de 1996 a 2014 de diferentes centros de saúde de todo o país.

### **Resultado:**

As suspensões dos QDs-CdTe-PepDENV exibiram máximos de emissão variando de 410 a 610 nm, conforme a variação do tempo de reação de 5 a 70 minutos. Uma sensibilidade mais elevada foi observada com os QDs preparados em 70 minutos de reação ( $\lambda_{exc} = 293 \text{ nm}$  e  $\lambda_{em} = 410 \text{ nm}$ ). A presença de anticorpos específicos para a dengue presentes no soro humano causou uma supressão na intensidade da emissão fluorescente, seguindo uma estratégia quenching tipo FRET, o acoplamento dipolo-dipolo entre o QDs-CdTe-PepDENV e os anticorpos presentes no soro foi responsável pela supressão da fluorescência. Uma sensibilidade mais alta foi observada na ausência do tampão. O tempo de interação entre os QDs-CdTe-PepDENV e os anticorpos presentes no soro humano variou de acordo as condições da síntese.

### **Conclusão:**

Os resultados foram bastante promissores, demonstrando que este nanomaterial pode ser aplicado com sucesso em testes diagnósticos rápidos para dengue, apenas pela adição de uma pequena quantidade de soro humano ao QD.

**Palavras-chave:** Diagnóstico Dengue; *Quantum Dots*; Epitopos

## **REA 04 - Avaliação da estabilidade de IgG de cabra anti-humano marcado com FITC por espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (W)**

Luãna Elisa Liebscher Vidal<sup>1\*</sup>; Giselle Santana de Oliveira<sup>2</sup>; Hilton Jorge dos Santos<sup>1</sup>; Patricia Barbosa Jurgilas<sup>1</sup>; Simone de Amorim Chermont<sup>2</sup>; José Godinho da Silva Junior<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz, Laboratório de Macromoléculas (LAMAM);

2 Bio-Manguinhos / Fiocruz, Seção de Insumos, Conjugados e Apoio (SEICA).

### **Introdução:**

Conjugados são moléculas utilizadas em diversos ensaios imunológicos, formados através da ligação covalente entre um anticorpo e uma molécula que permita a sua detecção. Os kits de diagnóstico de imunofluorescência indireta produzidos por Bio-Manguinhos utilizam IgG de cabra anti-humano marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC). A estabilidade deste conjugado está associada com as condições de armazenamento, que podem afetar a sua integridade conformacional e atividade. Dessa forma, a avaliação de condições que permitam melhorar a estabilidade do conjugado se torna importante. Para tanto, a técnica de espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (W) se mostra interessante por ser rápida, econômica e robusta.

### **Objetivo:**

Avaliar a estabilidade do conjugado de IgG de cabra anti-humano/FITC através de espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano (W).

### **Metodologia:**

Alterações conformacionais no anticorpo IgG de cabra anti-humano conjugado com FITC foram monitoradas através do espectro de fluorescência intrínseca do triptofano (W). O conjugado foi incubado em tampão fosfatossalino (PBS) com quatro diferentes estabilizantes: arginina 125mM, glicerol 10%, tween 20 0,01% ou albumina 1%, usando os mesmos parâmetros para a análise. Em seguida, a cinética térmica de desnaturação do conjugado foi realizada para cada condição, através de um intervalo de temperatura (25°C -85°C). O comprimento de onda de excitação usado foi 280nm, e a emissão

do comprimento de onda foi escaneada de 295nm à 415nm. A análise de espalhamento de luz foi realizada no intervalo de 300-340nm, sendo excitado com 320nm.

### **Resultado:**

Ensaio preliminares mostraram que o anticorpo se mantém estável até 50°C, enquanto o conjugado se mostrou estável até 55°C. O termograma do centro de massas mostrou que não houve diferença entre o conjugado sem ou com estabilizante, uma vez que nestas condições o valor de centro de massas se mantém estável até 55°C. O termograma de fluorescência mostrou um decaimento progressivo na razão 330/350, quando submetido ao aumento de temperatura, em diferentes condições. A análise do espalhamento de luz (LS) mostrou que há um aumento progressivo de agregação no conjugado, porém, quando incubado com tween e glicerol a agregação foi acentuada a partir de 60°C e 65°C, respectivamente. Além disso, o conjugado nas condições com estabilizantes apresentou uma redução de, aproximadamente, 75% na agregação na maior temperatura (85°C) quando comparado ao conjugado sem estabilizante.

### **Conclusão:**

Os resultados mostraram que a temperatura induz modificações conformacionais nos resíduos de triptofano do anticorpo. O aumento da temperatura crítica quando o conjugado foi tratado previamente com glicerol sugere que esta é a melhor condição de estabilização. Ensaio por cromatografia de exclusão molecular serão realizados para confirmar os dados de agregação do conjugado.

**Palavras-chave:** Conjugado; Fluorescência Intrínseca do Triptofano; Estabilidade

## **REA 05 - Estudo imunológico da aspártico protease de *Angiostrongylus cantonensis* como potencial alvo de testes diagnósticos para a angiostrongilíase humana**

Patrícia Fernandes Ferreira<sup>1\*</sup>; Paloma Napoleão Pêgo<sup>1</sup>; André Luis Almeida Souza<sup>2</sup>; Arnaldo Maldonado Junior<sup>2</sup>; Salvatore Giovanni De-Simone<sup>1</sup>.

1CDTS / Fiocruz;

2IOC / Fiocruz.

### **Introdução:**

*Angiostrongylus cantonensis* é um parasita nematóide zoonótico emergente causador da angiostrongilíase humana, cujo os sintomas são: dor de cabeça, vômito, febre parestesia e rigidez na nuca. Patologicamente a forma mais comum apresentada da doença é a meningite eosinofílica. Os roedores sinantrópicos são os hospedeiros definitivos e os moluscos gastrópodes os hospedeiros intermediários. Os humanos são hospedeiros acidentais e se infectam através da ingestão de moluscos contaminados. Um dos fatores limitantes para o diagnóstico da angiostrongilíase humana é que a sua sintomatologia pode ser confundida com outras doenças. Além disso é fundamental uma anamnese acurada para a confirmação da ingestão de moluscos. Os testes laboratoriais disponíveis incluem análise do sangue e líquido cérebro-espinhal através de PCR, e testes sorológicos possuem baixa sensibilidade e especificidade. Devido a esses fatores, é de suma importância o desenvolvimento de um teste diagnóstico que permita a confirmação precoce da angiostrongilíase humana, direcionando assim para um tratamento rápido e eficaz.

### **Objetivo:**

O objetivo desse trabalho foi identificar os epítomos mais imunoreativos como potencial alvo para o desenvolvimento de teste diagnóstico sensível e específico para a angiostrongilíase humana.

### **Metodologia:**

Apesar da elevada reação cruzada existente entre proteínas de diferentes helmintos, este estudo identificou através de microarranjos peptídicos um provável alvo para o desenvolvimento de testes diagnósticos específicos. Assim, partindo da sequência proteica da aspártico protease de *A. cantonensis*, foram

sintetizados quimicamente 45 peptídeos contendo 15 aminoácidos de extensão em estrutura linear. Esses peptídeos foram testados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) na concentração de 2 ng/ $\mu$ L, permitindo verificar a interação de cada peptídeo com os anticorpos específicos contidos no *pool* de soros de rato, nas diluições de 1:50 e 1:200. Com a análise dessa varredura foi possível identificar 15 epítomos, dos quais dois apresentaram maior reatividade.

A análise *in silico* foi realizada para a previsão de regiões que abrangem a superfície da membrana com a sequência proteica estrutural através do programa Tmpred, mostrando que esses dois epítomos estavam localizados na porção extracelular.

#### **Resultado:**

Deste modo, foram selecionados dois peptídeos com maior reatividade que ao serem testados com 20 soros de ratos infectados na diluição de 1:50, um dos peptídeos apresentou maior sensibilidade. Da mesma forma estes peptídeos foram submetidos ao mesmo teste imunoenzimático com soros de pacientes doentes com febre amarela, leishmaniose, doença de Chagas, hepatite e leptospirose, apresentando maior de especificidade no mesmo peptídeo.

#### **Conclusão:**

Outros testes ainda deverão ser realizados para complementar este estudo, entretanto foi identificado um possível alvo a ser utilizado em testes diagnósticos para detecção de angiostrongilíase humana.

**Palavras-chave:** Teste diagnóstico; Angiostrongilíase humana; Síntese de peptídeo

## **REA 06 - Obtenção de aptâmeros para detecção do vírus Zika em testes diagnóstico – Estudos preliminares**

Liliane Monteiro de Moraes<sup>1\*</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>; Ana Maria Bispo de Filippis<sup>2</sup>; Sotiris Missailidis<sup>1</sup>.

1Bio-Manguinhos / Fiocruz;

2Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz.

### **Introdução:**

O vírus Zika (ZIKV) é um Arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivírus*, cuja transmissão ocorre principalmente por picadas de mosquitos do gênero *Aedes*. Embora as manifestações clínicas da doença sejam geralmente leves, evidências crescentes têm associado a infecção por ZIKV com o aumento de anomalias neurológicas congênitas e distúrbios neuropáticos. O diagnóstico laboratorial da infecção é realizado principalmente a partir de técnicas moleculares, uma vez que testes sorológicos podem apresentar reação cruzada com outros *Flavivírus*. Embora estas técnicas sejam altamente sensíveis e específicas, são dispendiosas, extensas e laboriosas, necessitando de laboratórios e pessoas especializadas. Atualmente, se faz necessário o desenvolvimento de testes eficazes, rápidos e escalonáveis, que permitam o diagnóstico precoce, evitando reações cruzadas e agilizando o diagnóstico em campo. Uma solução promissora é o desenvolvimento de reagentes à base de ácidos nucleicos, chamados aptâmeros, que são capazes de se ligar a agentes infecciosos com alta afinidade e especificidade, além de oferecerem várias vantagens, incluindo seleção *in vitro*, síntese química, estabilidade térmica e custo relativamente baixo.

### **Objetivo:**

Estabelecer metodologias de seleção de aptâmeros específicos para a partícula viral a partir de uma biblioteca de DNA (SELEX); Obter clones dos aptâmeros selecionados e caracterizar a ligação destes com as proteínas de interesse; Avaliar, *in vitro*, a eficiência da utilização dos aptâmeros em testes sorológicos.

### **Metodologia:**

A seleção de aptâmeros foi realizada através de um processo de seleção “*in vitro*” denominado SELEX. Uma biblioteca de ácidos nucleicos fita simples foi

submetida à interação com a partícula íntegra do vírus Zika, onde foram selecionados aptâmeros ligantes. Estes aptâmeros pré-selecionados foram submetidos a uma seleção negativa frente aos vírus de febre amarela e aos 4 sorotipos de dengue. Aqueles não ligantes a outros Flavivírus, que apresentaram perfil eletroforético esperado, foram clonados em células Top10 quimicamente competentes, utilizando o vetor pCR TOPO do Kit TOPO TA de clonagem (Invitrogen). Os DNAs dos clones positivos foram extraídos e amplificados utilizando oligonucleotídeos iniciadores M13 (senso e anti-senso). As amostras foram sequenciadas e as sequências, analisadas utilizando programas de alinhamento (Muscle) e predição de estrutura secundária (Mfold).

**Resultado:**

Foi possível obter 94 clones, dos quais 30 foram sequenciados, alinhados e analisados de acordo com sua estrutura secundária. Selecionamos 4 diferentes aptâmeros que serão sintetizados e submetidos a testes de afinidade e interação com o alvo.

**Conclusão:**

Os resultados preliminares indicam a existência de 4 aptâmeros altamente promissores para compor um kit diagnóstico, seja do tipo ELISA ou teste rápido.

**Palavras-chave:** Aptâmeros; Vírus Zika; Diagnóstico

## **REA 07 - Obtenção da proteína recombinante E2 do vírus Chikungunya como insumo para o desenvolvimento de um novo teste diagnóstico**

Carolina Lessa-Aquino<sup>1\*</sup>; Haroldo Cid da Silva Junior<sup>1</sup>; Karen Soares Trinta<sup>1</sup>; Gabriela dos Santos Esteves<sup>1</sup>; Edimilson Domingos da Silva<sup>1</sup>; Marco Alberto Medeiros<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

O vírus Chikungunya (CHIKV) é um membro da família *Togaviridae*, gênero Alphavirus. Este vírus é transmitido a humanos pela picada de mosquitos do gênero *Aedes*. O CHIKV tem sido responsável por epidemias em diversos países, inclusive no Brasil, onde emergiu em 2014. O diagnóstico clínico desta arbovirose é dificultado pela sintomatologia inespecífica, sendo a confirmação da doença realizada através de diagnóstico laboratorial por sorologia, qRT-PCR ou isolamento viral. Neste contexto, o desenvolvimento de insumos para o diagnóstico de CHIKV é de extrema relevância para o fortalecimento das políticas públicas de enfrentamento a esta doença.

### **Objetivo:**

Obter a proteína recombinante E2 de CHIKV (rE2) e avaliar a sua reatividade frente a soros de pacientes com Chikungunya.

### **Metodologia:**

A seqüência correspondente à proteína E2 sem a região transmembrana foi amplificada por PCR e o amplicon foi digerido com as enzimas NdeI e HindIII para clonagem no vetor pET 28a. A clonagem foi confirmada por PCR e sequenciamento nucleotídico. O clone selecionado foi transformado em *Escherichia coli* BL21 DE(3) Star e a expressão da proteína recombinante foi realizada em meio *Terrific Broth*, com indução na fase exponencial por IPTG 0,5mM durante 4 horas a 37°C. A rE2 foi purificada por IMAC em coluna HP HisTrap, sob condições desnaturantes. A soro-reatividade da proteína foi avaliada para IgG, contra soros positivos para Chikungunya (n=3), Zika (n=2) e Dengue (n=2), por *dot blot* e *western blot*, com detecção por fosfatase alcalina.

**Resultado:**

A sequência foi amplificada por PCR e a clonagem do amplicon no vetor de expressão gerou 8 clones, dos quais 5 foram confirmados quanto à presença do inserto. O clone 1 apresentou 100% de identidade e foi selecionado para expressão da rE2. A proteína foi expressa na forma de corpo de inclusão, que foi solubilizado e submetido à purificação. A rE2 foi dialisada em tampão Tris 20mM L-arginina 75mM Ureia 2M e apresentou reatividade IgG positiva apenas para as 3 amostras de soro de indivíduos confirmados para infecção por CHIKV, tanto em *dot blot* quanto em *western blot*.

**Conclusão:**

A proteína rE2 de CHIKV produzida apresentou soro-reatividade específica para pacientes com Chikungunya. Novos ensaios serão realizados a fim de avaliar a sua reatividade frente a um painel sorológico mais abrangente e confirmar o seu potencial diagnóstico.

