



## Anais do III Simpósio Internacional de Imunobiológicos







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

# III SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE IMUNOBIOLOGICOS

Anais do III Simpósio Internacional de Imunobiológicos

Rio de Janeiro  
2016



TODOS OS DIREITOS RESERVADOS.

#### PROJETO GRÁFICO E DIAGRAMAÇÃO

Danielle Gandarillas

#### REVISÃO FINAL

Cristina de Albuquerque Possas

Reinaldo de Menezes Martins

#### APOIO LEGAL

Ana Paula Cossenza

Cintia Reis Costa

Livia Rubatino de Faria (NITBio)

#### PRODUÇÃO

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos

Bio-Manguinhos

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos

Rio de Janeiro, RJ - 21040-360

Telefone: (021) 3882-3000

E-mail: [sact@bio.fiocruz.br](mailto:sact@bio.fiocruz.br)

Site: [www.bio.fiocruz.br](http://www.bio.fiocruz.br)

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Seção de Gestão de Documentos e Arquivos (SIGDA)

Bio-Manguinhos, Fiocruz - RJ

S612

Simpósio Internacional de Imunobiológicos (3. : 2016 : Rio de Janeiro, RJ).

Anais do III simpósio internacional de imunobiológicos, Rio de Janeiro, RJ, 2-5 de maio de 2016 / Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Org.). – Rio de Janeiro, 2013.

200 p.

ISBN 978-85-69231-01-1

1. Imunobiológicos. 2. Vacinas. 3. Resumos. I. Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. II. Bio-Manguinhos. III. Título.

CDD 615.372





## CRÉDITOS

### **PRESIDENTE DE HONRA**

Paulo Ernani Gadelha Vieira, presidente da Fiocruz

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

Artur Roberto Couto, diretor de Bio-Manguinhos

Maria da Luz Fernandes Leal, vice-diretora de Qualidade

Antonio de Pádua Barbosa, vice-diretor de Produção

Marcos da Silva Freire, vice-diretor de Desenvolvimento Tecnológico

Lorena Drummond, vice-diretora de Gestão e Mercado

Cristiane Frensch, chefe de Gabinete

### **COMITÊ EXECUTIVO**

Artur Roberto Couto, Akira Homma, Cristiane Frensch Pereira, Gisele Correa Miranda, Patricia Pedroso Porto e Renata Ribeiro Gómez de Sousa.

### **COMISSÃO CIENTÍFICA**

Akira Homma (Coordenação), Adelaide Antunes (UFRJ), Aline de Almeida Oliveira, Amílcar Tanuri (UFRJ), Ana Paula Cossenza, Antonio G P Ferreira, Beatriz de Castro Fialho, Cristiane Frensch Pereira, Cristina de Albuquerque Possas (Coordenação), Elba Lemos (IOC/Fiocruz), Ernesto Marques (CPqAM/Fiocruz), Isabella Lira Figueiredo, Ivna Alana Silveira, Jorge Bermudez (Fiocruz), José Paulo Leite (IOC/Fiocruz), Jose Godinho da Silva Junior, José Procópio Moreno Senna, Luciane Pinto Gaspar, Luiz Antônio Camacho (IOC/Fiocruz), Marcos da Silva Freire, Marco Krieger (IBMP), Maria de Lourdes Sousa Maia, Marilda Siqueira (IOC/Fiocruz), Martin Bonamino (INCA e Fiocruz), Paulo Lee Ho (Butantan), Reinaldo de Menezes Martins (Coordenação), Rodrigo Coelho Ventura Pinto, Rodrigo G. Stabeli (Fiocruz), Sheila Farage e Wilson Savino (IOC/Fiocruz).

### **COMISSÃO JULGADORA DE PRÊMIOS**

Cristina Brandileone, José Mauro Peralta, José Vitor Bomtempo, Lia Hasenclerver, Marco Antonio Stephano e Maria Sato.







## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>VACINAS</b>	<b>19</b>
V1 Eventos adversos pós-vacinação nas estratégias de imunização contra o surto de sarampo no estado do Ceará.	20
V2 Impacto da vacina meningocócica C conjugada sobre a Doença Meningocócica no estado do Rio de Janeiro.	22
V3 Vigilância das coberturas vacinais utilizando indicadores pactuados no Sistema Único de Saúde brasileiro.	24
V4 Avaliação da importância da medição de incerteza em bioensaios para a pesquisa clínica.	26
V5 Impacto da vacina pneumocócica conjugada 10 valente sobre a Meningite Pneumocócica no estado do Rio de Janeiro.	28
V6 Eventos adversos pós-vacinais notificados à Vigilância Epidemiológica do município de Camaçari, Bahia no período de 2014 a 2015.	30
V7 Dietary retinol role and retinoic acid adjuvant effect in mucosal LaAg vaccine efficacy against <i>Leishmania amazonensis</i> infection.	32
V8 Proposal of an intranasal formulation for meningococcal group C conjugate vaccine.	34
V9 Contribuição para o Controle da Qualidade de vacinas inativadas: estudo da decomposição da betapropiolactona em diferentes meios.	36
V10 Study of the immune response induced by different adjuvants.	38
V11 Aplicabilidade de métodos alternativos ao uso de animais no controle de qualidade de biológicos: modelo da vacina contra Febre Amarela.	40





- V12 Collaborative study among Bio-Manguinhos / Fiocruz, PATH and WHO using Yellow Fever vaccines in a controlled temperature chain. \_\_\_\_\_ 42
- V13 Expression of pro inflammatory genes after Yellow Fever vaccination in humans: implications for acquired immune response. \_\_\_\_\_ 44
- V14 Estabelecimento do material de referência da vacina contra Sarampo, Caxumba e Rubéola: evolução para autossuficiência na produção de vacinas. \_\_\_\_\_ 46
- V15 Padronização das reações de PCR em tempo real e microarranjo líquido para determinação do título da vacina tríplice viral. \_\_\_\_\_ 48
- V16 Otimização da vacina brasileira contra meningococo B com base na avaliação dos componentes vacinais na resposta bactericida induzida em camundongos. \_\_\_\_\_ 50
- V17 Yellow Fever vaccine, Recombinant Envelope Protein (rYFE), plant derived, for active immunization – preclinical studies in mice and monkey models. \_\_\_\_\_ 52
- V18 PvMSP9<sub>E795-V808</sub>: antigenicidade e imunogenicidade do epítipo de célula-B identificado *in silico* na Proteína-9 de superfície de merozoítas de *Plasmodium vivax*. \_\_\_\_\_ 54
- V19 Produção e avaliação de uma proteína de *A. marginale* e *Babesia sp.* para uso como imunógeno contra Tristeza Parasitária Bovina. \_\_\_\_\_ 56
- V20 Evaluation of scheduled MRM parameters. A powerful tool for analysis of modified carrier protein of meningococcal polysaccharide C conjugate vaccine. \_\_\_\_\_ 58
- V21 Molecular and epidemiological prospective study of a cohort of children under two years of age (Manguinhos, RJ), vaccinated with Rotavirus vaccine. \_\_\_\_\_ 60
- V22 Synthetic intermediate for meningococcal serogroup C conjugate vaccine production. Quantification and structural aspects. \_\_\_\_\_ 62
- V23 Recombinant proteins of HPV16 capsid expressed in 293-F cells cultured in suspension and serum free medium for vaccine development. \_\_\_\_\_ 64







V24	Amino acid analysis by LC-MS/MS using precolumn derivatization with a TRAQ™ reagent: a preliminary study. _____	66
V25	Prevalence and risk factors associated with hookworm infection in northeastern Brazil: assessing the potential impact of a human hookworm vaccine. _____	68
V26	Avaliação do perfil sorológico materno-infantil de anticorpos neutralizantes contra vírus Dengue em uma coorte clínica. _____	70
V27	Avaliação da combinação das vacinas brasileiras contra <i>Neisseria meningitidis</i> sorogrupos B e C. _____	72
V28	Avaliação estatística dos dados dos estudos de estabilidade da vacina bivalente de poliomielite em comparação com resultados da vacina trivalente. _____	74
<b>BIOFÁRMACOS</b> _____		77
B1	Integration methodologies for risk management in the biopharmaceutical industry. _____	78
B2	Inhibition of the myotoxicity induced by crotoxi B, from <i>Crotalus durissus terrificus</i> venom, by camelid nanobodies. _____	80
B3	Avaliação do contexto regulatório para registro sanitário de anticorpos monoclonais para uso terapêutico. _____	82
B4	Obtenção de alfa-amilase pancreática e maltase-glicoamilase humanas com potencial para desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para Diabetes. _____	84
B5	Clonagem e expressão do domínio transglicosilase da PBP2 de <i>Staphylococcus aureus</i> . _____	86
B6	<i>In silico</i> development of a scFv antagonistic to $\alpha 4\beta 1$ integrin. _____	88
B7	Evaluation of antifungal properties of the chimeric protein WGA-Fc against the fungal cell wall. _____	90
B8	Production of potential cathepsins D for the development of new agents against schistosomiasis. _____	92





B9	Avaliação preliminar de uma bomba centrífuga magnética e seu impacto na viabilidade de células CHO. _____	94
B10	Eritropoetina e controle da qualidade: novas abordagens analíticas para antigas limitações dos bioensaios. _____	96
B11	Modeling of the CD20 and CD52 membrane receptors and study of their interaction with DMPC membrane by molecular dynamic simulation. _	98
<b>REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO</b> _____		101
R1	A protein platform for the rapid bioengineering of multi-epitope antigens and multi-valent biomarkers. _____	102
R2	Accuracy of a DPP Syphilis Bio-Manguinhos assay for simultaneous detection of nontreponemal and treponemal antibodies in patients with acquired Syphilis. _____	104
R3	Obtaining a recombinant antigen of <i>Taenia crassiceps</i> for use in immunodiagnosis. _____	106
R4	Immunological method using magnetic beads for chagas infection diagnosis. _____	107
R5	Recombinant production of antigens and antibodies for diagnosis purposes using synthetic biology methods. _____	108
R6	Clonagem, expressão e purificação de metalo- $\beta$ -lactamase do tipo NDM para o desenvolvimento de um protótipo de teste imunocromatográfico. _____	110
R7	Identificação de culturas de estafilococos resistentes à metilina por imunoensaio de fluxo lateral. _____	112
R8	Detecção de Zika, Dengue e Chikungunya em ensaio molecular multiplex. _____	114
R9	Desenvolvimento de uma nova partícula calibradora para o Kit NAT HIV / HCV / HBV Bio-Manguinhos. _____	116
R10	Chikungunya virus (CHIKV) outbreak in Feira de Santana, Bahia: preliminary report. _____	118
R11	A Luminex-based single DNA fragment amplification assay as a practical tool for detecting and serotyping dengue virus. _____	120





<b>GESTÃO</b>	123
G1	Análise sobre perdas de vacinas e soros no estado do Ceará – 2014/2015. 124
G2	Análise farmacoeconômica das apresentações de somatropina. 126
G3	Proposta de um método de validação de esterilização dos reatores de produção de imunobiológicos. 128
G4	Integrating quality by design inside quality management technology transfer projects in biopharmaceutical industry. 130
G5	Monitoramento Rápido de Coberturas Vacinais (MRC): uma estratégia de supervisão e intervenção no estado do Ceará. 132
G6	Risk assessment: prospective approach on integrity inspection line of an oral vaccine's primary package. 134
G7	Current challenge in pharmacovigilance at Bio-Manguinhos/Fiocruz: detection of drugrelated problems in social media. 136
G8	Avaliação de Impactos de Sistemas, Componentes (AIS/AIC) e de Riscos à Qualidade (ARQ) da linha de embalagem secundária de vacina. 138
G9	Atuação da Comunidade de Práticas de Nanotecnologia (CoP-Nano) em Bio-Manguinhos. 140
G10	Avaliação dos riscos associados às etapas predecessoras em um processo de produção de injetáveis. 142
G11	Gestão e modelagem de processos operacionais: alinhando a assessoria clínica ao novo modelo institucional. 144
G12	Does labelling and packaging design affect efficiency and safety of vaccine? 146
G13	Implantação da gestão de manutenção, calibração e qualificação de equipamentos analíticos de Bio-Manguinhos. 148
G14	Monitoramento rápido de cobertura como instrumento de avaliação do Programa de Imunização do Estado do Rio de Janeiro. 150
G15	Mapeamento de parceiros para desenvolvimento de bioprodutos voltados ao tratamento de neoplasias. 152





G16	Mapeamento de tendências nos projetos acadêmicos, produtos e processos em plataformas vegetais. _____	154
G17	Estudo exploratório do cenário mundial de anticorpos monoclonais terapêuticos para o câncer, através de método de prospecção tecnológica. _____	156
G18	Serviços: papel da Divisão de Atendimento ao Cliente na construção de uma imagem positiva de Bio-Manguinhos junto à Hemorrede NAT. _____	158
G19	Assessment of parameters for lot release of tetanus antitoxin for human use through potency assays by ToBI test. _____	160
<b>OUTROS TEMAS RELACIONADOS _____</b>		<b>163</b>
OTR1	Kasumi-I cell line: an alternative to the potency assay of filgrastim biopharmaceutical. _____	164
ORT2	Immunomodulatory effect of <i>Bacillus cereus</i> var. <i>Toyoi</i> in mice experimentally vaccinated against <i>Leishmania infantum chagasi</i> . _____	166
OTR3	Métodos de genotipagem dos snps funcionais do gene FCGR2C. _____	168
OTR4	Construction and validation of an activating and inhibitory chimeric antigen receptor (CAR) system. _____	170
OTR5	Genomic editing, mediated by CRISPR/Cas9, of PDCDI, CTLA4 e LAG3 loci in T lymphocytes expressing Chimeric Antigens Receptor (CARs). _____	172
OTR6	Manufacturing of high-concentration monoclonal antibodies via an easy to handle disposable modular minifermenter. _____	174
OTR7	Ectopic expression of miR-182 in chimeric antigen receptor-modified T cells. _____	176
OTR8	Avaliação do perfil de replicação do vírus Zika em células Vero. _____	178
OTR9	Padronização da Técnica de neutralização em placa de 96 poços para avaliar a imunogenicidade da Caxumba em vacina combinada. _____	180
OTR10	Study of monoclonal antibody conformational by intrinsic fluorescence spectroscopy. _____	182





- OTR11 Rotavírus A genótipo G26P [19] em criança hospitalizada com gastroenterite aguda: segunda descrição mundial e caracterização genômica completa. \_\_\_\_\_ 184
- OTR12 Influência de diferentes tipos de material biológico na quantificação de anticorpos neutralizantes pelo micro PRNT de Febre Amarela e Sarampo. 186
- OTR13 Comparative molecular docking analysis among six scFv monoclonal antibodies against Hepatitis B virus surface antigen. \_\_\_\_\_ 188
- OTR14 IL28B polymorphisms: population genetics and relevance in the context of brazilian admixed populations. \_\_\_\_\_ 190
- OTR15 Desenvolvimento da cultura primária de hepatócitos de embrião de *Gallus gallus domesticus* para detecção de agentes adventícios em vacinas virais. \_\_\_\_\_ 192
- OTR16 Identificação de variantes gênicas com utilidade clínica em câncer. \_\_\_\_ 194
- OTR17 Diagnóstico universal, ou pandiagnóstico, de todos os patógenos humanos por PCR Multiplex e sequenciamento massivo paralelo. \_\_\_\_\_ 196
- OTR18 Secretome analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* microalgae in response to autophagy inducing conditions. \_\_\_\_\_ 198







## APRESENTAÇÃO

Caro participante,

É com imensa satisfação que o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos/Fiocruz) realiza o III Simpósio Internacional de Imunobiológicos e IV Seminário Anual Científico e Tecnológico como marco de comemoração dos 40 anos de criação do Instituto. Ter a oportunidade de compartilhar este momento ao lado de especialistas na área de imunobiológicos reconhecidos nacional e internacionalmente é um momento impar para as discussões acerca da saúde pública brasileira e mundial sobretudo considerando o momento epidemiológico atual.

A III edição do Simpósio e IV do Seminário objetiva incentivar e motivar profissionais da Fiocruz, de centros universitários e de instituições parceiras ao aperfeiçoamento e qualificação em suas áreas de atuação, criando um ambiente favorável à inovação.

Idealizado para propiciar o debate entre palestrantes e participantes, o Simpósio oportunizará a troca de informações e estimulará novas parcerias em redes colaborativas de pesquisa voltadas ao desenvolvimento de novos processos e produtos e contribuir para as discussões em prol das estratégias de saúde pública nas áreas de vacinas, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos, Em sua programação, temas fundamentais como Zika e tecnológicas inovadoras serão tratados.

Aproveite ao máximo!

Cordialmente,

**Artur Roberto Couto**  
Diretor de Bio-Manguinhos









## INTRODUÇÃO

Como um dos eventos comemorativos do seu aniversário de 40 anos e objetivando o fortalecimento institucional, Bio-Manguinhos organizou o III Simpósio Internacional de Imunobiológicos que ocorre a cada cinco anos; a cada ano, é organizado o Seminário Anual, ambos focando em 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 recentes e permitem antever o estado da arte, as tendências, o futuro desenvolvimento e novos produtos para estas áreas. Estas 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 o prêmio Oswaldo Cruz, Carlos Chagas e Alcides Godoy e de Jovem Talento Científico, com os prêmios Henrique de Azedo 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 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 nobre que permite a interação e troca de informações entre os profissionais envolvidos, buscando maior integração institucional.

Este Simpósio, com mais de 600 inscrições e de 120 resumos, mostra o interesse da sociedade e da comunidade de imunobiológicos em alcançar o desiderato maior: aumentar o acesso à população de imunobiológicos importantes para a Saúde Pública.





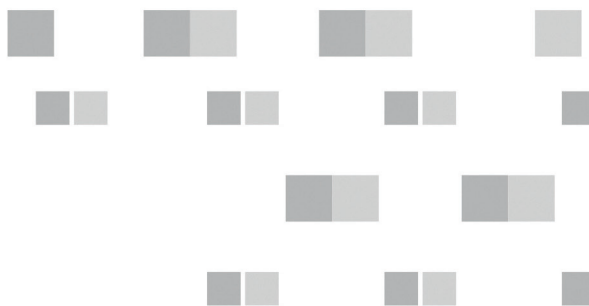
Agradecemos a todos que fizeram possível a organização deste evento, à Diretoria de Bio-Manguinhos, aos apresentadores das sessões, aos participantes estrangeiros e nacionais, aos patrocinadores e parabenizamos os premiados.

**Akira Homma**  
Pela Comissão Científica





# VACINAS





## VI. EVENTOS ADVERSOS PÓS-VACINAÇÃO NAS ESTRATÉGIAS DE IMUNIZAÇÃO CONTRA O SURTO DE SARAMPO NO ESTADO DO CEARÁ.

Surama Valena Elarrat Canto<sup>1</sup>; Ana Débora Assis Moura<sup>1</sup>; Ana Karine Borges Carneiro<sup>1</sup>; Ana Vilma Leite Braga<sup>1</sup>; Elaine Cristina da Silva Alves Bastos<sup>1</sup>; Tereza Wilma Silva Figueiredo<sup>1</sup>.

1 Secretaria da Saúde do Estado do Ceará - Núcleo de Imunizações.

**INTRODUÇÃO** Entre 25/12/2013 e 12/09/2015, foram notificados no estado do Ceará 4094 casos suspeitos de sarampo, sendo confirmados 22% (916 casos) e descartados 78% (3178 casos), sendo o último caso confirmado em 06/07/2015. Neste período foram implementadas várias estratégias de imunização para a contenção do surto de sarampo no estado, dentre elas: vacinação de rotina nos serviços de saúde, campanha de seguimento, bloqueio, intensificação vacinal e vacinação casa a casa nos municípios com circulação do vírus. Foram aplicadas mais de três milhões de doses da vacina com componente sarampo (dupla, tríplice e tetra viral), abrangendo a população a partir de seis meses de idade. No dia 24/09/2015 foi declarada a interrupção da transmissão do vírus no estado. O Evento Adverso Pós-Vacinação (EAPV) é qualquer ocorrência clínica indesejável em indivíduo que tenha recebido algum imunobiológico, porém, nem sempre um evento que está temporalmente associado ao uso da vacina, tem relação causal com ela.

**OBJETIVO** Identificar os EAPV relacionados às vacinas dupla, tríplice e tetra viral registrados no Sistema de Informação da Vigilância de Eventos Adversos Pós-vacinação (SIEAPV) online no período de 01/11/2014 a 30/11/15.

**METODOLOGIA** Trata-se de um estudo descritivo, para se conhecer os EAPV da dupla, tríplice e tetra viral no estado do Ceará. A pesquisa foi desenvolvida no Núcleo de Imunizações, da Secretaria da Saúde do estado do Ceará. A população de estudo foi composta por 43 notificações no SIEAPV online, relacionadas às vacinas dupla, tríplice e tetra viral, no período de 01/11/14, data em que foi implantado o sistema online no Ceará, até 30/11/2015. A coleta de dados ocorreu no mês de fevereiro de 2016.





**RESULTADOS** Foram identificadas 43 notificações de EAPV relacionadas às vacinas dupla, tripla e tetra viral, nas faixas etárias de seis meses a dez anos e de 28 anos a 40 anos. As manifestações de pele/mucosa representaram 29%, tendo o exantema e eritema como os mais registrados; outras manifestações, 19%, com maior frequência a febre e letargia; as neurológicas 14, 5%; seguida das respiratórias e locais com 12,5%; as gastrointestinais 8,5%, e cardiovasculares com 4%. A parotidite foi o diagnóstico de cinco notificações, entre 28 a 40 anos fato não observado nas crianças. Foram registrados quatro casos de convulsão entre seis meses a um ano de idade, porém, as crianças haviam recebido a pentavalente, sendo o EAPV atribuído a esta. No período investigado foram registrados 48 EAPV, todos classificados como não graves.

**CONCLUSÃO** Os EAPV identificados não foram significativos frente ao número expressivo de doses aplicadas das vacinas dupla, tríplice e tetra viral no período avaliado, onde se esperaria que eventos indesejáveis graves e raros pudessem acontecer, em virtude do quantitativo vacinado, contribuindo também para que as estratégias de vacinação para combater o surto de sarampo no Ceará fossem exitosas.

**PALAVRAS-CHAVE** imunização, cobertura vacinal, sarampo.



## V2. IMPACTO DA VACINA MENINGOCÓCICA C CONJUGADA SOBRE A DOENÇA MENINGOCÓCICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Evelin da Silva Munan<sup>1</sup>; Mayara Daher Pacheco<sup>1</sup>; Fátima Regina Moura Azevedo<sup>1</sup>; Itacirema de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>.

1 Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro.

**INTRODUÇÃO** A meningite ainda é reconhecida como importante e grave doença de interesse na saúde pública mundial. A doença é responsável por frequentes períodos de surto no Brasil, que variam conforme o agente infeccioso, aglomerados populacionais, cepas, condições socioeconômicas dos grupos e clima. A Doença Meningocócica (DM), causada pela *Neisseria meningitidis* e representada por 3 formas clínicas (meningite meningocócica, meningococemia e meningite meningocócica com meningococemia), geralmente possui rápida evolução e alta letalidade, justificando o estabelecimento de intervenções eficazes na vigilância epidemiológica e tratamento da mesma. Apesar da DM acometer indivíduos pertencentes a todas as faixas etárias, dados do Sistema Nacional de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) demonstram que a frequência é significativamente maior nos menores de 5 anos de idade, com destaque para os menores de 2 anos de idade. Frente à introdução da vacina meningocócica C conjugada (MnCc) no calendário nacional de vacinação para crianças menores de 2 anos, torna-se essencial avaliar a incidência e letalidade da doença no grupo alvo da vacinação.

**OBJETIVO** Analisar o impacto da vacina MnCc sobre as taxas de incidência e letalidade da DM no grupo de menores de 2 anos no estado do Rio de Janeiro.

**METODOLOGIA** Foram analisados os casos confirmados e óbitos por DM registrados no banco Sinan por faixa etária, referente ao estado do Rio de Janeiro entre 2007 e 2014, a fim de comparar as médias das taxas de incidência e letalidade no período antes (2007-2010) e após (2011-2014) da introdução da vacina.

**RESULTADOS** Comparando-se o período pré-vacinal (2007-2010) com o pós-vacinal (2011-2014) observou-se redução das taxas de incidência da DM nos grupos de menores de 1 ano (26%), 1 ano (38%) e 2 anos (30%). Em relação às taxas de





letalidade observou-se aumento da taxa no grupo de menores de 1 ano (22%), redução da taxa no grupo de 1 ano (11%) e de 2 anos (17%).

**CONCLUSÃO** Foi possível concluir que houve redução significativa nas taxas de incidência e letalidade (somente nos grupos de 1 ano e 2 anos) da DM após a introdução da vacina MnCc no calendário nacional de vacinação no grupo alvo no estado do Rio de Janeiro. Em relação à taxa de letalidade o grupo de menores de 1 ano registrou aumento da taxa em 19%, suscitando reflexões sobre a assistência hospitalar prestada e sobre o aumento da gravidade da DM neste grupo. As reduções registradas podem não ser completamente decorrentes da vacinação em razão de outros fatores que poderiam contribuir para o declínio das taxas ao longo do tempo, porém é possível observar impacto vacinal nos grupos vacinados analisando as taxas em grupos não vacinados.

**PALAVRAS-CHAVE** doença meningocócica, vacinas, *Neisseria meningitidis*.





### **V3. VIGILÂNCIA DAS COBERTURAS VACINAIS UTILIZANDO INDICADORES ACTUADOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE BRASILEIRO.**

Rui Moreira Braz<sup>1</sup>; Carla Magda Allan S. Domingues<sup>1</sup>; Antônia Maria da Silva Teixeira<sup>1</sup>; Expedito José de Albuquerque Luna<sup>2</sup>.

1 Coordenação Geral do PNI/DEVIT/SVS/MS;

2 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Universidade de São Paulo.

**INTRODUÇÃO** Apesar das coberturas vacinais adequadas serem observadas nos âmbitos nacional e estadual, o mesmo não ocorre nos municípios onde as coberturas são heterogêneas.

**OBJETIVO** Apresentar classificação de risco de transmissão de doenças imunopreveníveis nos municípios utilizando indicadores pactuados no sistema único de saúde para vigilância das coberturas vacinais

**METODOLOGIA** Foram avaliados cinco indicadores para vigilância das coberturas de dez vacinas do calendário da criança menor de dois anos: cobertura vacinal e homogeneidade de coberturas, ambos pactuados pelos gestores do sistema único de saúde, taxa de abandono, proporção de crianças menores de dois anos vivendo em municípios com cobertura vacinal adequada e risco de transmissão de doenças imunopreveníveis no município. O indicador de risco foi classificado em muito baixo, baixo, médio, alto e muito alto.

**RESULTADOS** No ano de 2014, dos 5.570 municípios brasileiros, 11,97% alcançaram coberturas adequadas para as dez vacinas e 31,87% para oito ou nove vacinas, totalizando 43,84% os que atingiram as metas de cobertura e homogeneidade pactuadas. Em 667 (12,0%) dos municípios a homogeneidade foi adequada para o Programa de Qualificação das Ações de Vigilância em Saúde (PQAVS). Em outros 1.775 (31,9%) municípios a homogeneidade atendeu aos requisitos previstos no Contrato Organizativo de Ação Pública da Saúde (COAP), em 2.801 (50,3%) a homogeneidade foi baixa ou muito baixa e em 327 (5,9%) foi zero. No grupo de risco muito baixo para transmissão de doenças imunopreveníveis foram observados 11,97% dos municípios, no de risco baixo, 29,62%, no de risco médio, 2,24%, no de risco alto,







54,34% e no grupo de risco muito alto, 1,85%.

**CONCLUSÃO** A vigilância da situação vacinal nos municípios permitiu identificar: maioria dos municípios em situação de alto risco; inexistência de informação da situação vacinal em alguns municípios; coberturas vacinais com valores altos e atípicos; variação nas taxas de abandono desde valores negativos até abandono completo de algumas vacinas; quantidade significativa de municípios com homogeneidade igual a zero; minoria das crianças vivendo em municípios com cobertura adequada. A vigilância de risco das coberturas utilizando indicadores pactuados no sistema único de saúde oferece nova ferramenta para identificação de áreas prioritárias onde as ações de controle poderão ser realizadas com maiores chances de acerto pelos gestores para melhorar a qualidade e o sucesso do programa de imunizações.

**PALAVRAS-CHAVE** coberturas vacinais, vigilância, monitoramento, risco.





## V4. AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA MEDIÇÃO DE INCERTEZA EM BIOENSAIOS PARA A PESQUISA CLÍNICA.

Victor de Oliveira Silva Ferreira<sup>1</sup>; Ester Ribeiro de Figueiredo<sup>1</sup>; Erika Martins de Carvalho<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz;

2 Far-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** Inovar é o principal fator de sobrevivência para as empresas em um mercado globalizado. E especificamente para a indústria farmacêutica significa disponibilizar comercialmente um produto com eficácia comprovada e consumo viável. É nas atividades de pesquisa e desenvolvimento que a inovação se concentra. Neste contexto, a pesquisa clínica contribui para avaliar novas formas de tratamento e/ou produtos inovadores capazes de substituir aqueles já existentes no mercado, além de gerar novos conhecimentos científicos que garantam tecnologias em saúde efetivas, seguras e acessíveis a população. O objetivo da pesquisa clínica dependendo da fase (I-IV) é verificar segurança, avaliar eficácia, investigar efeitos colaterais e monitorar reações adversas. Para isso os bioensaios utilizados precisam ter a metodologia validada de forma a garantir a robustez do estudo. Só após a realização de estudos clínicos randomizados de qualidade e poder adequado estatístico, estes novos tratamentos ou produtos inovadores podem ser aprovados para uso. Entretanto, no Brasil a RDC27/2012, resolução vigente para a validação de bioensaios, não abrange a complexidade dos ensaios para qual foi destinada, sendo necessário utilizar outros guias como referência para uma validação mais direcionada e coerente (Figueiredo, 2014). Um dos pontos cruciais que deveria ser considerado nestes ensaios é a alta variabilidade dos resultados. Por isso, durante a validação deveria ser considerado a avaliação da incerteza de medição.

**OBJETIVO** Este trabalho tem como objetivo discutir e avaliar os métodos de incerteza presentes na literatura aplicados na pesquisa clínica de vacinas.

**METODOLOGIA** Para a discussão e avaliação dos métodos de incerteza utilizados em pesquisa clínica de vacinas, realizou-se um estudo retrospectivo e comparativo entre os guias, compêndios oficiais, legislação vigente e artigos científicos utilizando as bases eletrônicas de dados Pubmed, Medline e o SciFinder, que apresentam as publicações científicas mundiais indexadas pelo Chemical Abstracts, sem restrição de tempo, mas priorizando os trabalhos publicados na última década.

26





**RESULTADOS** Durante o estudo, foi visto que a determinação da incerteza analítica é orientada pela Eurachem/CITAC, que adequou os princípios de incerteza do *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* (GUM) em um guia cujo escopo são análises químicas. Ainda que o foco deste documento não sejam os bioensaios, as etapas de avaliação da incerteza e as equações nelas descritas, assim como as diretrizes da *European Accreditation* e da *International Laboratory Accreditation Cooperation*, podem ser aplicadas desde que as particularidades dessa categoria sejam levadas em consideração, ou incluindo os dados obtidos na validação da metodologia. Na literatura científica existem artigos relatando a importância em imunoenaios.

**CONCLUSÃO** Até o momento não foi encontrado um documento específico para avaliação da incerteza em bioensaios utilizados em pesquisas clínicas de vacinas ou que inclua essa avaliação como parâmetro a ser estimado na validação desses métodos.

**PALAVRAS-CHAVE** incerteza de medição, validação, bioensaios, pesquisa clínica, vacina.





## V5. IMPACTO DA VACINA PNEUMOCÓCICA CONJUGADA 10 VALENTE SOBRE A MENINGITE PNEUMOCÓCICA NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.

Evelin da Silva Munan<sup>1</sup>; Mayara Daher Pacheco<sup>1</sup>; Itacirema de Oliveira Bezerra<sup>1</sup>; Fátima Regina Moura Azevedo<sup>1</sup>.

1 Secretaria de Estado de Saúde do Rio de Janeiro.

**INTRODUÇÃO** O pneumococo é a segunda principal causa de meningite bacteriana no Brasil, estando também relacionado às pneumonias e septicemias. Possui mais de 90 sorotipos capsulares que podem causar a Doença Pneumocócica (DP) invasiva e não invasiva. A DP, causada pelo *Streptococcus pneumoniae* (pneumococo), possui significativa morbidade e mortalidade, justificando o estabelecimento de ações eficazes na prevenção da mesma, destacando-se a imunização ativa. No Brasil, as crianças de até 2 anos de idade são as mais acometidas pela meningite pneumocócica (MP). Dessa forma, baseado na magnitude, letalidade e incidência da DP invasiva, o Ministério da Saúde (MS) introduziu em 2010 no calendário nacional de vacinação a vacina pneumocócica conjugada 10 valente (PNM10), que protege contra dez sorotipos do pneumococo. Frente à introdução da PNM10 no calendário nacional de vacinação, para crianças menores de 2 anos, torna-se essencial avaliar a incidência e letalidade da MP antes e após a introdução da vacina.

**OBJETIVO** Analisar o impacto da vacina PNM10 sobre as taxas de incidência e letalidade da MP no grupo de menores de 2 anos no estado do Rio de Janeiro. Metodologia: Foram analisados os casos confirmados e óbitos por MP registrados no banco Sinan por faixa etária, referente ao estado do Rio de Janeiro entre 2007 e 2014, a fim de comparar as médias das taxas de incidência e letalidade nos menores de 2 anos no período antes da introdução da vacina (2007-2010) e após a introdução da vacina (2011-2014).

**RESULTADOS** Comparando-se o período pré-vacinal (2007-2010) com o pós-vacinal (2011-2014), observou-se redução das taxas de incidência da MP nos grupos de menores de 1 ano (46%), 1 ano (32%) e 2 anos (27%). O mesmo ocorreu em relação às taxas de letalidade com redução de 41% no grupo de menores de 1 ano, de 78% no de 1 ano e de 33% no de 2 anos.





**CONCLUSÃO** Foi possível concluir que houve redução significativa nas taxas de incidência e letalidade da MP após a introdução da vacina PNM10 no calendário nacional de vacinação no grupo de menores de 2 anos no estado do Rio de Janeiro. As reduções registradas podem não ser completamente decorrentes da vacinação em razão de outros fatores que poderiam contribuir para o declínio das taxas ao longo do tempo, porém é possível observar impacto vacinal nos grupos vacinados analisando as taxas em grupos não vacinados.

**PALAVRAS-CHAVE** meningite pneumocócica, vacinas, *Streptococcus pneumoniae*.





## **V6. EVENTOS ADVERSOS PÓS-VACINAIS NOTIFICADOS À VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO MUNICÍPIO DE CAMAÇARI, BAHIA NO PERÍODO DE 2014 A 2015.**

Laís Torres Saraiva<sup>1</sup>; Ana Paula Nogueira<sup>2</sup>; Eloisa Barreto Bacelar<sup>2</sup>.

1 Unidade Básica de Saúde do Gravatá/ Secretaria de Saúde Camaçari-BA;

2 Coordenação de Vigilância Epidemiológica/Dep. de Vigilância à Saúde Camaçari-BA.

**INTRODUÇÃO** Todo e qualquer evento adverso pós-vacinal (EAPV) deve ser notificado e encaminhado à Vigilância Epidemiológica, para que os mesmos sejam investigados e esclarecidos, e assim seja estabelecida uma conduta adequada frente à ocorrência desses agravos.