**Palavras-chave:** Febre Chikungunya; Proteína Recombinante; Diagnóstico

## **REA 08 - Contribuição ao desenvolvimento e validação de um KIT-QPCR em tempo real para detecção de carbapenemases em sepse por bacilos gram-negativos**

Marisa Zenaide Ribeiro Gomes<sup>1\*</sup>; Débora Souza Beck<sup>1</sup>; Newton Dias Lourenço<sup>2</sup>; Stephani da Silva Ribeiro<sup>1</sup>; Elisangela Martins de Lima<sup>2</sup>; Karen Yumi Miyashiro<sup>2</sup>; Caio Augusto Santos Rodrigues<sup>2</sup>; Saint Clair S. Gomes Junior<sup>3</sup>; Patrícia Alvarez<sup>4</sup>; Marise Dutra Asensi<sup>1</sup>.

1IOC / Fiocruz, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar;

2Hospital Federal Servidores do Estado, Ministério da Saúde;

3IFF / Fiocruz;

4 Bio-Manguinhos / Fiocruz, Laboratório de Tecnologia Diagnóstica.

### **Introdução:**

Sepse por bastonetes Gram-negativos (BGN) resistentes aos carbapenemas é uma das principais causas de óbito em unidades intensivas. A detecção precoce de marcadores de resistência bacteriana em amostras clínicas é crucial para guiar a terapia antibiótica e reduzir a mortalidade na sepse.

### **Objetivo:**

Nesse estudo, a partir dos resultados do protótipo qPCR-KPC2-NDM1, desenvolvido pelo LAPIH/IOC e LATED/Bio-Manguinhos, FIOCRUZ, para a detecção de genes de carbapenemases blaKPC-2 e blaNDM-1 na colônia de BGN, objetivamos avaliar a sua utilização diretamente no sangue total e em hemoculturas positivas e negativas de pacientes com suspeita de sepse, internados em CTI médico-cirúrgico de adultos do Rio de Janeiro. Além disso, investigamos a prevalência de BGNs produtores de carbapenemases em materiais clínicos e de vigilância desses pacientes, visando determinar a melhor combinação de marcadores para o desenvolvimento futuro de um kit específico de detecção de resistência bacteriana em sepse.

### **Metodologia:**

O BioRobot EZ1 e EASY 1 DNA investigator kit QIAGEN Blood foi utilizado para a extração do DNA bacteriano em sangue. A reação do real time qPCR em ABI 7500 (*Applied Biosystems*). Entre agosto de 2015 a setembro de 2016 foram enviadas ao LAPIH 1.016 amostras, sendo 692 hemoculturas (401 hemocul-

turas positivas), 174 culturas positivas de outros materiais e 150 alíquotas de sangue, identificando-se 261 culturas com BGN, 154 cocos Gram-positivos e 9 fungos.

### Resultado:

Entre 286 isolados de BGN, predominaram *Klebsiella pneumoniae* (27%), *Pseudomonas aeruginosa* (25%), e *Acinetobacter baumannii* (17%). Genes de carbapenemases foram detectados em 35% (78/220) dos BGNs identificados no LAPIH. blaKPC-2 em 58% das cepas de *K. pneumoniae*, enquanto blaOXA-51 e blaOXA-23 em 100% e 84% de cepas de *A. baumannii*, respectivamente. Em *P. aeruginosa* apenas 5% teve blaKPC-2 e 1,5% de blaOXA-48. blaSPM-1 e blaNDM-1 não foram identificados. Quanto aos resultados do protótipo, de 83 hemoculturas avaliadas inicialmente, sendo 41 alíquotas em “pools” coletadas no mesmo momento de mesmo paciente, todas as hemoculturas positivas para KPC-2 (n=9) por cultura e PCR convencionais (padrão ouro) foram também positivas para este gene e amplificaram 16S-RNA pelo qPCR. Seis hemoculturas positivas não KPC-2 (26%, 6/23) amplificaram 16SRNA. Enquanto, 5 hemoculturas negativas (14%, 5/37) amplificaram 16SRNA. Não houve amplificação de blaNDM-1. Todas as amostras de sangue total analisadas (n=14) apresentaram Ct's elevados, provavelmente pela baixa concentração de DNA bacteriano. Desse modo, qPCR-KPC2-NDM1 apresentou 100% e 83% de sensibilidade e 100% e 87% de especificidade para a detecção de blaKPC-2 e 16SRNA em hemoculturas, respectivamente.

### Conclusão:

Elevada prevalência de BGN produtor de carbapenemases em pacientes com sepse foi observada, e esses resultados indicam a incorporação de OXA-51 e/ou OXA-23 ao protótipo desenvolvido. Os resultados preliminares são bastantes promissores para o desenvolvimento de um multiplex qPCR específico e fundamental para a melhoria do prognóstico em sepse por BGN em pacientes críticos.

**Palavras-chave:** Sepse; Bactéria Gram-negativa; Carbapenemase

## **REA 09 - Immunological mapping of the OMP H6PGA4\_RICRI and evaluation of an ELISA for early diagnosis of spotted fever**

Salvatore Giovanni De Simone<sup>1</sup>; Isis C Prado<sup>1</sup>; André Luis Almeida Souza<sup>2</sup>; Alexandre Oliveria Saisse<sup>2</sup>; Elba Regina Lemos<sup>2</sup>; David William Provance-Jr<sup>1</sup>; Monica Elizabeth Alcoón-Chino<sup>2\*</sup>.

1FIOCRUZ-CDTS;

2FIOCRUZ-IOC.

### **Introduction:**

Brazilian spotted fever, maculose fever or Rocky Mountain spotted fever is an acute febrile infectious disease caused by *Rickettsia rickettsii*, transmitted by tick bite. Timely diagnosis is an essential first step in providing proper patient care and in controlling transmission. Maculose fever diagnosis in Brazil is often treated based on clinical diagnosis and/or indirect immunofluorescence. As this disease is rare and has high mortality rates in Brazil, there is a need of a development assay for rapid laboratory diagnosis for this condition. The OMP H6PGA4\_RICRI of *Rickettsia* is a highly immunogenic transmembrane protein.

### **Objective:**

Study the immunochemistry of OMP using a peptide library and serum of patients and use the most reactive to develop an ELISA-peptide for the diagnosis of the human disease.

### **Methodology:**

A library of 84 peptides with 15 mer in length covering the extension of 429 amino acids of the H6PGA4 outer membrane protein and containing overlapping sequences of nine amino acids were synthesized by F-moc technique. The peptides were chemically bound to a cellulose membrane and reacted independently with patient's sera (n=5). A peptide enzyme-linked immunosorbent assay was used to confirm the reactivity and cross reactivity using a panel of 20 sera.

### **Results:**

Eight distinct epitopes were mapped by this method. Four of the epitopes were located in the outer side of the transmembrane domains of mature processed

protein. Three of these epitopes were present on both *R. prowazekii* and *Rickettsia typhi*. The analysis of ROC curve indicated that the E4 and E5 peptides were the most immunogenic, with a specificity of 90% and sensitivity of 94%. .

**Conclusion:**

The IgG-ELISA-peptide test has high sensitivity, and, because is quick and easy to perform, be good confirmatory screening test for acute spotted fever infection

**Keywords:** Maculouse fever ; Peptide-ELISA; Diagnostic

## **REA 10 - Evaluation of IgM and IgG Chikungunya diagnostic assays: differences in sensitivity of serology assays in one outbreak in Brazil**

Salvatore Giovanni De Simone<sup>1</sup>; Patricia Fernandes<sup>1\*</sup>; Paloma Napoleão Pêgo<sup>1</sup>; Isis C Prado<sup>1</sup>; Michelle Pacheco<sup>1</sup>; Viveca Giongo<sup>1</sup>; David William Provance-Jr<sup>1</sup>.

1CDTS / Fiocruz.

### **Introduction:**

Chikungunya is a mounting public health concern in many parts of the world. Definitive diagnosis is critical in differentiating the diseases, especially in Mayaro, Dengue and other endemic areas. There are some commercial chikungunya kits and published molecular protocols available, for serodiagnostic presumptive confirmation of viral infection, but no comprehensive comparative evaluation of them was performed. The current and recent outbreaks of several febrile diseases associated with recent outbreaks of CHYV and ZIKAV in Brazil has resulted in a massive effort to accelerate the development of new and specific diagnostic methods. Some are available in Europe or EUA using virus isolated from those countries or from Africa, but other need be developed. The introduction of these tests in other countries do not always work properly.

### **Objective:**

Evaluate the performance of two commercially and one in house IgM and IgG Capture-ELISA assay for the detection of anti-Chikungunya virus (CHIKV).

### **Methodology:**

We tested two commercial IgG test (CDC and NovaTec Immundiagnostica GmbH), one IgM test (NovaTec Immundiagnostica GmbH, Germany) alongside our two in-house IgM and IgG assays. The sensitivity and specificity of the five cap-ELISA assay were evaluated using a cohort comprised 100 sera obtained from one city of Brazil (Fortaleza, CE) affected by Chikungunya disease outbreak before the Olympics games in Brazil (2015) and 80 other sera from patients with dengue, Mayaro, yellow fever and healthy individuals. Sensitivities of the three immunological protocols were also evaluated based on ROC curve.

**Results:**

The commercial assays had different performances in detect IgM and IgG, with the IgM and IgG NovaTec cap-ELISA tests having the best performance, followed by our in-house test. A significant difference qualitative inter tests in detect acute and chronic disease (CDC x Novatec) was observed, in spite of all the tests being able to detect the febrile syndrome. All the tests presented an excellent sensitivity and specificity being the NovaTec the best ( $\geq 98\%$ ).

**Conclusion:**

Use of the IgM and the IgG capture-ELISA tests assay improves a very good performance to detect Chikungunya. The evaluation carried out in this work demonstrates the importance of appraisal of commercial kit and published protocols before application of a diagnostic tool in the clinical and operational setting. Factors that may interfere with an immunological test are many and therefore a thorough evaluation of these tests is required before they are marketed and / or used on a large scale. Concluding, we report differences in IgG and IgM detection efficacy of different assays between the three assay analysed.

**Keywords:** Chikungunya; Serological assays; ELISA

## **REA II - Construção de proteínas quiméricas multi-epítomos para emprego em testes sorológicos para o diagnóstico da doença de Chagas**

Andressa da Matta Durans<sup>1,2,3,4\*</sup>; Flávia Coelho Garcia dos Reis<sup>1,2,3</sup>; Paloma Napoleão Pêgo<sup>1,2,5</sup>; Isis Campos Prado<sup>1,2,5</sup>; Angela Cristina Verissimo Junqueira<sup>4</sup>; Salvatore Giovanni De Simone<sup>1,2,5</sup>; David William Provance-Jr.<sup>1,2,3</sup>.

- 1- CDTs / Fiocruz;
- 2- INCT, Inovação em Doenças de Populações Negligenciadas;
- 3- IOC / Fiocruz, Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas;
- 4- IOC / Fiocruz, Laboratório de Doenças Parasitárias;
- 5- Universidade Federal Fluminense.

### **Introdução:**

O diagnóstico precoce da infecção por *Trypanosoma cruzi* é necessário para início imediato do tratamento, evitando-se o aparecimento da doença de Chagas. Os testes sorológicos empregados embora rápidos, ainda podem apresentar reatividade cruzada e baixa sensibilidade em algumas regiões, como encontradas no estado do Amazonas. Sabe-se que o desempenho dos testes sorológicos varia de acordo com o tipo e qualidade da preparação dos antígenos utilizados para a detecção de anticorpos anti-*T. cruzi*. Nesse contexto, o nosso estudo foi concebido para concentrar em um único alvo proteico quimérico epítomos abrangentes de proteínas de *T. cruzi* que são específicos e apresentam uma alta capacidade de ligação a anticorpos.

### **Objetivo:**

Produzir uma proteína quimérica carregando epítomos de várias proteínas de *T. cruzi* e que sirva de alvo em testes sorológicos.

### **Metodologia:**

Os epítomos B lineares inseridos na poliproteína foram selecionados de um conjunto de estruturas previamente identificadas experimentalmente, tanto em nosso laboratório quanto da literatura, e que representam cepas de diferentes regiões geográficas. A poliproteína foi construída contendo um cerne estrutural que permite a inserção de dez epítomos. Um gene foi gerado sinteticamente e a poliproteína expressa foi purificada usando cromatografia de

afinidade e sua reatividade frente a soros de pacientes com doença de Chagas, Leishmaniose e dengue avaliada por western-blot e ELISA. Para estudarmos a contribuição e importância de cada epítipo na reatividade da poliproteína, dez proteínas quiméricas mutadas individualmente foram produzidas e analisadas como descritas anteriormente.

**Resultado:**

Os estudos de ELISA com a plataforma inteira mostraram uma especificidade de 98,55%, e uma sensibilidade de 86,11%. Por sua vez, a análise (por ELISA) das dez plataformas poliproteicas (mutadas individualmente), mostra que induziram diferentes graus de reatividades com os soros de pacientes. Além disso, uma pequena reatividade contra o cerne proteico bacteriano foi detectada.

**Conclusão:**

Os estudos mostraram que alguns epítipos influenciam estruturalmente na reatividade dos anticorpos e sugerem que a baixa sensibilidade pode estar relacionada à conformação do núcleo cerne. Das análises realizadas até o momento, podemos destacar a identificação de três proteínas quiméricas com grande potencial de serem usadas como ferramentas sorológicas diagnósticas para a doença de Chagas, e que abrangem se não todas, a maioria das DTUs (discrete typing units) das regiões endêmicas do Brasil. O próximo passo, será validar as três poliproteínas com soros das Referências Biológicas da OMS, e soros obtidos de diversos LACENs.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas; Diagnóstico; Proteína quimérica

## **REA 12 - Desenvolvimento e padronização de ensaio molecular para a detecção de *Plasmodium sp.* em amostras de sangue total e plasma humano**

Daniele Rocha<sup>1\*</sup>; Elaine Costa<sup>1</sup>; Elisabete Andrade<sup>1</sup>; Marisa Ribeiro<sup>1</sup>; Marcela Fontana<sup>1</sup>; Sthefanie Ribeiro<sup>1</sup>; Daniela T. Godoy<sup>1</sup>; Antonio G. P. Ferreira<sup>1</sup>; Patrícia Alvarez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

A malária é uma protozoonose dos eritrócitos, causada nos seres humanos por cinco espécies do gênero *Plasmodium*: *P.falciparum*, *P.vivax*, *P.ovale*, *P.malariae* e *P.knowlesi*. O *P.falciparum* é a principal causa da malária clínica grave e de mortes. No Brasil, a maioria dos casos de malária se concentra na região Amazônica (Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), área endêmica para a doença. Para o tratamento adequado dos pacientes com malária, o diagnóstico deve ser realizado de maneira rápida e precisa. O exame de rotina para o diagnóstico da malária é a gota espessa, que consiste na identificação de parasitos no sangue periférico, através de microscopia óptica. Esta técnica é amplamente utilizada, embora possua baixa sensibilidade e especificidade em situações de densidade parasitária baixa e infecções mistas. Por isso, as regiões endêmicas do país necessitam de uma melhor ferramenta de diagnóstico para a detecção de malária.

### **Objetivo:**

Desenvolver e padronizar um ensaio molecular para o diagnóstico de malária (*Plasmodium sp.*) em sangue total e plasma humano, baseada na plataforma de PCR em Tempo Real.

### **Metodologia:**

Foi utilizada a técnica de PCR em tempo real para o desenvolvimento do teste. E, para detectar qualquer isolado de *Plasmodium sp.* foram desenhadas algumas sequências de iniciadores e de sondas da região genômica conservada 18SrRNA. Em toda reação foi utilizada uma partícula calibradora (PC), como controle interno do sistema. Para a padronização da reação duplex e prova de conceito foram utilizadas amostras de pacientes.

**Resultado:**

Após diversos testes para a padronização da reação Duplex (Malária CY5/PC ABY), um conjunto de iniciadores e de sonda obtiveram resultados satisfatórios para a detecção do alvo *Plasmodium sp*, apresentando um bom desempenho nas curvas de amplificação e sem reação inespecífica. Os testes para aperfeiçoamento da reação foram realizados com amostras de pacientes com diferentes concentrações de sondas e de iniciadores. Após aperfeiçoamento, o ensaio molecular para o diagnóstico de malária apresentou sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade satisfatória. Trinta e duas amostras de plasmas positivos para Malária foram submetidas ao ensaio molecular. Todas as amostras, exceto uma, tiveram amplificação para Malária.

**Conclusão:**

Os testes realizados mostraram que a reação duplex (Malária/PC) é satisfatória. O desenvolvimento de um ensaio molecular para o diagnóstico de Malária irá ajudar nos inquéritos epidemiológicos, na determinação do portador assintomático, no monitoramento da resposta terapêutica e no rastreamento de doadores infectados em bancos de sangue.

**Palavras-chave:** Malária; Diagnóstico; PCR em tempo real

## **REA 13 - Desenvolvimento e padronização de ensaio molecular para a detecção de vírus Mayaro**

Marcela Fontana<sup>1\*</sup>; Elisabete Andrade<sup>1</sup>; Marisa Ribeiro<sup>1</sup>; Daniele Rocha<sup>1</sup>; Elaine Costa<sup>1</sup>; Sthefanie Ribeiro<sup>1</sup>; Daniela T. Godoy<sup>1</sup>; Antonio G. P. Ferreira<sup>2</sup>; Patrícia Alvarez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

O vírus Mayaro (MAYV) é um arbovírus pertencente ao gênero Alphavirus da família *Togaviridae*. A febre do Mayaro é uma zoonose silvestre transmitida por mosquitos, especialmente pelas picadas do *Haemagogus janthinomys*, que também transmite a febre amarela. Ensaios em laboratório já demonstraram que os mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* podem ser vetores do Mayaro. O fato de viverem próximos do homem e de se adaptarem facilmente ao ambiente urbano representa risco maior de se tornarem vetores envolvidos na disseminação da infecção pelo MAYV. Os sintomas da doença são muito parecidos com os da Dengue e da febre Chikungunya, o que dificulta o diagnóstico baseado na análise do quadro clínico.

### **Objetivo:**

Padronizar ensaio para diagnóstico molecular para detecção dos vírus Mayaro na plataforma de PCR em Tempo Real.

### **Metodologia:**

Os iniciadores e sonda utilizados na padronização do ensaio estão localizados na região conservada, nsP1. 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.

### **Resultado:**

O processamento das amostras de cultivo do MAYV demonstrou resultados significativos, apresentando um bom desempenho das curvas de amplificação de MAYV e da PC, em uma mesma reação. Os testes de especificidade e reação cruzada foram realizados com amostras verdadeiras negativas e com outros arbovírus como, Zika e Chikungunya, e não apresentaram amplificação inespe-

cífica e nem reação cruzada com os outros arbovírus. Em testes preliminares, obtivemos MAY VIC e PC DYE3, como a combinação das fluorescências. As extrações de vírus de cultura de Mayaro foram feitas em sistemas automatizados de extração, em coluna de sílica ou com partículas magnéticas.

**Conclusão:**

Os testes realizados mostraram que a reação duplex, por PCR em tempo real, para Mayaro 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, além de estudos de avaliação da metodologia, os quais definirão as características técnicas, como os níveis de sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade entre outros.

**Palavras-chave:** Vírus Mayaro; Diagnóstico; PCR em tempo real

## **REA 14 - Desenvolvimento de um sistema molecular de detecção e tipagem do vírus da Dengue**

Elaine Costa<sup>1</sup>; Elisabete Andrade<sup>1</sup>; Marisa Ribeiro<sup>1</sup>; Sthefanie Ribeiro<sup>1</sup>; Daniele Rocha<sup>1</sup>; Marcela Fontana<sup>1</sup>; Daniela T. Godoy<sup>1</sup>; Antonio G. P. Ferreira<sup>1</sup>; Patrícia Alvarez<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

O vírus da dengue pertence ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviridae*, e apresenta propriedades antigênicas distintas que caracterizam quatro sorotipos denominados vírus dengue 1 (DENV 1), vírus dengue 2 (DENV 2), vírus dengue 3 (DENV 3) e vírus dengue 4 (DENV 4). São transmitidos aos humanos por mosquitos do gênero *Aedes*, sendo o *Aedes aegypti* o principal vetor. Dengue é a doença viral, transmitida por vetor, mais difundida mundialmente, com aproximadamente 390 milhões de casos reportados anualmente. A variabilidade genotípica dos DENV tem sido associada a distribuição geográfica e seu potencial epidêmico. O desenvolvimento de um ensaio para detecção e sorotipagem dos DENV facilita tanto no diagnóstico clínico como na vigilância epidemiológica deste agravo.

### **Objetivo:**

Padronizar um ensaio molecular para detecção e discriminação dos quatro sorotipos do DENV na plataforma de PCR em Tempo Real.

### **Metodologia:**

Os iniciadores e sondas utilizados na padronização do ensaio estão localizados em regiões conservadas, permitindo, assim, amplificar/detectar os quatro tipos de vírus Dengue em duas reações triplex, uma reação para Dengue 1 e Dengue 2, e outra para Dengue 3 e Dengue 4 e em toda reação é utilizada um controle interno (CI) do sistema. Até o momento, para a padronização da concentração de sondas 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.

### **Resultado:**

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

penho das curvas de amplificação de DEN e do CI, em uma mesma reação. Os testes de especificidade foram realizados com amostras verdadeiramente negativas e demonstraram 100% de concordância. Em testes preliminares, obtivemos Dengue 1 com fluorescência, FAM, Dengue 2 VIC e CI DYE3; Dengue 3 VIC, Dengue 4 FAM e CI DYE3, como as melhores combinações das fluorescências. A extração dos ácidos nucleicos 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.

### **Conclusão:**

Os testes realizados mostraram que as reações tríplice, por PCR em tempo real, para discriminação dos quatro sorotipos de Dengue e PC foram satisfatórias. Entretanto, para a validação do sistema há necessidade de testes frente a amostras clínicas positivas dos quatro tipos de vírus dengue. Além disso, amostras negativas para DENV e positivas para outros vírus, entre outros, ZIKAV e Chikungunya, serão utilizadas nos ensaios de especificidade. Atualmente, estão em andamento experimentos para avaliação das características técnicas, como os níveis de sensibilidade, reprodutibilidade, especificidade entre outros. O desenvolvimento de um teste molecular discriminatório de Dengue é de suma importância, considerando-se a relevância epidemiológica de dengue, no Brasil.

**Palavras-chave:** Vírus Dengue; Diagnóstico; PCR em tempo real

## **REA 15 - Detecção de infecções fúngicas concomitantes em pacientes portadores de HIV por meio de técnicas moleculares e coloração específica para fungos**

Fernando Almeida-Silva<sup>1\*</sup>; Claudia Vera Pizzini<sup>1</sup>; Leonardo Pereira Quintella<sup>1</sup>; Mauro de Medeiros Muniz<sup>1</sup>; Rosely Maria Zancopé-Oliveira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas / Fiocruz.

### **Introdução:**

Infecções fúngicas têm sido uma grande ameaça nas últimas décadas, principalmente com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos, decorrentes do uso de drogas imunossupressoras, infecção pelo HIV e terapia pós transplante. Entre as infecções fúngicas que acometem pacientes imunodeprimidos, estão, a histoplasmose e criptococose. A histoplasmose é causada por *Histoplasma capsulatum*, um fungo dimórfico, saprófita de solos enriquecidos com excretas de aves ou morcegos. Esta infecção tem caráter sistêmico e ocorre após a inalação de propágulos infectantes, com deposição nos alvéolos pulmonares, podendo ter um curso clínico, variando de casos assintomáticos aos sistêmicos, incluindo acometimento cutâneo. Já a criptococose, é causada por *Cryptococcus neoformans*, que também possui como habitat, fezes de pombos e galinhas. As manifestações clínicas da criptococose, geralmente envolvem os pulmões e o sistema nervoso central, sendo o envolvimento do SNC responsável pelos casos mais graves. O diagnóstico definitivo dessas infecções é obtido com o cultivo desses microrganismos. Fungos como *H. capsulatum* podem levar até seis semanas para apresentar crescimento em cultivo, necessitando ainda de conversão para a fase leveduriforme para total conclusão diagnóstica. Dada a complexidade para a obtenção do diagnóstico baseado no isolamento destes fungos, torna-se necessário avançar no desenvolvimento de metodologias que ofereçam um diagnóstico rápido com alta sensibilidade e especificidade.

### **Objetivo:**

O objetivo desse trabalho foi evidenciar a presença de agentes fúngicos em amostras respiratórias, com baixa celularidade provenientes de pacientes com aids.

### **Metodologia:**

Foram utilizadas três amostras de dois pacientes distintos, sendo dois escarros induzidos e um lavado traqueal, ambos com CD4 abaixo de 100 células/mm<sup>3</sup>

e as técnicas empregadas para o diagnóstico das doenças fúngicas foram nested PCR, PCR multiplex em tempo real (qPCR) coloração de Gomori-Grocott além dos exames micológicos de rotina.

**Resultado:**

Observou-se resultado positivo nas três amostras para *H. capsulatum* na nested PCR. Na qPCR, as três amostras também apresentaram positividade para *H. capsulatum*, ao passo que duas das três amostras, apresentaram resultado positivo concomitante para *C. neoformans*. Na coloração pela prata, duas amostras apresentaram resultado sugestivo de leveduras, ao passo que uma amostra apresentou resultado inconclusivo e na cultura, apenas uma amostra apresentou crescimento para *C. neoformans*, não havendo crescimento fúngico nas duas restantes.

**Conclusão:**

Com essas evidências, é possível sugerir que métodos mais rápidos e sensíveis como metodologias moleculares devem ser aplicados em rotina laboratorial das micoses, juntamente com o diagnóstico micológico, principalmente em amostras biológicas com baixa celularidade, permitindo um diagnóstico conclusivo e início de tratamento adequado. Posteriormente, incluiremos um número maior de amostras que serão testadas para obtenção de resultados mais conclusivos.

**Palavras-chave:** Histoplasmose; Criptococose; Diagnóstico Molecular

## **REA 16 - Epitoma do vírus Mayaro e aplicação em novos métodos diagnósticos**

Paloma Napoleão Pêgo<sup>1\*</sup>; Patrícia Fernandes Ferreira<sup>1</sup>; André Luis Almeida Souza<sup>2</sup>; Flávia Coelho Garcia dos Reis<sup>1</sup>; David William Provance-Jr<sup>1</sup>; Salvatore Giovanni De Simone<sup>1</sup>.

1CDTS / FIOCRUZ, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Inovação em Doenças Neglegenciadas (INCT-IDN);

2IOC / FIOCRUZ, Laboratório de Bioquímica Experimental e Computacional de Fármacos.

### **Introdução:**

O vírus Mayaro (MAYV) é um vírus de circulação enzoontica, pertencente ao gênero *Alphavirus*, do grupo das arboviroses. O ciclo biológico envolve o mosquito *Haemagogus janthinomys* e outros animais como reservatórios. A recente detecção de surtos do MAYV associado a surtos recentes de novos e antigos arbovirus no Brasil resultou em um enorme esforço para acelerar o desenvolvimento de métodos de diagnóstico e vacinas. Além disso, a potencial disseminação do vírus pelo envolvimento do *Aedes aegypti* têm sido demonstrado experimentalmente. A infecção pelo MAYV está associada a um quadro clínico debilitante caracterizado por febre, cefaléia, diarreia, vômito, mialgia, erupção cutânea e artralgia. Os sintomas são semelhantes aos da febre amarela, dengue e chikungunya, fazendo com que casos de infecção Mayaro sejam erroneamente diagnosticados. Como o teste para o diagnóstico de MAYV ainda apresenta uma série de dificuldades metodológicas e de especificidade, faz-se necessário o desenvolvimento de um teste rápido e específico para discriminar esta doença de forma eficaz.

### **Objetivo:**

Caracterizar epitopos B lineares do MAYV indutores de resposta imune e aplicação no desenvolvimento de testes diagnósticos específicos para infecção aguda e crônica.

### **Metodologia:**

As seqüências completas de todas as proteínas estruturais e não-estruturais do MAYV circulante no Brasil foram obtidas em banco de dados UNIPROT.

O mapeamento de epitopos foi realizado utilizando-se a metodologia do ponto concêntrico Spot-synthesis e soro de pacientes infectados por MAYV, e revelados com anticorpos anti-IgM e anti-IgG humanos conjugados com fosfatase alcalina. Quatro epitopos reconhecidos apenas por IgM e quatro somente por IgG foram selecionados por suas especificidades e reatividades com soro de pacientes. Dois genes codificando peptídeos IgM (Rx-MAYVM) e IgG (Rx-MAYVG), respectivamente, foram construídos sob a forma de proteínas recombinantes (em processo de patente), sintetizados e expressos em larga escala em sistema de *E.coli*. Os epitopos selecionados também foram sintetizados quimicamente sob a forma de peptídeo simples ou multimérico (MAP-8). A reatividade foi avaliada por western-blot e ELISA.

### **Resultado:**

O mapeamento imunológico resultou na identificação de painéis de epitopos, um específico para o reconhecimento de IgM, outro para IgG e sequências carregando epitopos reconhecidos por IgM e IgG. A análise por ELISA dos insumos produzidos indicou que os recombinantes Rx\_MAYVM e Rx\_MAYVG apresentaram melhor desempenho do que os MAPs e estes maior do que os peptídeos simples. Nenhuma reação cruzada foi detectada frente a um painel de soros de pacientes com Chikungunya, Oropouche, Dengue, Febre Amarela e Zika. A sensibilidade e especificidade maior do que 98% pela curva ROC.