**OBJETIVO** O objetivo deste estudo foi conhecer e caracterizar os eventos adversos notificados, as fontes notificadoras e a população atingida pelos eventos adversos pós-vacinação, de acordo com sexo, idade, tipos de eventos, tempo entre a administração do(s) imunobiológico(s) e a ocorrência do evento adverso, e imunobiológico(s) administrado(s).

**METODOLOGIA** Estudo epidemiológico descritivo de abordagem quantitativa, com dados obtidos por meio das fichas de notificação de EAPV que foram notificadas pelas Unidades de Saúde à Vigilância Epidemiológica do Município de Camaçari-Ba no período de 2014 a 2015.

**RESULTADOS** Através dos dados coletados e analisados observou-se que houve 92 notificações de EAPV do ano de 2014 a 2015, destas 34,78% foram notificadas por enfermeiros, 30,43% notificados por técnicos em enfermagem e 34,78% por profissionais que não identificaram a categoria profissional pertencente. Quanto aos estabelecimentos que notificaram, 56,52% foi notificado por Unidades Básicas de Saúde (UBS), 31,52% por Programa de Saúde da Família (PSF), 7,60% pelo Hospital do Município, e 3,26% por outras unidades. Quanto à faixa etária dos pacientes notificados, observou-se que a maioria apresentava entre 0 e 10 anos, representando 68,47%, sendo 51,08% do sexo feminino. Quanto ao tempo decorrente da administração do imunobiológico e aparecimento de evento adverso, 44,56% ocorreram nas primeiras 24 horas. Quanto ao tipo de evento, 89,13% foram eventos não- Graves. A vacina isolada





que mais causou reação adversa foi a Pentavalente (35,86%). Os eventos adversos mais notificados foram dor, rubor e calor (71,73%) seguido de edema (20,65%).

**CONCLUSÃO** Os resultados apontam fragilidades no que se refere às subnotificações e ao preenchimento das fichas de notificação pelos profissionais de Saúde, uma vez que das 40 Unidades de Saúde que pertencem ao Município de Camaçari, apenas 14 notificaram com periodicidade, bem como, as fichas de notificação demonstraram preenchimento incorreto e incompleto, comprometendo assim a qualidade da informação produzida. Sugere-se com esse estudo que haja capacitações com o intuito de sensibilizar às equipes de saúde sobre a importância de se notificarem, corretamente, os eventos adversos, para que os mesmos possam ser investigados e desta forma adotadas condutas adequadas, garantindo assim a credibilidade do Programa Nacional de Imunizações assim como a manutenção da segurança da população.

**PALAVRAS-CHAVE** evento adverso pós-vacinal, imunobiológico, notificação.





## **V7. DIETARY RETINOL ROLE AND RETINOIC ACID ADJUVANT EFFECT IN MUCOSAL LaAg VACCINE EFFICACY AGAINST *Leishmania amazonensis* INFECTION.**

Izabella Pereira da Silva Bezerra<sup>1</sup>; Júlia Gama de Azevedo<sup>1</sup>; Bartira Rossi Bergmann<sup>1</sup>.

1 Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**INTRODUCTION** Leishmaniasis are diseases that have different clinical manifestations depending on the parasite species involved and on the host immune status. Despite the intense effort in finding a safe and effective vaccine against leishmaniasis, none has been approved yet for human use. Our group has been exploring a new vaccination strategy through the mucosa to induce tolerance to parasite antigens related to the disease. We have already demonstrated that oral and intranasal immunization with total antigen of *L. amazonensis* promastigotes (LaAg) induces protection in mice against cutaneous leishmaniasis. It is well established that mucosae are involved with immune tolerance induction, given that they are in constant contact with exogenous antigens. Retinoic acid (RA), a metabolite of retinol (vitamin A), is a cofactor required for generation of regulatory T cells in the intestinal mucosa, which have been associated with immune tolerance.

**OBJECTIVE** In this work, the influence of dietary retinol in the efficacy of oral and intranasal LaAg vaccines was evaluated. We also evaluated the adjuvant role of retinoic acid in intranasal LaAg vaccine efficacy.

**METHODOLOGY** BALB/c mice subjected to dietary retinol restriction (Retinol<sup>-</sup>) or supplementation (Retinol<sup>+</sup>) were orally (100 µg of protein/dose) or intranasally (10 µg of protein/dose) vaccinated with two doses of LaAg with a seven day interval between them. One week after immunization, mice were subcutaneously infected in the footpad with *L. amazonensis* promastigotes and the lesion development was monitored for 60 days, when the parasite burden and cytokine profile in the infection site were evaluated. To evaluate the adjuvant role of RA, we used RA encapsulated in solid lipid nanoparticles (RA-SLN, 15 µg of RA/dose), which was administered with the LaAg intranasal vaccine in normally fed BALB/c mice.

**RESULTS** Retinol<sup>-</sup> mice were more resistant to infection than Retinol<sup>+</sup> mice,







presenting a lower lesion development and a reduced parasite burden. However, oral or intranasal LaAg vaccine were only protected by Retinol<sup>+</sup> mice, which presented increased IL-12 and reduced IL-4 levels in the lesions compared to non-vaccinated animals. Moreover, Retinol<sup>-</sup> mice presented reduced TGF- $\beta$  levels in the lesions compared to Retinol<sup>+</sup> animals. We also observed that RA-SLN increased LaAg intranasal vaccine efficacy and enhanced CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> population in cervical lymph nodes after immunization.

**CONCLUSION** Altogether, these results show that dietary retinol was required for both oral and intranasal LaAg vaccine efficacy against *L. amazonensis* infection. Moreover, RA-SLN was a good adjuvant for LaAg intranasal vaccine, inducing regulatory T cell generation in draining lymph nodes. These data suggest a tolerogenic effect of mucosal LaAg vaccine.

**KEYWORDS** leishmania, LaAg, vaccine, oral, intranasal, retinol, retinoic acid, immune tolerance.





## V8. PROPOSAL OF AN INTRANASAL FORMULATION FOR MENINGOCOCCAL GROUP C CONJUGATE VACCINE.

Isabelly Santos Pereira<sup>1</sup>; Elezer Monte Blanco Lemes<sup>1</sup>; Ana Maria Pereira dos Santos<sup>1</sup>.

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

**INTRODUCTION** *Neisseria meningitidis* group C is the main responsible for meningitis outbreaks in Brazil. This is a public great concern due to the high mortality rates and sequelae in survivors. The Immunobiological Technology Institute (Bio-Manguinhos), an Oswaldo Cruz Foundation's unit, developed a conjugate vaccine for *N. meningitidis* group C from the conjugation of polysaccharide with tetanus toxoid using the modified reductive amination method. The common application of this vaccine is by injection. Mucosal immunization (intranasal) for *N. meningitidis* is the most indicated administration route, due to the microorganism feature to cause infection through the respiratory tract. Mucosal vaccines offer a better immune response, because they can stimulate the systemic and local responses. However, despite the high mucosal immune system efficiency, only a reduced number of vaccines use this administration route, due to difficulties in developing appropriate formulations. One of the strategies adopted to deliver the antigen to the mucosa is using biodegradable polymers.

**OBJECTIVE** This study describes an intranasal formulation strategy for a meningococcal group C conjugate vaccine using the polymer chitosan for encapsulation. Thus, the encapsulation efficiency of the vaccine antigen must be evaluated with different chitosan concentrations, the formulation's characterization, and the generated immunological activity.

**METHODOLOGY** The meningococcal group C conjugate vaccine was provided by the Bacterial Technology Laboratory (LATEB), located in Bio-Manguinhos. The formulation preparation was performed by a precipitation process. Sodium sulfate salt was added to the chitosan solution with the vaccine antigen. Moreover, different concentrations of chitosan (0,25%, 0,5%, 0,75% e 1%) were used to select the most appropriate formulation. After the preparations were made, the encapsulation efficiency of each formulation was investigated by protein measurement using the bicinchoninic





acid method (BCA).

**RESULTS** Until this moment, the developed formulation showed good encapsulation results at different evaluated chitosan concentrations. In the chitosan formulation concentration of 0,5% were obtained an average of 46,48% for 15 µg doses and 52,04% for 20 µg doses; in the case of 0,75% of chitosan were obtained an average of 55,36% e 70,10% for 15 µg and 20 µg doses respectively.

**CONCLUSION** Despite the need to finish the immunological evaluation testing and characterization of particles, data showed that the proposed formulation methodology is promising for mucosal immunization against *N. meningitidis* group C.

**KEYWORDS** meningococcal group C conjugate vaccine, intranasal, chitosan.





## V9. CONTRIBUIÇÃO PARA O CONTROLE DA QUALIDADE DE VACINAS INATIVADAS: ESTUDO DA DECOMPOSIÇÃO DA BETAPROPIOLACTONA EM DIFERENTES MEIOS.

Joyce Silva<sup>1</sup>; Kátia Leandro<sup>1</sup>.

1 INCQS.

**INTRODUÇÃO** A vacina contra febre amarela utilizando o vírus atenuado apresenta um histórico de segurança e eficácia, no entanto os relatos esporádicos de eventos adversos em indivíduos saudáveis e a contra indicação da imunização em indivíduos imunocomprometidos, incentivam o desenvolvimento de pesquisas em prol de uma formulação utilizando o vírus inativado. Dentre as formas de inativação viral, a inativação química utilizando a betapropiolactona é a mais imunogênica. Para vacinas já disponíveis no mercado que utilizam esta forma de inativação órgãos internacionais especificam limites residual abaixo de 25 nanogramas por 0,5 mL, em função do potencial cancerígeno da BLP.

**OBJETIVO** Assim, é fundamental o desenvolvimento de metodologia analítica sensível para a detecção do residual da BPL na vacina contra a Febre Amarela.

**METODOLOGIA** No presente trabalho foram desenvolvidas metodologias utilizando a CGAR e CLAE com diferentes detectores e a escolha da metodologia mais adequada foi auxiliada pela espectroscopia de RMN de hidrogênio (<sup>1</sup>H) e carbono (<sup>13</sup>C). O método proposto para o estudo da BPL nas soluções virais em meio aquoso e tampão TRIS e HEPES foi a CLAE-UV em fase reversa, coluna C18, comprimento de onda 195 nm e fase móvel composta de solução de ácido fórmico 0,1% pH 2,5: Acetonitrila (60:40).

**RESULTADOS** Em 105 minutos o residual de BPL em tampão HEPES foi indetectável e nos demais meios testados até 150 minutos ainda foi possível detectar sinal relativo à molécula. A BPL se decompôs em meio aquoso a 40°C seguindo um modelo de pseudo primeira ordem. Em meio aquoso a 200°C e em tampão TRIS, o decaimento ocorreu seguindo o modelo de pseudo segunda ordem. Em tampão HEPES as reações





ocorreram rapidamente impossibilitando a determinação da cinética. A mudança nos modelos de decaimento para a BPL a 40C e 20 0C confirmou experimentalmente a grande influência que a temperatura exerce sobre as reações com BPL e a diferença observada no comportamento da molécula nos dois tampões estudados confirmou que a natureza dos nucleófilos modifica a estabilidade da molécula.

**CONCLUSÃO** Os resultados revelaram que o método proposto é promissor para uma avaliação semi quantitativa da BPL nas soluções virais, além de contribuir para a investigação do comportamento da BPL na presença de nucleófilos. Para tal, o método deverá ser otimizado e posteriormente validado, a fim de disponibilizá-lo para uso na rotina do Controle da Qualidade da produção de uma vacina inativada contra o vírus da Febre Amarela, de forma a garantir a segurança da vacina a ser oferecida população.

**PALAVRAS-CHAVE** CLAE-UV, residual, betapropiolactona.





## VI0. STUDY OF THE IMMUNE RESPONSE INDUCED BY DIFFERENT ADJUVANTS.

Patrícia Conceição Gonzalez Dias<sup>1</sup>; Tamiris Azamor da Costa Barros<sup>1</sup>; Patrícia Cristina da Costa Neves<sup>2</sup>; Gabriela Santos Esteves<sup>2</sup>; Marco Alberto Medeiros<sup>2</sup>.

1 Instituto Oswaldo Cruz e Bio-Manguinhos - Fiocruz;

2 Bio-Manguinhos - Fiocruz.

**INTRODUCTION** The biggest challenge for the development of subunit vaccines based on recombinant or purified proteins is that they have low immunogenicity and mobilize an insufficient immunoprotective response. Adjuvants are used to amplify and direct the immune response. In this study, the protein Lig (*Leptospira spp.* immunoglobulin-like protein) was used as a model. Studies demonstrate that this antigen corresponds to an OMP that works as a mediator in pathogenic mechanisms, allowing its use in experimental vaccines with success. To optimize immunogenicity of the vaccine based on Lig proteins, a comparative study was conducted between Al(OH)<sub>3</sub>, Nanoparticles (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), Flagellin (flagellar protein) and ISCOM (saponin based) adjuvants.

**OBJECTIVE** Evaluation and characterization of the immune response induced in mice by different adjuvants in association with rLig protein.

**METHODOLOGY** The recombinant protein Lig was expressed in *E. coli*. Purification was performed through IMAC. Mice immunizations with rLig (3 and 30µg/dose) and adjuvants were performed in a two doses regime with a 15-day interval between each dose. Serum were obtained on days 0, 14, 29, 59, 89 and on day 119 followed by euthanasia and splenectomy. The kinetic and profile of the humoral immune response was evaluated by ELISA. The avidity of the antibodies was evaluated by ELISA, adding urea. The cellular immune response was evaluated by ELISpot for the detection of IFN-γ, IL-4, IL-2 and IL-17. Mice splenocytes were harvested in plates in the presence of: (1) rLig, (2) Concanavalin A and (3) in the absence of stimulation. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism®3.5 (p value <0.05).

**RESULTS** Recombinant Lig used in vaccine formulations was obtained with homogeneity above 90%. ELISA assays demonstrated that all adjuvants were able to induce humoral response when compared to negative controls. The immune response





profile was similar between adjuvants with higher titers after the second immunization, followed by a decline in the titers of circulating antibodies over time, except for the adjuvant Al(OH)<sub>3</sub> which kept increasing titers throughout the trial period. The biggest titers in ELISA Units per milliliter and avidity index obtained for each adjuvant were: ISCOM (37036; 83.84), Flagellin with Al(OH)<sub>3</sub> (14782; 91.92), Flagellin (13933; 86.08), Al(OH)<sub>3</sub> (6287; 89.68) and Nanoparticles Adjuvant (3328; 87.11). The IgG1 isotype was the predominant in all the formulations. However, the formulations with ISCOM and Flagellin in association with Al(OH)<sub>3</sub> revealed a larger equilibrium between the isotypes. ISCOM was the only adjuvant capable of stimulating a significant cellular immune response compared to the control, stimulating IFN- $\gamma$  and IL-2.

**CONCLUSION** Overall, this study provided important information to understand the immune response triggered by each adjuvant when associated with recombinant protein Lig, helping in the development of novel vaccines. Furthermore, the obtained data can be used in other immunization models with bacterial antigens.

**KEYWORDS** adjuvants, subunit vaccines.





## VII. APLICABILIDADE DE MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS NO CONTROLE DE QUALIDADE DE BIOLÓGICOS: MODELO DA VACINA CONTRA FEBRE AMARELA.

Elaine Cristina Azevedo Navega<sup>1</sup>; Alessandra Santos Almeida<sup>1</sup>; Cristiane Caldeira da Silva<sup>2</sup>; Octavio Presgrave<sup>2</sup>; Daniel Silva Guedes<sup>1</sup>; Igor Barbosa da Silva<sup>1</sup>; Isabella Fernandes Delgado<sup>3</sup>; Katherine Antunes de Mattos<sup>1</sup>.

1 Laboratório de Controle Microbiológico, Dpto. de Controle de Qualidade, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Fiocruz;

2 Departamento de Farmacologia e Toxicologia Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Centro Brasileiro para Validação de Métodos Alternativos, Fiocruz;

3 Departamento de Farmacologia e Toxicologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Vice Diretoria de Pesquisa e Ensino do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** A necessidade de alternativas ao uso de animais no teste de pirogênio é guiada pelo princípio dos 3R's, culminando na aceitação pela Farmacopeia Europeia (F.E.) do método alternativo *in vitro*, o Teste de Ativação de Monócitos (MAT, 2010). Respeitando esta premissa, o MAT utiliza como matriz, fontes de monócitos humanos, sendo considerado um método promissor e eficiente, por excluir riscos inerentes à extrapolação inter-espécies, detectar amplo espectro de pirogênios e suprir limitações dos testes atuais, o Teste de Endotoxina Bacteriana (LAL) e o Teste de Pirogênio em coelhos. Apesar das vantagens abordadas, alguns obstáculos técnico-científicos-regulatórios devem ser transpostos para a implantação efetiva do MAT na rotina industrial, em especial, de produtos biológicos.

**OBJETIVO** Neste contexto, a vacina contra febre amarela (VFA) foi selecionada como primeiro modelo de aplicabilidade do MAT em vacinas por: (1) ser carro-chefe do portfólio de Bio-Manguinhos, (2) processo de produção complexo, com fatores críticos de interferência como uso de vírus vivo e resíduos de componentes de processos (ovos embrionados), (3) potencial investigativo de outras fontes pirogênicas não detectadas pelo método descrito na monografia da vacina.

**METODOLOGIA** Os métodos farmacopeicos descrito para MAT utilizando IL-1/sangue criopreservado, IL-6/ sangue fresco e proposta de método para rotina industrial, IL-6/ sangue criopreservado, foram validados conforme requisitos da F.E. A verificação produto-específica foi realizada com a VFA/10 doses e fatores interferentes







avaliados através da máxima diluição válida. Após determinação da diluição, o método quantitativo foi aplicado aos lotes vacinais, com interpretação entre os sistemas de leitura e matrizes do MAT e LAL.

**RESULTADOS** Os dados mostram reprodutibilidade do teste utilizando diferentes doadores e medidores de pirogenidade (IL-6/IL-1) frente ao estímulo da endotoxina. Após verificação da aplicabilidade da VFA ao MAT com diluição 1:10, demonstramos que os sistemas utilizando sangue criopreservado (IL-1/IL-6) respeitam os limites de recuperação da endotoxina e se mostraram mais adequados do que o sistema IL-6/sangue fresco. Os resultados quantitativos da resposta pirogênica no produto determinada pelo MAT correspondem àqueles observados pelo LAL.

**CONCLUSÃO** Os dados demonstram pela primeira vez a aplicabilidade do MAT em vacinas, sendo o modelo VFA compatível com a utilização de sangue criopreservado, acessível à rotina industrial. Este trabalho reflete o compromisso da maior produtora nacional de vacinas com a saúde pública e bem-estar animal, obediência das diretrizes internacionais, cuidado com o controle da qualidade e contribuição científica para a expansão da tecnologia e do conhecimento na avaliação de biológicos com end-points humanos.

**PALAVRAS-CHAVE** métodos alternativos, pirogênio, teste de ativação de monócitos, biológicos, febre amarela.



## V12. COLLABORATIVE STUDY AMONG BIO-MANGUINHOS/ FIOCRUZ, PATH AND WHO USING YELLOW FEVER VACCINES IN A CONTROLLED TEMPERATURE CHAIN.

Ingrid Pinheiro de Medeiros<sup>1</sup>; Vanessa Alvaro Diniz<sup>1</sup>; Anderson Peclat Rodrigues<sup>1</sup>; Eliane Coutinho do Nascimento Britto<sup>1</sup>; Izabel Cristina Crespo<sup>1</sup>; Carlos Alberto Corrêa Antunes<sup>1</sup>; Darcy Akemi Hokama<sup>1</sup>.

1 Fundação Oswaldo Cruz, Bio-Manguinhos, Departamento de Controle de Qualidade.

**INTRODUCTION** The live attenuated Yellow Fever (YF) vaccine is used for active immunization in adults and children. This vaccine is freeze-dried and should be stored at 2-8°C. It is reconstituted with diluent (water for injection) stored at 15-30°C and 24 hours before use should be kept at 2-8°C.

**OBJECTIVE** The present study aims to assess the feasibility to use YF vaccines in a controlled temperature chain (CTC), defined as the temperature out of 2-8°C range, which can occur in the field, but shouldn't exceed 40°C. The study was conducted at 40°C using 5 and 10 doses vaccines and respective diluents.

**METHODOLOGY** Batches of YF 5 and 10 doses have been used in the following CTC studies:

1. Vaccines and diluents, separately, submitted at 40°C for 28 days. Potency and moisture content were performed in 7, 14, 21 and 28 days.
2. CTC study after reconstitution:
  - a) Vaccines at 40°C was reconstituted with diluent at 40°C and maintained at 40°C for 6 hours;
  - b) Vaccines at 2-8°C was reconstituted with diluent at 2-8°C and maintained at 40°C for 6 hours;
  - c) Vaccines at 2-8°C was reconstituted with diluent at 40°C and maintained at 2-8°C for 6 hours.
3. Vaccines with VVM14 stored at 2-8°C for 18 months, was submitted at 40°C for 3 days and returned to 2-8°C until the end of shelf life.





## RESULTS

1. The potency test and moisture content results of the vaccines at 40°C showed stable and within specification for 21 days.

2. a) Both vaccine and diluent submitted at 40°C/28days and maintained for 6 hours at 40°C showed very rapid loss of the titre in 30 minutes and out of specification;

2. b) Both vaccine and diluent maintained at 2-8°C and after reconstitution submitted at 40°C showed that in this condition the reconstituted vaccine are not stable;

2. c) When vaccines maintained at 2-8°C and the diluent at 40°C/28 days and after reconstitution kept at 2-8°C, the titres are maintained during 6 hours within specification, demonstrating its stability.

3. The vaccines with VVM stored at 2-8°C and exposed at 40°C for a maximum of 3 days (the VVM do not reach the end-point), the potency titres is maintained under specification and can be stored again at 2-8°C for future use until it reaches the end of shelf life.

**CONCLUSION** The study of freeze-dried vaccines and diluents in CTC conditions showed satisfactory results for potency test for 21 days and 28 days for residual moisture content. The potency results are not satisfactory when the reconstituted vaccines are maintained at 40°C.

**KEYWORDS** Yellow Fever vaccine, potency, CTC.





### **VI3. EXPRESSION OF PRO INFLAMMATORY GENES AFTER YELLOW FEVER VACCINATION IN HUMANS: IMPLICATIONS FOR ACQUIRED IMMUNE RESPONSE.**

Tamiris Azamor da Costa Barros<sup>1</sup>; Andréa Marques Vieira da Silva<sup>1</sup>; Caroline Xavier Carvalho<sup>2</sup>; Lucia E. Alvarado-Arnez<sup>2</sup>; Camilla Bayma Fernandes<sup>1</sup>; Denise Cristina de Souza Matos<sup>1</sup>; Milton Ozório Moraes<sup>2</sup>; Patrícia Cristina da Costa Neves<sup>1</sup>.

1 Bio- Manguinhos/ Fiocruz;

2 Instituto Oswaldo Cruz/ Fiocruz.

**INTRODUCTION** The vaccine against Yellow Fever is one of the most effective ever made with more than 540 million doses administered globally. It confers long term protection after a single dose. Vaccination with YF17D virus induces polyvalent immune responses, with a mixed Th1/Th2 CD4+ cell profile, which results in robust TCD8+ responses and high titers of neutralizing antibody. Despite these characteristics, very little is known about the cellular and molecular mechanisms that lead to such good immune response. Moreover, although rarely observed, some serious adverse events may occur after vaccination and the mechanisms for its development are not yet understood. It is now clear that early events following YF17D immunization have a key role in determining the strength and quality of the adaptive immune response. In this manner, our group has previously shown that primary immunization of humans, monkeys and mice, with YF vaccine resulted in: i) early synthesis of IFN- $\gamma$  and ii) correlation between the magnitude of early IFN- $\gamma$  release and the quality of acquired immune responses in mice. Interestingly, another group has already shown that early IFN- $\gamma$  and IL-6 responses after YF immunization are correlated with the levels of neutralizing antibodies in humans.

**OBJECTIVE** Herein we have investigated early IFNs and IL-6-related gene expression in volunteers immunized with YF17DD.

**METHODOLOGY** Blood samples from fifteen volunteers immunized with 17DD were collected 0, 4, 7, 10 and 30 days after immunization. The peripheral blood mononuclear cells were isolated and submitted to RNA extraction, followed by cDNA synthesis. The q-PCR assay was carried out in samples from 0, 4, 7 and 10 days p.i, to quantify expression of CLEC5A, IFNG, IL6, RNASEL, IRF7, IRF9, STAT2 and





OAS1. Antibodies against yellow fever were quantified using Virus Binding inhibition assay.

**RESULTS** It was possible to observe an increase in the expression of all genes studied, mainly OAS1 and IRF7. All of them, except IFNG and IL6, were significantly correlated with the development of antibodies against Yellow Fever Virus. In addition, we show a differential expression of CLEC5A gene as early as four days after immunization, to our knowledge this has not been previously reported. This up or down regulation in gene expression was also correlated with the levels of yellow fever antibodies, indicating a role for this lectin receptor expressed in cells from the myeloid lineage during immunological response development after YF17DD inoculation. It is noteworthy that CLEC5A has also been implicated in several mechanisms during Dengue and Japanese Encephalitis infections, two flaviviruses related to YF virus.

**CONCLUSION** These results indicated that early events after yellow fever immunization are, in fact, related to antibodies development. Moreover, we described a new gene, CLEC5A, which may be involved in yellow fever response.

**KEYWORDS** Yellow Fever vaccine, early gene expression, acquired response.



## VI4. ESTABELECIMENTO DO MATERIAL DE REFERÊNCIA DA VACINA CONTRA SARAMPO, CAXUMBA E RUBÉOLA: EVOLUÇÃO PARA AUTOSSUFICIÊNCIA NA PRODUÇÃO DE VACINAS.

Danielle da Silva Almeida<sup>1</sup>; Paulo César Dick<sup>1</sup>; Ingrid Pinheiro de Medeiros<sup>1</sup>; Jarbas Emilio dos Santos<sup>2</sup>; Karen Friedrich<sup>3</sup>; Carlos José da Silva<sup>1</sup>; Katherine Antunes de Mattos<sup>1</sup>.

- 1 Laboratório de Controle Microbiológico, Departamento de Controle de Qualidade, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), Fundação Oswaldo Cruz;
- 2 Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz;
- 3 Departamento de Toxicologia e Farmacologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz.

**INTRODUÇÃO** A monografia farmacopeica da vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) exige uma validação de desempenho do ensaio de potência utilizando material de referência (MR) apropriado. A necessidade de MRs no controle da qualidade de produtos imunobiológicos é notória e evidente, sendo um recurso de alto valor agregado presente em inúmeros processos dos mais diversos setores da indústria, sendo primordiais, quando se considera as perspectivas urgentes de harmonização de metodologias entre laboratórios produtores e reguladores.

**OBJETIVO** Atualmente, Bio-Manguinhos vem utilizando no controle de qualidade para realização do teste de potência da vacina tríplice viral o MR trivalente (sarampo, caxumba e rubéola) cedido através de acordo de transferência de tecnologia com a GlaxoSmithKline (GSK) e diante do avançado estágio da transferência de tecnologia desta vacina, o objetivo do estudo foi estabelecer e validar o primeiro MR de trabalho (MRT) in-house que será utilizado na rotina como controle dos ensaios para a determinação de potência da vacina tríplice viral nos laboratórios de controle da qualidade.

**METODOLOGIA** O MRT candidato designado de cMRTBio, preparado em Bio-Manguinhos, foi avaliado através de um estudo colaborativo envolvendo as duas instituições, Bio-Manguinhos e INCQS, respeitando as metodologias de determinação de potência in-house. Os ensaios foram validados em paralelo com os MR internacional (MRI) monovalentes, provenientes do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), sendo designados MRI<sub>NIBSC</sub> e MRT controle (MRT<sub>CTRL</sub>) originário da GSK e atual MRT de Bio-Manguinhos. Os parâmetros de homogeneidade do





lote e consistência intra-ensaios, interensaios e entre laboratórios e todo o desenho experimental e análises estatísticas seguiram as premissas de produção e elaboração de MRs biológicos e as adequações destas normas para MR secundários para vacinas recomendadas pela OMS.

**RESULTADOS** O  $cMRT_{Bio}$  foi considerado apropriado como MR *in house* por estar em concordância com as especificações baseadas nas normativas de compêndios, tendo variações intra-ensaios (<5%), inter-ensaios (<10%) e entre laboratórios (<10%) abaixo dos limites aceitáveis, e potência estimada ( $\log_{10} CCID_{50} / DH$ ) em: 3,72 para sarampo; 4,80 para caxumba e 3,70 para rubéola. Atendendo todas as recomendações, o  $cMRT_{Bio}$  foi protocolado e certificado na instituição como MRT biológico para o ensaio de potência na vacina sarampo, caxumba e rubéola com a codificação de MRT(B)TVV001/13.

**CONCLUSÃO** A iniciativa de produção do primeiro MR da vacina tríplice viral nacional demonstrada neste trabalho, reflete o compromisso do único produtor nacional desta vacina com a saúde pública, descrevendo a expansão da tecnologia, harmonização dos parâmetros técnicos de controle da qualidade pelas Instituições nacionais, obediência às diretrizes internacionais e nacionais, que propõe como estratégias o desenvolvimento de MRs e culminância para a autossuficiência nacional na produção de vacinas.

**PALAVRAS-CHAVE** material de referência, vacina tríplice viral, ensaio de potência.





## **VI5. PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL E MICROARRANJO LÍQUIDO PARA DETERMINAÇÃO DO TÍTULO DA VACINA TRÍPLICE VIRAL.**

Jéssica Malheiros<sup>1</sup>; Gisela de Freitas Trindade<sup>1</sup>; Denise de Souza Matos<sup>1</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** A vacina tríplice viral é responsável pela prevenção contra Sarampo, Caxumba e Rubéola. Consiste de uma formulação de vírus vivos atenuados e veiculados em um meio estéril. Para o sarampo são utilizadas as cepas Schwarz, Moraten e Edmonston Zagreb. As cepas de caxumba são Jeryl Lynn, L-3 Zagreb e Urabe AM9 e para a Rubéola, é utilizada a cepa Wistar RA27/3. Sua eficácia é resultado da apresentação de antígenos de mais de um agente infeccioso com apenas uma aplicação. Os componentes são altamente imunogênicos, conferindo imunidade duradoura. A vacina age estimulando o organismo a produzir sua própria proteção (anticorpos) contra as três doenças com soroconversão de aproximadamente 95%. A síndrome causada por esses vírus foi significativamente diminuída devido à implementação de programas de imunização, como o Programa Nacional de Imunização no qual a vacina é utilizada amplamente desde 2003. Atualmente, a determinação da potência da vacina é realizada por ensaios de unidades formadoras de placa (UFP), que medem a quantidade de partículas infecciosas individualmente para cada componente da vacina. Esses testes convencionais dependem da observação do efeito citopático, ou seja, lise celular provocada pela infecção viral. Embora este método seja considerado o padrão ouro para titulação viral, é laborioso e demanda alguns dias para ser realizado.

**OBJETIVO** Este projeto, visa a implementação das metodologias de microarranjo líquido e qPCR como metodologias alternativas para determinação da carga viral dos vírus que compõem a vacina tríplice viral.

**METODOLOGIA** A primeira metodologia consiste no revestimento de microesferas com anticorpos neutralizantes específicos utilizando uma solução de acoplamento, que se ligarão aos vírus alvos e a detecção final será feita através da ligação de anticorpo específico, seguido de um terceiro anticorpo anti IgG (idiotipo) marcado com fluorocromo estreptavidina-ficoeritrina (PE). A metodologia de qPCR determina







a carga viral através da quantificação do genoma utilizando curva padrão sintética em poucas horas. Estas duas técnicas têm como vantagem a obtenção mais rápida do resultado, permitindo o processamento de maior número de amostras, e a especificidade que é dada pela sequencias gênicas usadas na amplificação da amostra alvo.

**RESULTADOS** Como parte dos resultados deste projeto, temos a implantação desta metodologia molecular e otimização das condições de reação para os três vírus. Faremos ainda cinéticas de crescimento viral em cultura celular e monitoramento do título pelas metodologias propostas neste trabalho.

**CONCLUSÃO** Desta forma, pretendemos contribuir com outras metodologias mais simples e robustas para o controle de qualidade e verificação da potência da vacina tríplice viral produzida por Bio-Manguinhos.

**PALAVRAS-CHAVE** triplice viral, qpcr, microarranjo liquido.





## **VI6. OTIMIZAÇÃO DA VACINA BRASILEIRA CONTRA MENINGOCOCO B COM BASE NA AVALIAÇÃO DOS COMPONENTES VACINAIS NA RESPOSTA BACTERICIDA INDUZIDA EM CAMUNDONGOS.**

Camila Lordello Xavier<sup>1</sup>; Verônica Nascimento Oliveira<sup>1</sup>; Sonia de Castro Abreu<sup>1</sup>; Fernanda Otaviano Martins<sup>1</sup>; Denise S. G. Pereira<sup>1</sup>; Maria de Lourdes Moura Leal<sup>1</sup>; Ellen Jessouron<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** A epidemiologia da doença meningocócica apresenta grande variação de acordo com a área geográfica e ao longo do tempo. O estudo de imunogenicidade da vacina brasileira experimental contra o meningococo B apontou resposta acentuada para antígenos da cepa prevalente no país e baixa imunogenicidade para as cepas heterólogas. Este resultado mostrou-se coerente com o descrito na literatura para vacinas disponíveis no mercado com abordagens semelhantes. O desenvolvimento de uma vacina contra o meningococo B precisa de novas alternativas que passam pela avaliação do papel de cada componente vacinal na resposta imune induzida.

**OBJETIVO** Apresentar a avaliação dos antígenos vacinais da vacina brasileira contra o meningococo B na indução da resposta imune em camundongos e propor a otimização desta vacina.

**METODOLOGIA** Inicialmente, foram formuladas seis vacinas experimentais em hidróxido de alumínio, que continham um ou mais dos seguintes componentes: VME de N44/89, VME de N603/95, dLOS e concentrado antigênico da vacina meningocócica C conjugada. Camundongos suíços foram divididos em seis grupos e imunizados com as formulações acima, por via intramuscular, em esquema de três doses com intervalo de 15 dias entre elas. Os anticorpos obtidos a partir do soro dos camundongos vacinados com diferentes preparações tiveram a atividade bactericida avaliada antes e após soroneutralização dos soros com os diferentes antígenos vacinais. Em função dos resultados, novas formulações, contendo diferentes proporções dos componentes da vacina B, foram testadas em camundongos, com o mesmo esquema vacinal, como alternativas de otimização da vacina.





**RESULTADOS** No ensaio bactericida realizado para as duas cepas vacinais, N44/89 e N603/95, todas as preparações testadas induziram soroconversão em relação aos soros préimunes, exceto no grupo que recebeu o dLOS separadamente, que não apresentou resposta protetora. Para todas as vacinas experimentais avaliadas, os títulos bactericidas para N44/89 foram maiores do que para N603/95, resultado que foi corroborado pelo ensaio de soroneutralização. Após a soroneutralização os animais imunizados com a preparação de dLOS, formulada sem os antígenos proteicos, não apresentaram redução de título indicativa de especificidade de anticorpos para esta molécula. A combinação das vacinas B e C não alterou esta resposta. As novas formulações testadas sugerem que a resposta para cepas diferentes da N44/89 pode ser potencializada sem prejuízo do potencial pirogênico das preparações.