### **Conclusão:**

Neste estudo descrevemos a identificação, clonagem, expressão e análise imunológica de duas proteínas recombinantes (para epitopos IgM e IgG) do vírus Mayaro, que possuem excelentes possibilidades de serem empregadas no desenvolvimento de testes sorológicos específicos para o diagnóstico da febre Mayaro.

**Palavras-chave:** Mayaro vírus; Epitopo B linear; Spot-synthesis



# GESTÃO



## **GES 01 - Profilaxia pós-exposição antirrábica humana em tempos de desabastecimento: reestruturação da rede de atendimentos com adoção de esquema intradérmico**

Renata Siqueira Julio<sup>1\*</sup>; Monique Borsato Silva Filardi<sup>2</sup>; Ana Paula Sayuri Sato<sup>3</sup>.

1Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Superintendência Regional de Saúde de Varginha; Centro Universitário do Sul de Minas;

2Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Superintendência Regional de Saúde de Varginha;

3Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

### **Introdução:**

Diante do cenário de grave desabastecimento da vacina antirrábica humana verificado no Brasil em 2016 que exigia pronta resposta, uma unidade de regional de saúde de Minas Gerais reorganizou a rede de atendimentos e adotou esquema de profilaxia pós-exposição reconhecido pela OMS e recém aceito para uso no Brasil. Tal esquema consiste na aplicação de quatro doses de 0,2mL, pela via intradérmica em contraposição ao esquema de cinco doses de 0,5mL pela via intramuscular, utilizado até então. A via intradérmica, considerada mais reatogênica e imunogênica quando comparada às vias intramuscular e subcutânea, demonstra que menor volume é suficiente para a indução de proteção.

### **Objetivo:**

O objetivo deste estudo foi descrever a organização da rede de atendimentos e verificar o rendimento e economia de doses da vacina antirrábica.

### **Metodologia:**

Para compor a rede foram elegíveis cinco municípios de referência por apresentarem média de aplicação de duas ou mais doses diárias e terem profissionais capacitados para aplicação. Tornaram-se referência para outros 50 municípios que compõem a região. Trata-se de uma análise descritiva, quantitativa, cujas variáveis acessadas foram: o quantitativo de doses fornecidas; número de doses aplicadas; rendimento esperado; economia do número de doses e o custo da vacina. Para o cálculo do rendimento esperado multiplicou-se o número de doses enviadas por dois, visto que com um frasco de 0,5mL da vacina é possível atender duas pessoas com administração pela via intradérmica.

A economia de doses baseou-se na diferença entre o número de doses aplicadas e fornecidas. Para encontrar o valor economizado, multiplicou-se esse resultado por R\$40,52, valor unitário da dose.

Os dados foram extraídos do Sistema de Informação de Insumos Estratégicos e do Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunizações (SIPNI), de setembro a dezembro de 2016. Tal período coincide com o mês de adoção do esquema e estruturação da rede, bem como de maior desabastecimento da vacina.

### **Resultado:**

Entre os cinco municípios de referência, três demonstraram otimização do produto, visto que receberam ao todo 514 frascos que renderam 814 doses. Dois deles não informaram dados no SIPNI.

Os três municípios de referência aplicaram, respectivamente 77, 81 e 79% do número de doses esperadas. Apesar do cálculo de rendimento esperado, seria razoável que o rendimento não fosse, necessariamente, o dobro visto que um frasco após aberto tem validade de 6 a 8 horas.

De modo global verificou-se economia de 300 doses no período, representando custo de R\$12.156,00.

### **Conclusão:**

Tratando-se da profilaxia de uma doença que gera alto grau de apreensão devido à sua letalidade, um evento relacionado ao desabastecimento se traduz em grande desafio para a gestão pública.

Todavia, verificou-se que em curto período de tempo, a estratégia, possibilitou otimização do produto, dado que foi possível atender a um maior número de pessoas com número restrito de doses.

**Palavras-chave:** profilaxia pós-exposição antirrábica; programa de imunizações; gestão pública em saúde

## **GES 02 - Utilização de HAZOP em biorreator single-use em um processo de vacina viral**

Lucas de Paula da Silva Cruz<sup>1\*</sup>; Miguel Angel de La O Herrera<sup>1</sup>; Daniel Arêas da Silva Pinto<sup>1</sup>; Luciane Pinto Gaspar<sup>1</sup>; Daniel André Ribeiro<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

Bio-Manguinhos é referência mundial na produção da vacina para febre amarela. Nesde âmbito, com o intuito de satisfazer a demanda do Ministério da Saúde, a instituição possui diferentes projetos de desenvolvimento de novas plataformas para produção desta vacina, incluindo um projeto de vacina inativada, que utiliza como plataforma células de mamíferos. Para este projeto foi adquirido um biorreator single-use XDR-50 para a produção de lotes para estudo clínico desta vacina na planta piloto do Centro Henrique Pena (CHP). Diante das orientações da ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), tornou-se necessária uma avaliação dos riscos inerentes aos processos de desenvolvimento e produção de novos produtos biofarmacêuticos, avaliando-se desde a concepção até a aplicação do produto, gerando uma matriz de conhecimento robusta. A Gestão de Riscos para a Qualidade (GRQ) é um processo sistemático para avaliação, controle, comunicação e análise de riscos visando à qualidade do produto em todo o seu ciclo de vida. Neste contexto, a ferramenta HAZOP foi utilizada com o intuito de desenvolver um critério racional que pudesse ser aplicado na qualificação e operação do biorreator XDR-50 na planta piloto do CHP, utilizando-se como referência a produção de um lote em escala piloto da vacina inativada para febre amarela.

### **Objetivo:**

Utilizar a ferramenta HAZOP para a análise de riscos do Biorreator modelo XDR-50 a ser instalado, qualificado e operado na planta piloto do CHP.

### **Metodologia:**

Nesta análise HAZOP, avaliaram-se características inerentes ao sistema de biorreação da vacina de febre amarela inativada, analisando-se o processo desenhado no software SuperPro Designer da referida vacina, o conhecimento

técnico existente em Bio-Manguinhos e a especificação técnica do equipamento. Com estas informações definidas e analisadas, geraram-se “nós de estudo”, os quais tornam possível avaliar parâmetros dos equipamentos e seus desvios utilizando palavras-guias, com o intuito de descobrir desvios potenciais, suas causas e conseqüências, classificando-as utilizando-se uma matriz de risco.

**Resultado:**

Através da metodologia de HAZOP, foram identificados 7 nós de estudo, e conseqüentemente, seus respectivos desvios em potencial. De todos os 48 desvios identificados, 48% foram classificados como aceitáveis, 27% insignificantes, 19% não desejáveis e 6% inaceitáveis. Dentre as principais causas para os desvios encontrados, foram evidenciadas questões de manutenção, estrutura predial e falha humana. As recomendações para mitigação dos riscos se basearam, principalmente, no treinamento do operador, no planejamento do programa de manutenção e na adição de etapas no controle de qualidade para extraíveis e lixiviáveis.

**Conclusão:**

Conclui-se o alinhamento do resultado obtido com o início da qualificação do biorreator XDR-50 na planta piloto do CHP, no qual a ferramenta utilizada permitiu a obtenção de conhecimento sobre as características inovadoras do processo e os principais desvios que podem ser aplicados na qualificação e operação do equipamento, tornando-o mais seguro e eficaz.

**Palavras-chave:** HAZOP; Single-Use; Planta Piloto

## **GES 03 - A experiência do FIO-CÂNCER para formação de redes temáticas na FIOCRUZ**

Patrícia Cristina da Costa Neves<sup>1\*</sup>; Aline de Almeida Oliveira<sup>1</sup>; Cristine Maria de Lima Andrade<sup>1</sup>; Martin Hernan Bonamino<sup>2</sup>; Adriana Bonomo<sup>3</sup>.

1Bio-Manguinhos / Fiocruz;

2Fiocruz, VPPLR; INCA;

3Fiocruz, VPPLR.

### **Introdução:**

Recentemente houve uma alteração no perfil de morbimortalidade brasileiro, com diminuição da incidência de doenças infectocontagiosas e um aumento das doenças crônico-degenerativas. Atenta a estas mudanças, a FIOCRUZ lançou em 2015 o “Programa de Pesquisa Translacional - PPT” com dois objetivos: suprir a instituição de competência científica e tecnológica para responder a demandas em saúde e contribuir para a melhoria da intervenção/combate a agravos de caráter estratégico para o país. Para tanto, os PPTs deverão identificar lacunas e mobilizar recursos de modo a maximizar a capacidade institucional e integrar os cientistas formando “Redes de Colaboração”. O FIO-CÂNCER, um dos 11 PPTs, é voltado ao tema neoplasias, área em que não há uma atuação tradicional da instituição e que exigirá esforços coordenados no sentido de obtermos soluções inovadoras para assistência, diagnóstico e tratamento.

### **Objetivo:**

Apresentar os resultados do mapeamento dos grupos de pesquisa da Fiocruz atuando em câncer, visando contribuir para o processo de construção de uma rede de colaboração temática na FIOCRUZ.

### **Metodologia:**

Foi realizada uma análise do material oriundo do Simpósio FIO-CANCER, disponibilizado pela comissão do evento. Observou-se que foram feitas chamadas para inscrições voltadas aos grupos de pesquisa da FIOCRUZ que tivessem interesse no tema, de forma a não criar barreiras para participação. Utilizando a descrição das linhas de pesquisa nas fichas, foram definidos 3 temas principais: Diagnóstico/prognóstico; Epidemiologia/Gestão Pública; Abordagens terapêuticas/mecanismos das neoplasias. O objetivo foi agrupar

os pesquisadores para que apresentassem sua linha de pesquisa e para possíveis colaborações espontaneamente. Desta forma os relatores nos grupos puderam mapear atividades e possíveis interações, além de identificar as sobreposições. Este mapeamento foi apresentado aos participantes que, em seguida, puderam interagir com participantes de áreas diferentes da sua. Todas as interações foram compiladas pelos relatores e reportadas à organização do evento.

### **Resultado:**

Foram identificadas 77 inscrições de 18 unidades da Fiocruz. No que diz respeito aos temas, 76% das inscrições estavam relacionadas a abordagens terapêuticas/mecanismos da doença, refletindo provavelmente não só a ênfase em conseguir novas formas de tratamento como também a necessidade de um maior conhecimento a respeito da doença. Quanto à adesão das unidades, as que tiveram maior número de inscrições foram IOC (25%), Far-Manguinhos (19%) e Bio-Manguinhos (18%), provavelmente refletindo o direcionamento estratégico institucional, bem como o foco da atuação/ interesse dos grupos. Foram também identificadas ou estabelecidas 21 diferentes interações entre grupos ou pesquisadores participantes, bem como 2 grupos de pesquisa com ampla sobreposição em suas linhas de atuação.

### **Conclusão:**

O saldo da dinâmica de dois dias de interação foi extremamente positivo e permitiu identificar uma fração considerável das competências em câncer presentes na FIOCRUZ. As interações identificadas serão estimuladas e utilizadas como base para o desenvolvimento de projetos transversais, para os quais a rede buscará financiamento intra e extra muros.

**Palavras-chave:** Programas Translacionais; FIO-CÂNCER; Redes

## **GES 03 - Análise de tendências dos parâmetros físico-químicos no monitoramento dos sistemas de águas em Bio-Manguinhos**

Rhayssa Maia Costa Pinto<sup>1\*</sup>; Janaína Duque de Souza<sup>1</sup>; Jéssica Goulart Garcia<sup>1</sup>; Matheus Fernandes Guimarães de Oliveira<sup>1</sup>; Vinícius Alves Pessanha<sup>1</sup>, Katia Rodrigues Silva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

A água para uso farmacêutico é uma das principais matérias-primas utilizadas na produção de medicamentos e em processos produtivos, sendo fundamental o controle da contaminação. Dada a sua criticidade, os sistemas de geração, armazenamento e distribuição de água devem ser monitorados a fim de garantir qualidade físico-química, com métodos de avaliação das tendências observadas em revisões periódicas. Nesse contexto, para auxiliar no monitoramento do sistema e na avaliação de tendências devem ser definidos tanto limites de alerta e de ação, para fins de avaliação do perfil, quanto métodos para acompanhar as tendências, que podem ser estabelecidos por meio de métodos estatísticos.

### **Objetivo:**

Analisar tendências dos parâmetros físico-químicos (*Total Organic Carbon* - TOC e condutividade) do monitoramento dos sistemas de águas em Bio-Manguinhos.

### **Metodologia:**

Realizou-se a análise de tendência dos parâmetros TOC e condutividade do sistema de águas de Bio-Manguinhos (Centros de Tratamento de Água – CTA), utilizando-se os dados da série histórica do período de janeiro de 2014 a junho de 2016. Foi definido o nível de alerta com a aplicação da ferramenta estatística percentil 95, sendo o padrão de tendência determinado quando o percentual de dados nas cartas gráficas em nível de alerta for superior a 5%. Aplicou-se os testes estatísticos não paramétricos de tendência Cox-Stuart e Mann-Kendal utilizando-se os dados do período de janeiro a setembro de 2016. É recomendável que o p-valor (nível descritivo do teste) seja superior a 5,0%, caso contrário, há tendência nos parâmetros avaliados.

### **Resultado:**

Observou-se resultados em alerta superior a 5,0% em três CTA, com padrão de

tendência associada ao parâmetro físico-químico condutividade. Essa tendência também foi observada no mesmo parâmetro e CTA nos dois testes estatísticos, com p-valor inferior a 5,0%. Não foram encontradas tendências associadas ao parâmetro TOC nos CTA avaliados.

**Conclusão:**

A análise de tendências identificou 3 ocorrências associadas ao parâmetro físico-químico condutividade, baseadas tanto em cartas gráficas como nos testes estatísticos, que sinalizam indícios de tendência à obtenção de resultados fora da especificação com o decorrer do tempo e, assim, viabilizam a tomada de ações preventivas. Conclui-se que a adoção desses critérios auxilia a melhoria contínua dos processos e produtos produzidos por Bio-Manguinhos e se apresenta em conformidade com as expectativas regulatórias nacionais e internacionais.

**Palavras-chaves** Parâmetros TOC; Monitoramento de águas; Condutividade

## **GES 05 - Ferramenta de criticidade para o processo decisório da gestão de manutenção de equipamentos de controle de qualidade no caso Alfaepoetina.**

Aline da Silva Lima<sup>1\*</sup>; Cristine Maria de Lima Andrade<sup>1</sup>; André Ribeiro de Oliveira<sup>2</sup>; Aline de Araújo Pereira<sup>1</sup>; Nathalia Ferreira Valentim da Silva<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz;

<sup>2</sup>UERJ.

### **Introdução:**

O conjunto de equipamentos analíticos de controle de qualidade para atender a produção de produtos terapêuticos e biológicos líquidos injetáveis, como a Alfaepoetina, necessita de uma Engenharia de Manutenção proativa e eficiente. As atividades fundamentadas em testes físico-químicos, biológicos e microbiológicos, dependem, dentre outros recursos, da disponibilidade dos equipamentos analíticos intermediados com as melhores práticas de gestão, relacionados diretamente à gestão de manutenção e à gestão de riscos operacionais, prevendo a indisponibilidade de equipamentos e promovendo a melhoria do desempenho para atender ao fornecimento dos produtos ao SUS.

### **Objetivo:**

Aplicar metodologia para análise de criticidade e operacionais dos equipamentos do processo de controle de qualidade da Alfaepoetina. Melhorar o desempenho dos tempos de liberação de produtos com as melhores práticas na gestão de equipamentos, desde a visão de processos do Controle de Qualidade pela Engenharia de Manutenção.

### **Metodologia:**

Verificaram-se os macroprocessos do Departamento de Qualidade ANDRADE (2011), o Certificado de Liberação do produto e as Instruções de trabalho relacionadas à Alfaepoetina. Realizaram-se entrevistas com responsáveis dos processos, identificaram-se os equipamentos utilizados e mantidos pelo Departamento de Manutenção, categorizando a criticidade pelo critérios de MACEDO, (2011): velocidade de manifestação da falha, segurança do pessoal e do ambiente, custos de parada de produção, custos de reparação, documentação, origem, gargalo, mão de obra e idade do equipamento. Os dados foram alinhados

dos para o plano de manutenção e operacionais da área. Definiram-se graus de importância para os critérios utilizando a matriz de decisão de Mudge, para definir a classificação de criticidade alta, média e baixa.

**Resultado:**

Para a rota dos testes de liberação e atividades de apoio de controle de qualidade de Alfaepoetina, composto por quinze equipamentos de dez instruções de trabalho em doze processos relacionados, classificamos os equipamentos. 70% foram classificados com criticidade média, 18% com criticidade alta e 12% com criticidade baixa. Foi elaborado o plano de manutenção contemplando diretrizes de atuação para cada nível de criticidade de equipamentos, tais como: peça de reposição dos itens de equipamentos mais críticos em estoque, estruturação do corpo de manutenção para eficácia no atendimento, políticas de contrato de *outsourcing* de manutenção, critérios para *back up* de equipamentos, etc.

**Conclusão:**

A ferramenta desenvolvida contribui para o alinhamento da missão de Bio-Manguinhos ao atendimento ao SUS, já que facilita e dá suporte às decisões estratégicas no processo decisório entre VQUAL – Vice Diretoria de Qualidade e VGEST – Vice Diretoria de Gestão, quanto à gestão de recursos financeiros e demandas de fornecimento de produtos estratégicos aos clientes PNI, MS entre outros, pois o método pode ser replicado em novas rotas de produtos. Ao nível estratégico o desdobramento deste estudo realizado, auxilia no planejamento dos recursos, para cada caso quanto à alocação de investimentos no parque tecnológico.

**Palavras-chave:** Política de Manutenção; Macroprocessos; Qualidade

## **GES 06 - Assistência farmacêutica na internet: informação e acesso ao Componente Especializado da Política Pública de Medicamentos**

Tatiana Sanjuan Ganem Waetge<sup>1\*</sup>; Hugo Garcia Tonioli Defendi<sup>1</sup>; Carlos José Saldanha Machado<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz;

<sup>2</sup>ICICT / Fiocruz.

### **Introdução:**

Avaliar a disponibilidade da informação na internet sobre orientações para acesso ao Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CEAF) nos sites das Secretarias Estaduais de Saúde (SES) do país, uma vez que o direito à saúde está previsto na Constituição brasileira. Apesar do acesso aos programas do Sistema Único de Saúde (SUS) serem universais, é notável que as diferenças regionais implicam em desigualdade no acesso, principalmente no que diz respeito às informações disponibilizadas nos sites das SESs, que dificultam o acesso, pois dificilmente são padronizadas. O CEAF é uma importante política pública para acesso ao tratamento de 79 doenças de diversas especialidades. Dentre as patologias atendidas, tem-se a Doença de Gaucher que configura uma doença rara e de elevado custo, na qual o laboratório oficial Bio-Manguinhos atualmente está num processo de transferência de tecnologia para a internacionalização da alfataglucerase usada no tratamento desta doença. com isso se poderá garantir a sustentabilidade na distribuição deste medicamento para o SUS, além de possibilitar o aumento no seu acesso.

### **Objetivo:**

Identificar a disponibilização, ou não, das informações no site oficial da SES, sobre a política do CEAF, priorizando a Doença de Gaucher.

### **Metodologia:**

A busca das informações foi realizada de forma simplificada, como procede qualquer usuário comum, sem a utilização de métodos de busca booleana. Foi selecionado um estado de cada região, com o objetivo de representatividade nas desigualdades regionais, identificando-se aqueles mais populosos (dados IBGE), como medida indireta da maior probabilidade de acesso às informa-

ções. Para tanto, utilizou-se o campo de “busca” da página principal da SES com 5 termos: taliglicerase, taliglucerase, alfataliglicerase, alfataliglucerase, Doença de Gaucher.

### **Resultados:**

Foram analisados os sites de 6 estados (Amazonas, Bahia, Goiás, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e São Paulo). Destes, dois não apresentavam campo de busca ou outro mecanismo de busca rápida (Amazonas e Rio Grande do Sul), um estado não retornou a busca com nenhum dos termos, porém apresenta atendente virtual como forma de busca rápida (Goiás). Dos estados que retornaram com informações de acesso, tem-se Rio de Janeiro (Doença de Gaucher: retorna matérias, mas não orientações; Taliglicerase e taliglucerase: retornam links para lista de medicamentos e página intuitiva; Alfataliglicerase ou alfataliglucerase: sem retorno), São Paulo (Doença de Gaucher: retorna link para Protocolo estadual com informações; Alfataliglicerase: sem retorno; Alfataliglicerase: retorna outros links; Taliglucerase: retorna link para guia estadual com informações) e Bahia (Doença de Gaucher: retorno com links com orientações. As buscas pelos termos dos medicamentos não retornam informação).

### **Conclusão:**

Pôde-se demonstrar o quanto o acesso às informações relacionadas a medicamentos nos sites da SES é heterogêneo, e pouco efetivas, de modo geral, na busca por orientações de acesso. Conclui-se que as SES devem adaptar suas ferramentas de busca, principalmente ao público leigo, promovendo assim maior acesso à informação e conseqüentemente aos medicamentos.

**Palavras-Chave:** Componente Especializado da Assistência Farmacêutica; Informação em saúde; Acesso a serviços

## **GES 07 - Avaliação dos custos operacionais do CHP provenientes da verificação de aderência do empreendimento às regulações vigentes**

Daniel Arêas da Silva Pinto<sup>1\*</sup>; Alaíde Aline Xavier Leal da Motta<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

Bio-Manguinhos está operacionalizando o Centro Henrique Penna (CHP). O Centro se destaca por integrar na mesma construção a planta de protótipos, de produção de Ingrediente Farmacêutico Ativo e de Reativos para Diagnóstico. Portanto, o planejamento das atividades de operação na fase de projeto, atendendo às Boas Práticas de Fabricação, é essencial para garantir a prevenção das contaminações. Também é importante considerar os aspectos econômicos, visando a continuidade e viabilidade do negócio, uma vez que o custo do ciclo de vida, normalmente, é maior que o capital inicial investido nas unidades fabris. Dentre os diversos custos operacionais, o de monitoramento ambiental é diretamente determinado pelo grau de limpeza declarado para as áreas produtivas e pode ser otimizado mediante a correta avaliação de adequação regulamentar dos processos produtivos. Dado que o empreendimento ocorreu previamente à publicação do guia da OMS de 2012, que contém as diretrizes para determinação do grau mínimo das atividades produtivas, a revisão das declarações de classificação das áreas foi um dos desafios equacionados que mudaram os componentes do custo operacional da planta.

### **Objetivo:**

Avaliar alterações no custo operacional proveniente dos componentes correlacionados à atividade de monitoramento ambiental do CHP por meio da análise de aderência do projeto executivo da infraestrutura às regulamentações vigentes, visando determinar a oportunidade de redução dos custos.

### **Metodologia:**

Para verificação da aderência de acordo com a regulação vigente, utilizou-se as plantas de arquitetura de classificação e de fluxo de processos que foram concluídas antes da emissão do guia da OMS/2012. Após consolidação da análise, foram realizadas às adequações da cascata de pressão, do fluxo de pessoal e das

rotinas de certificação e de monitoramento ambiental de ar, o que possibilitou a alteração das quantidades e frequências dessas rotinas em relação à situação prévia. Com base nas ações relatadas foi possível realizar uma avaliação referente a redução do custo operacional de forma teórica, ponderando em planilha eletrônica de elaboração de Bio-Manguinhos, calculado após simulação deste custo teórico antes e depois da adequação.

**Resultado:**

Foi estimada uma redução do custo baseada na proposta de otimização das operações de monitoramento necessárias às áreas limpas. Com expressiva alteração para a área de Reativos para Diagnóstico que, com adequação das declarações de classificação eliminou os custos operacionais relacionadas as atividades de monitoramento ambiental, por não serem mais requeridas na rotina. Os demais pisos apresentaram uma menor oportunidade de redução, porém ambos superiores ao previamente planejado. Ambos são resultados teóricos dada a não operacionalização das atividades no CHP. A planilha, memória de cálculo e resultados alcançados serão apresentados.

**Conclusão:**

O estudo representa possibilidade real de ganho para a Unidade permitindo a diminuição de capital alocado em aquisição de equipamentos, insumos, reagentes e contratação de funcionários para cumprimento das rotinas adicionais que seriam requeridas.

**Palavras-chaves:** Custos operacionais; Monitoramento ambiental; Plantas farmacêuticas



# OUTROS TEMAS RELACIONADOS



## **OTR 01 - Mapeamento dos Epitopos B lineares da proteína ALT-2 de *Wuchereria bancrofti* (Cobbold, 1877)**

Verônica Gonçalves Mendes<sup>1\*</sup>; Salvatore Giovanni De Simone<sup>2</sup>; André Luis Almeida Souza<sup>2</sup>; Paloma Napoleão Pêgo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Fiocruz;

<sup>2</sup>CDTS / Fiocruz.

### **Introdução:**

A identificação de epitopos em proteínas reconhecidas por anticorpos clinicamente relevantes é útil para o desenvolvimento de diagnósticos e vacinas à base de peptídeos. Neste estudo, tivemos como objetivo mapear os epitopos de células B lineares da proteína ALT-2 (*Abundant Larval Transcript-2*) do verme *Wuchereria bancrofti*, agente infeccioso da filariose linfática (bancroftose).

### **Objetivo:**

Geral: Mapear os epitopos B lineares da proteína ALT-2 (D3JEM9) de *Wuchereria bancrofti*. Específico: 1. Construir uma biblioteca peptídica e identificar os epitopos B lineares da proteína ALT-2; 2. Desenhar peptídeos sintéticos e avaliar sua antigenicidade utilizando um painel de soros humanos provenientes de área endêmica; 3. Avaliar, utilizando ferramentas de bioinformática a especificidade dos epitopos; 4. Desenvolver um teste de ELISA indireto empregando peptídeo(s) sintético para possível diagnóstico sorológico.

### **Metodologia:**

Uma biblioteca de 24 peptídeos sintéticos cobrindo toda a extensão da sequência da proteína ALT-2 da larva L3 de *Wuchereria bancrofti* foi sintetizada em solução usando a estratégia F-moc e analisada por uma matriz-peptídica puntiforme (*Spot*) usando soros de pacientes com *Wuchereria bancrofti*. Os epitopos foram identificados através da sobreposição dos arranjos positivos e os peptídeos selecionados, representando os epitopos, foram analisados por um ensaio imunoenzimático indireto baseado em peptídeos. A especificidade e sensibilidade dos ensaios imunoenzimáticos foram determinados pela curva ROC. A presença de reações cruzadas dos epitopos com outros organismos foi avaliada utilizando-se ferramentas de bioinformática.

**Resultado:**

A estratégia empregando a síntese em solução de uma biblioteca de peptídeos e a matriz puntiforme permitiu identificar com sucesso seis determinantes antigênicos da proteína ALT-2 reconhecidos por anticorpos IgG. Os estudos de bioinformática sugeriram que os epitopos E-1, E-2 e E-6 são exclusivos de *Wuchereria bancrofti*, enquanto que o epitopo E-3 apresenta similaridade com uma sequência presente nas proteínas de *Brugia malayi*, *Loa Loa* e *Ascaris suum*. Subsequentemente, os peptídeos que representam os epitopos E1(P-4), E-3(P-11), E-4(P-14), E-5(P-18) e E-6(P-22) foram analisados por ELISA. O antígeno (E-5) P-18 apresentou a maior sensibilidade e especificidade, 100% e 98%, respectivamente. Enquanto o antígeno P-4(E-1) mostrou uma especificidade de apenas 86%.

**Conclusão:**

Os epitopos reconhecidos pelos anticorpos anti-*Wuchereria bancrofti* foram localizados com precisão na estrutura da proteína ALT-2. Os resultados da análise de um painel de 44 soros de pacientes através do ELISA-baseado em peptídeos, representando estes epitopos, sugerem fortemente que as sequências de E1, E-2 e E-6 são as mais úteis para o desenvolvimento de novos testes diagnóstico para detectar a filariose linfática causada pela *Wuchereria bancrofti* com maior sensibilidade e especificidade.

**Palavras-chave:** *Wuchereria bancrofti* ; Peptídeo; ELISA.

## **OTR 02 - Use of small interfering RNA (siRNA) as a viral replication inhibitor of Human Herpesvirus 1 in BALB/C mice with keratoconjunctivitis**

Alexandre dos Santos da Silva<sup>1\*</sup>; Ana Carolina Silva Guimarães<sup>1</sup>; Guilherme Padalecki Silva dos Anjos<sup>1</sup>; Marcelo Alves Pinto<sup>1</sup>; Vanessa Salete de Paula<sup>1</sup>.

IIOC / Fiocruz.