**CONCLUSÃO** O estudo indica que a indução de resposta protetora da vacina meningocócica B brasileira está relacionada a combinação de antígenos, como descrito na literatura. Os resultados sugerem que diferentes proporções de antígenos vacinais podem otimizar a resposta para cepas heterólogas a N44/89. Esta melhora de resposta pode estar relacionada tanto a expressão e concentração das proteínas de membrana como ao LOS. Este trabalho sugere ainda que o LOS parece contribuir para a indução de anticorpos bactericidas, capazes de aumentar o título protetor.

**PALAVRAS-CHAVE** meningococo B, soroneutralização, vacinas meningocócicas, resposta bactericida.



## **V17. YELLOW FEVER VACCINE, RECOMBINANT ENVELOPE PROTEIN (rYFE), PLANT DERIVED, FOR ACTIVE IMMUNIZATION: PRECLINICAL STUDIES IN MICE AND MONKEY MODELS.**

Rosane Cuber Guimarães<sup>1</sup>; André Tavares da Silva Fernandes<sup>1</sup>; Marisol Simões<sup>1</sup>; Renato Marchevsky<sup>1</sup>; Patrícia Cristina da Costa Neves<sup>1</sup>; Ana Paula Dinis Ano Bom<sup>1</sup>; Elena Cristina Caride<sup>1</sup>; Marcos da Silva Freire<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUCTION** Although there is a widely used and highly effective attenuated live vaccine to combat yellow fever, there are very rare cases of serious adverse events associated with the vaccine. Therefore, in collaboration with Fraunhofer USA (FhCMB), Bio-Manguinhos / Fiocruz, is developing a plant-derived subunit vaccine for prevention of yellow fever. The vaccine candidate, termed YFE-1T, is based on the envelope protein (YFE) from Yellow fever virus strain 17DD. The vaccine candidate is produced in *Nicotiana benthamiana* plants, purified, characterized in vitro and in vivo. FhCMB utilizes transient expression technology based on an *Agrobacterium tumefaciens* type vector to rapidly produce high levels of YFE target protein in hydroponically grown fresh leaf biomass. We believe that the use of plants could provide a safer supply of proteins than natural or animal-based sources and may contribute a cost advantage over traditional bioreactor technology.

**OBJECTIVE** Evaluation of virus neutralizing antibody response and cellular responses in animal models with each of two adjuvants: aluminium hydroxide adjuvant (Alhydrogel™) and an experimental saponin-based adjuvant.

**METHODOLOGY** For challenge study C57BL6 mice were used at 4 weeks of age. Animals were vaccinated with YFE-1T dose-escalation of 5µg; 1µg; 0,2µg and 0,1µg with both Alhydrogel and saponin-based adjuvants. The vaccination schedule was on days 0 and 28 with blood collection for plaque reduction neutralization test (PRNT) always two days before the application of the antigens. The intracerebral challenge with 17DD strain virus occurred on day 42. For monkey study, 22 rhesus macaques (*Macaca mulatta*) were vaccinated with 10µg or 30µg with both Alhydrogel and saponin-based adjuvants. The vaccination schedule was on days 0 and 30 with subcutaneous challenge on day 90. Samples were collected on days -3; 29; 60; 88 and





105 and viremia evaluated by qPCR and plaque assay.

**RESULTS** After the second vaccine dose, the groups inoculated with saponin-based adjuvant had a significant increase ( $p < 0.05$ ) in mean titers of neutralizing antibodies to YF. However, only the group, that received the highest dose of antigen, showed a mean titer above the cutoff point for seropositivity ( $2.6 \log_{10}$ ), significantly higher than the control group vaccinated with the commercial attenuated vaccine, which obtained a mean titer of  $1.86 \log_{10}$ . The survival rate, in the mice challenge study was 100% for the groups with  $5 \mu\text{g}$  YFE-1T dose for both adjuvants. Nevertheless, the group that received  $5 \mu\text{g}$  dose with saponin-based adjuvant did not develop symptoms related to infection of 17DD substrains virus in a murine model, while the group that received the same dose with Alhydrogel developed symptoms, such as claudication and paralysis of hind limbs, and ocular discharge.

**CONCLUSION** The results suggest that YFE-1T protein is a possible candidate vaccine against yellow fever to be evaluated in a Phase I Clinical Trial.

**KEYWORDS** Yellow Fever, plant-derived subunit vaccine, pre-clinical studies.





## VI8. PvMSP9<sub>E795-V808</sub>: ANTIGENICIDADE E IMUNOGENICIDADE DO EPÍTOPO DE CÉLULA-B IDENTIFICADO IN SILICO NA PROTEÍNA-9 DE SUPERFÍCIE DE MEROZOÍTAS DE *Plasmodium vivax*.

Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva<sup>1</sup>; Isabela Ferreira Soares<sup>1</sup>; Danielly Corrêa Moreira de Sequeira<sup>1</sup>; Paula Mello de Luca<sup>1</sup>; João Hermínio Martins da Silva<sup>2</sup>; Joseli de Oliveira Ferreira<sup>1</sup>; Josué da Costa Lima Junior<sup>1</sup>.

1 IOC - Fiocruz, RJ;

2 Fiocruz, CE.

**INTRODUÇÃO** A PvMSP9 é uma candidata potencial a vacina antimalárica. Além da sua localização, da habilidade de IgG específicas em inibir a invasão dos merozoítas e a alta imunogenicidade em modelos animais, estudos acerca da resposta imune humoral contra regiões da PvMSP-9 demonstraram que a região C-terminal, contendo dois blocos de repetição, é a mais imunogênica. Entretanto, seus epítomos de células B, bem como o potencial antigênico e imunogênico destas sequências imunodominantes, ainda permanecem desconhecidos.

**OBJETIVO** Identificar epítomos de células B desta região e avaliar o seu potencial antigênico e imunogênico.

**METODOLOGIA** Pela combinação de diferentes ferramentas de predição *In silico*, identificamos potenciais epítomos lineares na PvMSP9. A sequência de melhor score de predição (PvMSP9<sub>E795-V808</sub>) foi produzida como peptídeo sintético e confirmada como naturalmente antigênica a partir do seu reconhecimento por anticorpos IgG de indivíduos expostos a infecção (ELISA). Para avaliação de sua imunogenicidade, a sequência foi sintetizada como peptídeos lineares em sua forma simples (PvMSP9<sub>E795-V808</sub>) e conjugados a epítomos de células T (pL-PvMSP9<sub>E795-V808</sub>; TT-PvMSP9<sub>E795-V808</sub>), os quais foram emulsificados em Montanide ISA-51 e utilizados na imunização de camundongos BALB/c para avaliação do perfil de anticorpos IgG e subclasses (ELISA) e da resposta imune celular mediada por IFN- $\gamma$  e IL-5 (Fluorospot) induzidos pelos peptídeos. Por fim, também foi verificado o reconhecimento da proteína nativa do parasita por anticorpos induzidos durante a imunização (IFI).

**RESULTS** Identificamos na região C-terminal da proteína PvMSP-9 três regiões potencialmente imunogênicas. Entretanto, um bloco de 5 repetições em





tandem da sequência EAAPENAEPVHENA, apresentou alta probabilidade de ser um epítipo imunodominante de célula B (BepiPred=1,59), aliado a elevadas probabilidades de estar inserida numa região desordenada (IUPRED=0,98) e numa região de interação (Anchor=0,92) da proteína. A antigenicidade desta sequência foi confirmada, visto que 56% de indivíduos respondedores para os blocos de repetição da PvMSP-9 apresentavam anticorpos específicos contra o peptídeo PVMSP9<sub>E795-V808</sub>. Na avaliação de imunogenicidade, nossos dados demonstram que o peptídeo é também imunogênico em camundongos, induzindo altos títulos de anticorpos IgG específicos (1:6.400). Interessantemente, os grupos imunizados com polipeptídeos contendo epítipos de célula-T, pL-PVMSP9<sub>E795-V808</sub> e TTPVMSP9<sub>E795-V808</sub>, apresentaram maiores títulos de anticorpos (1:12.800; 1:51200), sugerindo que os epítipos de células T potencializem a resposta humoral. Corroborando esta hipótese, apenas camundongos imunizados com polipeptídeos apresentaram resposta celular com secreção de IFN-g (552/336 SFCs/10<sup>6</sup> cels) e IL5 (60/82 SFCs/10<sup>6</sup> cels). Por fim, observamos que os anticorpos induzidos se mostraram capazes de reconhecer a proteína nativa do parasita em ensaios de imunofluorescência.

**CONCLUSÃO** Nossos dados confirmam a presença de um epítipo linear, antigênico e imunogênico na região repetitiva da PvMSP9, que, utilizado em polipeptídeos lineares sintéticos, pode representar uma nova alternativa nas estratégias vacinais contra *P. vivax*, induzindo altos níveis de anticorpos capazes de reconhecer a proteína nativa do parasita.

**PALAVRAS-CHAVE** Malária, epítipos lineares, vacina, imunologia.





## VI9. PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE *A. marginale* E *Babesia* sp. PARA USO COMO IMUNÓGENO CONTRA TRISTEZA PARASITÁRIA BOVINA.

Juliana da Silva Gomes<sup>1</sup>; Lenita Ramires dos Santos<sup>2</sup>; Grácia Soares Rosinha<sup>2</sup>; Emanuelle Baldo Gaspar<sup>3</sup>.

1 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul;

2 Embrapa Gado de Corte;

3 Embrapa Pecuária Sul.

**INTRODUÇÃO** Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e que tem como agentes etiológicos os protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a riquetsia *Anaplasma marginale*. Estas doenças causam anualmente perdas consideráveis na pecuária no Brasil, especialmente em áreas de instabilidade enzoótica. Embora exista uma vacina contra TPB sendo comercializada no Brasil, esta é refrigerada e produzida com microrganismos vivos e atenuados, apresentando inúmeras desvantagens, tais como, curta vida de prateleira, risco de reversão de virulência e de transmissão de outros patógenos, por ser produzida em bovinos.

**OBJETIVO** Obter uma proteína recombinante a partir de genes de *A. marginale* e *Babesia* sp. e avaliar a reatividade de soros de animais naturalmente infectados com *Babesia* sp. e/ou *A. marginale* frente a esta proteína, para avaliar seu potencial como candidata a uma nova vacina.

**METODOLOGIA** A proteína recombinante foi obtida a partir de um gene sintético inserido em um vetor de expressão em *E. coli*, contendo porções de dois genes de *A. marginale* e um gene de *Babesia* sp., sabidamente imunogênicos. As porções de cada proteína que seriam componentes da proteína recombinante foram selecionadas *in silico* a partir da análise das sequências nas ferramentas de bioinformática ProPred<sup>®</sup> e Protean<sup>®</sup> (DNAS<sup>t</sup>ar), que predizem epítomos T. Soros de 25 bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* e/ou *Babesia* sp. foram analisados por ELISA indireto para resposta humoral do tipo IgG contra esta proteína.

**RESULTADOS** A proteína recombinante foi produzida com alto grau de pureza, confirmada por avaliação em SDS PAGE e *Western blotting*. Em uma primeira







análise, apenas três dos 25 soros dos animais foram capazes de reconhecer a proteína recombinante. É possível que isso tenha ocorrido porque as porções selecionadas neste estudo foram sintetizadas de modo a conter principalmente epítomos de ligação a MHC classe II, já que estudos sugerem que uma resposta imune capaz de proteger bovinos contra TPB é baseada em uma resposta predominantemente celular. Assim, estudos de avaliação da antigenicidade e imunogenicidade com uma amostragem maior, para bovinos, e análise de resposta imune humoral e celular após imunização de camundongos estão em processamento.

**CONCLUSÃO** O potencial de antigenicidade humoral para esta proteína recombinante foi baixo, reconhecida por apenas 12% dos soros de animais naturalmente infectados. Entretanto, esta proteína não pode ser descartada como potencial imunógeno, pois deve ainda ser melhor categorizada, principalmente com relação à imunidade celular.

**PALAVRAS-CHAVE** vacina, recombinante, tristeza parasitária, bovino.





## V20. EVALUATION OF SCHEDULED MRM PARAMETERS. A POWERFUL TOOL FOR ANALYSIS OF MODIFIED CARRIER PROTEIN OF MENINGOCOCCAL POLYSACCHARIDE C CONJUGATE VACCINE.

Marilza Batista Corrêa<sup>1</sup>; Renata Chagas Bastos<sup>1</sup>; José Godinho da Silva Junior<sup>2</sup>; Elza C. S. Figueira<sup>1</sup>; Maria de Lourdes M. Leal<sup>1</sup>; Ivna Alana F.B. da Silveira<sup>1</sup>.

1 Laboratório de Tecnologia Bacteriana, Bio-Manguinhos / Fiocruz;

2 Laboratório de Macromoléculas, Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUCTION** Liquid Chromatography, Multiple Reaction Monitoring by Mass Spectrometry (LC-MRM-MS) method, using a stable isotope-labeled internal standard has shown major progress in biological analysis. In this approach, optimizing the selected precursor ion in Q1 and product ion in Q3, for each monitoring transition, is important for establishing the most sensitive MRM assay. The sensitivity and accuracy improvement requires an experimental study for determination of optimal instrumental parameters, in order to generate abundant quantities of precursor and product ion pair. The use of LC allows a fast separation, generating narrow peaks, reproducible retention time and peak area. The control of chromatographic parameter is performed by system suitability test. The use of Scheduled MRM requires determination of dwell and MRM detection window. The dwell time is the time spent for recording the signal intensity of one data point; a longer dwell time results in more accurate measurements of signal intensity. All these instrument settings are important to determine the exact amount of scans time of a particular event, leading to the best quality and quantity data possible.

**OBJECTIVE** Comparative study of accuracy observed in automatic Scheduled MRM and manually set up: evaluation by amino acid (Glu/Asp) standard solution analysis.

**METHODOLOGY** The MRM detection window, dwell and retention window times were optimized for LC-MS system (API 3200; Sciex). The chromatographic separation was carried out with an Agilent Column (C18; 4,6x150mm, 5 $\mu$ m), in gradient mode. System suitability was performed using a commercial amino acid solution Atraq<sup>TM</sup> (Sciex). A solution of isotope-labeled aspartic and glutamic acids, in concentration range from 0.25 to 5 pmol/ $\mu$ L, was used as control.

58





**RESULTS** Acquired data for treated aminoacids (Glu/Asp) were provided by Analyst Software Scheduled MRM™ Algorithm(method 1) and two others manual MRM methods: dwell time calculated for each analyte (method 2) and MRM detection window using 120ms (method 3). Data were analyzed using statistic program GRAPHPP ad PRISMA. For comparison among methods, a regression analysis was performed by least squares method. The standard deviations results of the linear adjust ( $S_{y,x}$ ) calculated for three methods were in area units (AU): method 1 (29,350) and methods 2, 3 (9,000) for Asp; method 1 (14,030) and methods 2,3 (5000) for Glu; this represents a decrease about 60%. The better correlation coefficient ( $r^2$ ) was for the method 3 (0.99) showing acceptable statistical relationship between the concentration and observed data for both amino acids; others methods showed  $r^2$  values out of acceptable range.

**CONCLUSION** Statically, the use of MRM detection window of 120ms (method 3) resulted in more accurate data and will be further used in the compilation of data generated by amino acid analysis of carrier protein present in meningococcal C conjugate vaccine.

**KEYWORDS** MRM/LC/MS, amino acid analysis.



## V21. MOLECULAR AND EPIDEMIOLOGICAL PROSPECTIVE STUDY OF A COHORT OF CHILDREN UNDER TWO YEARS OF AGE (MANGUINHOS-RJ), VACCINATED WITH ROTAVIRUS VACCINE.

Carina Cantelli Pacheco de Oliveira<sup>1</sup>; Alvaro Jorge Velloso<sup>1</sup>; Denise Cotrim<sup>2</sup>; Patrícia Brasil<sup>3</sup>; Alexandre Madi Fialho<sup>4</sup>; Sérgio da Silva e Mouta Junior<sup>4</sup>; Juliana da Silva Ribeiro de Andrade<sup>4</sup>; Rosane Maria Santos de Assis<sup>4</sup>; José Paulo Gagliardi Leite<sup>4</sup>; Marcia Terezinha Baroni de Moraes e Souza<sup>4</sup>.

1 Bio-Manguinhos;

2 Escola Nacional de Saúde Pública;

3 Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas;

4 Instituto Oswaldo Cruz.

**INTRODUCTION** Group A rotavirus (RVA) is a genetically diverse population of segmented double-stranded RNA (RNAs) viruses with 11 segments with a binary classification, G and P genotypes. Nowadays, 27G and 37P genotypes have been described. They are the main etiological agents of acute gastroenteritis (AG) affecting mainly children  $\leq 5$  years old worldwide. Annually, it is estimated that a third of total deaths in the world due to AG are caused by these viruses. Two vaccines were recommended by the Pan American Health Organization and World Health Organization (WHO): the monovalent Rotarix<sup>®</sup> (RV1) (transfer of technology GSK/Bio-Manguinhos) and the pentavalent RotaTeq<sup>®</sup> (RV5). Brazil introduced the RV1 in its National Immunization Program (NIP) in March, 2006.

**OBJECTIVE** The main objective is to make molecular and epidemiological studies of RVA, from November 2014 to October 2017, in fecal samples from a cohort of newborns and infants in the Manguinhos, RJ, neighborhood, with medical assistance before, during and after receiving the RV1 in routine consultations and, as well as, during acute diarrhea disease (ADD) episodes.

**METHODOLOGY** RVA detection and molecular characterization have been done by protocols recommended by WHO as quantitative RT-PCR, multiplex RT-PCR for genotyping and nucleotide sequencing.

**RESULTS** 337 fecal samples have been analyzed, corresponding to 119 observed





children. 18 (5,3%) out of 337 analyzed samples were positive for RVA and 13 were genotyped as G1P[8]. In 4 samples the genotype P[8] was characterized by multiplex RT-PCR and the G genotype was characterized as G1 by sequencing. One sample remain G and P untypeable, and sequencing analysis are in progress. Two samples characterized as G1P[8] the nucleotide sequencing of the entire genomic region coding for the NSP4 enterotoxin protein is being conducted, to investigate the occurrence of genetic events in this region that could affect the dynamic of infection in vaccinated children.

**CONCLUSION** The results obtained from this study support the surveillance of RVA genotypes after RV1 introduction, allowing detection and molecular characterization of emerging variants or new genotypes that could interfere with the NIP.

**KEYWORDS** acute gastroenteritis, group A rotavirus, genotypes, monovalent vaccine.





## V22. SYNTHETIC INTERMEDIATE FOR MENINGOCOCCAL SEROGROUP C CONJUGATE VACCINE PRODUCTION. QUANTIFICATION AND STRUCTURAL ASPECTS.

Marilza Batista Corrêa<sup>1</sup>; Magaly G. Albuquerque<sup>2</sup>; Milton Neto da Silva<sup>1</sup>; Iaralice Medeiros de Souza<sup>1</sup>; Renata Chagas Bastos<sup>1</sup>; Maria de Lourdes M. Leal<sup>1</sup>; Ivna Alana F.B. da Silveira<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos;

2 (LabMMol)/IQ/UFRJ.

**INTRODUCTION** Capsular polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroup C (PSC), is a homopolymer of partially O-acetylated  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 9) 5-N-acetylneuraminic acid; that is considered a very important raw material in glycoconjugate synthesis, especially in reductive-animation conjugation approach. A step of PSC mild oxidation by sodium periodate is required, generating oligomer with terminal aldehydes. Although N-acetyl-neuraminic acid oxidation has been well described in literature, especially for (2  $\rightarrow$  8) N-acetylneuraminic acid; slightest difference in structure, may occur depending of sialic acid glycosidic bond pattern. To solve this question a structural characterization study is required. In addition, aldehyde quantification, generally performed by colorimetric analysis, is important for process control.

**OBJECTIVE** The main goal of this study is to investigate the structure of oxidized polysaccharide *Neisseria meningitidis* serogroup C by NMR and computational methods to evaluate and to quantify the relative amount of aldehyde by qNMR.

**METHODOLOGY** The oxidized PSC was O-deacylated in alkaline medium and the product was purified by size exclusion chromatography. The samples were analyzed by 2D NMR experiments (gCOSY, TOCSY, HSQC and HMBC). Computational calculations were performed on Spartan'10 (Wavefunction, Inc.) using the MMFF94 force field. Dimeric structural models was based on X-ray crystallography data from the Protein Data Bank (PDB ID: 1KQR). Quantitative NMR were performed in Bruker Advance 400MHz, NS 64, D1 25, temperature of 313K and using D<sub>2</sub>O as solvent.

**RESULTS** In NMR spectra, it was possible to verify the aldehyde-hydrates formation in the range of 5.0-5.1 ppm; and the oxidative cleavage between C7—C8.

62





In computation studies, an equilibrium between opened and cyclic hemiacetal forms of (2→8) dimer, may exist through chair-chair interconversion. However, the cyclic form of (2→9) dimer, a twisted-boat conformation is required. The qNMR analysis showed that 9.0% of the oxidized PSC, which is in accordance with the chemical analysis 9.3%.

**CONCLUSION** NMR data of the oxidized (2→9) Neu5Ac structure is compatible with the hydrate form and computation method demonstrated that its cyclization involves the twisted-boat interconversion; while the hemiacetal was not verified. Computational data shows that cyclization involves as interconversion from chair to twistedboat conformations. By qNMR, it was possible to determinate that only 9,0% of native PSC was converted to aldehyde. Together, these data will contribute to better process control.

**KEYWORDS** capsular polysaccharide, qNMR, computational studies.





## V23. RECOMBINANT PROTEINS OF HPV16 CAPSID EXPRESSED IN 293-F CELLS CULTURED IN SUSPENSION AND SERUM FREE MEDIUM FOR VACCINE DEVELOPMENT.

Dirce Sakauchi<sup>1</sup>; Érica Akemi Kavati<sup>1</sup>; Fernanda de Oliveira Bou Anni<sup>1</sup>; Balasubramanyam Karanam<sup>2</sup>; Richard Roden<sup>3</sup>; Martin Müller<sup>4</sup>; Aurora Marques Cianciarullo<sup>1</sup>.

1 Laboratory of Genetics, Butantan Institute, Dr. Vital Brasil, Brazil;

2 Department of Biology and Cancer Research, USA;

3 Department of Pathology, Johns Hopkins University, USA;

4 Tumovirus-specific Vaccination Strategies, Infection, Inflammation and Cancer Program, German Cancer Research Center (DKFZ), Germany.

**INTRODUCTION** Cervical cancer is the most serious consequence of infection by human papillomavirus (HPV), constituting one of the leading causes of death among women worldwide, and a fact that points to a major challenge to global public health. The prophylactic vaccination on a large scale would be an alternative to reducing cervical cancer rates, making it essential to search for new vaccine strategies. Current vaccines are based on virus-like particles (VLPs) of the major virus capsid protein L1, with effective protection against specific types, but with a limited cross-protection against other HPV types. The vaccine proposal is to use the L2 protein, which contains highly conserved sequences for a broader protection against different types of HPVs.

**OBJECTIVE** In this study, we have developed the production of VLPs containing L1 and L2 recombinant proteins of HPV16, using human embryonic kidney cells (293-F) suspended in medium fetal bovine serum free.

**METHODOLOGY** Cells 293-F were cultivated in serum-free medium and cotransfected with expression vectors for mammals pUF3L1 (L1) and pU3L2h (L2). The expression of the proteins L1 and L2 were analyzed by confocal laser microscopy, flow cytometry and transmission electron microscopy. The recombinant proteins HPV16L1L2 were purified by affinity chromatography with heparin resin and immunized in Balb/c mice subcutaneously with three doses of HPV16L1L2 formulated with aluminum hydroxide as an adjuvant and used saline solution as control. The immune response induced by recombinant HPV16L1L2 was evaluated by Elisa test and western-blotting.







**RESULTS** The kinetics of expression of the HPV16 proteins L1L2 showed that maximal expression occurs around 48h post-transfection by confocal microscopy and flow cytometry. Both proteins were localized in the nucleus and cytoplasm of cells. The analysis by transmission electron microscopy showed the formation of VLPs and the presence of proteins L1 and L2 through colloidal gold immunolabeling, in cell lysate. Purification by affinity chromatography allows obtaining VLPs more structurally correct. The immunoassays by Western blotting and ELISA confirmed the induction of immune response to both proteins by the immune system of mice. The serum anti-HPV16 L1 and anti-HPV16 L2 of animals immunized with VLPs L1L2 recognized the major protein L1 molecular weight around 55 kDa and the secondary protein L2 of approximately 72 kDa, respectively. The ELISA assays demonstrated that serum antibodies showed anti-HPV16 L1 titers above in relation to anti-HPV16 L2 in the group immunized with adjuvant.

**CONCLUSION** New strategies should be experienced to optimize the immunogenicity of VLPs L1L2 of HPV16. However, VLPs L1L2 of HPV16 production system was established efficiently in human epithelial cells in suspension and with promising results, which may contribute to the development of a prophylactic vaccine with broad protection spectrum against diverse HPV types.

**KEYWORDS** human papillomavirus, cancer, HPV16, VLP, L1L2, prophylactic vaccine.





## V24. AMINO ACID ANALYSIS BY LC-MS/MS USING PRECOLUMN DERIVATIZATION WITH aTRAQ™ REAGENT: A PRELIMINARY STUDY.

Renata Chagas Bastos<sup>1</sup>; Maria de Lourdes M. Leal<sup>1</sup>; Marilza Batista Corrêa<sup>1</sup>; Ivna Alana da Silveira<sup>1</sup>; Ricardo de Andrade Medronho<sup>2</sup>; José Godinho da Silva Junior<sup>1</sup>.

1 Fiocruz / Bio-Manguinhos;

2 EQ / UFRJ.

**INTRODUCTION** Brazilian meningococcal conjugate vaccine developed by Bio-Manguinhos initially involves a selective chemical activation in carrier protein aspartic (Asp) and glutamic (Glu) residues generating an hydrazide activated monomeric tetanus toxoid (MATT). To characterize the modified protein, liquid chromatography and multiple reaction monitoring mass spectrometry (LC-MRM-MS) method using a stable isotope-labeled internal standard has been proposed. This analytical process, consists of three steps: acid hydrolysis of the protein; isotopic labeling of amino acid released by hydrolysis and analysis by LC-MRMMS, using a scheduled MRM algorithm. Here we describe the analytical procedures required to amino acids quantitation using a standard amino acid solution (Asp/Glu) and myoglobin as models, to set up the experimental parameters.

**OBJECTIVE** Evaluate the feasibility of using amino acid analysis by LC-MS/MS and isotopic labelling aiming to further MATT structural characterization.

**METHODOLOGY** Myoglobin (0.01 mg) and standard amino acid solution: Asp/Glu (0.018 mg / 0.010 mg) were submitted to hydrolysis condition: 5.8 N HCl, 110°C, 24 h using Eldex H/D Workstation (Pico Tag®). Residual HCl was removed by freeze drying. Hydrolysis products and standard amino acid solution (non-submitted to hydrolysis condition) were labeled according to “Amino Acid Analysis for Physiological Samples” protocol (SCIEX). Labeled samples were analyzed by LC using following conditions: 2 µL injection volume; C18 column (4.6 i.d × 150 mm); 0.8 mL min<sup>-1</sup> flow rate and water/methanol gradient, both containing 0.1% formic and 0.01% heptafluorobutyric acids. Fractions were detected by API 3200 (SCIEX) mass spectrometer, using a schedule MRM acquisition method.





**RESULTS** Recoveries of Asp and Glu in solution nonsubjected to hydrolysis condition were > 80% for Asp and 100% for Glu. This same sample showed, when submitted to hydrolysis condition, only 10% recovery (Asp and Glu) – without freeze drying step (pH about 3.0). On the other hand, it was achieved 90% recovery for both amino acids with the additional freeze drying stage (pH about 5.0). Myoglobin hydrolysis efficiency was monitored by MALDI-TOF and the absence of peptide peaks in the range of  $m/z$  300 – 24,000 was used as a reference to show complete hydrolysis of protein. Recovery of Asp and Glu in myoglobin was higher than 75%.

**CONCLUSION** Three freeze drying cycles were necessary for complete removal of HCl, consequently to improve the amino acid (Asp e Glu) labelling and recovery. By using myoglobin as protein model and taking into account the absence of peptide peaks ( $m/z \geq 300$ ) after hydrolysis, it was considered the amino acid analysis as satisfactory (recoveries > 75 % for Asp and Glu). However further improvement in this methodology must be performed to reach amino acids recoveries above 90 %. This is essential to begin the study related to MATT characterization.

**KEYWORDS** amino acid analysis, meningococcal conjugate vaccine, LC-MS / MS.



## V25. PREVALENCE AND RISK FACTORS ASSOCIATED WITH HOOKWORM INFECTION IN NORTHEASTERN BRAZIL: ASSESSING THE POTENTIAL IMPACT OF A HUMAN HOOKWORM VACCINE.

Kerla Joeline Lima Monteiro<sup>1</sup>; Beatriz Coronato Nunes<sup>2</sup>; Lauren Hubert Jaeger<sup>3</sup>; Elis Regina Chaves dos Reis<sup>1</sup>; Jéssica Pereira Santos<sup>4</sup>; Deiviane Aparecida Calegar<sup>1</sup>; Filipe Anibal Carvalho-Costa<sup>1</sup>.

1 Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

2 Secretaria Municipal de Nossa Senhora de Nazaré, Piauí;

3 Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

4 Fiocruz, Piauí.

**INTRODUCTION** Among the soil-transmitted helminths, hookworms affect near 440 million people worldwide, motivating research for vaccine development. A vaccine composed with two *Necator americanus* recombinant antigens (glutathione-S-transferase [Na-GST-1] and aspartic protease [Na-APR-1]), represented by enzymes involved in the hemoglobin uptake by hookworms has been passed in Phase 1 clinical trial in Brazil. Hookworm exposure to the host's blood (and hence to antibodies) make them susceptible to the action of vaccines.

**OBJECTIVE** This study aims to characterize prevalence and risk factors associated with hookworm infection in a rural area of Piauí state, northeastern Brazil, assessing the potential impact of a vaccine.

**METHODOLOGY** The study was carried out in the municipality of Nossa Senhora de Nazaré, Piauí state. A cross-sectional survey (n=601 subjects; 172 families/houses) was carried out in 2014 and 2015. Maps were generated using the kernel density estimation method. Spatial data were analyzed in a GIS platform using ArcGis 9.3<sup>®</sup> software. Parasitological examinations were performed through the formalin-ethyl-acetate centrifugation and quantitative Kato-Katz smears.

**RESULTS** The overall prevalence of hookworm infection was 14% (84/601). Prevalence rates in the rainy (2014) and dry (2015) seasons were 13.6% and 14.3%, respectively (p=0.797), with higher positivity rate among subjects aged 13 to 21 years (18.6%) and lower among persons aged > 60 years-old (9.3%). Concerning families,





the rate of detection of at least one positive subject was 39/172 (22.7%). Positivity in families performing open defecation or using rudimentary tanks was significantly higher (31/107 [29%]) than in houses with access to septic tanks (8/65 [12.3%]),  $p=0.011$ . Positivity in houses with uncoated clay floor was significantly higher than among families living in domiciles with ceramic-coated floor (11/27 [40.7%] vs. 28/145 [19.3%];  $p=0.015$ ). Among 84 hookworm-positive subjects, in 67 the infection intensity could be assessed: 62 (92.5%) had low intensity, four (6%) had moderate intensity and one (1.5%) had heavy hookworm burden. Median parasitic load of infections was 168 eggs per gram (epg) of faeces, ranging from 24 to 4,368 epg. Intensity of hookworm infections presented a trend to increase inversely to age ( $R=0.155$ ;  $p=0.213$ ). Children aged 1-4 years presented the higher fecal egg counts (median=384 epg), while children aged 5-12 years presented median egg count=120 epg, nevertheless differences were not statistically significant. Eggs had 57.2-80.2  $\mu\text{m}$  in length, being compatible with hookworms, infection with the zoonotic *Trichostrongylus sp.* being discarded. One subject was infected with *Trichuris trichiura* (0.16%). No infections with *Ascaris lumbricoides* were found. Geoprocessing identified hotspots with higher prevalence rates.

**CONCLUSION** Hookworm infection persists as a rural endemic disease with focal character, and some regions with specific demographic characteristics can produce high prevalence rates, with moderate parasitic loads. An effective vaccine would contribute to the control of hookworm in rural areas.

**KEYWORDS** hookworm, northeastern Brazil, prevalence, hookworm vaccine.





## V26. AVALIAÇÃO DO PERFIL SOROLÓGICO MATERNO-INFANTIL DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES CONTRA VÍRUS DENGUE EM UMA COORTE CLÍNICA.

Ana Claudia Machado Duarte<sup>1</sup>; Vanessa de Oliveira Santos<sup>1</sup>; Marisol Simões<sup>1</sup>; Renata Pedro Saraiva<sup>2</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>; Patrícia Brasil<sup>2</sup>.

1 Biomanguinhos-Fiocruz;

2 INI-Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** A dengue é uma arbovirose causada pelo vírus dengue, que apresenta quatro distintos sorotipos- DENV1, 2, 3 e 4. Estudos epidemiológicos sugerem que casos severos da doença ocorrem mais frequentemente em pacientes com infecção secundária por um diferente sorotipo. A resposta imune é tipo-específica, ou seja, a infecção por um não confere proteção aos demais sorotipos. A infecção prévia representa um fator de risco para formas graves em infecções subsequentes, devido ao fenômeno da amplificação anticorpo-dependente. Gestantes e neonatos representam um subgrupo vulnerável à infecção. Acredita-se que a transmissão vertical de anticorpos neutralizantes tenha papel fundamental no curso da infecção em neonatos, uma vez que pode proteger o bebê na infecção primária, mas potencializar o risco de desenvolvimento de formas mais graves na segunda infecção. Assim, o grau de proteção conferido pelos anticorpos neutralizantes passados da mãe para o feto precisa ser mais bem avaliado.

**OBJETIVO** Realizar a avaliação do perfil sorológico de gestantes e neonatos de uma coorte clínica, verificando a cinética da transmissão vertical de anticorpos neutralizantes e a interferência destes no curso da infecção/proteção para os bebês acompanhados.

**METODOLOGIA** Amostras de sangue de cordão umbilical de 298 gestantes foram coletadas e submetidas a *screening* sorológico para avaliação de anticorpos por meio de teste de PRNT (Plaque Reduction Neutralization Test) utilizando-se ponto de corte 1:10 (menor diluição) como parâmetro de positividade de anticorpos contra dengue. Adicionalmente, avaliamos a cinética da transmissão dos anticorpos em 58 bebês cujas mães foram positivas, através da dosagem de amostras pareadas (primeira e segunda coleta) por PRNT.





**RESULTADOS** Ao todo, 95% das gestantes foram consideradas positivas para pelo menos 1 sorotipo de dengue e 68,7% foram positivas para todos os sorotipos. Para os neonatos, a média de título obtido na primeira coleta foi de 181,4 (D1), 151,2 (D2), 141,2 (D3) e 145,6 (D4), utilizando-se a recíproca da diluição como unidade de medida. A média da segunda coleta para D1 foi de 97,4, 74,2 (D2), 44,6 (D3) e, 81,5 (D4).

**CONCLUSÃO** Os resultados preliminares dos neonatos indicam que a transmissão vertical ocorre e que nos primeiros meses de vida os títulos de anticorpos se mantêm relativamente altos. Porém, a partir da segunda coleta, observou-se que há queda significativa de título para todos os sorotipos ( $p < 0,05$ ), o que pode tornar o neonato susceptível a infecção. Pretendemos futuramente aumentar o n de amostras de bebês testados por PRNT, a fim de avaliar todos os neonatos cujas mães foram positivas. Com isso, esperamos estabelecer associações entre o perfil sorológico materno-infantil e a evolução clínica das crianças; além de gerar conhecimentos para nortear a realização de futuros esquemas vacinais contra dengue.