### **Introduction:**

Herpetic keratoconjunctivitis (HK) is mainly caused by Human Herpes virus 1 (HHV-1) and is the most common cause of infectious blindness in developed countries, with an incidence of 21/100,000 cases per year and a prevalence of 149/100,000. In Southeast Brazil an study found an herpetic keratoconjunctivitis positivity of 26,8% in patients with keratoconjunctivitis. Patients with HK present blepharoconjunctivitis, ocular pain, dry eye sensation, dendritic ulceration, loss of sensation in injured areas, intermittent conjunctivitis and the persistence of infection could cause corneal destruction and vision loss by corneal opacification leading to corneal transplantation. Nowadays, HK treatment has encountered difficulties such as utilization of antivirals with elevated toxicity, metabolic side effects and HHV-1 resistance. An alternative to antivirals is the use of small interfering RNA (siRNA) as viral replication inhibitor.

### **Objective:**

The aim of this study was the evaluation of siRNA anti-HHV-1 as an alternative for treatment of HK in BALB/C mice.

### **Methodology:**

20 BALB/C mice were inoculated via intraocular with HSV-1 and treated with siRNA anti-HHV-1. Mice were divided in 5 groups to evaluate the siRNA treatment and number of administered doses (one, two and four doses) of siRNA anti-HHV-1. Besides that, HK clinical signs, mortality and viral replication inhibition in brain, trigeminal ganglia, serum, left eye and right eye were evaluated to measure siRNA therapy.

### **Results:**

Animals treated with one dose and two doses of siRNA did not lose weight. The viral replication inhibition was high in trigeminal ganglia (96.95%), left

eye (99.63%) and right eye (99.35%) of animals treated with one dose of siRNA anti-HHV-1. Animals treated with two doses of siRNA anti-HHV-1 showed viral replication inhibition of 91.25% in trigeminal ganglia, 98.84% in left eye and 97.80% in right eye; and in animals treated with four doses the replication inhibition in brain was of 81.02%, in trigeminal ganglia was of 96.81%, in serum was of 67.88%, in left eye was of 99.46% and in right eye was of 99.82%.

**Conclusion:**

These findings demonstrated that siRNA can inhibit HHV-1 replication in mice with herpetic keratoconjunctivitis. However, further studies need to be undertaken to confirm if siRNA can be a potential alternative HK treatment.

**Keywords: HSV-1; Herpetic Keratoconjunctivitis; siRNA**

## **OTR 03 - Identificação de protozoários empregando componentes principais e imagens hiperespectrais**

Guilherme Coelho<sup>1\*</sup>; Gustavo Teodoro Laureano<sup>2</sup>; Arlindo Rodrigues Galvão Filho<sup>3</sup>; Adriano Gomes da Silva<sup>1</sup>; Clarimar José Coelho<sup>3</sup>.

1INI / Fiocruz;

2UFG - Universidade Federal de Goiás;

3PUC/GO - Pontifícia Universidade Católica de Goiás.

### **Introdução:**

As protozoonoses, como leishmanioses, doença de Chagas e giardíase, são um grave problema de saúde brasileiro devido às suas amplas distribuições geográficas e aos comprometimentos clínicos e psicossociais dos pacientes acometidos. O diagnóstico dos pacientes infectados é a base para se estabelecer medidas de controle destas doenças uma vez que não há disponibilidade de métodos profiláticos eficazes como, por exemplo, vacinas. As abordagens para identificação do agente etiológico, com alta especificidade e sensibilidade, são baseadas em métodos bioquímicos ou genéticos que dependem de recursos materiais (insumos e equipamentos) e humano (treinamento especializado), os quais nem sempre estão disponíveis. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas de identificação de parasitos mais econômicas, simples e rápidas do que as técnicas tradicionais pode contribuir para o estabelecimento de novas estratégias de controle.

### **Objetivo:**

Avaliar a capacidade do sistema de análise de imagens hiperespectrais no infravermelho de ondas curtas (*Short-Wave Infrared*, SWIR) de identificar diferentes espécies de protozoários.

### **Metodologia:**

A identificação alternativa dos protozoários oriundos de culturas axênicas foi realizada a partir de imagens hiperespectrais SWIR obtidas com a estação de trabalho SisuCHEMA (SPECIM?). Ondas curtas SWIR são semelhantes à luz visível onde os fótons são refletidos ou absorvidos por um objeto que proporciona forte contraste para uma imagem de alta resolução. Foram utilizados dois protozoários caracterizados pelo método padrão de isoenzimas: *Leishmania*

*guyanensis* e *Leishmania chagasi* e dois protozoários caracterizados por sequenciamento gênico: *Trypanosoma cruzi* e *Giardia lamblia*. A produção dos espécimes foi realizada pela fixação das formas parasitárias, com paraformaldeído 4%, e a deposição de 40µL da suspensão de parasitos sob cada lâmina. A detecção e distinção das espécies de protozoários a partir da imagem foi realizada empregando-se um procedimento matemático que usa a ortogonalização de vetores (representação matemática de uma medida) e converte observações de variáveis correlacionadas num conjunto de variáveis não correlacionadas chamado análise de componentes principais (*Principal Component Analysis*, PCA).

### **Resultado:**

O método qualitativo de análise PCA, a partir de imagens hiperespectrais SWR, foi capaz de identificar assinaturas espectrais específicas. A correlação dos dados comprimidos pelo modelo PCA (pixels no domínio original) que representam os protozoários na imagem foi sensível às características bioquímicas específicas de cada parasito.

### **Conclusão:**

A especificidade das assinaturas espectrais correlaciona-se à especificidade bioquímica de cada parasito. Dessa forma, foi possível identificar e diferenciar os quatro protozoários analisados: *Trypanosoma cruzi*, *Giardia lamblia* e, inclusive, as espécies *L. guyanensis* e *L. chagasi*.

**Palavras-chave:** Identificação de Patógenos; Imagem Hiperespectral; Principal Component Analysis

## **OTR 04 - Identification of targeted epitopes of yellow fever virus based on homology with other species of flavivirus**

Michelle Pacheco de Lima<sup>1\*</sup>; Paloma Napoleão Pêgo<sup>2</sup>; Gabriel de Vasconcelos Feixas Ferreira da Silva<sup>2</sup>; Salvatore Giovanni De Simone<sup>1</sup>.

1- Laboratório de bioquímica de proteínas e peptídeos - CTDS / FIOCRUZ.

2 - UFF - Universidade Federal Fluminense;

2Laboratório de bioquímica de proteínas e peptídeos - CTDS / FIOCRUZ..

### **Introduction:**

The current outbreak of yellow fever virus (YFV) associated with recent outbreaks of old and new viruses (DENV, ZIKAV, CHYV, MAYV) in Brazil has resulted in a massive effort to accelerate the development of new diagnostic methods and specific vaccines. The identification of the epitopes of these viruses and consequently of the immune response in humans would be of extreme importance for the preparation of more specific tests and to understand the mechanism of vaccination. Much has been described about the immune response against the yellow fever virus and the usefulness of the vaccine, however little is known about its antigenic repertoire in humans.

### **Objective:**

To predict the epitopes from the yellow fever virus polyprotein and other Flavivirus polyproteins from Brazil

### **Methodology:**

While mapping is in progress in our laboratory, we use bioinformatics tools and information from a large number of experimental epitopes from other Flaviviruses available in the IEDB for a comparative analysis against the YFV proteome in order to project targets of the YFV immune response. The complete sequences of the structural and non-structural proteins of the Brazilian vaccine strain and of the other flaviviruses were obtained from EXPASY and the homology with the proteins was determined through the CLUSTAL OMEGA. To analyze sequence conservation among different Flavivirus species, the following method was used: for YFV, zika virus, e dengue virus I, II, III and IV at consensus sequence it was derived from a multiple sequence alignment of all strains matching the respective taxonomic ID (PO3314, Q32ZE1, Q80RP0,

Q8QR27, Q6B523 e H2EJJ4 respectively). The BLAST search was performed using the consensus sequence to identify a representative strain of the following criteria: complete proteome having highest sequence identity to the consensus and full annotation of individual proteins (residue positions).

**Results:**

We found a significant level of overlap between known antigenic sites of other Flavivirus proteins with residues in the YFV polyprotein. E and NS1 proteins shared functional antibody epitopes, whereas regions of T cell reactivity were conserved in NS3 and NS5 for YFV.

**Conclusion:**

The analysis performed based on epitopes described, provided a good orientation of the knowledge of a set and the location of cross-reaction targets of regions of the YFV polyprotein with other flaviviruses. These data may be useful and therefore provide novel approaches for the development of specific B-cell and T-cell antibodies specific for diagnosis, therapy and prophylaxis.

**Keywords:** Bioinformatics; Epitope; Prediction

## **OTR 05 - Detection of antibodies anti horse albumin and anti horse IgG3 in a population of Rondonia state**

Salvatore Giovanni De Simone<sup>1</sup>; Armando F Noguera<sup>2</sup>; Anibal Raphael Gimenez<sup>3</sup>; Aniesse Silva Aguiar<sup>3</sup>; Patricia Fernandes<sup>1</sup>; Michelle Pacheco de Lima<sup>1\*</sup>; Paloma Napoleão Pêgo<sup>1</sup>.

1CDTS / Fiocruz;

2IOC / Fiocruz;

3Instituto Vital Brazil.

### **Introduction:**

Allergy to hoSA is exceptional, in individuals who received therapeutics preparations of horse. However to our knowledge, there is little information about this antigen in reactions produced and evolutive studies in patients sensitized with therapeutic preparation of horse. In Brazil, hoSA is considered a minor allergen in therapeutic preparations produced in horses, but fragments of hoSA were detected by mass spectrometry in these preparations. Since allergic sensitization to antivenom has been reported, anaphylactic reactions to therapeutic horse sera might be an underestimated factor contributing to fatal cases of anaphylaxis. However, little information is available on the determinants of such reaction. Hence, we studied a group of individuals living in the Rondônia State of Brazil exposed to therapeutic horse antivenom (hoAV) preparation, in order to clarify the factors related with antivenom allergy.

### **Objective:**

The aim of this work was to investigate the prevalence and predictors of antivenom allergy among individuals exposed to hoAV and to confirm the involvement of IgE anti-hoIgG3-mediated mechanisms in this condition.

### **Methodology:**

Individuals exposed to hoAV were assessed for antivenom allergy using questionnaires and immunological tests. The presence of horse sera sensitization was determined through quantification simultaneous of specific anti-horse IgE (anti-hoIgE), anti-horse IgG (anti-hoIgG) and anti-horse serum albumin (anti-hoSA). Allergens were studied using enzyme linked immunoenzymatic assays (ELISA).

**Results:**

Of the 45 individuals evaluated, 7 (10.4%) presented specific IgE antibodies to horse IgG3 (hoIgG3). Of those, 6 presented typical symptoms of an IgE-mediated allergic reaction when exposed to hoAV. hoIgG3 sensitization was associated with length of employment ( $P=0.042$ ) and high levels of total IgE ( $P=0.034$ ), atopy ( $P=0.051$ ).

**Conclusion:**

Our observations suggest that the level of exposure to hoAV can result in allergic sensitization in snake handlers through IgE-mediated mechanisms. The prevalence rate of this condition appears to be high among these individuals which living near the forest. Increase in exposure to equine therapeutic preparations, and history of atopy was predictors of its occurrence.

**Keywords:** Anaphylatic reaction; Therapeutic immunoglobulins; Immunological assay

## **OTR 06 - Atividade moluscicida de extrato butanólico e nanoformulação de *Sideroxylon obtusifolium***

Leonardo S. Rangel<sup>1\*</sup>; Jose Augusto A. Santos<sup>1</sup>; Robson X. Farias<sup>2</sup>.

1IOC / Fiocruz, LAPSA;

2IOC / Fiocruz, LabTOXO.

### **Introdução:**

Causando a segunda maior doença infecto-parasitária mundial, o *Shistosoma mansoni* é presente no Brasil e estima-se que haja mais de 2,5 milhões de infectados. A infecção ocorre em ambientes aquáticos através de penetração cutânea ativa das cercarias, forma larvar caudal que sai dos hospedeiros intermediários *Bimphalaria sp.* O tratamento é restrito ao Praziquantel®, que não é 100% eficaz e não age em todas as formas do parasito. A melhor maneira de prevenção é o controle populacional do hospedeiro intermediário e saneamento básico. A Niclosamida® é o único método químico de controle populacional, porém, é tóxico para outras espécies e ao ambiente. Como alternativa biotecnológica e sustentável, os testes com plantas são desenvolvidos.

### **Objetivo:**

Avaliar a ação moluscicida da planta *Sideroxylon obtusifolium* (Quixabeira, espinheiro, maçaranduba-da-praia) usando a fração Butanólica obtida das folhas, sobre o molusco *Biomphalaria glabrata*.

### **Metodologia:**

As folhas secas foram submetidas à extração por percolação com etanol a 96°GL. O extrato bruto obtido foi submetido à extração com solventes de polaridade crescente. O ensaio moluscicida foi realizado segundo a metodologia descrita pelo *World Health Organization*, 1965, empregando caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* com tamanho de 10-12mm, livres de infecção por *S.mansoni*. O extrato butanólico foi testado em soluções aquosas nas concentrações de 50, 100, 125, 150, 200, 250 e 300 mg/L. A nanoformulação baseada na fração butanólica foi testada em soluções aquosas nas concentrações de 0.01, 0.1, 1.0, 10, 25, 50 e 100 mg/L. O teste foi feito em triplicata usando grupos de 3 moluscos para cada extrato e controles. Para controle positivo utilizou-se Niclosamida® a 1 mg/L e para controle negativo utilizou-se água des-

tilada e DMSO 1%. A mortalidade dos caramujos foi observada após 24, 48, 72 e 96 horas do início do experimento. A ausência de retração dos caramujos para dentro de suas conchas e/ou a liberação de hemolinfa, foram os critérios de morte.

**Resultado:**

A fração butanólica apresentou atividade de 100% na concentração de 200 mg/L (DL50 = 130 mg/L, n= 21, R<sup>2</sup>: 0.952). Tal fração foi selecionada de forma biodirecionada, devido a sua composição rica em Saponinas. Comprovada a ação da fração butanólica, foi realizado teste com nanoformulação baseada na mesma. Com isso, seria possível maior dispersão do ativo no meio, além de maior capacidade de absorção das partículas ativas pela mucosa do molusco. A nanoformulação apresentou ação de 100% na concentração de 1.0 mg/L (DL50 = 0.07 mg/L, n= 21, R<sup>2</sup>:0.799)

**Conclusão:**

A fração Butanólica apresentou ação moluscicida de 100% na concentração de 200 mg/L e a Nanoformulação na concentração de 1 mg/L, demonstrando-se, como excelente alternativa ao controle do molusco. É necessário apenas a avaliação tóxica dos compostos testados sobre outras espécies aquáticas(microcrustáceos).