**PALAVRAS-CHAVE** dengue, neonatos, anticorpo neutralizante, PRNT.





## V27. AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO DAS VACINAS BRASILEIRAS CONTRA *Neisseria meningitidis* SOROGRUPOS B E C.

Denise da S. G. Pereira<sup>1</sup>; Lucia Martins Teixeira<sup>2</sup>; Maria de Lourdes M. Leal<sup>1</sup>; Ivna Alana B. da Silveira<sup>1</sup>; Ellen Jessouroun<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos;

2 Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

**INTRODUÇÃO** A doença meningocócica é um problema de saúde pública em todo o mundo, com incidência variável em diferentes áreas geográficas. A proteção contra a doença meningocócica é relacionada à produção de anticorpos com atividade bactericida e sua persistência ao longo do tempo. A combinação de vacinas é uma estratégia atual contra infecções, entre elas a meningite.

**OBJETIVO** Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da combinação de duas vacinas meningocócicas desenvolvidas em Bio-manguinhos; a vacina C conjugada e a vacina B, na indução da resposta imune em camundongos.

**METODOLOGIA** Os anticorpos induzidos nos camundongos foram avaliados com relação à atividade bactericida frente às cepas vacinais, a indução de IgG total, isotipos de IgG e avides, por ELISA, além de desafio bacteriano. Os camundongos foram imunizados por via intramuscular com vacina meningocócica C conjugada, vacina meningocócica B e a combinação das duas. Os animais receberam 1/10 da dose humana num esquema de imunização de três doses com intervalo de 15 dias e dose reforço 30 dias após a terceira dose. Amostras de sangue foram obtidas via plexo orbital, antes da administração de cada dose e após a dose reforço.

**RESULTADOS** Para as vacinas teste a resposta bactericida para o sorogrupo B foi maior para a cepa N44/89 do que para cepa N603/95, se equivalendo após a dose reforço. Observou-se tendência de aumento para a vacina combinada. Para as vacinas C conjugada, monovalente ou combinada, após imunização primária, verificou-se alto potencial de proteção para a cepa C11, sem variação após a 3ª dose e a dose reforço. Os títulos de IgG total para os antígenos da vacina B não mostraram valores significantes entre as vacinas monovalentes, enquanto foram mais elevados para as vacinas combinadas. O mesmo foi constatado em relação à avides, com privilégio para a combinação das vacinas. Para o polissacarídeo C, a combinação das duas vacinas, levou a obtenção

72







de valores significativamente maiores do que os obtidos para a vacina monovalente, principalmente na avidéz dos anticorpos induzidos. A análise de isotipos de IgG, induzidos para este componente vacinal, revelou concentrações mais elevadas de anticorpos fixadores de complemento, para as vacinas combinadas, sugerindo participação de resposta Th1.

**CONCLUSÃO** Os resultados indicam a vantagem da combinação das duas vacinas avaliadas, com relação aos títulos de anticorpos induzidos, à sua especificidade e persistência de anticorpos. Observou-se proteção em torno de 80% para principal cepa circulante de meningococo sorogrupo B e também para a cepa do sorogrupo C. Tais observações sugerem que a combinação de vacinas pode melhorar a imunidade induzida pelas vacinas monovalentes, contribuindo com mais uma evidência de que o uso de vacinas multivalentes pode representar uma interessante estratégia de prevenção contra a doença meningocócica.

**PALAVRAS-CHAVE** *Neisseria meningitidis*, vacina meningocócica B, vacina meningocócica C conjugada, vacina combinada.





## V28.AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DOS DADOS DOS ESTUDOS DE ESTABILIDADE DA VACINA BIVALENTE DE POLIOMIELITE EM COMPARAÇÃO COM RESULTADOS DA VACINA TRIVALENTE.

Adeilton Pedro de Alcântara<sup>1</sup>, Darcy Akemi Hokama<sup>1</sup>, Wagner Nascimento Costa<sup>1</sup>, Gileleia Oliveira de Faria<sup>1</sup>, Izabel Cristina Crespo<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** Após reunião do Grupo Consultor Estratégico de Especialistas (SAGE) de Imunização da OMS foi confirmada política de retirada globalmente sincronizada do tipo 2 da vacina oral contra poliomielite trivalente (tOPV) que irá ocorrer durante uma janela de duas semanas entre abril e maio de 2016, durante a qual todos os países que utilizam tOPV substituirão pela vacina bivalente OPV 1 e 3 (bOPV). Foi enfatizada a importância de estabelecer vias regulatórias relevantes para garantir o licenciamento do produto no tempo previsto. Assim, foi produzida por Bio-Manguinhos uma vacina bivalente que deverá ser registrada junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

**OBJETIVO** Em cumprimento às exigências para obtenção do registro da bOPV junto à ANVISA, foi realizado um estudo de comparação estatística entre os resultados obtidos nos estudos de estabilidade de lotes de bOPV com estudos obtidos em lotes de tOPV. Dessa forma, foram realizadas avaliações estatísticas entre os Estudo de Estabilidade Acelerado e Longa Duração da bOPV em comparação com os estudos com de tOPV. Ambas as vacinas foram produzidas com os mesmos ingredientes farmacêuticos ativos, somente sendo retirado o tipo 2. Além disso, foi avaliado perfil de degradação de ambas as vacinas, bOPV e tOPV, comparando os parâmetros potência trivalente, potência tipo 1 e 3, nos mesmo estudos de estabilidade.

**METODOLOGIA** Para efetuar as comparações, foi utilizado o teste não paramétrico U de *Mann-Whitney* (1947). Para avaliar o perfil de degradação foram utilizados modelos de regressão linear e modelos não paramétricos.

**RESULTADOS** Comparações. Os resultados obtidos com base no p-valor da estatística de teste U de *Mann-Whitney*, na avaliação estatística dos Estudos de Estabilidade Acelerado e Longa Duração, indicaram que a vacina bOPV é uma vacina





com tendência de estabilidade similar à vacina tOPV.

**RESULTADOS** Modelagem. Para descrever as potências trivalente, bivalente, tipo 1 e 2, ao longo do tempo, foram considerados diversos modelos de regressão linear, modelos de regressão não paramétricos, além de regressões polinomiais e transformações das variáveis resposta e explicativa. A escolha do modelo final foi realizada com base nas análises dos resíduos, nos resultados da análise de variância e na comparação com os modelos não paramétricos. Com base no modelo escolhido para descrever as potências acima citadas ao longo do tempo, bem como para efetuar as respectivas extrapolações, concluiu-se que os resultados da vacina bOPV apresentaram perfil de degradação similar ao perfil apresentado pela vacina tOPV.

**CONCLUSÃO** Em linhas gerais, com base nos resultados da Estatística U de *Mann-Whitney* e das análises de tendências efetuadas, pode-se concluir que a vacina bOPV, apresenta tendência de estabilidade análogas à vacina tOPV.

**PALAVRAS-CHAVE** vacina de poliomielite, modelos de regressão.







# BIOFÁRMACOS





## BI. INTEGRATION METHODOLOGIES FOR RISK MANAGEMENT IN THE BIOPHARMACEUTICAL INDUSTRY

---

Miguel Angel de la O Herrera<sup>1</sup>; Elezer Monte Blanco Lemes<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

---

**INTRODUCTION** The biopharmaceutical industry has been working recently to attend the suggestion of international standards to structure a Risk Assessment Quality System. For example, the ICH (International Conference on Harmonization) through the Q9 guide, recommends the use of risk analysis tools to support the risk management process. However, methodologies for identification and analysis of failures and deviations proposed in this guide are focused mainly for risk management at specific targets, such as processes, noncompliance, equipment, infrastructure, etc., and is commonly necessary to apply independently more than one tool for analysis and identification of risk.

**OBJECTIVE** To propose a Hazard and Operability Study (HAZOP) and the Failure Modes and Effects Analysis (FMEA) integrated methodology for risk analysis, which allows the identification and treatment of deviations in equipment and new infrastructure within the biopharmaceutical industry, from the analysis of operating parameters and unit operations used in production processes.

**METHODOLOGY** To perform this work, a process for recombinant protein production was analyzed as a case of study. Key unit operations comprising process stages were characterized. For each process, parameter causes and consequences of possible deviations were defined; subsequently the level of risk was established, as indicated by HAZOP methodology. Likewise, detection measures and controls were identified; finally, based on the concepts of the FMEA methodology, the Risk Prioritization Number (RPN) was calculated.

**RESULTS** In the multiplication stages 04 nodes were identified with 15 possible deviations, being 90% considered undesirable and 10% acceptable. The bioreaction stage showed 33 deviations divided in 07 nodes, being 21% acceptable and 79% undesirable. The culture centrifugation and inactivation stage had 05 nodes with 33 deviations, 51% acceptable and 49% undesirable. In the cell disruption stage 28 deviations were





identified in 06 nodes. 21% of deviations were acceptable, 71% undesirable and 8% unacceptable. Finally, in the washing of inclusion bodies stages 35 deviations in 06 nodes were found, being 31% acceptable and 69% undesirable. Considering the high incidence of deviations cataloged as undesirable, the concept of detectability of deviations was applied. Detection rates allowed establishing the RPN, thus facilitating the prioritization of deviations treatment regardless of their level of risk.

**CONCLUSION** The proposed methodology allowed the simultaneous analysis of deviations in operating parameters and the failure modes of process functions, bringing benefits such as the sparing of resources and required time to implement a risk management program. Prioritization in the treatment of risks was used in structuring a plan of action to mitigate the risks.

**KEYWORDS** HAZOP, FMEA, risk.





## **B2. INHIBITION OF THE MYOTOXICITY INDUCED BY CROTOXIN B, FROM *Crotalus durissus terrificus* VENOM, BY CAMELID NANOBODIES.**

Marcos Barros Luiz<sup>1</sup>; Soraya dos Santos Pereira<sup>1</sup>; Naan Rodrigues Gonçalves<sup>1</sup>; Nidiane Dantas Reis Prado<sup>1</sup>; Leandro Soares Moreira Dill<sup>1</sup>; Andreimar Martins Soares<sup>1</sup>; Fernando Berton Zanchi<sup>1</sup>; Juliana Pavan Zuliani<sup>1</sup>; Rodrigo Guerino Stábeli<sup>2</sup>; Carla Freire Celedônio Fernandes<sup>3</sup>.

1 Fiocruz - RO;

2 Fiocruz;

3 Fiocruz - RO, 2Centro de Pesquisa em Medicina Tropical - CEPEM.

**INTRODUCTION** In addition to conventional immunoglobulins G, camelids produce functional antibodies devoid of light chains and CH1 domains, called heavy-chain camelid antibodies (HCAbs). The antigen recognition site of HCAbs is formed by the single domain referred to as VHH or nanobody (Nbs). Besides thermal and pH stability, important for field treatment, nanobodies have one tenth the size of conventional antibodies, possess low immunogenicity, can be produced in microorganisms and are able to neutralize animal toxins, allowing its use as a tool in the treatment of snakebite envenoming. The genus *Crotalus* accounts for about 7.5% of snakebite accidents in Brazil and its mortality rate can reach 4.7%. Neurotoxic, nephrotoxic and myotoxic effects of crotalus envenoming are mainly related to the crotoxin (CTX), a heterodimer formed via noncovalent interactions between the phospholipase A2 (CB, crotoxin-B, PLA2-CB) basic and enzymatically active, and crotopotin (CA, crotoxin-A), acid component and enzymatically inactive. The treatment is performed by administering immunobiologics derived from hyperimmunized horses. Besides high cost of production, the serum therapy is less effective in neutralizing toxins in deep tissues and can cause adverse reactions. Thus, the search for complementary methods in cases of snakebite envenoming has been increasing.

**OBJECTIVE** Exploring the advantages of nanobody, this work aimed to characterize *in silico*, *in vitro* and *in vivo* clones previously selected against crotoxin, from a llama VHH library.

**METHODOLOGY** The molecular docking was used for demonstrate *in silico* interaction between Nbs and CB subunit and affinity constants were determined by







surface plasmon resonance (SPR). *In vitro* inhibition of CB and CTX phospholipase A2 activity was performed using synthetic fluorescent phospholipid acyl-NBD-PE and *in vivo* neutralization of myotoxic effect induced by crotoxin-B in mice, was evaluated by measuring the increase of the serum creatine kinase (CK).

**RESULTS** *In silico* analysis demonstrated the possible profile de interaction of KF498604 and KF498605 clones with CB subunit, and kinetic analysis of interaction determined affinity with KD value in 81,34 and 1716 nM, respectively. Both clones were able to inhibit more than 70% the *in vitro* phospholipase activity of the CTX and CB, in a 1:40 ratio (w/w). Additionally, the KF498604 was capable to neutralize more than 60% of the myotoxic effects induced by crotoxin-B in mice, in a 1:20 ratio (w/w).

**CONCLUSION** Preliminary results demonstrate that the selected nanobodies could be an interesting tool to improve the crotalic serum therapy, however *in vivo* neutralization ability of the neurotoxic effects caused by crotoxin and *Crotalus durissus terrificus* venom are being investigated.

**KEYWORDS** VHH, nanobodies, crotoxin-B, PLA2-CB, *Crotalus durissus terrificus*.



### **B3. AVALIAÇÃO DO CONTEXTO REGULATÓRIO PARA REGISTRO SANITÁRIO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS PARA USO TERAPÊUTICO.**

Monique Collaço de Moraes Stávale<sup>1</sup>; Elezer Monte Blanco Lemes<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** Com o objetivo de buscar equilíbrio na balança comercial da saúde, e aumentar sua autonomia e capacidade para formular e implementar políticas no âmbito do Sistema Único de Saúde, o governo vem implementando uma série de iniciativas. Nesse contexto, destacam-se os anticorpos monoclonais (mAbs), produtos com metodologias de produção e controle de qualidade complexos, com valor agregado elevado e responsáveis por considerável parte dos recursos destinados à saúde. Esta classe de medicamento tem se mostrado uma boa alternativa no tratamento de câncer, artrite reumatoide e doenças autoimunes, classes terapêuticas de maior crescimento no Brasil e no mundo. A complexidade dessas moléculas alinhada aos riscos ao paciente traz a necessidade de instrumentos regulatórios eficientes. Essa questão torna-se mais crítica quando o mAb é um biossimilar. Na regulamentação brasileira (RDC n° 55/2010), não há consideração específica para o registro sanitário de mAbs, essas moléculas devem atender aos mesmos requisitos dos demais produtos biológicos, portanto, é comum que as solicitações de registro sejam analisadas caso a caso, baseando-se em requisitos das Agências Regulatórias internacionais.

**OBJETIVO** O objetivo deste trabalho é avaliar o contexto regulatório para o registro sanitário de mAbs para uso terapêutico, considerando as principais agências do mundo, utilizando ferramentas de Gestão da Qualidade.

**METODOLOGIA** Nesta abordagem se aplicou a metodologia de Estudo de Caso, utilizando como fontes a base de dados a plataforma Cortellis Thomson Reuters e os sítios eletrônicos das Agências de países historicamente regulados, guias internacionais e regulação nacional. Os dados serão categorizados e analisados utilizando a ferramenta de causa e efeito de forma a encontrar os principais aspectos para alvo de análise pela regulação nacional vigente.

**RESULTADOS** Foi construído um diagrama de causa e efeito onde problema





central foi definido como “Qualidade e Segurança de mAbs para uso terapêutico”. Os itens relacionados ao problema central foram categorizados em quatro grandes blocos: Sistemas de Banco de Células, Vetor de Expressão e Célula Hospedeira, Meio de Cultura e Materiais e Processo Produtivo.

**CONCLUSÃO** A partir da elaboração do banco de dados, percebeu-se que a Agência Europeia de Medicamentos foi pioneira no estabelecimento de requerimentos para o registro de mAbs. A Agência Americana, apesar de ainda possuir pontos em discussão no assunto biossimilares, tem guias para registro de anticorpos monoclonais que são claros e cobrem todas as etapas de desenvolvimento, produção e controle de qualidade. O ICH e a OMS apesar de não serem Agências Regulatórias, também possuem guias completos baseados em discussões maduras envolvendo a comunidade científica e produtores. Neste cenário nossa proposta de requerimentos para registro sanitário é um passo importante para a compreensão e obtenção de conhecimento acerca da discussão de mAbs e biossimilares e a abordagem de diretrizes consideradas impactantes nesta classe de proteínas terapêuticas.

**PALAVRAS-CHAVE** mAbs, registro sanitário, biossimilares.





## **B4. OBTENÇÃO DE ALFA-AMILASE PANCREÁTICA E MALTASE-GLICOAMILASE HUMANAS COM POTENCIAL PARA DESENVOLVIMENTO DE NOVOS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA DIABETES.**

Caroline de Souza Almeida de Avellar<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** A Diabetes Mellitus tipo II é a doença mais comum dentre as desordens metabólicas crônicas, sendo atualmente a maior causa de morbidade e mortalidade, acometendo jovens, adultos e idosos. Representa um conjunto de síndromes patológicas que culminam em hiperglicemia decorrente da ingestão excessiva de carboidratos. A amilase salivar inicia a digestão do amido, prosseguindo no duodeno, por ação da amilase pancreática e  $\alpha$ -glicosidases localizadas no intestino delgado, responsáveis por finalizar a digestão do amido. As principais  $\alpha$ -glicosidases intestinais são a Sucrase-isomaltase e a Maltaseglicoamilase, que hidrolisam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 das dextrinas, liberando glicose. A Sucrase-isomaltase é mais abundante do que a Maltase-glicoamilase, porém esta última possui maior atividade catalítica. Inibidores da  $\alpha$ -amilase pancreática e das glicosidases intestinais, como a acarbose, têm sido empregados no tratamento da Diabetes tipo II. Inibidores de glicosidase contendo o núcleo 1,2,3-triazol, um heterociclo nitrogenado de origem sintética, tem servido de base para o desenho de diversos fármacos. Por estarem envolvidas em uma grande variedade de eventos biológicos, as glicosidases recombinantes são importantes produtos biotecnológicos empregados como alvo de uma série de compostos com potencial terapêutico para o tratamento de doenças como a Diabetes tipo II.

**OBJETIVO** Obter as glicosidases humanas recombinantes Alfa-amilase pancreática e Maltase-glicoamilase através de sistemas de expressão por Baculovírus geneticamente modificados e células de inseto Sf9 de *Spodoptera frugiperda* com potencial para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

**METODOLOGIA** Plasmídeos de clonagem recombinantes foram selecionados em *Escherichia coli* One Shot Mach T1 e transformados para *Escherichia coli* DH10Bac, dando origem a bacmídeos recombinantes. Foram utilizados vetores de clonagem pFastBac/HBM-TOPO, que possuem sequência Histag C-terminal e apresentam





sinal de secreção da proteína para o meio extra celular. Bacmídeos recombinantes foram transfectados em células de inseto da linhagem Sf9 e as glicosidases obtidas foram identificadas e caracterizadas por eletroforese SDS-PAGE e ensaio imunoenzimático.

**RESULTADOS** O processo de padronização das concentrações de anticorpos policlonais foi realizado para dar prosseguimento à realização dos géis em Poliacrilamida (SDS-PAGE) e *Western Blot*. As secreções da Alfa-amilase e Maltase-glicoamilase foram obtidas em cultivos de células Sf9, com inóculo inicial de  $2,0 \times 10^5$  células viáveis/mL, infectadas por Baculovírus geneticamente modificados e analisadas por *Western Blot*, através da visualização de banda protéica correspondente à massa molar do controle positivo obtido por indução em *E. coli*.

**CONCLUSÃO** A partir da obtenção das glicosidases por expressão heteróloga, foi confirmada a secreção das glicosidases Alfa-amilase e Maltase-glicoamilase em células de inseto Sf9 infectadas por Baculovírus geneticamente modificados. Desta forma, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para Diabetes Mellitus Tipo II tendo como alvo estas enzimas torna-se possível.

**PALAVRAS-CHAVE** alfa-amilase pancreática, maltaseglicoamilase, Diabetes Mellitus, Sf9, baculovírus.



## B5. CLONAGEM E EXPRESSÃO DO DOMÍNIO TRANSGLICOSILASE DA PBP2 DE *Staphylococcus aureus*.

Amanda Maria Nunes Peres<sup>1</sup>; Ana Paula Corrêa Argondizzo<sup>1</sup>; Anna Erika Vieira de Araujo<sup>1</sup>; Mariana Tardelli Garcia Miguez<sup>1</sup>; José Procópio Moreno Senna<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Tecnologia Recombinante.

**INTRODUÇÃO** *Staphylococcus aureus* é uma bactéria grampositiva comumente encontrada na superfície da pele e trato respiratório superior. Infecções comunitárias e hospitalares causadas por *S. aureus* têm aumentado e seu tratamento dificultado devido ao surgimento de cepas resistentes, como MRSA. Proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) são enzimas essenciais na biossíntese do peptidoglicano. Somente encontradas em bactérias, estas macromoléculas são consideradas um excelente alvo para o desenvolvimento de estratégias destinadas ao controle bacteriano. *S. aureus* possui 4 PBPs e apenas a PBP2 apresenta atividade de transglicosilação, sendo um bom modelo para avaliar se o bloqueio deste domínio poderia levar à inviabilidade funcional bacteriana.

**OBJETIVO** Clonar, expressar e purificar a região transglicosilase da PBP2 de *S. aureus*.

**METODOLOGIA** A sequência nucleotídica do gene que codifica o domínio transglicosilase da proteína PBP2 de *S. aureus* e dos aminoácidos que o constituem foi consultada no GenBank. Análises *in silico* foram realizadas para avaliar estrutura 3D e regiões transmembranares. O ADN total da cepa sensível à meticilina (MSSA) ATCC25923 foi extraído, o gene codificante da PBP2T amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão pET100-D/TOPO. Os plasmídeos foram transformados em *Escherichia coli* TOP10, extraídos e os clones recombinantes confirmados por PCR e sequenciamento nucleotídico. Para a expressão, células de *E. coli* BL21 (DE3) *Star* contendo o plasmídeo recombinante foram induzidas com diferentes concentrações de IPTG (0,1; 0,5 e 1 mM) e cultivadas em diferentes temperaturas após a indução (19, 23, 30 e 37°C). Corpos de inclusão foram lisados por sonicação em tampão contendo uréia, e a PBP2T foi purificada por cromatografia de afinidade a íons metálicos (IMAC). O *refolding* da proteína foi realizado através de diálise em PBS, empregando concentrações decrescentes de uréia e aditivos para permitir sua solubilização e estabilização.





**RESULTADOS** O gene codificante para a proteína PBP2T foi amplificado e clonado no vetor pET100-D/TOPO e a proteína recombinante expressa em *E. coli* BL21 (DE3) Star. Nenhuma das condições testadas foi capaz de aumentar a solubilidade protéica, sendo a proteína expressa na forma de corpos de inclusão. Para solubilizar a PBP2T empregou-se o agente desnaturante uréia a 5M. A PBP2T foi purificada em gradiente linear de 5 a 500 mM de imidazol, sendo a proteína eluída em torno de 120 a 200 mM de imidazol. O *refolding* foi realizado através de diálise em PBS, gradiente decrescente de uréia e utilização de aditivos como sacarose e glicerol; no entanto a maior parte da proteína precipitou nesta etapa.

**CONCLUSÃO** O presente estudo demonstrou que foi possível expressar e purificar a proteína recombinante PBP2T. Entretanto, dada a intensa precipitação durante a etapa de *refolding*, diferentes aditivos (detergentes, açúcares, sais) devem ser testados a fim de estabelecer um correto reenovelamento proteico após a retirada do agente caotrópico.

**PALAVRAS-CHAVE** *Staphylococcus aureus*, MRSA, PBP2, domínio transglicosilase.





## **B6. *In silico* DEVELOPMENT OF A scFv ANTAGONISTIC TO $\alpha 4\beta 1$ INTEGRIN.**

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

1 Universidade Federal do Ceará;

2 Fundação Oswaldo Cruz.

**INTRODUCTION** Integrins are heterodimeric glycoprotein receptors located in cellular membrane. These proteins are involved in various physiological processes, mediating signaling pathways, which coordinate cellular functions. The  $\alpha 4\beta 1$  integrin is found in the immune system cells and they take part of leukocyte migration during inflammatory processes, such as encephalomyelitis, Chron's disease, multiple sclerosis and others diseases. Single Chain Fragment Variable (scFv) are the smallest shape of antibodies. They conserve the variable regions of light and heavy chains, therefore preserving their specificity. Currently, the only monoclonal antibody commercially available, which interacts with  $\alpha 4\beta 1$  integrins is Natalizumab. However, this antibody is not specific just for  $\alpha 4\beta 1$ , it also interacts with  $\alpha 4\beta 7$ .

**OBJECTIVE** The aim of this project is to build a scFv specific to  $\alpha 4\beta 1$  integrin *in silico*.

**METHODOLOGY** A search of monoclonal antibodies, which recognize subunits  $\alpha 4$  or  $\beta 1$  from integrins, was performed against the database Integrity. From the selected sequences, the comparative modelling of tridimensional structures of the light and heavy antibodies' chains was done. In addition, the evaluation of the structures was performed on the SAVES and Molprobit servers. Two types of scFv were made using the modeled chains. The first one uses a short peptide linker, GGGGS, to connect the light and heavy chains. The second one uses a long linker made of three repetitions of the first linker. A molecular docking of all scFv and the  $\alpha 4\beta 1$  integrin was done through Haddock server. The best clusters generated were submitted to Robetta Alanine Scanning for hotspot identification. From these results, mutations in strategic residues interacting with  $\alpha 4\beta 1$  were done. A new docking using the modified scFv and  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrins was performed. The best scFv was selected and submitted to docking with  $\alpha 4\beta 7$ . Thus, new mutations were done to ensure the antibody specificity for  $\alpha 4\beta 7$  comparing to the others integrins.







**RESULTS** Three sequences were obtained from Integrity under 257898, 670484 and 725144 codes. The modeled chains obtained satisfactory values on Molprobit and SAVES evaluation. 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 a short linker due to better Haddock score, Cluster size, and RMSD values. After the new mutations, this scFv also presented the best Haddock Score for  $\alpha 4\beta 1$  comparing to  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 471$ .

**CONCLUSION** A scFv specific to  $\alpha 4\beta 1$  integrins was obtained. In addition, it was able to better distinguish among  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha 4\beta 7$  integrins. As perspective, scFv molecular dynamics will be performed to analyze its stability and mode of interaction. This method is preliminarily used to select better proteins in a group of generated mutants, following the *in vitro* evaluation.

**KEYWORDS** antibodies, integrins,  $\alpha 4\beta 1$ .





## **B7. EVALUATION OF ANTIFUNGAL PROPERTIES OF THE CHIMERIC PROTEIN WGA-Fc AGAINST THE FUNGAL CELL WALL.**

Susie Coutinho Liedke<sup>1</sup>; Allan Jefferson Guimarães<sup>2</sup>; José Mauro Peralta<sup>1</sup>.

1 Universidade Federal do Rio de Janeiro;

2 Universidade Federal Fluminense.

**INTRODUCTION** Fungal infections have emerged as a serious public health problem and most therapeutic strategies are inefficient. Therefore, it makes necessary the development of new and efficient therapeutic strategies for the treatment of mycosis. Passive immunization using monoclonal antibodies is a powerful alternative to eliminate fungal infections, mainly targeting surface structures such as chitin and glucan that are common to all fungi. However, these polysaccharides are not immunogenic and unable to induce humoral response.

**OBJECTIVE** In order to develop a broader reagent against mycosis, we have used lectins, dectin-1 and WGA, with recognized affinity to common fungal structures such as  $\beta$ -1,3-glucan and chitin, and fused to effector Fc part of IgG.

**METHODOLOGY** The chimeric protein WGA-Fc (IgG2a) was expressed and characterized. Initially, we showed that WGA-Fc chimera formed dimers in solution with quaternary structure resembling an antibody.

**RESULTS** Phagocytosis assays showed that the chimera has opsonizing activity in macrophages and stressed the antifungal activity of these cells in pretreated fungi with the chimera compared to controls. The protective activity was evaluated in vivo and three groups of different treatments were used: control only with PBS, native WGA and WGA-Fc chimera. C57BL/6 mice were treated in the three conditions and infected with *H. capsulatum*. One week later, the animals were sacrificed and lungs, spleen and liver were macerated and plated. The group treated with WGA-Fc had attenuated growth of the fungi in the lungs, spleen and liver, compared to controls. The numbers of CFU of PBS, native WGA and WGA-Fc were, respectively,  $5,8 \times 10^7$ ,  $2,1 \times 10^7$  and  $4,6 \times 10^6$  in the lungs;  $3,8 \times 10^6$ ,  $1,6 \times 10^6$  and  $2,4 \times 10^5$  in the spleen and  $1,1 \times 10^6$ ,  $1,1 \times 10^6$  and  $1,0 \times 10^5$  in the liver. Treatment with WGA-Fc followed by





infection of mice also reduced effectively the mortality relative to control animals. PBS treated animals died by 17 days and with native WGA died by 26 days. All the animals treated with WGA-Fc chimera survived within the 60 days period of the experiment.

**CONCLUSION** These results showed the potential of WGA-Fc chimera as possible antifungal agent. In order to increase the spectrum of organisms, plasmids for dectin-Fc chimeras were constructed, and currently, we are expressing the proteins in CHO-k1 cells.

**KEYWORDS** proteína quimérica, antifúngico, micosis.





## B8. PRODUCTION OF POTENTIAL CATHEPSINS D FOR THE DEVELOPMENT OF NEW AGENTS AGAINST SCHISTOSOMIASIS.

Nathália da Costa e Silva<sup>1</sup>; Bogar Omar Araujo Montoya<sup>2</sup>; Floriano Paes Silva Junior<sup>2</sup>; Álvaro Paiva Braga de Sousa<sup>1</sup>.

- 1 Bio-Manguinhos / Fiocruz;  
2 IOC / Fiocruz.

**INTRODUCTION** Schistosomiasis is a parasitic disease caused by trematodes of the genus *Schistosoma*, whose occurrence of different species vary according to geographical location worldwide. Here in Latin America, it is reported the presence only of *S. mansoni*. It is estimated that schistosomiasis affects 240 million people and poses a threat to more than 700 million people living in risk areas. Thus, according to the World Health Organization (WHO), schistosomiasis is the second in the list of parasitic diseases that most affect the man, one of the most widespread parasitic diseases in the world. Praziquantel is the drug of choice (and in practical means the single available) for the treatment of schistosomiasis. Besides treatment, WHO also recommends its use in preventive treatment of schistosomiasis in massive drug administration campaigns. However, although safe and effective against all the species of *Schistosoma*, successive use in endemic areas can encourage the emergence of resistance. In this context, it becomes clear the need to seek and develop new agents and therapeutic alternatives for the treatment of schistosomiasis. Proteases (or proteolytic enzymes) catalyze the hydrolysis of peptide bonds. Found in the pepsin-like family of aspartic peptidases is cathepsin D, for which has been suggested numerous physiological functions. One of them is an important role in the nutrient digestion by blood-feeding parasites of man and other animals. Thus, cathepsin D-like aspartic peptidases are recognized as potential drug targets. The development of therapeutic agents against these drug targets involves their production in heterologous expression systems. One of the eukaryotic systems that attracted significant interest in recent years is the baculovirus-infected insect cell platform.

**OBJECTIVE** Obtain *Schistosoma mansoni* cathepsin D in baculovirus systems using recombinant insect Sf9 cell cultures.

**METHODOLOGY** *Spodoptera frugiperda* insect cells (Sf9 line) were obtained from working cell bank. Sf9 cells were infected with the genetically modified





baculovirus obtained through the Bac-to-Bac TOPO cloning kit. The obtained proteases were analyzed by biochemical techniques, such as electrophoresis under denaturing conditions (SDS-PAGE) and by enzyme immunoassay (*Western Blot*). Protein measurements were performed by the Bradford method at 660 nm using the Protein Assay kit (Pierce®).

**RESULTS** Due to the standardization of concentrations of the polyclonal antibodies made and through analysis by SDSPAGE and *Western Blot*, were observed, from the supernatants of cell suspension infected with genetically modified baculovirus, protein bands corresponding to the mass molar of the positive control obtained by induction in *E. coli*, suggesting that SmCD1 and SmCD3 enzymes were expressed in Sf9 cells.

**CONCLUSION** The efficiency of the system baculovirus-infected insect cell for the production of recombinant proteins was proved, being an appropriate choice for obtaining *Schistosoma mansoni* cathepsins D.

**KEYWORDS** baculovirus, Sf9 insect cells, schistosomiasis, cathepsin D.





## **B9. AVALIAÇÃO PRELIMINAR 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>; Maíra Peixoto Pellegrini<sup>1</sup>; Rodrigo Coelho Ventura Pinto<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** Células de mamíferos são cultivadas em suspensão, com agitação, de forma a manter uma distribuição homogênea de células, nutrientes, metabólitos e produto. Isto permite um monitoramento das condições da cultura, cultivos com maiores densidades e maior produção da proteína de interesse. Biorreatores operados em perfusão, com constante troca de meio de cultivo e retenção de células, necessitam de um sistema de recirculação por bombeamento que mantenha alta viabilidade, sem consequente impacto no produto. As bombas mais utilizadas na indústria biotecnológica são bombas peristálticas, no entanto, apresentam vazão relativamente baixa, fluxo e pressão intermitentes e alta tensão de cisalhamento. Bombas centrífugas com impelidor magnético começaram a ser aplicadas a processos biotecnológicos, já que não promovem atrito com o eixo do rotor, reduzindo a exposição das células ao estresse mecânico.

**OBJETIVO** Avaliar as condições operacionais de uma bomba centrífuga, com impelidor magnético, em uma linha de recirculação fechada e analisar o impacto na viabilidade de células CHO.

**METODOLOGIA** A bomba foi conectada à linha de recirculação de um biorreator de 2L e a correlação entre velocidade de rotação e a vazão de bombeamento foi verificada a partir de uma curva de calibração, em uma faixa de 1000 a 3000rpm. O teste preliminar de recirculação com células CHO foi realizado com velocidade de 2000rpm, com recirculação de 20 vezes o volume de cultivo. A viabilidade e concentração celular foram mensuradas em hemocitômetro com azul de tripan imediatamente após o reciclo e durante um período de 72 horas.

**RESULTADOS** A bomba foi operada por 18 minutos, atribuídos a uma recirculação de 20 vezes o volume do cultivo, admitindo-se que cada célula foi submetida ao





ambiente da câmara de bombeamento 20 vezes. A concentração celular e viabilidade do cultivo foram mensuradas imediatamente após a operação, 2, 4, 24, 48 e 72 horas depois, sem identificar queda significativa na viabilidade celular (mantida acima de 80%) nem prejuízo na concentração celular quando comparadas ao cultivo controle. Para evitar que o efeito da exaustão dos nutrientes interferisse nos resultados, o biorreator foi operado em modo contínuo com taxas de diluição que variaram entre 0,4 e 0,6.

**CONCLUSÃO** A manutenção da viabilidade celular indica que o procedimento de recirculação das células no biorreator não causou estresse mecânico suficiente para induzir, de forma significativa, a morte celular, sugerindo que a utilização da bomba com a linhagem celular é viável. Vale ressaltar que o período de recirculação utilizado (18 minutos) é equivalente ao que é observado em um período de 24 horas de operação em escala industrial, no entanto com uma velocidade menor. Outras velocidades de operação serão testadas levando em consideração a frequência e a intensidade resultantes de diferentes vazões, para que seja possível estabelecer as condições ideais de operação do sistema.

**PALAVRAS-CHAVE** biorreator, bomba centrífuga, célula CHO.





## **BI0. ERITROPOETINA E CONTROLE DA QUALIDADE: NOVAS ABORDAGENS ANALÍTICAS PARA ANTIGAS LIMITAÇÕES DOS BIOENSAIOS.**

Melissa Chamon Alves Premazzi<sup>1</sup>; Eduardo da Silva Gomes de Castro<sup>1</sup>; Alessandra Santos Almeida<sup>1</sup>; Camila Faia de Sá<sup>1</sup>; Ingrid Pinheiro de Medeiros<sup>1</sup>; Daniel da Silva Guedes Junior<sup>1</sup>; Igor Barbosa da Silva<sup>1</sup>; Katherine Antunes de Mattos<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUÇÃO** A Alfaepoetina<sup>®</sup> produzida pelo Instituto de Tecnologia de Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) tem seu processo de produção compartilhada com o Centro de Imunología Molecular (CIM/Cuba) através da transferência tecnológica do produto. Dentro do controle da qualidade, a potência é um ensaio crucial para demonstrar a efetiva relação entre a resposta clínica e a atividade biológica da eritropoetina, sendo o bioensaio em camundongos normocitêmicos a metodologia preconizada pela monografia do produto. Porém, a personalização do produto com o alto teor do estabilizante, a albumina sérica humana (HSA), nos lotes formulados restringe análises químicas de caráter investigativo do produto final.

**OBJETIVO** De modo a investigar lacunas entre potência biológica e análise quali/quantitativa da Alfaepoetina<sup>®</sup>, o DEQUA investiu na busca de autossuficiência de conhecimento de técnicas ajustáveis ao produto, iniciando uma abordagem multidisciplinar para o controle da qualidade baseado em análises de potência biológica e físico-químicas.

**METODOLOGIA** Análise comparativa entre dados de bioensaios realizados no CIM e Bio. Estudo molecular do ingrediente farmacêutico ativo (IFA) e nas diferentes apresentações do produto final a partir de adequações de métodos físico-químicos validados pelo LAFIQ, utilizando os parâmetros técnicos controlados pelo uso do material de referência desenvolvido em estudo colaborativo (Bio/CIM/INCQS). Avaliação da metodologia por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE-FR) como técnica quantitativa e preparativa para ensaios de mapeamento peptídico, integridade da molécula e análise de isoformas, características diretamente relacionadas com a potência biológica.







Resultados: A quantificação seletiva do princípio ativo de Alfaetina na presença da HSA foi padronizada e validada conforme as especificações da USP, sendo considerada aplicável a rotina do controle de qualidade. Esta metodologia pode ser utilizada como etapa preparativa para outras análises de caráter qualitativo aplicáveis ao produto como perfil peptídico, análise de isoformas e integridade.

**CONCLUSÃO** A qualidade e consistência do controle lote-alote em diferentes apresentações do produto reforça que possíveis variações no valor declarado pelos bioensaios podem ser um reflexo da variabilidade e complexidade dos ensaios in vivo. A capacidade de quantificar e caracterizar a eritropoetina em qualquer etapa da produção, fortalece o conhecimento e integração de parâmetros do processo produtivo, abrindo caminho para outras frentes investigativas pertinentes à identificação de possíveis alterações intrínsecas de potência biológica. A customização deste trabalho reflete o compromisso de Bio-Manguinhos com o controle da qualidade de seus produtos, além de exercer sua contribuição científica com um novo olhar sobre a avaliação integrada do produto baseado nas interfaces, permitindo maior valorização de novos métodos físico-químicos que possibilitem a substituição progressiva do uso de animais em bioensaios.

**PALAVRAS-CHAVE** eritropoetina, alfaetina, cromatografia, potência.



## **B11. MODELING OF THE CD20 AND CD52 MEMBRANE RECEPTORS AND STUDY OF THEIR INTERACTION WITH DMPC MEMBRANE BY MOLECULAR DYNAMIC SIMULATION.**

Marcos Roberto Lourenzoni<sup>1</sup>; Alison de Sousa Rebouças<sup>1</sup>; Natália Fernandes Frota<sup>1</sup>; Ana Virgínia Frota Guimarães<sup>1</sup>; Gabriel Nascimento Maranhão<sup>1</sup>; Maurício Cardoso da Costa Júnior<sup>1</sup>; Claudia do Ó Pessoa<sup>1</sup>.

1 Fundação Oswaldo Cruz - CE.

**INTRODUCTION** Cancer is one of the main causes of mortality in the world according to the World Health Organization. Thus, studies of alternatives for cancer treatment are extremely important, such as, the use of more effective monoclonal antibodies (mAbs). CD20 and CD52 are membrane receptors that are overexpressed in leukemia and lymphoma cells, which makes them ideal targets for mAbs, for example, the commercial antibodies Rituximab and Campath-1H. There is no crystallographic structure available for these receptors, which limits a better understanding of their interaction with mAbs and the biological membrane.

**OBJECTIVE** To obtain three-dimensional structure of CD20 and CD52 receptors in a model membrane represented by a dimyristoyl phosphatidylcholine (DMPC) bilayer.

**METHODOLOGY** Four CD20 transmembrane helices were modeled in the Swiss-PdbViewer software, and then submitted to molecular dynamics (MD) simulation immersed in n-hexane/water interface. CD20 was modeled by inserting the polypeptide chains that connect the helices. Then, it was inserted into the DMPC bilayer followed by submission to DM simulation for 100 ns. CD52 structure contains a 12 amino acid peptide and a GPI anchor, which was drawn in the Accelrys Draw 4.2 software and then submitted to the Automated Topology Builder (ATB) and Repository program for obtaining a three-dimensional structure and a force field compatible with GROMOS53a6 force field. The CD52 was obtained by unifying the GPI and the peptide topologies for the same force field, and submitted to DM simulation immersed in DMPC bilayer, interfaced by water. The CD20 and CD52 structural stability was evaluated by root mean square deviation (RMSD) in Gromacs 5.0.2 software.





**RESULTS** CD20-loop structure that binds to Rituximab stabilizes after 27 ns of simulation with RMSD of  $\sim 0.09$  nm. The structure of the CD20 epitope reaches equilibrium after 25 ns (RMSD of  $\sim 0.02$  nm). In the CD52 structure, the protein portion stabilizes after 10 ns (RMSD  $\sim 0.40$  nm) and the region that defines the epitope admits RMSD of  $\sim 0.15$  nm.

**CONCLUSION** The CD20 and CD52 models show a three dimensional structural organization in greater detail than the epitope only, which is normally used for obtaining the antibody. The small fluctuations in RMSD, after CD20 and CD52 reach equilibrium in MD, support the epitope function of being the most complementary region with mAbs, defining the antibody-antigen specificity. These models are validated for the continuity of the project of Rituximab and Campath-1H biobetters development, considering more realistic models of CD20 and CD52. Acknowledgments: Fiocruz, Funcap, CNPq, Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (Cenapad) – Ceará.

**KEYWORDS** CD20, CD52, cancer, molecular dynamics.







# REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO





## RI. A PROTEIN PLATFORM FOR THE RAPID BIOENGINEERING OF MULTI-EPITOPE ANTIGENS AND MULTI-VALENT BIOMARKERS

---

Andressa Durans<sup>1</sup>; Paloma Pêgo<sup>2</sup>; Flavia Reis<sup>3</sup>; Angela Junqueiro<sup>1</sup>; Salvatore Giovanni De-Simone<sup>3</sup>; D. William Provance, Jr.<sup>3</sup>.

1 IOC / Fiocruz;

2 Universidade Federal Fluminense (UFF);

3 CDTS / Fiocruz.

---

**INTRODUCTION** Recombinant technology has greatly advanced immunology-based solutions to infectious diseases. Prior to the use of recombinant proteins, reagents were generated directly from preparations of target pathogens. Such preparations have the distinct advantage of including all antigens to elicit or recognize immune system responses. However, they require the manipulation of pathogens, which can be costly and dangerous. Utilization of recombinant proteins can overcome this disadvantage, but robustness and sensitivity can often be decreased by the reduction in the epitopes present. Enhancements have been achieved by combining multiple pathogenic biomarkers into single recombinant proteins, but practical limitations have restricted the complexity of these chimeras and, therefore, the number of pathogen proteins represented.

**OBJECTIVE** To improve the immunologically relevant representation of a pathogen in a single recombinant protein, a protein platform was engineered to receive multiple short amino acid sequences (<20 aa) without altering the behavior of the resulting chimeric protein compared to the unaltered platform.

**METHODOLOGY** A naturally occurring protein sequence was identified that demonstrated a capacity to accommodate the insertion of extraneous sequences at various locations along the coding sequence. Through molecular biology, the sequence was modified to contain multiple insertion points spread throughout the coding region. Each point was defined by a unique restriction site that allows the incorporation of peptide sequences in frame to the platform protein. Four pathogens were selected to generate examples of multiepitope antigens and multi-valent biomarkers using elements of the pathogens that were identified as capable of delivering desired performance profiles. Chimeric proteins were expressed in *E. coli* using the pET expression system.

102





The performance of multi-epitope antigens will be tested for their ability to elicit an immune response towards pathogen specific sequences while multi-valent biomarkers were analyzed for reactivity to patient sera by *Western Blot*, ELISA and carbon printed electrodes.

**RESULTS** The expression profiles of the five chimeric proteins showed similar patterns with a 3 hour induction period sufficient to produce target levels of 50-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Identical protocols permitted the purification of each to high purity (>95%). The performance of the individual multi-valent biomarkers showed high reactivity to sera from patients with the corresponding infection without significant cross reactivity to other infections. Evaluation of the immune response against the multi-epitope antigen is in progress.

**CONCLUSION** The protein platform utilized in these studies shows great promise as a method to develop immunological tools for combating infectious agents. The results suggest that this approach can rapidly (<8 weeks) generate multiepitope antigens or multi-valent biomarkers with desired performance properties through standardized protocols.

**KEYWORDS** biomarkers, pathogens, rapid test.



## **R2. ACCURACY OF A DPP SYPHILIS BIO-MANGUINHOS ASSAY FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF NONTREPONEMAL AND TREPONEMAL ANTIBODIES IN PATIENTS WITH ACQUIRED SYPHILIS.**

Ricardo Cristiano Brum<sup>1</sup>; Nara Mazarakis Rubim<sup>1</sup>; Janaína Reis Xavier<sup>1</sup>; Elizabeth Maciel de Albuquerque<sup>1</sup>; Ramon Lemos Calaça das Neves<sup>1</sup>; Michel Verne Sucupira<sup>1</sup>; Tatiana Guimarães de Noronha<sup>1</sup>; Ricardo Wagner de Almeida<sup>1</sup>; Hugo Garcia Tonioli Defendi<sup>1</sup>; Maria de Lourdes Sousa Maia<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUCTION** Syphilis is a curable infection disease caused by *Treponema pallidum*. WHO estimates that there are 937,000 sexually transmitted syphilis cases per year in Brazil in its sexually active population. Rapid point-of-care (POC) tests for simultaneous detection of nontreponemal and treponemal antibodies can help resolve the issue with regard to treatment decisions.

**OBJECTIVE** To evaluate the accuracy of DPP nontreponemal / treponemal Syphilis Bio-Manguinhos Assay compared to the diagnostic tests currently being used (VDRL and TPHA).

**METHODOLOGY** Sectional study conducted in healthy units where syphilis diagnosis is usually made. The study population was composed by adults stratified in three groups: infected with HIV (N= 174), pregnant women (N=170) and neither pregnant nor HIV infected (N=149). The syphilis status wasn't known before study enrollment. Whole blood, serum and plasma specimens were used for study objective. Reference tests for treponemal and nontreponemal antibody tests were TPHA and VDRL, respectively, following the flowchart of testing from Brazilian Ministry of Health. The sensitivity, specificity, positive and negative predictive values (PPV/NPV) has been calculated separately for each study group and biological specimen. The main outcome was the combined results of nontreponemal and treponemal DPP assays compared with TPHA positive combined with a VDRL with titer of 1:8.

**RESULTS** Considering the reference flowchart and tests, the results for each specimen and group were: people infected with HIV in whole blood - sensitivity (100%), specificity (93.1%), PPV (7.7%), NPV (100%); people infected with HIV

104







in serum - sensitivity (100%), specificity (91.9%), PPV (6.7%), NPV (100%); people infected with HIV in plasma - sensitivity (100%), specificity (92.5%), PPV (7.1%), NPV (100%); pregnant women in whole blood - sensitivity (100%), specificity (99.4%), PPV (50%), NPV (100%); pregnant women in serum: sensitivity (100%), specificity (99.4%), PPV (50%), NPV (100%); pregnant women in plasma: sensitivity (100%), specificity (98.2%), PPV (25%), NPV (100%); people neither pregnant nor HIV infected in whole blood: sensitivity (80%), specificity (97.2%), PPV (50%), NPV (99.3%); people neither pregnant nor HIV infected in serum: sensitivity (100%), specificity (96.5%), PPV (50%), NPV (100%); People neither pregnant nor HIV infected in plasma - sensitivity (100%), specificity (96.5%), PPV (50%), NPV (100%). Two subjects were in treatment for syphilis during study evaluation and have been removed from the analysis. One study limitation was the observed syphilis prevalence lower than previously estimated, affecting the positive predictive value calculation.

**CONCLUSION** POC DPP Syphilis Bio-Manguinhos evaluated in this study shows good sensitivity and specificity in detecting treponemal and nontreponemal antibodies in whole blood, serum and plasma. Considering the overall study results and the assay simple performance, we conclude that this assay can be considered as an alternative in the diagnosis of syphilis, particularly in resource-limited areas where disease prevalence, and loss to follow-up, are high.

**KEYWORDS** syphilis, diagnostic, point of care, rapid test.





### R3. OBTAINING A RECOMBINANT ANTIGEN OF *Taenia crassiceps* FOR USE IN IMMUNODIAGNOSIS.

Regina Helena Saramago Peralta<sup>1</sup>; Thiago Rodrigues Lima<sup>1</sup>; Ronaldo Mohana-Borges<sup>2</sup>; José Mauro Peralta<sup>2</sup>.

1 Universidade Federal Fluminense;

2 Universidade Federal do Rio de Janeiro.

**INTRODUCTION** Neurocysticercosis (NC) is caused by the presence of *Taenia solium* in the CNS. Diagnosis requires proper evaluation of clinical, neuroimaging and serological data, in the correct epidemiological context. The development of immunological assays with purified and recombinant proteins and synthetic peptides can improve the assays efficiency, increasing sensitivity and specificity. Studies of cross-reactivity between *Taenia crassiceps* and *T. solium* antigens confirmed that both share common epitopes.

**OBJECTIVE** The aim of this study was to establish protocols for cloning, expression and purification of the gp14 recombinant protein of *T. crassiceps* and evaluate its diagnosis potential.

**METHODOLOGY** The cloning of gp14 DNA was performed through synthetic DNA technology. The DNA was inserted into the vector pET21dEZ and transformed into the *Escherichia coli* strain DH5 $\alpha$ . The plasmid was inserted into competent strains of *E. coli*. The recombinant 14 kDa protein purity was assessed by SDS-PAGE and also by *Western Blot*. The cloning was confirmed by sequencing. The SDS-PAGE and *Western Blot* analysis showed a band corresponding to the gp14r. The cloning using synthetic DNA technology allowed us to obtain recombinant protein in sufficient amount to use in immunoassays.

**RESULTS** The gp14r was used in ELISA and LIApеп for detection of antibodies of anti-*T. solium* in 8 samples of NC patients, with active disease; 25 samples of patients with others parasites, including hydatid disease; 8 samples of healthy individuals and 21 samples of pigs suspected of NC. All samples of control groups were no reactive in the tests and the NC patients were reactive.

**CONCLUSION** The results showed a good performance and consist in an important tool for the NCC diagnosis.

**KEYWORDS** neurocysticercosis, immunoassays, recombinant proteins.





## **R4. IMMUNOLOGICAL METHOD USING MAGNETIC BEADS FOR CHAGAS INFECTION DIAGNOSIS**

---

Thiago Ferreira de Araújo Rosa<sup>1</sup>; Regina Helena Saramago Peralta<sup>2</sup>; Mauro Jorge Cabral-Castro<sup>3</sup>; Giovani Carlos Verissimo da Costa<sup>3</sup>; José Mauro Peralta<sup>3</sup>.

1 Universidade Federal do Rio de Janeiro;

2 Universidade Federal Fluminense;

3 Universidade Federal do Rio de Janeiro.

---

**INTRODUCTION** Chagas' disease is caused by *Trypanosoma cruzi* and affects about 8 million people in the Americas. The development of laboratory methods for diagnosis in chronic phase is a major challenge, due to differences in parasite burdens in acute and chronic stages and problems of specificity caused by the cross-reactivity against antigens from other trypanosomatids. Some commercial immunoassays use parasite lysate as antigen, although there are others that use protein fractions, recombinant proteins and synthetic peptides as antigen.

**OBJECTIVE** In the current study we develop an assay with magnetic beads on Luminex platform using total antigen and protein fraction from the protozoa.

**METHODOLOGY** To detect antibodies in serum samples from individuals with or without Chagasic infection, from three endemic regions of Brazil, the assay was standardized with a total extract of *T. cruzi* and the 30-34 kDa protein fraction.

**RESULTS** The assay with beads sensitized with total antigen showed a sensitivity of 100 % and specificity of 97.5%, while the assay with 30-34 kDa protein fraction showed 96.6% and 95 %, respectively.

**CONCLUSION** It is concluded that the Luminex platform is a promising immunoassay to be applied in the diagnosis of *T. cruzi* infection, once it presented high sensitivity and specificity when using total antigen or fraction of 30 -34 kDa.

**KEYWORDS** chagas infection, Luminex, antibodies detection.





## R5. RECOMBINANT PRODUCTION OF ANTIGENS AND ANTIBODIES FOR DIAGNOSIS PURPOSES USING SYNTHETIC BIOLOGY METHODS.

---

Nilson I. T. Zanchin<sup>1</sup>; Marco Aurélio Krieger<sup>2</sup>; Claudemir Souza<sup>3</sup>; Danilo S. Eugenio<sup>1</sup>; Kelly Santos<sup>4</sup>; Lucianna F. O. de Lima<sup>1</sup>; Paola A. F. Celedon<sup>4</sup>; Nayara F. B. Santos<sup>1</sup>; Priscila T. Baschiroto<sup>1</sup>; Ueriton D. de Oliveira<sup>1</sup>.

- 1 ICC-Fiocruz;
  - 2 IBMP/Fiocruz;
  - 3 ICC-ICC-Fiocruz;
  - 4 IBMP.
- 

**INTRODUCTION** Quality control of blood transfusion and pregnancy risk assessment require millions of diagnostic tests to be performed on a daily bases. This work is motivated by two major points, namely the dependence of Brazil health programs from imported tests, which causes an estimated deficit of 200 million US Dollars/year, and the necessity to improve the biochemical reagents used in immunoassays to include the recently discovered genetic variants of many pathogens.

**OBJECTIVE** The objective of this work is to establish production processes and to test antigens and antibodies for diagnostic purposes.

**METHODOLOGY** Antigenic proteins from the pathogens tested in the quality control of blood transfusion and pregnancy risk assessment programs were selected taking into account their genetic variation. Over one hundred synthetic genes were optimized for their expression in *E. coli*. In some cases, antigenic regions were combined into chimeric proteins in order to reduce the number of bioprocesses. The development of recombinant antibodies involves production of full-length and Fab and scFv fragments.

**RESULTS** Eight pathogens (HIV1, HIV2, HTLV-I, HTLV-II, HCV, HBV, *Trypanosoma cruzi*, *Treponema pallidum*) are tested in quality control of blood transfusion, with *Plasmodium* and CMV being additionally required for malaria endemic areas and immunosuppressed patients, respectively. All of the pathogens above and toxoplasmosis and rubella are generally tested for pregnancy risk assessment. Depending on the region other pathogens must be included, as for example HRSV.





In addition to serum antibodies, immunodiagnostic tests of some pathogens (HIV1, HBV, HRSV, malaria) need to include detection of viral proteins, so that antibodies against viral proteins must be developed. Production processes have already been established for 30 recombinant antigens that passed immunological trials for the pathogens HIV1-2, HCV, HBV, *T. cruzi*, *T. pallidum* and *Toxoplasma gondii*. Three recombinant antibodies have been also produced.

**CONCLUSION** The approach adopted here allowed successful production of novel recombinant antigen and antibodies for immunodiagnosis.

**KEYWORDS** synthetic biology, biotechnology, immunodiagnosis.





## R6. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE METALO- $\beta$ -LACTAMASE DO TIPO NDM PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE TESTE IMUNOCROMATOGRÁFICO.

Isadora Rodrigues da Silva<sup>1</sup>; Thiago Pavoni Gomes Chagas<sup>2</sup>; Edimilson Domingos da Silva<sup>3</sup>; Ana Paula Carvalho-Assef<sup>2</sup>; Marise Dutra Asensi<sup>2</sup>; José Procópio Moreno Senna<sup>4</sup>; Cláudio Marcos Rocha<sup>2</sup>.

1 Lab. de Tecnologia Recombinante (LATER) - Biomanguinhos / Fiocruz e Lab. de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH) - Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

2 Lab. de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH) - Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

3 Laboratório de Tecnologia Diagnóstica (LATD) - Biomanguinhos / Fiocruz;

4 Laboratório de Tecnologia Recombinante (LATER) - Biomanguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** A disseminação de bactérias multirresistentes é considerada uma séria ameaça à saúde da população. Segundo a Organização Mundial da Saúde, investimentos em pesquisa devem ser realizados em busca de maior acurácia e rapidez na identificação de patógenos multirresistentes e dos genes de resistência. Com o aumento alarmante do número de casos de infecções por patógenos produtores de Nova Déli metalo- $\beta$ -lactamase (NDM) em diferentes países e a expansão da disseminação do gene para diversas espécies bacterianas, a detecção NDM se torna fundamental para o controle de infecção hospitalar, com o objetivo de prevenir a disseminação desse tipo de resistência e orientar a terapia antimicrobiana. O teste imunocromatográfico é uma técnica que se destaca em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico bacteriano, devido à sua rapidez para geração de resultados (10 a 30 minutos) e portabilidade, além de não exigir uma equipe qualificada ou equipamentos para interpretação dos resultados. Outras vantagens são a alta sensibilidade e a especificidade semelhantes aos testes de ELISA de terceira geração e com o custo mais baixo. Testes de imunocromatografia têm sido utilizados com sucesso na detecção de diferentes patógenos, como *Treponema pallidum*, *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, o desenvolvimento de um teste rápido cromatográfico se justifica por ir de encontro aos interesses públicos.

**OBJETIVO** O objetivo deste projeto é a clonagem e a expressão do gene bla<sub>NDM</sub> para futura construção e avaliação de um conjugado microesfera-anticorpos anti-NDM na plataforma imunocromatográfica, para a detecção de NDM em amostras bacterianas associadas a casos de infecção hospitalar.





**METODOLOGIA** O DNA genômico de uma amostra clínica de *Klebsiella pneumoniae* produtora de NDM foi extraído e o gene  $bla_{NDM}$  foi amplificado por PCR. O produto da PCR foi utilizado como molde para construção do vetor pET28a+ $bla_{NDM}$ . Em seguida, a construção foi inserida por eletroporação em uma *Escherichia coli* TOP10. Os clones recombinantes obtidos foram avaliados quanto à presença do gene por PCR, digestão do plasmídeo purificado e por sequenciamento para detecção da integridade do inserto.

**RESULTADOS** A análise da PCR demonstrou a presença do gene  $bla_{NDM}$  em diferentes clones recombinantes. Além disso, a digestão do plasmídeo purificado confirmou o resultado anterior gerando uma banda de aproximadamente 730 pb compatível com o tamanho do gene clonado. Adicionalmente, o sequenciamento demonstrou que o gene não apresentava mutações e que estava em código de leitura correto.

**CONCLUSÃO** Estudos de indução da expressão e de solubilidade da proteína NDM recombinante em *E. coli* BL21 Star estão em andamento visando futura produção de anticorpos anti-NDM.

**PALAVRAS-CHAVE** NDM, teste imunocromatográfico.



## R7. IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS DE ESTAFILOCOCOS EXISTENTES À METICILINA POR IMUNOENSAIO DE FLUXO LATERAL.

Alfredo Verlangieri Jabôr<sup>1</sup>; Ana Paula Corrêa Argondizzo<sup>1</sup>; Felipe Rodrigues Semcovici Ramos<sup>1</sup>; Edimilson Domingos da Silva<sup>1</sup>; José Procópio Moreno Senna<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos, Fiocruz-RJ.

**INTRODUÇÃO** A disseminação de bactérias resistentes a antibióticos é um problema mundial grave de saúde pública, e a detecção de resistência de forma rápida é essencial para o tratamento apropriado e controle epidemiológico dessas infecções. No Brasil, a resistência à meticilina em *Staphylococcus aureus* chega a c.25 % dos casos detectados anualmente. A proteína PBP2a é o produto do gene *mecA* e é o fator que confere a resistência aos antibióticos betalactâmicos.

**OBJETIVO** Nosso grupo está desenvolvendo um imunoenensaio de fluxo lateral para demonstrar a presença da proteína ligante de penicilina/meticilina PBP2a em culturas de estafilococos (*Staphylococcus aureus*) resistentes à meticilina (MRSA).

**METODOLOGIA** Um antígeno recombinante (rPBP2a) e o anticorpo monoclonal específico correspondente (mAb anti-PBP2a) estão disponíveis como componentes intermediários para o desenvolvimento do imunoenensaio. As amostras controladas consistem de culturas de MRSA. Os parâmetros de precisão analítica são obtidos com um desenho experimental baseado em padronização de ensaios sorológicos para o desenvolvimento de ensaios inovadores para diagnósticos, sob uma estrutura laboratorial colaborativa. O anticorpo monoclonal anti-PBP2a foi produzido, purificado e empregado em um processo de conjugação a microesferas de látex coloridas e ao ouro coloidal, como cromógenos visuais do imunoenensaio.

**RESULTADOS** Os resultados preliminares demonstraram a capacidade do anticorpo de reconhecer a proteína PBP2a em amostras de MRSA, mas ainda é necessário solucionar problemas de precisão analítica para fundamentar o uso do teste em laboratório.







**CONCLUSÃO** A interferência da proteína A, presente na membrana dos estafilococos, apresenta uma dificuldade para a interpretação de resultados. O dispositivo sorológico está desenhado para a detecção de proteína nativa PBP2a, mas a proteína A presente na membrana tem afinidade com imunoglobulinas IgG, o que produzirá sinal inespecífico e resultados falso-positivos. Para evitar este problema, é necessário remover a proteína A de amostras para o estudo e elaborar um algoritmo para minimizar os efeitos da proteína A endógena no teste. Nossas técnicas para conjugação requerem otimização adicional para cada ligante.

**PALAVRAS-CHAVE** teste rápido, estafilococos, resistência a antibióticos.





## R8. DETECÇÃO DE ZIKA, DENGUE E CHIKUNGUNYA EM ENSAIO MOLECULAR MULTIPLEX.

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

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUÇÃO** Os vírus Zika, Dengue e Chikungunya causam uma variedade de síndromes com sintomas muito semelhantes. Atualmente, médicos têm lidado cada vez mais com pacientes com essas doenças. Neste contexto, o diagnóstico laboratorial diferencial se torna uma ferramenta de grande importância para determinar a etiologia da doença e construir a nossa compreensão da epidemiologia e importância médica dos arbovírus.

**OBJETIVO** Desenvolver um ensaio molecular multiplex, capaz de detectar e discriminar os vírus Zika, Dengue e Chikungunya em amostras clínicas de pacientes suspeitos.

**METODOLOGIA** Um ensaio molecular multiplex discriminatório, *one-step*, PCR em tempo real para Zika, Dengue e Chikungunya, com um controle interno (CI), foi padronizado com vírus de cultura. Amostras de pacientes com suspeita clínica foram utilizadas para acessar a performance do ensaio. De outubro de 2015 a fevereiro de 2016, plasmas foram coletados dos pacientes suspeitos. O RNA foi extraído com o equipamento MDX (Qiagen), as reações de PCR em tempo real foram pipetadas automaticamente no Janus (PerkinElmer) e amplificação feita no sistema QuantStudio (Life Technologies). Este ensaio triplex foi padronizado com primers e sondas gênero-específicos otimizados para detectar e discriminar os vírus Zika, Dengue, Chikungunya e o CI.

**RESULTADOS** O ensaio foi ajustado para performance satisfatória, reprodutibilidade, especificidade e alta sensibilidade. O CI monitorou e validou todos os passos e reações. O *threshold* foi fixado em 0,3. Oito replicatas, de diluições seriadas de base 10 ( $10 - 10^6$ ), de vírus Zika, Dengue e Chikungunya de cultura, foram analisadas e 100% delas foi detectada. Um total de 309 amostras de pacientes com suspeita clínica de Zika, Dengue e Chikungunya foram analisadas. O ensaio molecular multiplex detectou





27 pacientes positivos para Zika, 9 para Dengue e 63 para Chikungunya, confirmando uma fase aguda da infecção, comprovada pela presença do RNA de vírus circulante. O diagnóstico laboratorial Zika, Dengue e Chikungunya é desafiador, o RNA viral é detectado no soro de pacientes apenas durante os primeiros dias da doença. Em um desses pacientes confirmado para Zika vírus pelo ensaio molecular multiplex, no início dos sintomas, foi possível detectar o vírus na urina nove dias após o início dos sintomas, momento em que o vírus não estava mais presente no soro.

**CONCLUSÃO** A rápida implementação do ensaio molecular multiplex Zika/Dengue/Chikungunya (ZDC) no Brasil irá ajudar no manejo dos pacientes e a identificar regiões endêmicas. Todas as características técnicas de sensibilidade, especificidade e reprodutibilidade foram definidas em tempo recorde. A prova de conceito deste novo ensaio diagnóstico molecular ZDC foi obtida através do processamento pareado de amostras clínicas. A incorporação desta proposta de kit ZDC Brasileiro é uma realidade e está em fase de produção e validação de lotes piloto, visando à submissão de processo junto a ANVISA.

**KEYWORDS** diagnóstico molecular / Zika, Dengue e Chikungunya.





## R9. DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA PARTÍCULA CALIBRADORA PARA O KIT NAT HIV/HCV/HBV BIO-MANGUINHOS.

Daniele Rocha<sup>1</sup>; Elisabete Andrade<sup>1</sup>; Marcela Fontana<sup>1</sup>; Marisa Ribeiro<sup>1</sup>; Elaine Motta<sup>1</sup>; Daniela T. Godoy<sup>1</sup>; Antonio G. P. Ferreira<sup>1</sup>; Rodrigo Brindeiro<sup>2</sup>; Amilcar Tanuri<sup>2</sup>; Patricia Alvarez<sup>1</sup>.

- 1 Bio-Manguinhos;
- 2 UFRJ.

**INTRODUÇÃO** O Kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos está implementado em toda a hemorrede pública nacional, ampliando a segurança transfusional no Brasil. Até o momento, 9 milhões de bolsas de sangue já foram testadas e mais de 70 amostras em fase de janela imunológica foram detectadas. O Kit NAT HIV/HCV/HBV utiliza uma partícula viral mimética (VLP – *virus like particle*), biossegura, chamada partícula calibradora ou controle interno (CI), que controla todas as etapas do processo. Inicialmente, o conceito de CI consistia na competição da amplificação do alvo, com a falha esperada do calibrador em amostras positivas. Visando otimizar o sistema, além de ampliar ainda mais a sensibilidade do kit, um novo CI aperfeiçoado foi desenvolvido.

**OBJETIVO** Modificar a região alvo de ligação dos primers do CI para impedir a competição com os primers de HIV/WT e melhorar ainda mais o desempenho do kit NAT HIV/HCV/HBV Bio-Manguinhos.

**METODOLOGIA** A técnica *Scramble Site Directed Mutagenesis* foi utilizada para modificar a região alvo no plasmídeo do CI com o objetivo de gerar um novo sítio de ligação para os primers do CI e impedir a competição com os primers do HIV/WT. Foram desenhados dois pares de primers direcionados para a mutagenese das regiões originais no plasmídeo (integrase) e foi utilizada a enzima *Pfu turbo*. A extensão dos iniciadores gera um plasmídeo contendo a região mutagenisada. Posteriormente, foi realizada a transformação da bactéria JM109 com o plasmídeo e a confirmação da mutagenese foi feita pela PCR do plasmídeo e sequenciamento. A transfecção foi realizada na célula 293T. O RNA do vírus gerado foi extraído e seu desempenho avaliado pela PCR em tempo real (qPCR) com primers específicos. Também foi avaliada a eficiência da transfecção realizando a PCR em tempo real com e sem a enzima transcriptase reversa (RT).





**RESULTADOS** A PCR convencional detectou o plasmídeo mutagenizado com a região do novo sítio de ligação. O sequenciamento do plasmídeo confirmou que a região de interesse foi mutagenizada, com 100% de concordância. A transfecção nas células 293T obteve excelente rendimento de aproximadamente  $10^8$  cópias/mL de vírus. A qPCR realizada a partir do RNA extraído do vírus, com os iniciadores do novo CI, apresentou desempenho satisfatório e o controle negativo não apresentou amplificação. A qPCR com e sem RT mostrou que quando não há a enzima o material extraído não amplifica. O novo CI aumentou a sensibilidade e reprodutibilidade do produto, principalmente em amostras com baixa carga viral de HIV.

**CONCLUSÃO** O NAT HIV/HCV/HBV Brasileiro é um produto diferenciado sob os aspectos científico e tecnológico, sendo um dos principais exemplos da política afirmativa do Ministério da Saúde. Sendo assim, o novo controle interno é extremamente importante para o aperfeiçoamento contínuo do kit e garantia da ampliação da segurança transfusional no Brasil.

**PALAVRAS-CHAVE** Kit NAT, aperfeiçoamento contínuo.





## RI0. CHIKUNGUNYA VIRUS (CHIKV) OUTBREAK IN FEIRA DE SANTANA, BAHIA: PRELIMINARY REPORT.

Karen Trinta<sup>1</sup>; Marisa Ribeiro<sup>2</sup>; Marcela Maurell<sup>2</sup>; Michel Sucupira<sup>2</sup>; Camila Montalbano<sup>3</sup>; Maricélia Maia<sup>4</sup>; Márcia Dal Fabbro<sup>5</sup>; Rivaldo Venâncio da Cunha<sup>6</sup>.

- 1 LATED / Bio-Manguinhos / Fiocruz;
- 2 LATED / Bio-Manguinhos / Fiocruz;
- 3 Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS);
- 4 Secretaria de Vigilância Sanitária de Feira de Santana, BA;
- 5 Secretaria de Saúde de Campo Grande, MS;
- 6 Fiocruz - MS.

**INTRODUCTION** CHIKV is an arthropod-borne virus that is transmitted by *Aedes* mosquitoes. The infection is characterized by painful arthralgia that may last over two years after the onset of the illness. The first autochthonous cases of CHIKV infection in Brazil were reported in Oiapoque – AM, on September 2014. On the same month, autochthonous cases were also confirmed in Feira de Santana - BA. By February 2016, 26.952 cases were reported in 14 Brazilian states. The patient's disability during CHIKV infection is a serious public health problem, which can economically affect the country's health system.

**OBJECTIVE** The aim of this study is to evaluate clinical, epidemiological and laboratory aspects of Chikungunya virus infection in Feira de Santana, BA. The samples obtained in this study will also be used for the assembly of serological panels for validation of diagnostic tests that are being developed in Bio-Manguinhos.