**Palavras-chave:** *Biomphalaria glabrata*; Esquistossomose; Moluscidas

## **OTR 07 - Integração metabólica na interação micobactéria-hospedeiro: nova abordagem para intervenção terapêutica em doenças infecciosas**

Katherine Antunes de Mattos<sup>1\*</sup>; Julio Jablonski Amaral<sup>2</sup>; Marcia de Berredo Pinho Moreira<sup>3</sup>; Patricia Torres Bozza<sup>4</sup>; Georgina Correa Atella<sup>5</sup>; Maria Cristina Vidal Pessolani<sup>3</sup>.

1Bio-Manguinhos / Fiocruz, Laboratório de Controle de Qualidade; IOC / Fiocruz, Laboratório de Microbiologia Celular;

2Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO;

3IOC / Fiocruz, Laboratório de Microbiologia Celular;

4IOC / Fiocruz, Laboratório de Imunofarmacologia;

5Laboratório de Bioquímica de Lipídeos e Lipoproteínas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

### **Introdução:**

Hanseníase é uma das doenças mais antigas que ainda afligem a humanidade com deformidades irreversíveis, decorrente da infecção do *Mycobacterium leprae* (ML) nas células de Schwann (CS) e conseqüente acometimento dos nervos. Apesar de aceitável a eficácia do tratamento, evidências epidemiológicas e biológicas reforçam a necessidade de investigação de novos alvos terapêuticos pela crescente resistência bacteriana à polioquimioterapia.

### **Objetivo:**

Avaliar o nível de integração metabólica durante a infecção micobacteriana, através da abordagem lipidômica no hospedeiro. Esta estratégia metodológica visa identificar potenciais alvos para estratégias terapêuticas alternativas e/ou complementares, no tratamento de doenças metabolo-infecciosas, como hanseníase.

### **Metodologia:**

O perfil metabólico disparado durante a infecção foi analisado através da estratégia lipidômica de células do sistema nervoso, CSs infectadas in vitro e biópsias de nervos de pacientes. O perfil lipídico foi traçado por análises de HPTLC, microscopia e citometria de fluxo. A expressão de receptores e fatores de transcrição envolvidos na homeostase do colesterol do hospedeiro foi investigada por microscopia confocal e citometria de fluxo. Estudos funcionais

do papel do colesterol foram realizados utilizando-se a abordagem terapêutica, envolvendo drogas que bloqueiam a síntese e captação de colesterol e o tráfego de vesículas lipídicas, através da inibição do rearranjo do citoesqueleto. A significância do tratamento com diferentes drogas, focando a intervenção nas vias do colesterol, foi investigada por citometria de fluxo para avaliar o perfil de associação e viabilidade micobacteriana frente ao acúmulo de lipídeos intracelulares nas CSs.

### **Resultado:**

A abordagem lipídômica nos permitiu identificar vários metabólitos alterados durante a infecção micobacteriana, destacando-se a via do colesterol. As implicações funcionais previstas pela avaliação gênica e proteica de pacientes foram confirmadas pelo aumento da expressão de receptores envolvidos na homeostase do colesterol, estando este co-localizado com bactérias no fagossoma. Para identificar esta estreita relação entre desregulação da via do colesterol no hospedeiro e infecção pelo ML, a estratégia de inibir a via de síntese e captação do colesterol do hospedeiro pela intervenção terapêutica com estatinas e inibidores de citoesqueleto resultou em uma menor capacidade de associação do ML com as CSs, maior efeito bactericida e menor acúmulo de colesterol intracelular.

### **Conclusão:**

O rastreamento da principal via metabólica modulada na hanseníase demonstrou a via do colesterol como potencial alvo de intervenção terapêutica, o que nos permitiu propor uma estratégia racional de utilização da estatina, eleita pela sua clássica ação moduladora do metabolismo do colesterol no hospedeiro. Assim, o entendimento da integração metabólica durante a interação ML-hospedeiro permitiu mapear biomarcadores que sirvam de impressão digital da infecção e consequentemente como alvos de intervenção para o tratamento de doenças infecciosas bacterianas que envolvam distúrbios metabólicos.

**Palavras-chave:** Lipidômica; Hanseníase; Intervenção terapêutica

## **OTR 08 - Análises estratégicas para minimizar reação cruzada em Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise do vírus da ZIKA**

Stephanie Almeida da Silva<sup>1\*</sup>; José Henrique Rezende Linhares<sup>1</sup>; Vanessa de Oliveira Santos<sup>1</sup>; Emily Hime Miranda<sup>1</sup>; Kátia Paulino Ribeiro de Souza<sup>1</sup>; Felipe Soares Figueiredo<sup>1</sup>; Marcia Archer da Motta<sup>1</sup>; Elena Caride<sup>1</sup>; Marcos da Silva Freire<sup>1</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

O vírus ZIKA atualmente está disseminado em países da África, Ásia e Américas. Os sintomas são semelhantes aos de Dengue. Entretanto, após sua emergência no Brasil, observou-se o aumento de casos de microcefalia e síndrome de Guillain-Barré. Ao nível de diagnóstico, recomenda-se o Teste de Neutralização por Placas de Lise (PRNT, do inglês Plaque Reduction Neutralization Test) como teste confirmatório ao ELISA, uma vez que este método é considerado padrão ouro para quantificação de anticorpos neutralizantes. Entretanto, estudos preliminares demonstram a ocorrência de falsos positivos em pacientes que apresentaram infecção prévia por outros flavivírus. Sendo assim, avaliar estratégias para minimizar reações cruzadas é indispensável para a obtenção de um resultado confiável.

### **Objetivo:**

O principal objetivo do estudo é minimizar reações cruzadas com flavivírus no PRNT de ZIKA, a partir da análise de endpoint , 50% e 90%, e do tempo de neutralização do teste.

### **Metodologia:**

Para esta avaliação foram utilizadas quinze amostras, divididas em grupos, sendo: duas amostras positivas para ZIKA e negativas para Dengue (Z+/D-); duas amostras positivas para ZIKA e Dengue (Z+/D+); onze amostras coletadas no período anterior à circulação do vírus no Brasil, logo, negativas para ZIKA, porém entre estas, oito são positivas para Dengue (Z-/D+) e três são negativas para estes dois flavivírus , no entanto, positivas para Febre Amarela (Z-/D-/F+). Esses grupos foram todos previamente testados por PRNT de

Dengue, e Febre Amarela no caso do último grupo . Além disso, os grupos positivos para ZIKA foram selecionados por quadros clínicos característicos e confirmados por PRNT. Os resultados foram analisados por 50% (PRNT<sub>50</sub>) e 90% (PRNT<sub>90</sub>) de redução do vírus. Avaliou-se também o tempo de neutralização do teste, 1 e 2 horas.

### **Resultado:**

O tempo de neutralização não impacta significativamente no título da amostra, escolhendo-se assim o tempo de 1 hora para otimizar o tempo do ensaio. Nesta análise exploratória, observou-se que por PRNT<sub>50</sub> as amostras do grupo Z-/D-/F+ apresenta uma pequena neutralização, enquanto que por PRNT<sub>90</sub> os títulos encontram-se abaixo do limite de detecção do teste, o que sugere que não há reação cruzada com este flavivírus. Entretanto, o grupo Z-/D+ apresenta quatro amostras com títulos próximos à amostra de menor título do grupo Z+/D- quando analisado por PRNT<sub>50</sub>, e apenas uma amostra com esse perfil quando analisado por PRNT<sub>90</sub>. Sendo assim, verifica-se a presença de reação cruzada com Dengue, que pode ser minimizada pelo PRNT<sub>90</sub>, por ocasionar uma maior separação entre os grupos positivos e negativos para ZIKA.

### **Conclusão:**

Mais análises devem ser realizadas. No entanto, o estudo sugere que não há reação cruzada com amostras positivas para Febre Amarela em PRNT de ZIKA. No entanto, este evento ocorre com amostras positivas para Dengue, podendo ser minimizado com o aumento do percentual de neutralização de 50% para 90%.

**Palavras-chave:** ZIKA; Reação cruzada; PRNT

## **OTR 09 - Partnerships for productive development as an instrument for promotion of industrial development and innovation capacity: the case of Bio-Manguinhos**

Felipe Rodrigues Semcovici Ramos<sup>1\*</sup>; Thiago Botelho Azeredo<sup>2</sup>.

1UFRJ; Bio-Manguinhos;

2UFRJ.

### **Introduction:**

The Partnerships for Productive Development (PDP) consist in formal technology transfer agreements between public institutions and private companies. They are aimed at reducing national technology dependence, rationalizing the State's purchasing power, amplifying access to strategic products and promoting the formation of structural conditions to increase production and innovation capacity - all whilst prioritizing the development of the public sector network and its strategic role for Brazilian National Health System (SUS).

### **Objective:**

To describe the historical agenda of Bio-Manguinhos in the political scenario for innovation and technology capacitation in the health sector.

To describe the profile the PDPs held in Bio-Manguinhos, providing useful information to the current and future PDP in the Institute.

### **Methodology:**

Historical agenda: primary and secondary sources in the literature were searched, using as key words: Bio-Manguinhos; technology transfer; innovation in health; technology capacity. A list of relevant thesis, official documents and published books were used as source to trace the Institute historical agenda.

Bio-Manguinhos partnerships profile: a data survey was performed to collect official public documents describing and characterizing the PDPs. The specific partnerships held in Bio-Manguinhos were identified and characterized by a set of parameters (number of contracts, type of product, therapeutic class, PDP phase). The profile served as a basis to analyze the partnerships in regard to aspects of access to medicines, innovation and technology capacity building, and attendance to SUS demands of strategic products.

**Results:**

Bio-Manguinhos historical agenda elicits its intense adoption of the technology transfer strategy as the means to promote technology capacity building. This strategy has initially focused on the production of vaccines, being lately extended to diagnostic tests and biopharmaceuticals. The technology transfer process has demonstrated to be fruitful and satisfactory at the Institutional level, once BioM holds favorable conditions such as installed industrial capacity, qualified technical-scientific human resources and a consumer market with elevated purchasing power (SUS).

The data collection from official public documents indicated a total of 15 PDP held in Bio-Manguinhos, most in phase II and III, with 93% of partnerships involving biopharmaceuticals. Those products are divided in seven therapeutic classes, among which the oncologic ones are the most representative class (33%). Bio-Manguinhos holds 41% of all PDP for biopharmaceuticals. The PDP Profile mostly explores imitative innovation strategies in the maturation phase of the technologies and concentrates efforts in productive capacitation. Potential fragility scenarios were identified and reinvestments proposed to induce innovation cycles within the institute.

**Conclusion:**

The results indicated Bio-Manguinhos relevance for supplying SUS demands of immunobiologicals. The institutional PDPs represent an initiative that propels considerable efforts to revert the technological dependance scenario and strengthen national innovation system. Furthermore, relevant information was provided to assist tracing further improvement actions for ongoing and future partnerships.

**Keywords: Partnerships for Productive Development; Innovation in Health; Technology Capacity Building**

## **OTR 10 - Desenho da qualidade com uso da técnica de espectroscopia RAMAN portátil para a inovação na indústria biotecnológica**

Cristine Maria de Lima Andrade<sup>1</sup>; Willian Gonçalves Ferreira<sup>1</sup>; Mariana Praia Borges<sup>1\*</sup>; Guilherme Marques Antunes<sup>1</sup>; Vitor Sisino Brasil<sup>1</sup>; Leila Lahas<sup>1</sup>; Ester Ribeiro de Figueiredo<sup>1</sup>; Claudia Maria Dias<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / Fiocruz.

### **Introdução:**

A detecção pela técnica de espectroscopia Raman, pode ser empregada para identificar e avaliar vários materiais farmacêuticos, quanto a riscos de adulterações ou falsificações, sendo indicada pelo Food and Drug Administration dos EUA (USFDA). A espectroscopia Raman é uma técnica fotônica de alta resolução que pode proporcionar, em segundos, informação química e estrutural de materiais, compostos orgânicos ou inorgânicos permitindo sua identificação com uma única impressão digital vibratória. A vantagem do RAMAN, inclusive na comparação de modelos portáteis, é que a informação estrutural no nível molecular apresenta maior especificidade, em comparação com as bandas espectrais Infra-Vermelho Próximo (NIR), geralmente muito amplas e sobrepostas.

### **Objetivo:**

Desenvolver e validar o método analítico, produzir as instruções de operação do equipamento, protocolos de validação e o fluxo de trabalho do novo desenho da qualidade para inspeção de matérias-primas de acordo com a RDC 17/2010, com representatividade de 100% do tamanho do lote.

### **Metodologia:**

Utilizar o equipamento Truscan Raman, faixa espectral 250 a 2875  $\text{cm}^{-1}$  e laser à excitação  $\lambda$  785 nm através de leitura direta no frasco. Para aplicação, foram elegidas sete matérias-primas para desenvolvimento e validação do método analítico (lactose anidra, sacarose, manitol, carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, fosfato de sódio monobásico monohidratado, fosfato dissódio anidro). Selecionaram-se respectivos padrões para biblioteca, definidos a partir de lotes aprovados por métodos preconizados em compêndios

oficiais (USP e EP) pelo laboratório físico-químico, realizaram-se análises concomitantes de amostra padrão (controle positivo) e de material estruturalmente semelhante (controle negativo), além de cada matéria-prima estudada. Definiu-se o protocolo de validação, segundo RE899, a categoria IV para o método de identificação.

### **Resultado:**

Foi finalizada a identificação das sete matérias-primas elencadas neste novo desenho da qualidade através da espectroscopia RAMAN, dos seus respectivos controles positivos de padrões da biblioteca e negativos, de todos os protocolos de validação de cada produto do escopo, atingindo-se assim a completa validação analítica do método.

A partir deste trabalho, foi concluída a etapa de partida para atendimento e mudança ampliada do desenho de qualidade proposto, em direção à análise de 100% do tamanho do lote de matérias-primas conforme RDC 17/2010, até então com entraves de logística e operação para as áreas afins no processo.

### **Conclusão:**

A nova abordagem de controle de qualidade, em que a qualidade deve ser testada em linha, em estágios iniciais de fabricação, elimina etapas de fracionamento de amostragem, preparo de amostra e natureza não-invasiva, volume de amostras para realização de método analítico de maior complexidade. E esta nova abordagem promove a técnica portátil de espectroscopia RAMAN e introduz nova tecnologia de medição e desenvolvimento, fabrico e garantia de qualidade, desde matérias-primas, produtos farmacêuticos intermediários e acabados. O benefício se ampliará a extensão com o uso do método RAMAN, uma vez que será replicável em mais de 100 matérias-primas.

**Palavras-chave:** Espectroscopia RAMAN; Qualidade; Indústria Biotecnológica

## **OTR II - Desenvolvimento de estratégia de purificação de Imunoglobulina M**

Hilton Jorge Nascimento<sup>1</sup>; Renata Chagas Bastos<sup>1</sup>; Luãna Elisa Liebscher Vidal<sup>1</sup>; Patricia Barbosa Jurgilas<sup>1</sup>; Priscila Muniz da Paz<sup>1</sup>; Izabella Sodré Buty da Silva<sup>1\*</sup>; Alexandre Bezerra Conde Figueiredo<sup>2</sup>; Márcia Arissawa<sup>2</sup>; José Godinho da Silva Junior<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Bio-Manguinhos / FIOCRUZ, LAMAM;

<sup>2</sup>Bio-Manguinhos / FIOCRUZ, LATAM.

### **Introdução:**

Imunoglobulinas do tipo M são excelentes imuno marcadores para detecção de doenças na fase aguda. Neste contexto, Bio-Manguinhos produziu cinco IgM monoclonais diferentes para serem utilizados no desenvolvimento de um teste diagnóstico (em processo de patente). Via de regra, a purificação de IgM requer várias etapas, envolvendo processos de precipitação principalmente salina e métodos cromatográficos que devem ser otimizados em função da proteína alvo. As metodologias utilizadas para o isolamento e purificação de IgM influenciam diretamente a especificidade e sensibilidade de ensaios imunológicos. Neste trabalho, visamos desenvolver uma metodologia que pode ser aplicada para as diferentes IgMs produzidas, com menor tempo de execução, maior recuperação proteica e reprodutibilidade.

### **Objetivo:**

Este estudo visa a otimização de um protocolo de purificação de IgM envolvendo, precipitação com PEG associado às cromatografias de exclusão molecular e troca iônica.

### **Metodologia:**

Amostras obtidas a partir de diferentes clones secretores de IgM foram submetidos à precipitação com PEG-6000 à 4%. Os sobrenadantes obtidos foram incubados novamente com PEG-6000 em concentrações variando de 5 a 13% de concentração final para avaliação da cinética de precipitação de IgM. Os precipitados foram analisados por SDS-PAGE e cromatografia de exclusão molecular (SEC) em coluna Superdex 200 (10/30) para estabelecer a condição

que favorece a maior concentração da IgM. Após definição da condição ideal de precipitação, o material foi submetido à SEC em coluna Superdex 200 High Load 26/60. As frações contendo IgM foram reunidas e submetidas a cromatografia de troca iônica (IEX) em coluna Poros 50HQ. A homogeneidade das frações purificadas foi analisada por SDS-PAGE.

### **Resultado:**

A precipitação inicial com PEG 4% reduziu em 88% o teor de albumina contida nas amostras avaliadas por SDS-PAGE. Entretanto, a fração contendo IgM apresentou apenas 6,14% da área total analisada por SEC, sugerindo a necessidade de uma segunda precipitação para concentrar a fração de IgM.

Pela avaliação da cinética de precipitação subsequente observou-se que PEG na concentração final de 10% promoveu um aumento do pico de IgM de aproximadamente 5 vezes (51,72% de área total) em relação à amostra tratada com PEG 4%. Concentrações de PEG superiores a 10% promovem a precipitação de outros contaminantes que podem incluir a alfa 2 macroglobulina, principal contaminante de preparações de IgM comercial. O perfil obtido após SEC permitiu a separação de proteínas de médio a baixo peso molecular, incluindo a albumina residual. Contudo, por SDS-PAGE verificou-se a presença de contaminantes, sendo necessário uma segunda etapa cromatográfica para a purificação. A melhor condição para isolamento de IgM por IEX foi utilizando-se um gradiente do tipo degrau, no qual IgM eluiu com 0,4M de NaCl.

### **Conclusão:**

O protocolo proposto de precipitação com PEG, SEC seguido por IEX promoveu o isolamento das imunoglobulinas tipo M produzidas em diferentes clones de forma eficiente e rápida.

**Palavras-chave:** IgM; Purificação; monoclonal

**ÍNDICE ONOMÁSTICO****A**

- Adriana Bonomo 110  
Adriano Gomes da Silva 126  
Alaíde Aline Xavier Leal da Motta 118  
Alessandra Santos Almeida 18, 22  
Alexandre Bezerra Conde Figueiredo 52, 142  
Alexandre dos Santos da Silva 124  
Alexandre Fialho 16  
Alexandre Oliveria Saisse 88  
Aline Carvalho de Azevedo 72  
Aline da Silva Lima 114  
Aline de Almeida Oliveira 110  
Aline de Araújo Pereira 114  
Aline de Oliveira Albuquerque 52  
Álvaro Paiva Braga de Sousa 50  
Alvaro Velloso 16  
Ana Carolina Silva Guimarães 124  
Ana Caroline Cavalcante de Araújo 68  
Ana Luisa Furtado 20  
Ana Maria Bispo de Filippis 82  
Ana Maria Pereira dos Santos 44  
Ana Paula Argondizzo 44  
Ana Paula dos Santos 26  
Ana Paula Sayuri Sato 106  
Anderson Alex da Silva 46  
Anderson Peclat Rodrigues 42  
André da Silva Tavares 24  
André Luis Almeida Souza 74, 80, 88, 102, 122  
Andre Luiz Pires 46  
André Ribeiro de Oliveira 114  
Andressa da Matta Durans 92  
Anibal Raphael Gimenez 130  
Aniesse Silva Aguiar 130  
Anna Erika Vieira de Araújo 58  
Annarita Falanga 62  
Antônio Eugenio Castro Cardoso de Almeida 32, 34  
Antonio G. P. Ferreira 94, 96, 98

Arlindo Rodrigues Galvão Filho 126  
Armando F Nogueira 130  
Arnaldo Maldonado Junior 80  
Artur Hermano Sampaio Dias 52

## B

Beatriz Chaves 54  
Beatriz Cyranka 28

## C

Caio Augusto Santos Rodrigues 86  
Carina Cantelli Pacheco de Oliveira 16  
Carla Mônica Pinheiro 30  
Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida 60  
Carlos José Saldanha Machado 116  
Carolina Lessa-Aquino 84  
Caroline Moura Ramirez 42  
Célia Machado Ronconi 76  
Celso Farias Crespo 42  
Cíntia Cardoso da Costa 30  
Clarimar José Coelho 126  
Claudia de Alencar Santos Lage 60  
Claudia Ferreira Andrade 72  
Claudia Maria Dias 140  
Claudia Maria Lopes Leibel 30  
Claudia Vera Pizzini 100  
Cristiane Caldeira da Silva 18, 22  
Cristine Maria de Lima Andrade 110, 114, 140

## D

Daniel André Ribeiro 108  
Daniel Arêas da Silva Pinto 108, 118  
Daniela T. Godoy 94, 96, 98  
Daniel Da Silva Guedes Junior 18  
Daniele Alves de Oliveira 42  
Daniele Rocha 94, 96, 98  
Darcy Akemi Hokama 16  
David William Provance-Jr 88, 90, 92, 102  
Débora Souza Beck 86

Denise Cotrim 16  
Denise Cristina de Souza Matos 38  
Denise Pereira 26

## E

Edimilson Domingos da Silva 84  
Elaine Costa 94, 96, 98  
Elaine Cristina Azevedo Navega 22  
Elba Regina Lemos 74, 88  
Elena Caride 24, 136  
Eliane Matos dos Santos 40  
Elisabete Andrade 94, 96, 98  
Elisangela Martins de Lima 86  
Emily Hime Miranda 136  
Erica Louro da Fonseca 28  
Ester Ribeiro de Figueiredo 140  
Esther Vinhais Guitierrez 64  
Esther Vinhais Gutierrez 66  
Esther Vinhais Gutierrez1 56  
Ethiene da Silva Corrêa Rocha 50  
Etiene Moreira Gabriel 26

## F

Felipe Soares Figueiredo 136  
Fernanda Martins 26  
Fernando Almeida-Silva 100  
Fernando Couto Motta 20  
Flávia Coelho Garcia dos Reis 92, 102  
Fred Luiz Furriel de Oliveira 46

## G

Gabriela dos Santos Esteves 84  
Gabriel de Vasconcelos Feixas Ferreira da Silva 128  
Gabriel Vasconcelos 62  
Geiseane da Conceição Corrêa 58  
Georgia Correa Atella 134  
Gisela Freitas Trindade 24, 38  
Giselle Santana de Oliveira 78  
Greice Maria Silva da Conceição 28

Guilherme Coelho 126  
Guilherme Marques Antunes 140  
Guilherme Padalecki Silva dos Anjos 124  
Guillermo Marini 68  
Gustavo Teodoro Laureano 126

## H

Haroldo Cid da Silva Junior 58, 84  
Hilton Jorge dos Santos 78  
Hilton Jorge Nascimento 142  
Hugo Garcia Tonioli Defendi 116

## I

Isabella Fernandes Delgado 22  
Isabelly Santos Pereira 44  
Isis Campos Prado 74, 76, 92  
Isis C Prado 88, 90  
Ivano de Filippis 72  
Ivna Alana Freitas Brasileiro da Silveira 18, 26  
Izabella Sodré Buty da Silva 142  
Izabel Paixão 62

## J

Jaline Alves Cabral 20  
Janaína Duque de Souza 112  
Janaina Reis Xavier 40  
Jéssica Goulart Garcia 112  
Jéssica Malherios 38  
João Hermínio Martins da Silva 52, 54  
Jose Augusto A. Santos 132  
José Godinho da Silva Junior 78, 142  
José Henrique Rezende Linhares 136  
José Paulo Gagliardi Leite 16  
José Procópio Moreno Senna 58, 68  
Joyce Brito de Carvalho Coelho 28  
Julio Cesar Rodrigues Coelho 42  
Julio Jablonski Amaral 134

**K**

- Karen Soares Trinta 84  
Karen Yumi Miyashiro 86  
Katherine Antunes de Mattos 18, 22, 134  
Kátia Paulino Ribeiro de Souza 136  
Katia Rodrigues Silva 112

**L**

- Laís Nascimento Alves 60  
Leandro Ferraz 20  
Leila Lahas 140  
Leonardo Pereira Quintella 100  
Leonardo S. Rangel 132  
Liliane Monteiro de Moraes 24, 82  
Livia Queiroz Ferreira 46  
Luãna Elisa Liebscher Vidal 78, 142  
Lucas de Paula da Silva Cruz 108  
Luciana Palomba 62  
Luciane Pinto Gaspar 108  
Luiz Augusto Pinto Lima 28  
Luiz Gustavo Almeida Mendes 24, 42

**M**

- Maíra Peixoto Pellegrini 64, 66  
Marcela Fontana 94, 96, 98  
Marcele da Silva Tamara 58  
Marcelo Alves Pinto 124  
Marcia Archer da Motta 24, 136  
Márcia Arissawa 52, 142  
Marcia de Berredo Pinho Moreira 134  
Márcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza 16  
Marco Alberto Medeiros 84  
Marcos Antonio Rodrigues Gomes 46  
Marcos da Silva Freire 32, 34, 136  
Maria Cristina Vidal Pessolani 134  
Maria de Lourdes Aguiar Oliveira 20  
Maria de Lourdes de Sousa Maia 40  
Maria de Lourdes Leal 26  
Maria do Carmo Rosa 20

Mariana Miguez 44  
Mariana Pierre de Barros Gomes 24  
Mariana Praia Borges 140  
Maria Teresa Dias Ferreira 28  
Maria Vargas 62  
Marilda Mendonça Siqueira 20  
Marina Vergne de Almeida 64, 66  
Marisa Ribeiro 94, 96, 98  
Marisa Xavier Souza 42  
Marisa Zenaide Ribeiro Gomes 86  
Marise Dutra Asensi 86  
Marta Cristina de Oliveira Souza 24  
Martin Hernan Bonamino 110  
Matheus Fernandes Guimarães de Oliveira 112  
Mauro de Medeiros Muniz 100  
Michelle Pacheco 90  
Michelle Pacheco de Lima 128, 130  
Miguel Angel de La O Herrera 108  
Monica Elizabeth Alcoón-Chino 88  
Mônica Elizabeth Tatiana Alcón Chino 74  
Monique Borsato Silva Filardi 106

## N

Nathalia Ferreira Valentim da Silva 114  
Newton Dias Lourenço 86

## O

Octávio Augusto França Presgrave 18, 22

## P

Paloma Napoleão Pêgo 80, 90, 92, 102, 122, 128, 130  
Patricia Alvarenga Agra 36  
Patrícia Alvarez 86, 94, 96, 98  
Patricia Barbosa Jurgilas 78, 142  
Patrícia Brasil 16  
Patrícia Cristina da Costa Neves 110  
Patricia Fernandes 90, 130  
Patrícia Fernandes Ferreira 80, 102  
Patricia Mouta Nunes de Oliveira 40

Patrícia Neves 26  
Patricia Torres Bozza 134  
Patrick Guyot 28  
Paulo Roberto Gomes dos Santos 40  
Pedro Augusto Alves 28  
Priscila Born 20  
Priscila Muniz da Paz 142  
Priscila Ramos Coimbra Martins 28

## R

Raiane Borges Gomes 74  
Raquel Ferraz Nogueira 66  
Reinaldo de Menezes Martins 40  
Renata Chagas Bastos 142  
Renata Siqueira Julio 106  
Renato Becho Moura 42  
Rhayssa Maia Costa Pinto 112  
Ricardo Jorgensen Cassella 76  
Robson X. Farias 132  
Rodrigo Coelho Ventura Pinto 50, 56, 64, 66  
Rosane Cuber Guimarães 32, 34  
Rosely Maria Zancopé-Oliveira 100

## S

Saint Clair S. Gomes Junior 86  
Salvatore Giovanni De-Simone 62, 74, 76, 80, 88, 90, 92, 102, 122, 128  
Sandra Bianchini Fernandes 20  
Sérgio Luiz de Lima Assumpção 36  
Sérgio Mouta 16  
Sheila Maria Barbosa de Lima 24, 38, 82, 136  
Simone de Amorim Chermont 78  
Sotiris Missailidis 60, 82  
Stefania Galdiero 62  
Stephani da Silva Ribeiro 86  
Stephanie Almeida da Silva 136  
Sthefanie Ribeiro 94, 96, 98

**T**

- Tatiana Gregianini 20  
Tatiana Sanjuan Ganem Waetge 116  
Thalita da Matta de Castro 40  
Thiago Botelho Azeredo 138  
Tiago Pereira dos Santos 50, 56, 64, 66  
Túlio Fumian 16

**U**

- Úrsula Fernanda Tavares Rodrigues da Silva 68

**V**

- Vanessa Alvaro Diniz 42  
Vanessa Barreto de Brittes 46  
Vanessa de Oliveira Santos 136  
Vanessa Salete de Paula 124  
Verônica Gonçalves Mendes 122  
Vinícius Alves Pessanha 112  
Vitor Fernandes Silva 18, 22  
Vitor Sisino Brasil 140  
Viveca Giongo 62, 90

**W**

- Wania Renata dos Santos 30, 42, 46  
Willian Gonçalves Ferreira 140