**METHODOLOGY** Serial samples from patients with clinical symptoms of CHIKV infection, spanning an observation period of six months, are being analyzed. All patients filled out a detailed questionnaire in order to collect epidemiological data. Serum samples are being tested for IgM and IgG antibodies against CHIKV and Dengue virus, using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) employing recombinant antigens. They are also being tested for the presence of Chikungunya, Dengue and Zika virus RNA, by a real time RT-PCR.

**RESULTS** Until now, 188 patients with clinical symptoms of CHIKV infection were enrolled in this study. A total of 575 samples were obtained. So far, 116 serum

118





samples obtained from the first visit to Feira de Santana, have been tested for IgM anti-CHIKV, 58 were positive (50%). One hundred and thirty five samples were tested by real time RT-PCR for the presence of CHIKV and Dengue RNA, 47 were positive (34.2%) for CHIKV. None of the samples were positive for Dengue virus RNA. Twenty nine samples suspect of Zika virus infection were tested by real time RT-PCR, six were positive (21.7%). The initial analysis of the questionnaires has shown cases of chronic joint pain in a high number of patients infected with CHIKV.

**CONCLUSION** We are still working on samples characterization and data analyzes, however, the initial data showed a high frequency of CHIKV infection in the studied population, as well as Zika virus circulation. With our results we expect to obtain a well-characterized panel of positive samples for CHIKV and also Zika virus that can be used by Biomanguinhos for validation of serological tests.

**KEYWORDS** Chikungunya virus, epidemiology, Feira de Santana.





## RI I. A LUMINEX-BASED SINGLE DNA FRAGMENT AMPLIFICATION ASSAY AS A PRACTICAL TOOL FOR DETECTING AND SEROTYPING DENGUE VIRUS.

Mauro Jorge Cabral Castro<sup>1</sup>; Regina Helena Saramago Peralta<sup>2</sup>; Marta Guimarães Cavalcanti<sup>1</sup>; Marzia Puccioni-Sohler<sup>1</sup>; Valéria Lima Carvalho<sup>3</sup>; Pedro Fernando da Costa Vasconcelos<sup>3</sup>; José Mauro Peralta<sup>1</sup>.

1 UFRJ;

2 UFF;

3 IEC / PA.

**INTRODUCTION** Dengue is a mosquito-borne virus which may evolve from subclinical to severe forms of disease. Early recognition, during initial primary and secondary infections, correlates with reduced case-fatality rate in susceptible groups.

**OBJECTIVE** The aim of this study was to standardize a DNA hybridization assay using the Luminex system for detecting and serotyping of dengue virus (DENV).

**METHODOLOGY** Reference DENV of all four serotypes recognized to date was used as positive controls to standardize the methodology. Additionally, a total of 16 blinded DENV isolates were used to evaluate the reproducibility of the assay. The viral isolates were kindly provided by the WHO / PAHO Reference Center for Arbovirus Reference and Research at the Department of Arbovirology and Hemorrhagic Fevers, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua (PA), Brazil. Human whole blood samples were obtained from patients clinically suspected of having dengue fever at the University Hospital Clementino Fraga Filho/ Federal University of Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ), Brazil. All samples were tested in accordance with protocols approved by ethics in research committee of the HUCFF/UFRJ. Twentyfour DNA sequences DENV deposited in GenBank were analyzed for primers and probes design. After alignment, a fragment of approximately 159 bp was selected to design the primers and five probes. Among the five probes, four are serotype specific and one is common to all DENV serotypes. The reverse primer was biotinylated at the 5' end, and the probes were synthesized with a 5' end amino-modified group and linked to a 12-carbon linker. Viral RNA was extracted from 250 µL of cell culture supernatant or human whole blood samples, according to the manufacturer's recommendations. The coupling procedure was performed with capture probes amine-modified at the 5' end and

120







magnetic carboxylated microspheres (MagPlex® microspheres, Luminex Corp) using a covalent protocol described by the manufacturer. Complementary 5' biotinlabeled PCR amplicons were hybridized with the serotypespecific magnetic microsphere - capture probes. The assay was performed in a 96-conical well plate. Human whole blood samples were used to evaluate the methodology after a validating step comparing with the reference standard seminested RT-PCR.

**RESULTS** Using established conditions, the Luminex assay was able to correctly identify all 16 DENV isolates. In the evaluating step we obtained 86.7% of comparison with Semi-nested RTPCR. This is the first description wherein specific probes for each DENV serotype were defined from a single DENV DNA sequence and used in hybridization assays.

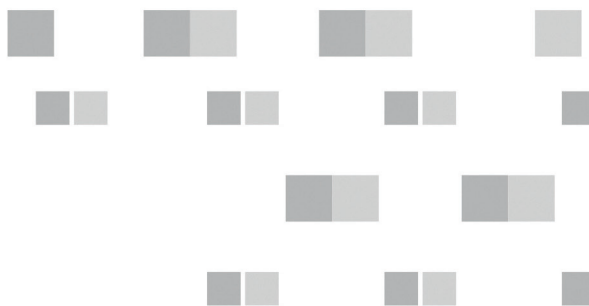
**CONCLUSION** The RT-PCR / Luminex system designed in this study proved to be an additional tool for early and faster detection and serotyping of the DENV. New optimization and validation of the RT-PCR/Luminex system will be produced to broaden the application of this methodology as an aid for the differential diagnosis between arboviruses such as DENV, Zika virus and Chikungunya virus

**KEYWORDS** Dengue virus, molecular diagnosis, RTPCR / Luminex system.





# GESTÃO





## GI. ANÁLISE SOBRE PERDAS DE VACINAS E SOROS NO ESTADO DO CEARÁ – 2014 / 2015.

Ana Débora Assis Moura<sup>1</sup>; Ana Karine Borges Carneiro<sup>1</sup>; Ana Vilma Leite Braga<sup>1</sup>; Elaine Cristina da Silva Alves Bastos<sup>1</sup>; Francisco Tarcísio Seabra Filho<sup>1</sup>; Surama Valena Elarrat Canto<sup>1</sup>; Teresa Wilma Silva Figueiredo<sup>1</sup>.

1 Secretaria da Saúde do Estado do Ceará.

**INTRODUÇÃO** As vacinas e soros são produtos termosensíveis, isto é, são sensíveis a alterações de temperatura. Quando esses produtos sofrem alterações bruscas de temperatura e/ou acompanhadas de um tempo de exposição prolongado, deverão ser descartados. Não poderão mais ser utilizados pela população, pois não terão mais o efeito protetor de imunizar.

**OBJETIVO** Descrever as principais causas de perdas das vacinas e soros no estado do Ceará; e quanto, em custos, essas perdas acarretaram para o Ministério da Saúde do Brasil.

**METODOLOGIA** Estudo do tipo descritivo, em que foram analisados 136 relatórios de vacinas sob suspeita dos municípios nos anos de 2014 (77) e até julho de 2015 (59). Esses relatórios encontravam-se arquivados na coordenação de imunizações da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará. Destes 136, apenas as vacinas e soros de 31 municípios receberam o parecer de reutilização, enquanto 105 municípios receberam o parecer de descarte, sendo essa a amostra do estudo. A coleta de dados ocorreu no período de abril a agosto de 2015.

**RESULTADOS** Verificou-se que, dos 105 municípios, 18 (17,1%) pertenciam à 13ª Coordenadoria Regional de Saúde (CRES); 15 (14,2%) à 15ª CRES; 13 (12,3%) à 1ª CRES; 10 (9,5%) à 2ª CRES; 8 (7,6%) à 6ª e 10ª CRES; 7 (6,6%) à 16ª CRES; 6 (5,7%) à 9ª CRES; 5 (4,7%) à 8ª CRES; 4 (3,8%) à 3ª CRES; 2 (1,9%) à 4ª, 5ª, 8ª, 12ª e 18ª CRES (cada); e por fim, apenas um (0,9%) à 20ª CRES. As causas das perdas referidas foram: em 59 (56,9%) municípios, por queda/falta de energia elétrica; em 11 (10,7%), problemas relacionados com o equipamento (refrigerador); em 8 (7,6%) ocorreram por esquecimento das vacinas nas caixas térmicas, sem o devido armazenamento; em outros 8 (7,6%), por desligamento do interruptor da energia geral da Unidade Básica de Saúde; em 7 (7,5%), o profissional da sala de vacinas deixou a porta

124





da geladeira aberta; em 5 (6,1%), ocorreu o desligamento do interruptor da geladeira da tomada elétrica; em um município (1,5%), ocorreu o esquecimento das vacinas no carro que as transportava; e em outro (1,5%), não constavam no relatório as devidas informações. Essas perdas acarretaram para o Ministério da Saúde um prejuízo de R\$ 415.187,10 no ano de 2014 e R\$ 352.357,94, até julho de 2015, totalizando um valor de R\$ 767.545,05 em vacinas e soros.

**CONCLUSÃO** As causas de perda de vacinas e soros poderiam ser, na maioria das vezes, evitadas, se os profissionais responsáveis tivessem os devidos cuidados e parcerias adequadas na prevenção desses acidentes; e por fim, que os custos dessas perdas são muito altos quando pensamos no número de pessoas que poderiam ser imunizadas com esse montante de vacinas e soros perdidos.

**PALAVRAS-CHAVE** vacinas, soros, perdas.





## G2. ANÁLISE FARMACOECONÔMICA DAS APRESENTAÇÕES DE SOMATROPINA.

Wenderson Walla Andrade<sup>1</sup>; Luis Fernando Duarte de Carvalho<sup>2</sup>; Thuane Sales Gonçalves<sup>3</sup>.

- 1 Fundação Ezequiel Dias;
- 2 Instituto de Pós-Graduação de Goiás (IPOG);
- 3 Universidade Federal de Minas Gerais.

**INTRODUÇÃO** A somatropina é a forma biossintética do GH, e faz parte do Componente Especializado da Assistência Farmacêutica (CESAF) desde 2002, nas apresentações de 4UI e 12UI. Atualmente, sete laboratórios farmacêuticos privados têm registro da Somatropina na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo que três dispõem de apresentações que estão disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS).

**OBJETIVO** O objetivo deste estudo é verificar se as apresentações de somatropina disponibilizadas no SUS são mais econômicas do que as apresentações de 16UI e 36UI, que serão disponibilizadas pelos Laboratórios Farmacêuticos Públicos Biomanguinhos / Fiocruz e a Fundação Ezequiel Dias – Funed em suas Parceiras para o Desenvolvimento Produtivo (PDP).

**METODOLOGIA** Foi realizada a análise do banco de dados das Autorizações de Procedimento de Alta Complexidade (APAC), no período de 2003 a 2014, de todas as Secretarias Estaduais de Saúde. Os dados foram coletados no site do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde – DATASUS.

**RESULTADOS** Verificou-se que as apresentações 16UI e 36UI são economicamente mais interessantes para o SUS, do que as atualmente disponíveis, de 4UI e 12UI. A demanda de somatropina, em UI, teve um comportamento irregular no período de 2004 a 2014 (tabela 1), sendo que até o ano de 2012 a demanda aumentou de maneira não uniforme, tendo um crescimento médio maior do que 10% até 2011, ano de 2013 observa-se um pequeno decréscimo de 12,24% e em 2014 um grande aumento (62,71%).

**CONCLUSÃO** Com base nos dados analisados, caso o Ministério da Saúde





(MS) adquira nos próximos 10 anos as apresentações 4UI e 12UI terá um gasto 6,7 vezes maior do que se fossem adquiridas as apresentações 16UI e 36UI, correspondendo a um gasto de R\$ 402,1 milhões, considerando os valores da APAC (tabela 2). Essa troca também teria impacto no número de ampolas desperdiçadas, uma vez que as apresentações de 4UI e 12UI apresentam 6,12 vezes mais desperdício do que as de 16UI e 36UI (tabela 3). Conclui-se, que o MS deve rever as apresentações de somatropina disponíveis no SUS para uma melhor gestão dos recursos financeiros e sustentabilidade do CESA, gerando possibilidade de ampliação do elenco de medicamentos, realização de capacitação e outras atividades importantes relativas à Assistência Farmacêutica.

**PALAVRAS-CHAVE** somatropina, farmacoeconomia, saúde pública, assistência farmacêutica.





### **G3. PROPOSTA DE UM MÉTODO DE VALIDAÇÃO DE ESTERILIZAÇÃO DOS REATORES DE PRODUÇÃO DE IMUNOBIOLOGICOS.**

Camila Braz Pereira da Costa<sup>1</sup>.

1 Instituto Vital Brazil.

**INTRODUÇÃO** O Instituto Vital Brazil (IVB) é produtor de sete tipos de Soros Hiperimunes: antibotrópico, anticrotálico, antibotrópico-crotálico, antibotrópico-laquétrico, antitetânico, antiescorpiônico, antirrábico, para atender às necessidades do Ministério da Saúde. O soro hiperimune é uma solução de imunoglobulina estéril e injetável, portanto, todo material ou equipamento em contato com o soro deve ser esterilizado. Para garantir a qualidade do produto e segurança do paciente, um dos métodos de esterilização mais utilizados na indústria farmacêutica é a esterilização por calor úmido, com o uso de vapor (grau farmacêutico), que destrói microorganismos, por coagulação e desnaturação irreversíveis de suas enzimas e proteínas estruturais.

**OBJETIVO** Propor um método de validação de esterilização para os reatores de produção de imunobiológicos do IVB.

**METODOLOGIA** Trata-se de um estudo experimental, realizado no período de março a abril de 2015 no departamento de produção de Soros Hiperimunes do IVB. Foi elaborado um protocolo de validação do método, que foi composto de duas etapas onde 9 reatores de produção foram divididos em 3 grupos de acordo com a sua capacidade produtiva. Foi definido que para os reatores de mesmo volume seriam feitos 3 ciclos no primeiro e 1 ciclo nos demais, assegurando a eficácia do processo em cada equipamento em particular. Na primeira etapa foi realizada a passagem do vapor fluente no interior do reator, durante 10 minutos. Na segunda etapa fechou-se a válvula de saída, permitindo a pressurização do reator (pressão superior a 1,1 Kgf/cm<sup>2</sup>). Para verificar a uniformidade da esterilização, foram utilizados três bioindicadores, *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 7953), em diferentes pontos. Após a etapa de esterilização, os bioindicadores foram retirados e incubados em estufa a uma temperatura de 56 °C ± 2 °C (48 horas). A validação do método de esterilização seria aprovada se todos os ciclos de esterilização apresentassem resultados satisfatórios.

**RESULTADOS** Todos os bioindicadores incubados apresentaram resultados







satisfatórios. Na primeira etapa foi observado que os 10 minutos de vapor fluente foram capazes de eliminar todo o ar frio residual, no interior do reator, o qual impediu a formação de bolsões de ar, garantindo que toda a superfície interna do reator fosse esterilizada. Durante a segunda etapa, a pressurização do vapor permitiu o alcance da temperatura min. de 121° C, por 15 minutos, esta etapa foi significativa para a “virada” dos bioindicadores.

**CONCLUSÃO** O método proposto foi eficaz e demonstrou reprodutibilidade para o processo de esterilização. O Sistema da Qualidade do IVB aprovou e incluiu o método no Plano Mestre de Validação. Atualmente o método faz parte da rotina de trabalho do departamento de produção de Soros Hiperimunes.

**PALAVRAS-CHAVE** validação, esterilização, soros hiperimunes.





## G4. INTEGRATING QUALITY BY DESIGN INSIDE QUALITY MANAGEMENT TECHNOLOGY TRANSFER PROJECTS IN BIOPHARMACEUTICAL INDUSTRY.

---

Alexander da Silva Neves<sup>1</sup>; Elezer Monte Blanco Lemes<sup>1</sup>.

1 Bio- Manguinhos / Fiocruz.

---

**INTRODUCTION** The Project Quality Management seeks to ensure that a project meets the customer's needs and involves all project activities during its life cycle. However, in technology transfer projects within the biopharmaceutical industry, the quality can not be measured only by the final product. Even if the product meets specifications, the absorption of knowledge and process parameters originated from scientific nature shall be documented and transferred to the technology absorber, so that it can internalize the activities in their routine production. With the creation of the International Conference on Harmonization - ICH 1990, it became possible to establish a guideline to the study of factors affecting the safety, quality, effectiveness and multidisciplinary of products in manufacturing processes as critical attributes. One of the regulatory practices that have been implemented is the Quality by Design (QbD) where, through a systematic approach to development, is emphasized the science and the risk management of quality, to ensure that the quality of a product is built in production processes from the beginning, rather than to be tested only at the end.

**OBJECTIVE** This paper aims to describe the use of QbD in quality management of a technology transfer project for a biopharmaceutical product, in order to minimize risks to the construction of product quality during the project execution.

**METHODOLOGY** The methodology is based on a case study, with the data collection source document research in reference guides and international laws, in which the main steps are mapped for the implementation of the QbD guidelines. After mapping the critical steps, Quality Target Product Profile (QTTP), Critical Quality Attributes (CQA) and Design Space will be outlined for the product, in the project quality management.

**RESULTS** The use of QbD steps will enable the knowledge of variables and process critical parameters, design space and comparability between processes involving





companies in technology transfer. With this, throughout the project it will be possible to see gaps that may influence negatively in the management of the product life cycle in each project phase.

**CONCLUSION** The application of the QbD tool will allow the formation of a model with scientific principles in the quality management of a biopharmaceutical technology transfer project that will assist in the construction of the QTTP during the phases of the project. With this, the expectation is to provide a more efficient construction of quality, facilitating compliance with regulatory requirements, reducing thus risk of delays and rework during project execution.

**KEYWORDS** project management, QbD, risk management, technology transfer.





## **G5. MONITORAMENTO RÁPIDO DE COBERTURAS VACINAIS (MRC): UMA ESTRATÉGIA DE SUPERVISÃO E INTERVENÇÃO NO ESTADO DO CEARÁ.**

Elaine Cristina da Silva Alves Bastos<sup>1</sup>; Ana Débora Assis Moura<sup>1</sup>; Ana Karine Borges Carneiro<sup>1</sup>; Ana Vilma Leite Braga<sup>1</sup>; Maria Júlia Araújo Borges<sup>1</sup>; Surama Valena Elarrat Canto<sup>1</sup>; Teresa Wilma Silva Figueiredo<sup>1</sup>.

1 Secretaria da Saúde do Estado do Ceará.

**INTRODUÇÃO** O monitoramento rápido de coberturas vacinais (MRC) é uma estratégia de rotina utilizada em diversos países das Américas, de acordo com a recomendação da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS). É um método útil para a avaliação da situação vacinal local, e seus resultados devem ser utilizados para redefinir as ações de vacinação, contribuindo para a melhoria das coberturas vacinais e sua homogeneidade.

**OBJETIVO** Descrever os motivos de não vacinação das crianças no MRC da vacinação contra sarampo, no ano 2015, informado pelas mães.

**METODOLOGIA** Estudo do tipo descritivo, em que foram analisadas 52.216 cadernetas de vacinação de crianças na faixa etária de 6 meses a menores de 5 anos de idade, residentes no estado do Ceará. O MRC da vacina contra sarampo (tríplice e tetra viral) ocorreu no ano de 2015, após a campanha nacional de vacinação contra sarampo e poliomielite, realizada em 2014. A coleta de dados ocorreu no primeiro semestre de 2015, através do sistema de informação do Programa Nacional de Imunizações (SI-PNI).

**RESULTADOS** Verificou-se um número de 836 crianças não vacinadas contra sarampo. Para cada criança poderia ser elencado mais de um motivo de não vacinação. Portanto, os motivos foram num total de 1.388 (100%), dentre eles: 2 (0,1%) evento adverso em dose anterior; 6 (0,4%) contra indicação médica; 7 (0,5%) posto de vacinação fechado; 13 (1%) recusa da vacina; 16 (1,2%) perdeu/sem comprovante vacinal; 24 (1,7%) várias injeções ao mesmo tempo; 36 (2,6%) dificuldade de ir ao posto de vacinação (acesso); 110 (7,9%) não estava agendada; 135 (9,7%) faltou vacina; 219 (15,8%) falta de tempo; 820 (59,1%) outros motivos. Percebeu-se um grande número





de crianças não vacinadas no estado do Ceará, ocasionando um bolsão de susceptíveis. Os motivos foram bem variados, podendo-se destacar a dificuldade de acesso dos usuários aos locais de vacinação; falhas relacionadas à gestão das salas de vacinação, como a falta de agendamento da vacina, que é fundamental para a orientação dos responsáveis, a garantia do estoque do imunobiológico, já que o mesmo não passou por nenhum momento de desabastecimento no país, bem como a falta de flexibilidade nos horários de funcionamento das Unidades de Saúde. Observou-se um número considerável de outros motivos, não sendo possível descrevê-los, já que a fonte de dados não fornece essa informação, tornando-se um fator dificultador de análise desses dados.

**CONCLUSÃO** Sugere-se correção dessa falha em futuros monitoramentos, e que a análise desses dados possa ser realizada por cada Unidade Básica de Saúde, para que sejam implementadas intervenções no sentido de minimizar os fatores contribuintes para a não vacinação das crianças no estado do Ceará.

**PALAVRAS-CHAVE** monitoramento, coberturas vacinais, imunobiológico.





## **G6. RISK ASSESSMENT: PROSPECTIVE APPROACH ON INTEGRITY INSPECTION LINE OF AN ORAL VACCINE'S PRIMARY PACKAGE.**

---

André Vinícius Costa Ribeiro<sup>1</sup>; Miguel Angel de la O Herrera<sup>1</sup>; Elezer Monte Blanco Lemes<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

---

**INTRODUCTION** Good Manufacturing Practices (GMP) establish the norms, procedures and obligations, which must be met by companies and manufacturers of biological supplies. Their main goal is the risk reduction associated to manufacturing. The processes validation is based on the documented evidence, in which a system performs pre-established processes, following normative specifications and attributes of quality, reducing loss, with less incidences of deviation, creating solid bases for the programs of risk assessment.

**OBJECTIVE** This paper proposes through a case study the risk assessment in a process of integrity inspection line of an oral vaccine's primary package, reaching consistent data for elaboration of a prospective validation.

**METHODOLOGY** This study was conducted to perform the risk evaluation in an oral vaccine's primary package inspection process in two stages. The first stage evaluated risks of two equipments comprising the line of inspection using the HAZOP tool to identify the operability of the equipment risks, and to propose actions to minimize potential risks. The second stage used the FMEA tool to identify failure modes and the respective causes and effects of the environmental conditions in process areas, resulting in action proposals and mitigation measurements.

**RESULTS** Through the HAZOP approach it was possible to identify 39 deviations in both equipments for inspection of integrity. Risks were classified as 28.21% acceptable; 53.85% non-acceptable; 2.56% critical and 15.38% unacceptable. FMEA's analysis listed 22 failure modes associated to the generation and maintenance of environmental conditionssystem, being 22.73% classified as tolerable and 77.27% as negligible.





**CONCLUSION** The risk evaluation by the HAZOP and FMEA analysis allowed the prospective identification of the associated risks to the inspection process of package integrity of an oral vaccine, assuring improvement actions and other measures to risk mitigation. A new evaluation might be necessary in the future, when the inspection line will be in operation.

**KEYWORDS** risk assessment, FMEA, HAZOP, integrity inspection.





## **G7. CURRENT CHALLENGE IN PHARMACOVIGILANCE AT BIO-MANGUINHOS / FIOCRUZ: DETECTION OF DRUGRELATED PROBLEMS IN SOCIAL MEDIA.**

Paulo Roberto Gomes dos Santos<sup>1</sup>; Patricia Mouta Nunes de Oliveira<sup>1</sup>; Beatriz Kaippert<sup>1</sup>; Gabriella Paredes da Ponte Gomes<sup>2</sup>; Adriana dos Santos Duarte<sup>3</sup>; Monique Amorim Pimenta<sup>3</sup>; Alessandra Bogio<sup>3</sup>; Maria de Lourdes de Sousa Maia<sup>1</sup>; Renata Ribeiro Gómez de Sousa<sup>2</sup>; Linda Khalili Boukai<sup>4</sup>.

- 1 Asclin / Bio-Manguinhos;
- 2 Ascom / Bio-Manguinhos;
- 3 Diacm / Bio-Manguinhos;
- 4 Diacm / Derem / Bio-Manguinhos.

**INTRODUCTION** Bio-Manguinhos / Fiocruz has been leading original and follow-on biologics joint development and technology transfer processes in order to attend the increasing demand of the Ministry of Health. Alongside this, new challenges have arisen: the establishment of new regulatory standards for pharmacovigilance due to the concern regarding risk-benefit ratio of biologics and the increasing range of social media that can be used to disseminate unreliable information that can jeopardize health programs. Pharmacovigilance is defined as the science and activities relating to detection, assessment, understanding and prevention of adverse effects or any other drug-related problem.

**OBJECTIVE** To evaluate the current detection methods and new approaches to optimize the efficacy and safety assessment system, envisioning debates and partnerships for the development of optimized pharmacovigilance activities.

**METHODOLOGY** A situational analysis of pharmacovigilance activities at Bio-Manguinhos / Fiocruz has been developed. Brazilian regulatory agency (Anvisa) and International Conference on Harmonization (ICH) present regulations, partner industries safety data exchange agreements, besides World Health Organization (WHO) guidelines, and Council for International Organizations of Medical Sciences (Cioms) and International Society of Pharmacovigilance (ISoP) recommendations have been accounted. A systematic collection and evaluation of data, aimed at identification of forces that may influence performance and choice of strategies, and assessment of current and future strengths, weaknesses, opportunities, and threats has







been performed and compiled into a matrix.

**RESULTS** It was found that regulatory authorities, health agencies and scientific organizations are increasingly recognizing the importance of spontaneous reports from persons other than healthcare professionals, and the necessity of social media screening for drug-related-problem monitoring. Voluntary reporting is one of the most versatile pharmacovigilance methods, because, among other advantages, it covers the entire population as well as all drugs throughout their commercial life, being also a process that provides the highest volume of information with relatively lower maintenance cost. The guidelines on good pharmacovigilance practices indicate that marketing authorization holders should regularly screen social media such as websites, Facebook, and Twitter profiles under their responsibility for potential reports of suspected adverse drug reactions, which may characterize a new safety signal, in addition to product complaints, pregnancy and lactation exposures, and unexpected benefits. In order to be in compliance, the Clinical Advisory Unit at Bio-Manguinhos has implemented strategies, including total staff awareness, related organizational units training sessions, pharmacovigilance link creation, and an ever stronger partnership with Communication Advisory, Consumer Care Service and Human Resources teams to support those activities.

**CONCLUSION** Breaking out of paradigm and investing in innovative pharmacovigilance approaches is essential in face of current regulatory requirements and public opinion about biopharmaceuticals and vaccines. Proactivity in the detection of drug-related problems followed by rapid response certainly can interrupt rumors and raise confidence on public pharmaceutical industry, and also in governmental health programs that have been consolidated over decades.

**KEYWORDS** drug-related problems, pharmacovigilance, social media.





## **G8. AVALIAÇÃO DE IMPACTOS DE SISTEMAS, COMPONENTES (AIS / AIC) E DE RISCOS À QUALIDADE (ARQ) DA LINHA DE EMBALAGEM SECUNDÁRIA DE VACINA.**

Artur Boechat Andrade<sup>1</sup>; Marília Vaz Belart<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUÇÃO** A indústria farmacêutica é pautada pelas Boas Práticas de Fabricação (BPF), que tem como objetivo minimizar os riscos inerentes à manufatura de seus produtos. Desta forma, técnicas de avaliar e gerenciar os riscos são assimiladas ao Sistema da Qualidade e trazem benefícios tais como a redução de riscos e o desenvolvimento de conceitos que vão além da interpretação de BPF. A Avaliação de Riscos à Qualidade (ARQ) auxilia na compreensão das fontes potenciais de danos, que afetam o produto e embasam as tomadas de decisões.

**OBJETIVO** Este trabalho teve como objetivo identificar a Lista de Requerimentos Críticos do Processo (LRCP), realizar a Avaliação de Impactos de Sistemas e Componentes (AIS / AIC), que a linha oferece à qualidade do produto, identificar Componentes Críticos (CC), direcionar a qualificação e a aplicação da ferramenta de análise dos modos de falha e efeitos (FMEA), para Avaliação de Riscos.

**METODOLOGIA** A avaliação foi prospectiva e integrou o exemplo específico da linha de embalagem secundária da vacina rotavírus. A linha foi dividida em cinco sistemas, de diferentes funções, para facilitar o estudo. Através de reunião com especialistas, foi definida a LRCP, que incluiu os Atributos Críticos de Qualidade, os Requerimentos do Processo e os Parâmetros Críticos de Processo. Na AIS, cada uma destas máquinas foi objeto de um questionário com nove perguntas e qualificadas em Impacto Direto (ID), Impacto Indireto (II) ou Sem Impacto (SI). Os sistemas com avaliação de ID foram decompostos em seus componentes e sofreram uma Avaliação de Impactos de Componentes (AIC), através de um questionário de sete perguntas. Esta avaliação segregou dois grupos: CC e Componentes Não-Críticos (CNC). A identificação dos CC direcionou a ARQ, onde se aplicou a FMEA.

**RESULTADOS** A LRCP foi produzida, o que permitiu a identificação de três sistemas de ID e dois II. Este resultado permitiu a redução de cinco para três siste-





mas avaliados. Os CC com mais perguntas positivas apontaram para a maior criticidade aos sistemas, demonstrando a importância do componente no objetivo do sistema à qualidade do produto. A AIS / AIC direcionou a ARQ / FMEA eliminando 31%, 42% e 61% dos CNC avaliados nos três sistemas de ID. Foram propostas ações para redução dos riscos avaliados.

**CONCLUSÃO** A AIS / AIC demonstrou excelente aplicação na otimização do processo de ARQ, que pode ser utilizada na definição das abordagens de qualificação. Os sistemas de ID apontaram os CC com características de criação ou preservação da qualidade do produto. As ferramentas AIS / AIC forneceram ótimos subsídios para a FMEA. A ARQ foi capaz de identificar dados dos riscos à qualidade referentes a modos de falha, efeitos, causas, controles existentes e obteve diversas propostas para a melhoria destes. O trabalho contribuiu para a melhoria dos processos e documentação técnica da linha em questão.

**PALAVRAS-CHAVE** gerenciamento de riscos, FMEA, avaliação de impactos, riscos à qualidade.





## G9. ATUAÇÃO DA COMUNIDADE DE PRÁTICAS DE NANO-TECNOLOGIA (CoP-NANO) EM BIO-MANGUINHOS.

Ana Emília Goulart Lemos<sup>1</sup>; Hugo Garcia Tonioli Defendi<sup>1</sup>; Cristine Maria de Lima Andrade<sup>1</sup>; Denise Pereira<sup>1</sup>; Ana Paula Diniz Ano Bom<sup>1</sup>; Gisele Correa Miranda<sup>1</sup>; Ana Paula da Silva Carvalho<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** O rápido avanço tecnológico em nanotecnologia e sua crescente relevância para o desenvolvimento de produtos para a saúde pode gerar grandes benefícios para a sociedade. Sendo a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) uma instituição estratégica para o Ministério da Saúde (MS), faz-se necessária sua atuação nesta vertente de inovação no Brasil. Como forma de atualizar a comunidade científica de Bio-Manguinhos sobre as novidades e potencialidades de diversos sistemas, processos e produtos na escala nanométrica relacionados à saúde, a Comunidade de Práticas de Nanotecnologia (CoP-Nano) foi reformulada em 2015.

**OBJETIVO** A reformulação da CoP-Nano visa:

1. fomentar a discussão sobre tendências tecnológicas em nanotecnologia;
2. estimular a capacitação de recursos humanos (RH) na área;
3. contribuir para o estabelecimento da regulamentação em nanobiotecnologia no Brasil.

**METODOLOGIA** Para alcançar os objetivos propostos, foi formada uma equipe multidisciplinar em Bio-Manguinhos composta por cinco colaboradores com experiências e conhecimentos diversificados e complementares necessários para atuar na área. Esta equipe se reuniu para gerar um modelo forte e sustentável de busca, absorção, discussão e geração de informações nesta área na unidade, utilizando a ferramenta de Comunidades de Práticas (CoP); participou e representou Bio-Manguinhos em grupos especializados de discussão e de trabalho, listas de e-mails e comitês; mapeou os principais grupos de conhecimentos e de pesquisa, unidades e projetos em nanotecnologia da Fiocruz através de buscas por artigos e revistas científicas no pubmed, documentos da ABDI, ABIFINA, FioNano e de diversos outros comitês e, resultados de editais do

140





Programa de Pesquisa Translacional FioNano.

**RESULTADOS** A equipe multidisciplinar que compõe o núcleo central da CoP-Nano listou grupos de conhecimentos com temas relevantes em nanotecnologia e mapeou as unidades da instituição onde estão lotados os principais grupos de pesquisa da Fiocruz que apresentam competência tecnológica na área. Além disso, o núcleo central da CoPNano iniciou participação na revisão de documentos da Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial através do Comitê de Nanotecnologia da ABIFINA.

**CONCLUSÃO** A CoP-Nano vem consolidando sua atuação por meio dos primeiros resultados obtidos durante sua reformulação. A identificação de temas relevantes em nanobiotecnologia, o mapeamento de grupos de pesquisa e unidades da Fiocruz que atuam neste campo está possibilitando a geração de ambiente rico em conhecimento e de grande utilidade para a capacitação de colaboradores de Bio-Manguinhos, já que permitirá importante interação com grandes especialistas da área. No futuro próximo, tal ação impactará positivamente na atuação de Bio-Manguinhos/Fiocruz no atendimento às demandas do MS em relação aos serviços, insumos, produtos e processos inovadores da escala nanométrica com aplicação na área da saúde. Vale ressaltar que a participação do núcleo central em reuniões de comitês e fóruns na área vem permitindo a inserção da instituição no contexto de estruturação do marco regulatório nacional em nanobiotecnologia.

**PALAVRAS-CHAVE** Comunidade de Prática de Nanotecnologia (CoP-Nano), nanotecnologia, inovação.





## **G10.AVALIAÇÃO DOS RISCOS ASSOCIADOS ÀS ETAPAS PREDECESSORAS EM UM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE INJETÁVEIS.**

Priscila Ramos Coimbra Martins<sup>1</sup>; Erica Louro da Fonseca<sup>1</sup>; Elezer Monte Blanco Lemes<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUÇÃO** A fabricação de qualquer substância biológica deve atender aos requisitos de Boas Práticas de Fabricação, conforme RDC N° 17/2010 (ANVISA). São medidas que asseguram que os produtos sejam consistentemente produzidos e controlados, com padrões de qualidade apropriados para o uso pretendido e requerido pelo registro. Para produtos injetáveis, a área produtiva deve possuir controle ambiental definido em termos de introdução, geração e retenção de partículas viáveis e não viáveis. Esta área é projetada, qualificada e operada de acordo com critérios rígidos de BPF, incluindo fluxos de pessoal e material, sistemas de tratamento de ar, utilidades, e qualificações de operadores. Os operadores constituem uma das principais fontes de contaminação, porém, materiais de processo, equipamentos e os próprios procedimentos podem propiciar a entrada de contaminantes. Entretanto, questões relacionadas às etapas predecessoras à produção, como os sistemas de tratamento de ar e de geração de utilidades, também devem ser consideradas como prováveis fontes de contaminação.

**OBJETIVO** Realizar uma avaliação dos riscos associados às etapas predecessoras a uma produção de injetáveis, visando à redução ou eliminação de contaminações microbiológicas no monitoramento ambiental e promovendo o ciclo de melhoria contínua.

**METODOLOGIA** Neste estudo foram coletados dados dos desvios microbiológicos de monitoramentos ambientais de uma área de produção de injetáveis e dados de análises diárias das utilidades realizadas nesta área (PW, WFI e vapor puro) de março/2011 a março/2013. De posse desses dados e juntamente com o uso complementar das ferramentas de análise de risco PHA e FMEA, este trabalho analisou os perigos, e suas respectivas causas e efeitos/danos, associados às etapas predecessoras ao processo, que podem contribuir para os desvios microbiológicos.

**RESULTADOS** Na análise de risco foram identificados 46 perigos e 101





possíveis efeitos, sendo 49 (48,5%) associados a risco alto. A combinação das ferramentas de análise de riscos PHA e FMEA permitiu que os 49 perigos associados a alto risco, indicados como modo de falhas, fossem estudados com maior profundidade, sendo indicadas propostas de melhorias que podem ser utilizadas para mitigação de contaminações microbiológicas, promovendo a melhoria contínua. A etapa de sistema de tratamento de ar foi considerada a mais crítica, pois apresenta diversos fatores que podem favorecer a entrada e proliferação de microorganismos nas áreas limpas. Nas análises microbiológicas foram observadas 33 espécies bacterianas com fontes de isolamento distintas, dentre elas: microbiota humana, solo e água. Sendo assim, é indicado cuidado redobrado no cumprimento de Boas Práticas de Fabricação para obtenção de um produto final com qualidade, eficácia e segurança garantidas.

**CONCLUSÃO** A utilização das ferramentas PHA e FMEA de forma complementar foi bastante adequada, sendo indicadas medidas de ação que podem ser utilizadas como um instrumental para a mitigação de contaminações, especialmente no contexto produtivo, onde existem informações disponíveis e dados históricos.

**PALAVRAS-CHAVE** injetável, PHA, FMEA, risco.





## **G II. GESTÃO E MODELAGEM DE PROCESSOS OPERACIONAIS: ALINHANDO A ASSESSORIA CLÍNICA AO NOVO MODELO INSTITUCIONAL.**

Rafael de Marchi<sup>1</sup>; Renata Silveira Thomazini de Oliveira<sup>1</sup>; Dayana Cristina Vieira de Souza<sup>1</sup>; Maria Letícia Borges dos Santos<sup>1</sup>; Francisco Elton Ribeiro<sup>1</sup>; Maria de Lourdes de Sousa Maia<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUÇÃO** A Assessoria Clínica (ASCLIN) é formada por profissionais especialistas em gestão e saúde que compõem: a Plataforma de Pesquisa Clínica, que provê gestão e suporte para ensaios clínicos, o suporte médico-científico, e farmacovigilância e tecnovigilância em atendimento à demanda de Bio-Manguinhos. Este projeto foi idealizado e alinhado à estratégia do novo modelo institucional, do crescimento do portfólio, visando atender às necessidades de saúde pública do país com produtividade, excelência e qualidade no serviço prestado.

**OBJETIVO** Reestruturar atividades por processos, promovendo a visão sistêmica, reduzindo riscos e adequando recursos, com foco em qualidade e melhoria contínua.

**METODOLOGIA** Na primeira fase do projeto, em parceria com o Escritório de Processos (ESPRO), foram realizados encontros entre os responsáveis de área onde se registraram os processos executados na ASCLIN. A partir desses encontros, as atividades desenvolvidas foram mapeadas em fluxogramas (situação atual), permitindo a visualização e melhor compreensão pelo grupo. Este trabalho em conjunto, visou maior integração da equipe e alinhamento dos processos entre as áreas. Na fase seguinte, a partir dos fluxos padronizados, foi possível identificar os gargalos, riscos e oportunidades de melhoria nos processos de trabalho, promover a reorganização da equipe, visando maior eficiência nas respostas às demandas, e alinhando os principais pontos de interface entre Unidades Organizacionais (UOs). Em continuidade à modelagem de processos, foram criadas frentes de trabalho, compostas pela própria equipe da ASCLIN, para desenvolvimento e aprimoramento dos temas de grande relevância, sendo estas: papéis e responsabilidades, cronogramas de ensaios clínicos, comunicação e integração, e padrões de documentos. Essas frentes visaram desenvolver melhorias de processos, ferramentas e indicadores de desempenho,







buscando excelência e qualidade nos trabalhos prestados.

**RESULTADOS** A fase inicial mapeou 5 macroprocessos, 11 subprocessos e 15 processos administrativos, identificou responsabilidades, definiu demandas e interações entre UOs, possibilitando otimização de recursos, identificação de riscos e oportunidades de melhorias. Em continuidade, frentes de trabalho definiram e implementaram métodos e ferramentas, para planejamento dos projetos e acompanhamento de indicadores de desempenho, resultando em ganhos de eficiência e eficácia.

**CONCLUSÃO** O projeto agregou qualificação e profissionalização à equipe ASCLIN no suporte médicocientífico e na realização dos estudos clínicos. A cultura de cooperação e melhoria contínua favorecem a gestão de pessoas, a identificação de oportunidades e a minimização de riscos nos processos de trabalho diários, trazendo como resultados maturidade, visão sistêmica compartilhada e uma efetiva comunicação.

**PALAVRAS-CHAVE** gestão, processos, modelagem, mapeamento, melhorias, reestruturar, reestruturação, indicadores de desempenho, Fiocruz, Bio-Manguinhos, ASCLIN, ESPRO.





## G12. DOES LABELLING AND PACKAGING DESIGN AFFECT EFFICIENCY AND SAFETY OF VACCINE?

Gisele Corrêa Miranda<sup>1</sup>; Paulo Roberto Gomes dos Santos<sup>2</sup>; Patricia Soares Pereira da Silva<sup>3</sup>; Thiago Sturiale<sup>4</sup>; Ricardo Creton Altino<sup>5</sup>.

- 1 Bio-Manguinhos / Fiocruz;
- 2 Assessoria Clínica de Bio-Manguinhos / Fiocruz;
- 3 Assessoria de Assuntos Regulatórios de Bio-Manguinhos / Fiocruz;
- 4 Departamento de Relações com o Mercado de Bio-Manguinhos / Fiocruz;
- 5 Assessoria de Engenharia Industrial de Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUCTION** According to the World Health Organization (WHO), globally almost 30% of medication errors with vaccines are related to information presented in labels and packaging, which have been ignored or misinterpreted and led to inappropriate use. This information shows the importance of labelling and packaging design in promoting rational use of medicines, considering ergonomic and visual aspects. Despite the increasing trends in differentiation and identification of medicines, the Brazilian National Regulatory Agency has published the Resolution RDC21/2012 with a Visual Identity Guide for the medicines distributed by public health programs. The impact of these changes has been evaluated by the multidisciplinary team of Community of Practice on Packaging and Logistics at Bio-Manguinhos/Fiocruz (CoP-PackLog).

**OBJECTIVE** This project aims to present a critical analysis of the Medicines Visual Identity Guide (Resolution RDC21/2012), in correspondence to good design labelling and packaging practices for parenteral drugs.

**METHODOLOGY** Due to the inexistence of an official guide to good labelling and packaging design practices, a comprehensive literature search has been performed in organized civil societies, PubMed and WHO portal in order to consolidate the best practices. A semi-structured interview has been applied to the pharmacist managers at the National Institute of Infectious Diseases Evandro Chagas. Both strategies have focused on medication errors related to labeling and packaging. These informations have been systematically compiled into a matrix used to perform the critical analysis of the RDC 21/2012.





**RESULTS** A significant number of publications was found in the systematic literature review connecting labelling and packaging design to unintended failure in the drug treatment process that leads to, or has the potential to lead to, harm to the patient. The most comprehensive document indicating the best practices for vaccine packaging design is the Guidelines for the Labeling of Vaccines issued by the WHO in 2013. Based on the literature review and the WHO Guideline, it was possible to consolidate a matrix with the most relevant topics of the vaccine packaging graphic design that can affect the safety for the patient. This matrix was validated and completed by an interview with an user of vaccines in the field. With this matrix, it was possible to perform the critical analysis of RDC 21/2013, identifying compliance and divergence issues, critically evaluating and integrating them to medication errors. Mistakes in the prescribing, dispensing, storing, preparation and administration of a medicine are the most common preventable cause of undesired adverse events in medication practice and present a major public health burden.

**CONCLUSION** As expected, the fragility in the adoption of the current Medicines Visual Identity Guide published under Resolution 21/2012 in the context of vaccines safety has been confirmed. Publicize the matter at hand raises awareness and contribute to the improvement of regulation and promoting rational use of medicines.

**KEYWORDS** vaccines, good labeling and packaging design practices, medication errors.



### **G13. IMPLANTAÇÃO DA GESTÃO DE MANUTENÇÃO, CALIBRAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DE EQUIPAMENTOS ANALÍTICOS DE BIO-MANGUINHOS.**

Aline da Silva Lima<sup>1</sup>; Aline de Araújo Pereira<sup>1</sup>; Ester Ribeiro de Figueiredo<sup>1</sup>; Victor de Oliveira Silva Ferreira<sup>1</sup>; Driele Marinho das Neves<sup>1</sup>; Lorena Drumond Loureiro<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUÇÃO** Para que Bio-Manguinhos possa atender à demanda de produção do Ministério da Saúde e de organizações internacionais como OPAS e UNICEF, é necessário ter uma infraestrutura com laboratórios modernos de controle de qualidade e desenvolvimento, com grande variedade de equipamentos analíticos e de alta precisão, gerando confiabilidade nos resultados obtidos. O aumento do parque de equipamentos instalados necessita de um bom gerenciamento das demandas de manutenção, calibração e qualificação, e a falta dos mesmos pode gerar um baixo desempenho dos equipamentos, prejudicando a produtividade dos laboratórios e não atendendo aos requisitos regulatórios. A gestão da manutenção dos equipamentos de laboratório enfoca o suporte às atividades desenvolvidas em Bio-Manguinhos, considerando os seus programas finalísticos e assume um caráter fundamental na garantia da efetividade dos resultados institucionais, pelo grau de sua abrangência e pelo vínculo presente entre os diversos processos de trabalho realizados na instituição.

**OBJETIVO** Garantir e incrementar a qualidade, contribuindo para o aumento do padrão dos processos de produção e controle de Bio-Manguinhos, através da gestão da manutenção e qualificação dos equipamentos analíticos.

**METODOLOGIA** Foi realizado um estudo de caso levando em consideração os processos utilizados pela Seção de Manutenção de Equipamentos de Laboratório – SEMEL, com relação à demanda de serviço e níveis de produtividade. Em paralelo, foram identificadas as necessidades de melhoria na prática de elaboração dos contratos, definindo parcerias, visando o melhor fluxo da contratação e aprovação dos serviços a serem prestados, atendendo as demandas atuais e futuras de Bio-Manguinhos.





**RESULTADOS** Foi realizada a reestruturação da equipe interna da SEMEL, tornando-a multidisciplinar e com perfis dedicados para elaboração e gerenciamento de contratos, fiscalização de serviços terceiros, e execução de serviços de manutenção. Iniciou-se uma parceria junto à Seção de Validação Analítica - SEVAN, na fiscalização, avaliação dos procedimentos e aprovação da documentação do serviço de qualificação e calibração executados, visando a cultura do trabalho com qualidade total. No período de 2015 foram elaborados vinte contratos, destes sete foram contínuos, o que permite a continuidade do serviço em até cinco anos e treze não contínuos, atuações pontuais. A partir dessas ações, observou-se o aumento de 101% no número de ordens de serviço concluídas em 2015 comparado ao ano de 2014, e nos dois primeiros meses de 2016 o aumento foi de 142,5% comparado ao mesmo período de 2015, gerando maior satisfação nos clientes internos.

**CONCLUSÃO** A atuação multidisciplinar da gestão atual da SEMEL e as parcerias desenvolvidas durante esse trabalho, geraram maior credibilidade aos setores de manutenção e qualidade, junto aos clientes internos, abrangendo de maneira efetiva o parque de equipamentos analíticos de Bio-Manguinhos, não apresentando não conformidades em inspeções externas da ANVISA, OMS e MAPA.

**PALAVRAS-CHAVE** manutenção, equipamentos analíticos, qualificação.



## **G14. MONITORAMENTO RÁPIDO DE COBERTURA COMO INSTRUMENTO DE AVALIAÇÃO DO PROGRAMA DE IMUNIZAÇÃO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

Mayara Daher Pacheco<sup>1</sup>; Bianca Campos<sup>2</sup>; Evelin da Silva Munan<sup>1</sup>.

1 SES;

2 UFF.

**INTRODUÇÃO** O Monitoramento Rápido de Cobertura (MRC) é um instrumento de supervisão, análise e acompanhamento de cobertura vacinal (CV) recomendado pela Organização Pan-Americana da Saúde. Em 2014, avaliou a situação vacinal de crianças, para as vacinas contra a poliomielite (VIP e VOP) e contra Sarampo (Tríplice Viral ou Tetra Viral)

**OBJETIVO** Descrever a realização do MRC, no estado do Rio de Janeiro (ERJ) em 2014, como estratégia de avaliação das ações do PNI para as vacinas de Poliomielite e Sarampo, em menores de cinco anos.

**METODOLOGIA** O tamanho da amostra (35.875 entrevistas) foi calculado de acordo com a população alvo existente e o número de salas de vacinas dos municípios, conforme Protocolo para realização do MRC definido pelo Ministério da Saúde. O Público alvo compreendeu crianças com idade de 6 meses a menor de 5 anos para Poliomielite e 1 ano a menor de 5 anos para Sarampo. Foram excluídas as crianças fora da faixa etária estabelecida, as não residentes e residentes ausentes que não dispunham do comprovante de vacinação. A coleta de dados foi feita por meio de atividade de campo, aplicando-se o instrumento pré-estabelecido pelo MS, pela equipe de saúde da unidade, no mês de janeiro de 2015. Os dados eram consolidados e inseridos no Sistema de Informação do Programa Nacional de Imunização para elaboração de relatórios de gestão da informação disponibilizados para todas as instâncias.

**RESULTADOS** Foram realizadas 55.394 entrevistas no ERJ, 21 municípios não realizaram o mínimo de entrevistas necessário e 37 apresentaram alguma inconsistência nos relatórios. A CV alcançada foi de 97,9% para Polio e 96,7% e 90,25% para sarampo, em D1 e D2 respectivamente. A principal inconsistência encontrada refere-se ao quantitativo de crianças entrevistadas, divergente da soma de crianças con-





sideradas vacinadas e não vacinadas. Foram informadas 1294 crianças não vacinadas. Entretanto, ao cruzar o quantitativo total de crianças com o quantitativo de crianças consideradas vacinadas, obteve-se uma estimativa de 2535 crianças “não vacinadas”. 61% (56) dos municípios apresentaram justificativas para os não vacinados, sendo: “outros motivos”(54%), seguindo de “falta de tempo”(23,3%), “dificuldade de ida ao posto de vacinação”(6,3%), “perda de comprovante”(4,8%) e “falta de vacina”(3,2%).

**CONCLUSÃO** A principal inconsistência encontrada, número de crianças consideradas “não vacinadas” nos leva a considerar a chance de uma identificação ineficiente dos indivíduos susceptíveis. Quando crianças não vacinadas oportunamente não são identificadas, facilita-se a formação de possíveis bolsões de não vacinados, áreas de risco para reintrodução da doença no território. Identificar as inconsistências, retroalimentar os municípios, e garantir capacitações para realização do MRC se faz necessário para que possamos obter relatórios consistentes e que subsidiem as intervenções necessárias.

**PALAVRAS-CHAVE** monitoramento vacinal, enfermagem, programa de imunização.





## **G15. MAPEAMENTO DE PARCEIROS PARA DESENVOLVIMENTO DE BIOPRODUTOS VOLTADOS AO TRATAMENTO DE NEOPLASIAS.**

Aline de Almeida Oliveira<sup>1</sup>; Ana Paula Dinis Ano Bom<sup>1</sup>; Ana Paula Carvalho<sup>1</sup>; Gisele Corrêa Miranda<sup>1</sup>; Patrícia Cristina da Costa Neves<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos/Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** O envelhecimento, a urbanização, as mudanças sócioeconômicas e a globalização impactaram o modo de viver dos brasileiros nos últimos anos. Segundo dados do Ministério da Saúde e do IBGE, estes fatores provocaram profunda mudança no padrão de morbimortalidade da população brasileira. Sabe-se que houve redução importante das mortes por doenças infecciosas e parasitárias, ao passo que se observou um incremento por doenças crônicas degenerativas, principalmente as neoplasias, que já representam a segunda causa de morte no país. Diante deste quadro, Bio-Manguinhos tem pela frente enormes desafios no que diz respeito ao desenvolvimento de produtos inovadores para o combate a estas doenças que possam ser incorporados ao Sistema Único de Saúde. Estas novas demandas trazem uma urgência para a reunião de especialistas, arranjados em redes de colaboração, que auxiliem o desenvolvimento destes novos produtos, já que esta é uma área de atuação relativamente nova para a instituição e que o conceito de colaboração e união de expertises vem se consolidando desde o início da década de 90 como a melhor alternativa para atender à crescente demanda por resposta a desafios de complexidade crescente. Neste sentido, em junho de 2014, foi criada a Comunidade de Prática para a discussão de temas na área de oncologia (CoP-Rede-Onco), com o intuito de buscar e trocar informações, para o compartilhamento de experiências, e para estimular a estruturação de parcerias que resultassem em redes de colaboração sob coordenação direta de Bio-Manguinhos

**OBJETIVO** O objetivo do trabalho foi mapear e identificar possíveis parceiros para acelerar o desenvolvimento de produtos inovadores para o tratamento de neoplasias.

**METODOLOGIA** A prospecção de potenciais parceiros foi feita a partir de pesquisa na base de dados do diretório de grupos de pesquisa do CNPq, utilizando-se como palavra chave “câncer”. A partir dos dados obtidos, foi feita uma seleção dos grupos, de acordo com a área de atuação de cada um, de modo que os possíveis par-







ceiros pudessem ser encaixados em 5 temas previamente definidos como gargalos para o desenvolvimento de produtos em Bio-Manguinhos.

**RESULTADOS** A pesquisa resultou na identificação de 750 grupos de pesquisa cadastrados no CNPq no tema “câncer”. Estes grupos foram avaliados individualmente quanto à linha de pesquisa e, dos 750 grupos, foram selecionados 81 com potencial para colaboração, obedecendo a uma classificação em 5 temas, de maneira a aumentar a capacidade inovadora e resolução de gargalos, auxiliando diversos projetos de desenvolvimento tecnológico em Bio-Manguinhos. Os temas escolhidos foram: novos alvos para diagnóstico, prognóstico e terapia, tecnologias de suporte, modelos animais para câncer e estudos clínicos. Já estão em andamento projetos iniciais com alguns destes colaboradores.

**CONCLUSÃO** Esse mapeamento está sendo de extremo valor na identificação de alianças estratégicas visando o desenvolvimento de novos produtos na área de oncologia.

**PALAVRAS-CHAVE** redes de colaboração, desenvolvimento de bioprodutos, inovação.





## **G16. MAPEAMENTO DE TENDÊNCIAS NOS PROJETOS ACADÊMICOS, PRODUTOS E PROCESSOS EM PLATAFORMAS VEGETAIS.**

Denise Cristina de Souza Matos<sup>1</sup>; Tamiris Azamor da Costa Barros<sup>1</sup>; Rosane Cuber Guimarães<sup>1</sup>; Diana Praia Borges Freire<sup>1</sup>; Gisele Corrêa Miranda<sup>1</sup>; Beatriz da Castro Fialho<sup>1</sup>; Daniel André Ribeiro<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUÇÃO** As plataformas vegetais estão emergindo como uma alternativa para produção de proteínas recombinantes para uso terapêutico ou para diagnóstico. As maiores vantagens em relação à produção utilizando células de mamíferos são o baixo custo de produção e o fácil escalonamento. Bio-Manguinhos, de forma inovadora, pretende incorporar a tecnologia de produção em plataformas vegetais através de parcerias estratégicas. Essa tecnologia será implantada em um novo campus a ser construído em Eusébio-CE, composto por áreas de produção de proteínas recombinantes e um prédio de desenvolvimento tecnológico. Neste contexto, a Comunidade Prática de Plataformas Vegetais (CoP-PVEG), tem como objetivo agregar conhecimento e aproximar possíveis parceiros, um dos resultados da CoP-PVEG foi o mapeamento de instituições acadêmicas, empresas e produtos em plataformas vegetais, identificando alianças estratégicas em potencial. A continuidade deste trabalho visando à análise de forma mais específica dos possíveis parceiros é um grande passo para o recrutamento de linhas de pesquisa para o prédio de desenvolvimento tecnológico do novo campus no Ceará.

**OBJETIVO** Analisar dados de mapeamento das tendências em plataformas vegetais, visando identificar soluções tecnológicas, os avanços e tendências em projetos, produtos e processos relacionados a tecnologias baseadas em plataforma vegetal em Bio-Manguinhos. Este mapeamento das soluções, produtos e mercados resultará no primeiro *roadmap* realizado internamente sobre plataformas vegetais, e que após refinamentos por meio de grupos focais poderá auxiliar na tomada de decisão a respeito dos investimentos nesta plataforma quanto a produtos, aplicações e mercados, bem como as competências que necessárias para a implantação desta plataforma.

**METODOLOGIA** O mapeamento de tendências em plataformas vegetais foi





realizado utilizando pesquisas bibliográficas em diferentes bases de dados científicos, bases de dados com informações de mercado e também em sites das empresas que utilizam plataformas vegetais, dentre outros, a partir de palavras-chave validadas com especialistas. A elaboração da primeira versão do *roadmap* se baseará na organização dos dados e informações levantados nas seguintes camadas: ciência, tecnologias, produtos e mercados, de forma a identificar a correlação entre os eventos identificados em cada camada.

**RESULTADOS** As informações processadas no levantamento bibliográfico foram organizadas em tabelas nas quais foram identificados os projetos acadêmicos, produtos e processos existentes seguindo as diretrizes propostas. Os dados foram organizados e discutidos em reuniões periódicas quanto à sua relevância no contexto das tendências em plataformas vegetais. Após este processo, foram elencados os principais projetos acadêmicos, produtos e processos existentes, sendo os dados apresentados na forma de *roadmapping*.

**CONCLUSÃO** Este levantamento de tendências se configura como uma importante ferramenta para identificação de alianças estratégicas com outras instituições e empresas, retroalimentação do conteúdo das discussões, palestras e visitas técnicas na CoP-PVEG, além de nortear os esforços de inovação em plataformas vegetais a serem adotados em Bio-Manguinhos.

**PALAVRAS-CHAVE** plataformas vegetais, mapeamento, parcerias estratégicas.



## **G17. ESTUDO EXPLORATÓRIO DO CENÁRIO MUNDIAL DE ANTICORPOS MONOCLONAIS TERAPÊUTICOS PARA O CÂNCER, ATRAVÉS DE MÉTODO DE PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA.**

Hugo Garcia Tonioli Defendi<sup>1</sup>; Luciana Silva Madeira<sup>1</sup>; Aline Almeida Oliveira<sup>2</sup>.

1 Bio-manguinho / Fiocruz;

2 IOC / Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** No Brasil está ocorrendo um processo de mudança nos perfis demográfico, epidemiológico e nutricional, trazendo importância crescente às “doenças crônicas não transmissíveis” como as neoplasias, que se tornaram a segunda causa de morte no país, substituindo as doenças infecciosas e parasitárias. A estimativa do INCA para o biênio 2016-2017 aponta ocorrência de cerca de 420 mil novos casos, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. A introdução de terapias alvo para tratar cânceres humanos tem sido anunciada como um dos frutos de três décadas de progresso notável de investigação sobre mecanismos de patogênese do câncer, onde anticorpos monoclonais (mAbs) são apontados como a principal estratégia terapêutica. No contexto de inúmeras pesquisas direcionadas nesta área, torna-se necessária a adoção de estratégias de prospecção tecnológica, por empresas envolvidas no processo de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de produtos, com intuito de identificar tendências tecnológicas e melhor direcionar os investimentos.

**OBJETIVO** Realizar análise exploratória do cenário mundial de mAbs, no que diz respeito aos produtos biológicos originais e biossimilares, através de base de dados comercial com informações de mercado e P&D de produtos biofarmacêuticos.

**METODOLOGIA** Selecionou-se a técnica de prospecção mais adequada para o universo de informações disponíveis na base de dados Medtrack. Em seguida, aplicou-se filtro para selecionar produtos oncológicos, exportando as informações para o programa Microsoft Excel 10. Assim, aplicou-se uma sistemática de busca para selecionar apenas mAbs terapêuticos para câncer. A partir deste compilado de informações desenvolveram-se metodologias de busca e análises dos dados obtidos.

**RESULTADOS** Foram encontrados na pesquisa 1339 diferentes mAbs,





desenvolvidos ou em desenvolvimento para tratamento, sendo 37 biológicos originais, 130 biossimilares e 1172 produtos sob investigação. Entre os biológicos originais, identificaram-se 233 indicações terapêuticas desenvolvidas e/ou em desenvolvimento, sendo o Avastin (bevacizumabe) o produto com maior número de indicações terapêuticas aprovadas ou em estudo (38). Para os biossimilares, 130 produtos encontrados somam 147 indicações terapêuticas em desenvolvimento ou desenvolvidas. No desenvolvimento dos produtos biológicos originais e biossimilares, é possível ver um maior número de estudos concentrados na fase II de pesquisa clínica (dose resposta) para biológicos (72) e fase pré-clínica para biossimilares (46).

**CONCLUSÃO** Nota-se que o número de indicações terapêuticas em desenvolvimento ou desenvolvidas de diferentes produtos é bem maior para biológicos originais (233 de 37) do que para biossimilares (147 de 130). O Avastin é o produto biológico original mais estudado com 38 indicações terapêuticas, podendo ser explicado, pelo fato de reconhecer VEGF e consequentemente diminuir a angiogênese, processo importante para progressão de diversos tipos de tumores. Concluímos que existem milhares de mAbs anti-câncer aprovados ou em desenvolvimento, tornando necessário o uso de ferramentas de prospecção tecnológica para acompanhar as tendências e embasar a tomada de decisões em P&D.

**PALAVRAS-CHAVE** anticorpos monoclonais, câncer, prospecção tecnológica.





## **G18. SERVIÇOS: PAPEL DA DIVISÃO DE ATENDIMENTO AO CLIENTE NA CONSTRUÇÃO DE UMA IMAGEM POSITIVA DE BIO-MANGUINHOS JUNTO À HEMORREDE NAT.**

Linda Khalili Boukai<sup>1</sup>; Ludmila Nascimento Rocha Villar Bezerra<sup>1</sup>; Priscilla Caroline Almeida dos Santos<sup>1</sup>; Marilúcia Sobrado Pina<sup>1</sup>; Tatiana Rose Pizzani Trindade<sup>1</sup>; Vivian Rabello<sup>1</sup>; Adriana Rodrigues Pedro<sup>1</sup>; Beatriz Coutinho Brum<sup>1</sup>; Alessandra Bógio<sup>1</sup>; Denise Maria Lobo Crivelli<sup>2</sup>.

1 Departamento de Relações com o Mercado, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fundação Oswaldo Cruz.

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

**INTRODUÇÃO** A palavra “serviço” tem o significado de “ato ou efeito de servir” e constitui uma modalidade de atendimento presente, de forma cada vez mais significativa, no panorama do mercado contemporâneo. A prestação de serviços é peça fundamental no processo de crescimento e maturação da relação empresa-cliente, influenciando diretamente na apuração do grau de satisfação, ferramenta de indicador de qualidade. A prestação de serviços eficientes, com impactos positivos, contribui favoravelmente para a gestão da organização e com a consolidação da sua imagem.

**OBJETIVO** Apresentar a atuação da Divisão de Atendimento ao Cliente e Pós-Marketing de Bio-Manguinhos (DIACM) na área de Serviços, com ênfase na qualidade do suporte técnico-científico prestado à Hemorrede NAT. Apontar os pontos-chave na ótica da satisfação dos clientes e no alcance das metas no que tange ao cumprimento dos requisitos de atendimento. Destacar a relação com as empresas parceiras no atendimento e a prática de cinco anos da relação contratual.

**METODOLOGIA** A DIACM é o canal de relacionamento com o cliente, responsável pela prestação de serviços de assistência técnico-científica ao campo. As bases da prestação de serviços à Hemorrede estão apoiadas em duas vertentes principais: suporte científico ao kit NAT HIV / HCV / HBV e suporte técnico à plataforma de equipamentos que operam interfaceados para emissão dos resultados. A equipe de atendimento, amplamente treinada, opera com procedimentos padronizados balizados pelos contratos de assistência técnica com as três empresas fabricantes dos equipamentos que compõem a plataforma NAT – QIAGEN, PerkinElmer e ThermoFisher.





**RESULTADO** A prestação de serviços pela DIACM é um trabalho de equipe dedicado que agrega valores ao público destinatário, via de regra, o cidadão brasileiro que recebe uma doação de sangue seguro e confiável. A importância deste trabalho se reflete no total de 10.229.944 bolsas testadas (2011-2015) e na apuração de mais de 50 janelas imunológicas detectadas, evitando a contaminação direta de mais de 200 pessoas. Desde 2011, a DIACM prestou 11.651 atendimentos, retornando respostas com qualidade. A apuração do grau de satisfação revelou que 88% dos clientes estão satisfeitos com os serviços prestados pela DIACM. Em relação às empresas parceiras, a QIAGEN possui 85% de satisfação, PerkinElmer 82% e ThermoFisher 81%. Os serviços prestados pela DIACM também incluem aplicação de pesquisas para avaliação das condições de entrega dos produtos (kit e acessórios). Até o momento, mais de 1.000 pesquisas foram aplicadas com o intuito de buscar oportunidades de melhorias no serviço.

**CONCLUSÃO** O sucesso de uma organização pública requer a conquista de resultados positivos em consonância com sua missão institucional. Neste cenário, Bio-Manguinhos ganha destaque pelos altos índices de satisfação da Hemorrede, apurados nas pesquisas, enfatizando a satisfação dos clientes com a qualidade dos serviços prestados. O paradigma mudou: a unidade de valor, hoje, além do produto, é uma prestação de serviços eficiente e eficaz.

**PALAVRAS-CHAVE** serviço, atendimento ao cliente, pesquisa de satisfação.





## G19. ASSESSMENT OF PARAMETERS FOR LOT RELEASE OF TETANUS ANTITOXIN FOR HUMAN USE THROUGH POTENCY ASSAYS BY TOBI TEST.

Deivid Wanderson Couto dos Anjos<sup>1</sup>; Kelly Oliveira Santos<sup>1</sup>; Andrea Pereira Laranjeira<sup>1</sup>; Wlamir Correa de Moura<sup>2</sup>; Isabella Fernandes Delgado<sup>1</sup>.

1 INCQS / Fiocruz;

2 BraCVAM / INCQS / Fiocruz.

**INTRODUCTION** The incidence of tetanus is still a public health problem in Brazil. The biological product adopted by National Immunisations Programme (NIP) for prophylactic and therapeutic purposes is the Tetanus Antitoxin for Human Use (TAHU). The National Institute for Quality Control in Health (INCQS) is the Brazilian laboratory responsible for evaluating the quality of TAHU lots. Potency assays for TAHU employ a large number of mice by tetanus toxin neutralisation testing (TNT). The Toxin Binding Inhibition (ToBI) test is a promising alternative to replace the use of animals in testing.

**OBJECTIVE** The aim of this study is to verify the adequacy of current minimum potency requirement (1000 IU/ml) for routine lot release of TAHU using ToBI test as an alternative to TNT in mice.

**METHODOLOGY** Twenty-five samples of commercial TAHU batches received in INCQS from 2010 to 2013 were randomly chosen from Brazilian producers. Samples were pre-diluted 1:250 (estimating higher potencies); 1:500 (standard assay procedure); and 1:1000 (estimating lower titres). TNT in mice: the assays were performed as described in TAHU monograph from The Brazilian Pharmacopoeia, using reference preparations calibrated against the International Standards. The potency requirement for TAHU is not less than 1000 IU/ml. ToBI test: 100µl of twofold dilutions of both reference and test sera were prepared in PBS and mixed with 100µl of tetanus toxin at 0.25Lf/ml in blocked pre-incubation microplates. After one hour at 37°C in humid atmosphere followed by overnight incubation at 2-8°C, the non-neutralised toxin was caught by transferring 100µl of the serum-toxin mixtures to immunoassay plates coated with tetanus antibodies. When the complex [Antibody-Toxin-Tetanus antitoxin conjugated to peroxidase] reacted with 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine substrate, the







plates was read at 450nm after use of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. Positive and negative controls should not exceed measures of absorbance of 0.01-0.1 and 0.5-1.3, respectively. The *in vitro* assays doseresponse curves should present significant regression ( $p < 0.05$ ) and no deviations of parallelism and linearity ( $p > 0.05$ ).

**RESULTS** Potency estimates through ToBI using a calibration curve by a 4-parameter logistic fit instead of OD<sub>50</sub> methods obtained better correlation to TNT. The Linear Regression Equation ( $y = ax + b$ , where  $x$  = potency value by TNT;  $y$  = potency value by ToBI) described the tendency of correlation very well. Then, it was possible to determine a novel minimal acceptable potency around 1600 IU/ml with specificity 100% to discriminate subpotent and potent batches using ToBI test.

**CONCLUSION** The threshold of 1000 IU/ml has not presented adequate specificity for routine lot release of TAHU through ToBI test. Thus, the establishment of a novel minimum potency requirement for ToBI test is suitable. Therefore, potency results obtained by ToBI test showed very good correlation with TNT, emphasising the replacement of expensive TNT in mice is feasible.

**KEYWORDS** tetanus hyperimmune serum, potency test, lot release, alternative method.





# OUTROS TEMAS RELACIONADOS





## OTRI. KASUMI-1 CELL LINE: AN ALTERNATIVE TO THE POTENCY ASSAY OF FILGRASTIM BIOPHARMACEUTICAL.

Nathália Vinagre<sup>1</sup>; Aline Rangel<sup>2</sup>; Raquel Maia<sup>2</sup>; Fausto Ferraris<sup>1</sup>; Ana Cristina Nogueira<sup>3</sup>.

- 1 INCQS / Fiocruz;
- 2 INCA;
- 3 IOC / Fiocruz.

**INTRODUCTION** Filgrastim is classified as a biopharmaceutical and it is the cytokine G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) human recombinant protein. The biological effect of this cytokine G-CSF is mainly related to the proliferation and differentiation of granulocytes, which are important cells in host defense against many microorganisms. Neutropenia caused by chemotherapy or as a consequence of diseases are widely treated with this recombinant protein. Filgrastim is part of the list of drugs that can be purchased by the Brazilian health system (SUS) and this medicine will soon be produced at Fiocruz. The relationship between potency and efficacy of recombinant proteins is very strong and any variations in this respect may compromise the wished effect in patients. Moreover, physicochemical assays alone does not assure the pharmacological effect of this type of substance. Therefore, quality control procedures must be designed to confirm the biological effect and be performed routinely. Currently, there is no method in the national pharmacopoeia for this biopharmaceutical. In the European Pharmacopoeia, the pharmacological potency is recommended to be determined by an *in vitro* assay performed in M-NFS-60 cell line and is based on the evaluation of proliferative potential, as measured by MTT metabolization. This cell line, however, has some disadvantages such as: the need for supplementation with M-CSF and it is a mouse cell line.

**OBJECTIVE** In this context, we aim to develop *in vitro* potency assay with a human cell line, Kasumi-1, using the MTT cell proliferation test. Specific objectives: Standardize the culture of Kasumi-1 cells; use different cell concentrations to the test the medicine; evaluate different concentrations of Filgrastim in the MTT assay;

**METHODOLOGY** Cell culture - Kasumi-1 was maintained in RPMI-1640 supplemented with 20% FCS maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. MTT proliferation assay - based on the criteria established in European Pharmacopoeia, viable cultured





cells are plated with medium in 96-well microplates. Subsequently, cells are exposed to different concentrations of the drug. After the incubation, MTT was added and absorbation was measured using a spectrophotometer 570nm .

**RESULTS** Two initial concentrations were used. 800 IU/ml as European Pharmacopoeia, with serial dilution 1: 2, and another curve starting in 100000 IU/ml, with serial dilution 1: 5. Both showed a tendency of a dose-dependent curve, indicating a potency relationship. The curve analysis was performed using a potency curve and the coefficient of determination ( $r$ ) was higher than 80%.

**CONCLUSION** The preliminary data obtained with Kasumi-1 cell line suggests that this cell might be useful in the determination of potency of filgrastim. More studies, however, must be performed to assure the feasibility of the proposed assay.

**KEYWORDS** potency assay, quality control, biopharmaceutical.





## **OTR2. IMMUNOMODULATORY EFFECT OF BACILLUS CEREUS VAR. TOYOI IN MICE EXPERIMENTALLY VACCINATED AGAINST LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI.**

Keila Patrícia Mota Souza<sup>1</sup>; Ana Paula Presley Oliveira Sampaio<sup>1</sup>; Joelson Spusa Lima<sup>1</sup>; Flávio da Silva<sup>1</sup>; Maiara Vasconcelos Monteiro<sup>1</sup>; Carina Martins de Moraes<sup>1</sup>; Talita Bandeira Roos<sup>1</sup>.

1 Laboratório de Microbiologia e Imunologia. Universidade Federal do Pará / Campus Castanhal-Instituto de Medicina Veterinária.

**INTRODUCTION** Immunization through vaccination is the demonstrably more efficient alternative for controlling infectious diseases such as canine visceral leishmaniasis. However, some of these vaccines do not have the necessary effectiveness for the protection of individuals. Thus, the probiotic supplementation has been shown to be an important tool to improve the vaccine immune response.

**OBJECTIVE** To evaluate the immunomodulatory effect of *Bacillus cereus* var. Toyoi in mice experimentally vaccinated against *Leishmania infantum chagasi*.

**METHODOLOGY** For this work 17 isogenic mice were used, species *Mus musculus*, race albino Balb C, at 21 days of age, females, divided in two groups: supplemented with the probiotic and control (unsupplemented). The supplemented group received feed with probiotic *Bacillus cereus* var. Toyoi in the concentration of  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> and the control group the same feed without addition of probiotic, and the animals were adapted to their diet (with or without probiotic) 14 days before the first dose of vaccine. All animals were vaccinated on days 0 and 28 with the *Leishmania infantum chagasi* particulate antigen, and blood collection to obtain serum was performed weekly to research the kinetics of antibody production by Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Indirect. To evaluate probiotics effects on the cellular immunity of the animals, the amplification of cytokine gene fragments (IL-12, IL-10 and IL-4) using cDNA obtained from RNA of splenocytes by quantitative method, Polymerase Chain Reaction (qPCR). Both serology data and differences on gene expression were analyzed by analysis of variance (ANOVA) and the means were compared by Tukey test ( $p < 0.05$ ), with BioEstat 5.0.

**RESULTS** The evaluation of the immune response conducted by the ELISA





shown in the supplemented group had a seroconversion average of 1.42 times higher than the group that did not received probiotic. In the evaluation of cytokine profile, the group supplemented with *B. cereus* var. Toyoi showed higher expression of IL-12 and IL-4 than the control group ( $p < 0.01$ ) and lower IL-10 expression ( $P < 0.01$ ) as compared to the group not supplemented (Fig. 2). The supplemented group showed IL-4 expression 2.6 times higher than the control group, while IL-12 was 8.3 times higher than the control group. Finally, IL-10 expression was 0.58 times lower than the control group.

**CONCLUSION** Based on the results and literature, we suggest that the probiotic *Bacillus cereus* var. Toyoi presents evidence of the modulation of the immune system and vaccine responses. Thus, it may support the modulation of adequate and efficient vaccine response for the control of canine leishmaniasis.

**KEYWORDS** probiotics, immunomodulatory vaccine, canine leishmaniasis.





### OTR3. MÉTODOS DE GENOTIPAGEM DOS SNPS FUNCIONAIS DO GENE FCGR2C.

Ana Claudia Dantas Machado<sup>1</sup>; Guilherme Afonso Melo<sup>1</sup>; Claudio Gustavo Stefanoff<sup>1</sup>.

1 Instituto Nacional de Câncer.

**INTRODUÇÃO** Variantes funcionais determinadas geneticamente vem sendo associadas com a eficiência dos mecanismos efetores Fc-dependentes mediados pelos anticorpos monoclonais das terapias antineoplásicas. Um polimorfismo de base única (SNP) no éxon 3 do gene FCGR2C, denominado “variante clássica” (c.169C>T, rs10917661), determina a expressão funcional do FcγRIIc (ORF/STOP) em células NK humanas, ao passo que outras duas variantes no íntron 7, descritas como “variantes não clássicas” (897+1 A>G, rs76277413 e 898-1 C>G, rs430178), ocasionam códons de parada em aproximadamente 20% dos portadores de genótipo FCGR2CORF. Uma característica notável do FCGR2C é a sua homologia com os genes FCGR2A e FCGR2B que dificulta as abordagens metodológicas.

**OBJETIVO** O presente estudo teve como objetivo desenvolver e validar metodologias confiáveis para a análise das variantes polimórficas clássicas e não clássicas do gene FCGR2C, no intuito de subsidiar a investigação futura destes SNPs como biomarcadores de resposta clínica individual ao tratamento com anticorpos monoclonais.

**METODOLOGIA** Foram utilizadas amostras de RNA e DNA genômico obtidas de doadores voluntários (n=26) e de linhagens celulares. Para a análise do SNP clássico, foram adotadas duas estratégias de PCR em ninho (*nested*) com o objetivo de amplificar especificamente o FCGR2C numa primeira etapa; uma das estratégias baseou-se na amplificação a partir de cDNA (fragmento 810 pb) e outra a partir de DNA genômico (fragmento 6.250 pb). Em ambos os casos, uma segunda etapa de PCR foi utilizada para a amplificação dos fragmentos contendo o SNP rs10917661, que posteriormente foram purificados e sequenciados. Para a análise das variantes polimórficas não clássicas, localizadas nas regiões 5' (rs76277413) e 3' (rs430178) do íntron 7 (regiões altamente homologas ao gene FCGR2A), foi utilizada uma estratégia de amplificação *touchdown* a partir de DNA genômico, seguido de sequenciamento direto.







**RESULTADOS** A análise do SNP clássico, de acordo com a estratégia de genotipagem de cDNA, revelou 6/26 doadores (23,07%) com genótipo ORF / ORF; 18 / 26 doadores (69,23%) com genótipo STOP / STOP e 2 / 26 doadores (7,7%) com genótipo heterozigotos ORF / STOP. Quanto às variantes não clássicas, para o trecho do SNP rs76277413 (897+1A>G) três dos cinco iniciadores *forward* desenhados permitiram amplificar o gene FCGR2C com sucesso; os amplicões sequenciados exibiram um nucleotídeo T na posição 897+28 e a sequência CT na posição 897+61. Para a região do SNP rs430178 (898-1C>G) os três iniciadores “forward” testados permitiram obter produtos específicos que exibiram um nucleotídeo C na posição 939, indicando especificidade dos métodos de PCR.

**CONCLUSÃO** Durante o presente trabalho, padronizamos com sucesso métodos de PCR para a análise das variantes polimórficas clássicas e não clássicas do gene FCGR2C. Os nossos resultados preliminares alertam sobre a necessidade de uma correta padronização e validação dos métodos de genotipagem dos SNPs funcionais nos genes dos Fc Rs, particularmente no gene FCGR2C que apresenta mais de 96% de homologia com os genes FCGR2A e FCGR2B.

**PALAVRAS-CHAVE** SNP, FCGR2C, variantes polimórficas.



## **OTR4. CONSTRUCTION AND VALIDATION OF AN ACTIVATING AND INHIBITORY CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR (CAR) SYSTEM.**

Leonardo Chicaybam<sup>1</sup>; Martin Bonamino<sup>1</sup>.

1 Fiocruz.

**INTRODUCTION** The use of adoptive transfer of T cells for the treatment of cancer is hampered by low avidity and persistence of infused cells and the difficulty in isolating and expanding antitumor lymphocytes. The use of chimeric antigen receptors (CARs) avoids some of these problems. CARs consist of an antigen recognition unit (Fab fragment as scFv), a transmembrane region and an intracellular activation domain. CARs redirect the specificity of lymphocytes, recognizing the target antigen with high affinity and independently of MHC. However, on target/off tumor responses due to target recognition in normal cells limits the widespread application of this therapy. The CD19 antigen represents a good target for elimination of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL) and lymphocytes expressing anti-CD19 CARs (19BBz) are being used in the clinical setting. However, the expression of CD19 as a pan-B marker can lead to undesired side effects such as depletion of mature B cells.

**OBJECTIVE** As mature B cells express both CD19 and CD20 antigens, we propose the creation of an inhibitory anti-CD20 CAR, that when used in combination with 19BBz would be able to discriminate between leukemic blasts and normal B cells.

**METHODOLOGY** Three inhibitory CARs were constructed containing signaling domains of CTLA-4, PD-1 or BTLA. As a reporter system to test our hypothesis, Jurkat T cells expressing the plasmid pGL4.30 - expressing luciferase controlled by a NFAT responsive promoter - were generated. K562 cell line was used as target cells and modified to express CD19 (K5-19), CD20 (K5-20) or CD19 and CD20 (K5-19/20). The *Sleeping Beauty* transposon was used to modify primary human T lymphocytes.

**RESULTS** In coculture experiments, Jurkat cells expressing 19BBz showed induction of luciferase activity when cultured with K5-19 or K5-19 / 20. However, Jurkat expressing both activation and inhibitory CAR showed inhibition of luciferase





activity when incubated with K5-19 / 20 while maintained high activity when cultured with K5-19 cells. Furthermore, all three inhibitory CARs were able to inhibit the expression of the activation marker CD69 induced by 19BBz in Jurkat cells. In primary human T cells, the 20PD1 CAR did not inhibit proliferation or cytotoxicity induced by 19BBz. The 20PD1 CAR was also unable to inhibit the first generation 19z CAR, which lacks the 4-1BB coestimulatory endodomain, showing that PD1-mediated inhibition in our system is inefficient.

**CONCLUSION** Additional experiments are needed to evaluate the activity of 20PD1 in primary human T cells. Experiments with additional inhibitory CARs (20BTLA, 20LAG3 and 20PD1LAG3) are ongoing and can serve as an alternative to CAR 20PD1 in the construction of a conditional response system.

**KEYWORDS** immunotherapy, chimeric antigen receptor, T lymphocytes.





## **OTR5. GENOMIC EDITING, MEDIATED BY CRISPR / Cas9, OF PDCD1, CTLA4 E LAG3 loci IN T LYMPHOCYTES EXPRESSING CHIMERIC ANTIGENS RECEPTOR (CARS).**

Bárbara Costa Peixoto<sup>1</sup>; Leonardo Chicaybam Peixoto<sup>2</sup>; Martin Hernán Bonamino<sup>2</sup>.

1 Programa de Carcinogênese Molecular - Instituto Nacional do Câncer, INCA;

2 Programa de Carcinogênese Molecular - Instituto Nacional do Câncer, INCA/VPPLR - Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz.

**INTRODUÇÃO** The immune system plays an important role in tumor editing, being capable of eliminating this threat. The actual landscape of cancer treatment includes surgery, chemotherapy, radiotherapy and more recently immunebased approaches, such as the use of monoclonal antibodies, vaccines and adoptive immunotherapy. Different approaches to genetic modulate patients own immune response are being successfully used, such as CAR based treatment. However, occasionally tumor escapes. The Programmed Cell Death 1 (PD-1), Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) and Lymphocyte-activation gene 3 (LAG-3) pathways are constantly associated with cancer evasion from immune system. When associated with its ligands, PD-L1, CD80/86 and MHCII, respectively, these proteins inhibit T lymphocyte activation and proliferation, frequently blocking their effector function. Knockdown of PD-1, CTLA-4 and LAG-3 expression by genomic editing, may increase the antitumor functions of these cells. Recently, the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats system (CRISPR/Cas9) has emerged, as a new tool for site-specific genome editing.

**OBJECTIVE** We propose here a CRISPR-based genetic engineering system to knockdown PD-1, CTLA-4 and LAG-3 expression in T-cells rendering these cells resistant to checkpoint inhibitors mediated inhibition.

**METHODOLOGY** We designed gRNAs using the Optimized CRISPR Design program at *crispr.mit.edu* targeting the PDCD1, CTLA4 and LAG3 loci. DNA sequences for the gRNAs were cloned into the CRISPR plasmid vector and electroporated into human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and HEK293FT cell line. 24 hours later, DNA of CRISPR expressing cells was extracted by phenol-chloroform. A PCR was designed to amplify each target locus.





**RESULTS** The PCR products were cloned into the TA Cloning® Kit vector and the colonies were sequenced to validate the gRNAs. We are currently characterizing the functional edition of these *loci* by co-electroporating the CAR and the pool of gRNAs transcripts (*in vitro* transcription by MEGAscript™ kit), in PBMCs aiming to evaluate the effective response of edited cells against CD19+, MHCII+, PD-L1+ and CD86+ cells by lysis assay, and their possible enrichment among the T cell population during *in vitro* lymphocyte expansion.

**CONCLUSION** We propose here a system to knockdown pathways largely used by tumors to inactivate the immune response. We will test the effects of PD-1, CTLA-4 and LAG-3 inactivation by CRISPR system in T Lymphocytes expressing a Chimeric Antigen Receptor.

**KEYWORDS** immunotherapy inhibitory receptors CRISPRCas9.





## **OTR6. MANUFACTURING OF HIGH-CONCENTRATION MONOCLONAL ANTIBODIES VIA AN EASY TO HANDLE DISPOSABLE MODULAR MINIFERMENTER.**

Guillermo Marini<sup>1</sup>; Fernando Paiva Conte<sup>1</sup>; Márcia Arissawa<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz - Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais.

**INTRODUCTION** In order to evaluate different *in vitro* production methods as an alternative to the *in vivo* production of monoclonal antibodies (MAbs) in mice, disposable systems like HYPERFlasks, hollow-fiber bioreactors, roller bottles and spinners have shown good performance in MAbs manufacturing. However, the use of these systems require great volume of supernatant, which implies considerable cost and time-consuming purification processes. In this work, an *in vitro* alternative system (MiniPERM<sup>®</sup>) was tested for two hybridoma lines in order to investigate the mAb productivity based on the consumption of a small volume of media as compared to other production systems.

**OBJECTIVE** Evaluate suspension culture of D1-4G2-4-15 and MRSA hybridomas in miniPERM as an *in vitro* alternative method to the traditional *in vitro* technologies (roller and HYPERFlasks) for producing MAbs. Cell viability, cell growth rate and IgG production were determined to compare with other *in vitro* systems.

**METHODOLOGY** Both murine hybridomas were grown in a high-glucose (4,5g/L) medium supplemented with fetal bovine serum 10% and L-Glutamine 6,4mM in the 35mL production module. The same medium without serum was use in the 350mL nutrient-module. Cell growth and IgG production kinetics of hybridoma were carried out (during 11 days) to characterize the batch-mode production system. Samples were taken daily to determine viable cell concentration ( $X_v$ ) and viability ( $V_b$ ) by Trypan-blue dye exclusion method. IgG production was quantified by the use of Easy-titer Mouse-IgG assay kit (Thermo Fisher Scientific).

**RESULTS** The MRSA and D1-4G2-4-15 cultures showed a 72-hour exponential growth, with specific growth rate of  $0.0211 \pm 0.0006$  and  $0.0264 \pm 0,0002$   $h^{-1}$  respectively, and reached a maximum viable cell concentration of  $5.2 \pm 0.1 \times 10^6$  cell/mL and  $8.6 \pm 0.2 \times 10^6$  cell/mL, respectively. In both hybridoma lines, even the specific





growth rates were similar to the traditional production systems. The maximum viable cell concentration reached in minipermeable system was 4 to 7-fold higher than those reached in traditional production systems (MRSA/roller/T-flasks:  $0.8 \pm 0.3 \times 10^6$  cell/mL; 4G2/roller:  $2.31 \pm 0.2 \times 10^6$  cell/mL). The IgG production reached a maximum of  $204 \pm 33$  mg/L and  $746 \pm 144$  mg/L for MRSA and D1-4G2-4-15 respectively (11 days). The MRSA production was approximately 20-fold higher than the traditional productions in roller and flasks (range 1–20 mg/L), meanwhile the 4G2 production was approximately 4-fold higher than that obtained in roller systems.

**CONCLUSION** The modular fermenter has shown to be a useful alternative to the other *in vitro* and *in vivo* production methods. Furthermore, it represents an easy way to culture cells in high density to obtain high-level MAb productions.

**KEYWORDS** monoclonal antibody, high-concentration, disposable system.





## OTR7. ECTOPIC EXPRESSION OF miR-182 IN CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR-MODIFIED T CELLS.

Mayra Carneiro<sup>1</sup>; Leonardo Chicaybam<sup>1</sup>; Martin Bonamino<sup>2</sup>.

1 Programa de Carcinogênese Molecular - Instituto Nacional do Câncer, INCA;  
2 Programa de Carcinogênese Molecular - Instituto Nacional do Câncer, INCA and VPPLR - Fundação Oswaldo Cruz.

**INTRODUCTION** Immunotherapy based strategies use components of the immune system, such as monoclonal antibodies, adoptive cell transfer and genetically modified T cells to respond specifically against cancer cells. B cell malignances have been clinically targeted by Chimeric Antigen Receptors (CARs) modified T lymphocytes. These receptors are derived from Fab portion from antibody, fused to transmembrane and T-cell cytoplasmic signaling domains of the CD3 zeta chain and 4-1BB molecule, called 19BB $\zeta$ , because they recognize the CD19 expressed in B cell lineage. Good therapeutic responses in hematological tumors have been described with this approach; although there is still field to optimize this response. To increase the antitumor response we explored the association of anti-CD19-41BBzeta CAR ( $\alpha$ 19BB $\zeta$ ) and microRNAs, described recently as modulators of T cell, such the miR-182.

**OBJECTIVE** We aim co-express CAR and miR-182 in primary T lymphocytes in order to evaluate potential functional improvements in antitumor responses *in vitro*.

**METHODOLOGY** Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were electroporated with bidirectional *Sleeping Beauty* transposon for simultaneous expression of the CAR and miRNA. Gene-modified T cells were expanded and activated *in vitro* by co-culture with irradiated L388 cell line. The expression of 19BB $\zeta$  miRNAs and targets were evaluated by FACS and RQ-PCR, respectively. *In vitro* expanded T lymphocytes were phenotyped for memory population, CD8 + and CD4 +, and evaluated for *in vitro* and *in vivo* activity of lysis of target pre-B ALL cell line NALM-6.

**RESULTS** Manufacture of T cell using the bidirectional Sleeping Beauty system has efficiently promoted CAR 19BB $\zeta$  and miR-182 expression. No difference was observed in lymphocyte subpopulations when miR-182 was overexpressed, however *in vitro* analysis showed more expansion of this group for the majority of the donors

176







tested. The cytotoxic assay indicated that CAR and miR-182 coexpression was not able to increase the antitumor activity of CAR-modified T lymphocytes.

**CONCLUSION** The co-expression of miR-182 and the CAR 19BB $\zeta$  seems to impact the rate of T lymphocyte expansion *in vitro* for cells expressing CARs.

**KEYWORDS** immunotherapy, CAR-T cell, miRNAs.





## OTR8. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE REPLICAÇÃO DO VÍRUS ZIKA EM CÉLULAS VERO.

Liliane Monteiro Morais<sup>1</sup>; Marta Cristina de Oliveira Souza<sup>1</sup>; Gisela Freitas Trindade<sup>1</sup>; Mariana Pierre de Barros Gomes<sup>1</sup>; Luiz Gustavo de Almeida Mendes<sup>1</sup>; Patricia Alvarez Baptista<sup>1</sup>; Kelly de Araujo Lucio<sup>1</sup>; Marcia Archer da Motta<sup>1</sup>; Ana Maria Bispo de Filippis<sup>2</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos;

2 IOC.

**INTRODUÇÃO** O vírus Zika (ZIKV) é um Arbovirus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus* e é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes spp.* O Brasil vem enfrentando sérios problemas de saúde pública decorrente da epidemia causada pelo vírus Zika em diversas regiões do país. O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos), responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, reativos e biofármacos voltados para atender prioritariamente às demandas de saúde pública nacional, está investindo em estudos que visam o desenvolvimento de uma vacina para o vírus Zika.

**OBJETIVO** O Laboratório de Tecnologia Viroológica (LATEV) busca caracterizar o comportamento do vírus em substratos celulares passíveis de aplicação em imunobiológicos de uso humano, acompanhar seu perfil de replicação e estabelecer um lote de trabalho que será usado em experimentos de caracterização viral.

**METODOLOGIA** A partir da cepa isolada de um paciente do Espírito Santo, o vírus foi amplificado em duas linhagens de células Vero ATCC (E6 e CCL81) utilizando cultivo estacionário em garrafas T-175. Bancos virais foram criados a partir dos dois substratos celulares, empregando meio de cultivo 199 contendo 5% de SFB. O perfil de replicação viral foi avaliado por plaqueamento e PCR em Tempo Real. Posteriormente, para refinamento do ensaio de plaqueamento, diferentes condições experimentais como densidade celular, concentração de meio semi-sólido e tempo de infecção foram testadas, objetivando a obtenção de plaques mais uniformes e tamanhos adequados à contagem, visando o estabelecimento das metodologias de titulação e PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*). Com o objetivo de observarmos o comportamento do vírus em culturas de célula Vero, cinéticas de replicação viral foram realizadas com coletas em intervalos de 8 h e 16 h pós infecção do vírus em células CCL81 durante





7 dias, utilizando três concentrações virais (MOI).

**RESULTADOS** Os bancos virais obtidos apresentaram título viral de 7,42 Log<sub>10</sub> PFU/mL e CT 14,45 e 6,54 Log<sub>10</sub> PFU/mL e CT 15,57, originados do substrato celular Vero CCL-81 e E6, respectivamente. A melhor condição de plaqueamento do vírus Zika foi obtida quando se empregou 2% de CMC, 100.000 cél/cm<sup>2</sup> e 4 dias de incubação. As cinéticas de replicação do vírus foram realizadas em meio contendo soro e os resultados ainda estão sendo avaliados. Análises iniciais indicam que o vírus atinge o pico de replicação entre o segundo e terceiro dia pós infecção em ambos os substratos celulares testados.

**CONCLUSÃO** Estes resultados nos permitem concluir que o vírus Zika, quando cultivado em células Vero certificadas e aprovadas para produção de imunobiológicos de uso humano, produz altos títulos virais, apresenta efeito citopático e forma placas de lise, característica importante para quantificação viral. As próximas etapas deste projeto incluem cinéticas de replicação em meio livre de soro, produção de um banco de trabalho, estudos de estabilidade e inativação viral.

**PALAVRAS-CHAVE** zika, virus, replicação.



## **OTR9. PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA DE NEUTRALIZAÇÃO EM PLACA DE 96 POÇOS PARA AVALIAR A IMUNOGENICIDADE DA CAXUMBA EM VACINA COMBINADA.**

Emily Hime Miranda<sup>1</sup>; Stephanie Almeida da Silva<sup>1</sup>; José Henrique Rezende Linhares<sup>1</sup>; Vanessa de Oliveira Santos<sup>1</sup>; Renata de Carvalho Pereira<sup>1</sup>; Kátia Paulino Ribeiro de Souza<sup>1</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>; Érika Martins de Carvalho<sup>2</sup>.

1 Biomanguinhos;

2 Farmanguinhos.

**INTRODUÇÃO** A caxumba é uma doença infecto-contagiosa imunoprevenível por vacinação. A imunogenicidade vacinal é avaliada através de testes sorológicos. O Teste de Neutralização (PRNT) apresenta vantagens frente a outros testes por ser mais específico na detecção de anticorpos neutralizantes. O mesmo apresenta morosidade para a obtenção de um resultado, como também variabilidade se as etapas do processo e critérios de aceitação não estiverem definidos.

**OBJETIVO** O objetivo deste trabalho foi avaliar a interferência do tempo de neutralização na ligação vírus - soro; determinar o melhor ponto de corte (*cut-off*) do teste e estabelecer critérios de aceitação em relação à faixa de variação do vírus e dos soros padrões após o estabelecimento das condições analíticas.

**METODOLOGIA** Inicialmente, o vírus estoque foi diluído em placas de 96 poços, mimetizando o PRNT. De forma a definir um teste que proporcione melhor visualização do fenótipo de placa de lise, ou seja, que apresente qualidade na definição atrelado a diluição viral, diferentes condições analíticas foram analisadas: tipos de tampões para o controle de pH, concentração da solução semi-sólida / CMC, tempo de incubação final, tempo de neutralização, e o tempo de adsorção e sedimentação celular. Posteriormente utilizando um painel sorológico contendo 126 soros pré e pós-vacinais de crianças imunizadas com a vacina tríplice viral foi construída a curva ROC. Em seguida foram determinadas as faixas que melhor classificam os resultados dos soros testados (positivo, negativo ou indeterminado).

**RESULTADOS** As condições analíticas definidas foram: diluição viral para obtenção de aproximadamente 30 placas de lise/poço, bicarbonato de sódio como





tampão no meio de cultura, meio semi-sólido 1,5%, tempo de adsorção de 3 horas e tempo de incubação final de 4 dias. Com relação ao tempo de neutralização, duas horas se demonstrou mais adequada ao ensaio. A partir da construção da curva ROC foi definido um ponto de corte de 23 (recíproca da diluição). De acordo com o ponto de corte foram estabelecidas faixas interpretativas para o teste: negativo:  $\leq 15 - 23$ ; indeterminado:  $> 23 - 50$ ; positivo:  $> 50$  (recíproca da diluição). Critérios de aceitação do teste foram estabelecidos para o controle viral (13 a 22) e para os soros controle (negativo: 19,26; positivo baixo: 96,11; positivo médio: 396,13; e positivo alto: 1723,31).

**CONCLUSÃO** Este estudo promoveu melhoria na eficiência e eficácia da técnica.

**PALAVRAS-CHAVE** neutralização, Caxumba, padronização, anticorpos.





## OTRI0. STUDY OF MONOCLONAL ANTIBODY CONFORMATIONAL BY INTRINSIC FLUORESCENCE SPECTROSCOPY.

Hilton Jorge Nascimento<sup>1</sup>; Luãna Elisa Liebscher Vidal<sup>1</sup>; Patricia Barbosa Jurgilas<sup>1</sup>; Priscila Muniz da Paz Gilio Guzzo<sup>1</sup>; Marcia Arissawa<sup>1</sup>; José Godinho da Silva Junior<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz.

**INTRODUCTION** Monoclonal antibodies (mABs) are biomolecules commercially produced for therapy and diagnosis. The potential commercial use of mAbs is strongly linked to its stability. In this sense, accelerated thermal screening studies are useful to provide information about stability protein formulations at different conditions, such as pH, ionic strength, buffer composition and stabilizers. The intrinsic tryptophan (W) fluorescence spectroscopy (ITF) technique can be employed in an accelerated thermal screening protocol because it is fast, economical, robust and ready-to-use.

**OBJECTIVE** Evaluate the potential conformational changes of 4G2 monoclonal antibody by tryptophan emission fluorescence spectra analysis in different conditions.

**METHODOLOGY** Conformational changes of the monoclonal antibody 4G2 was monitored by tryptophan fluorescence emission spectrum (Jasco FP-6500 spectrofluorometer). In this sense, the anti-4G2 was incubated at different concentrations (0.5 mg/mL, 2mg/mL, 6 mg/mL, 10 mg/mL and 14 mg/mL) and pH (4.0 – 10.0). The kinetic thermal denaturation of the antibody was also determined in a temperature range (20°C - 85°C). The excitation wavelength used was 280 nm and emission wavelength was scanned from 295 nm to 415 nm. The light scattering analysis was performed in the wavelength range of 300-340nm using 320nm as excitation wavelength. The temperature of 65°C (inflection point) was used to observe the behavior of three stabilizers (arginine 125mM, glycerol 10% and tween 20, 0.01%) using the same analysis parameters. Superdex 200 HR10/30 sieving exclusion chromatography (SEC) was used to evaluate molecule aggregation or degradation.

**RESULTS** The sieving exclusion chromatography peak homogeneity (91.3%) related to 4G2 monomer form showed a molecular weight of 150.000. The maximum fluorescence emission wavelength ( $\lambda_{max}$ ) was 331±1 nm and the mass center was





344.6nm at 20°C. The emission fluorescence ratio at 330nm and 350nm (F330/350) increased in the pH interval 5.0 to 9.0. Immunoglobulin aggregation forms in different pH measured by SEC analysis were: pH 4.0 (11.50%); pH 7.0 (8.72%) and pH 10 (10.23%). The fluorescence thermogram showed a progressive decay on F330/F350 with the increase of temperature. The mass center thermogram analysis showed a maximum shift of 3,23nm at 85°C. The gradual increase on protein aggregation was also showed by LS analysis in the temperature range (65°C-85°C) being this behavior also observed by SEC. The stabilizers used were not able to prevent aggregation/denaturation at 65°C, as observed by F330/F350 ratio and SEC.

**CONCLUSION** Our results point out that pH and temperature modifications induce conformational changes around tryptophan residues of 4G2mAB as demonstrated by ITF. Such analytical tool is suggested to be used in screening conditions that can prevent monoclonal antibody denaturation/aggregation process, important step in the immunoglobulin stability studies.

**KEYWORDS** mAB, stability, fluorescence.





## **OTRII. ROTAVÍRUS A GENÓTIPO G26P[19] EM CRIANÇA HOSPITALIZADA COM GASTROENTERITE AGUDA: SEGUNDA DESCRIÇÃO MUNDIAL E CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA COMPLETA.**

Mariela Martinez Gomez<sup>1</sup>; Alexandre Madi Fialho<sup>1</sup>; Rosane Maria Santos de Assis<sup>1</sup>; Eduardo de Mello Volotão<sup>1</sup>; Christian Sagave Mazzoco<sup>1</sup>; Juliana da Silva Ribeiro de Andrade<sup>1</sup>; Sergio da Silva e Mouta Junior<sup>1</sup>; Myrna Santos Rocha<sup>2</sup>; José Paulo Gagliardi Leite<sup>1</sup>.

1 Laboratório de Virologia Comparada e Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz;  
2 Hospital Municipal Jesus, Rio de Janeiro, Brasil.

**INTRODUÇÃO** Em 2006, a Organização Pan Americana da Saúde declarou que a introdução de uma vacina para rotavírus A (RVA) era prioridade nas Américas com a meta de prevenir as mortes e hospitalizações causadas por este vírus. Atualmente, 80 países já incorporaram uma das duas vacinas disponíveis (Rotarix® - RV1, RotaTeq®- RV5) em seus Programas de Imunizações, sendo que o Brasil introduziu a RV1 em março de 2006. Após a introdução da RV1 no Brasil observou-se uma importante redução de hospitalizações e mortalidade relacionadas às doenças diarreicas agudas (DDA); assim como flutuação temporal e geográfica dos genótipos de RVA. Diferentes fatores podem influenciar a flutuação de genótipos de RVA: a) introdução de vacinas; b) fluxo contínuo migratório de pessoas no mundo; c) emergência de variantes virais; d) diversidade genética dos diferentes genótipos; e) transmissão entre espécies; f) dose infectante e resistência do vírus no ambiente; g) fatores relacionados ao hospedeiro; g) mecanismos genéticos de evolução viral, entre outros. Eventualmente, novas variantes genéticas e antigênicas dos vírus circulantes poderão surgir, assim como algumas variantes poderão não ser mais detectadas na população.

**OBJETIVO** Realizar a caracterização molecular dos 11 genes (constelação gênica) de RVA genótipo G26P[19] detectado em amostra fecal de uma criança hospitalizada com DDA na cidade do Rio de Janeiro em 2015.

**METODOLOGIA** Os ácidos nucleicos foram extraídos pela metodologia descrita por Boom *et al.* (1990). A amplificação dos 11 genes virais foi realizada utilizando-se iniciadores consensuais e Kit OneStepRT-PCR® (Qiagen®). Para obtenção da







constelação gênica foi realizado *primer walking*. As sequências foram obtidas através da plataforma de sequenciamento PDTIS (Fiocruz), editadas e analisadas usando os programas: Bioedit v.7.2.3. O genótipo viral foi definido comparando-se as sequências obtidas com aquelas disponíveis no NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e o site RotaC (<http://rotac.regatools.be/>).

**RESULTADOS** A análise dos 11 genes virais VP7-VP8-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5-VP1-VP2-VP3-VP6 revelou a seguinte constelação gênica: G26-P19-A8-N1-T1-E1-H1-R1-C1-M1-I5. Observou-se que o gene que codifica para a proteína NSP5 apresentou uma duplicação de 280 nucleotídeos no final da sequência do gene.

**CONCLUSÃO** A circulação do genótipo G26P[19] na população humana foi descrita pela primeira vez em 2014, em crianças com DDA no Vietnã, sendo este genótipo definido como um *reassortment* humano-suíno. Este é o segundo relato deste genótipo e de sua constelação gênica no mundo. Estudos adicionais são necessários para esclarecer se este genótipo representa um caso isolado ou se o mesmo está circulando na população brasileira.

**PALAVRAS-CHAVE** rotavírus, G26P19, duplicação gênica.



## OTRI2. INFLUÊNCIA DE DIFERENTES TIPOS DE MATERIAL BIOLÓGICO NA QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS NEUTRALIZANTES PELO MICRO PRNT DE FEBRE AMARELA E SARAMPO.

Marisol Simoes<sup>1</sup>; Renata Carvalho Pereira<sup>1</sup>; Stephanie Almeida da Silva<sup>1</sup>; Emily Hime Miranda<sup>1</sup>; Ana Carolina R. A. Cajaraville<sup>1</sup>; José Henrique Rezende Linhares<sup>1</sup>; Vanessa de Oliveira Santos<sup>1</sup>; Sheila Maria Barbosa de Lima<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos.

**INTRODUÇÃO** O Teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT, do inglês *Plaque Reduction Neutralization Test*) é considerado o teste mais sensível e específico para a quantificação dos anticorpos neutralizantes, sendo o método de referência para a avaliação da resposta imune protetora após a vacinação. O micro PRNT (realizado em placas de 96 poços) foi padronizado para o processamento de soros como material biológico. Não se conhecia a possível influência de variáveis como a presença de hemólise nos soros amostrais, bem como a utilização de plasma para a realização dos testes de neutralização. Portanto, é de fundamental importância avaliar o impacto dessas variáveis sobre os resultados (títulos de anticorpos neutralizantes) obtidos do micro PRNT.

**OBJETIVO** O presente estudo objetiva comparar os resultados gerados pelo micro PRNT para Febre Amarela e Sarampo, a partir do processamento de soro amostral sem hemólise, soro com hemólise e plasma EDTA coletados dos mesmos doadores.

**METODOLOGIA** Para esta avaliação foram utilizadas amostras de 300 voluntários do Estudo “Protocolo para Obtenção e Produção de Soros *In House* para Testes de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT)”. 300 amostras de soro, 300 de plasma EDTA e 300 de soros hemolisados foram processados de forma pareada para o micro PRNT de Febre Amarela e Sarampo.

**RESULTADOS** A análise comparativa entre as diferentes amostras biológicas mostrou um perfil mais alto de títulos de anticorpos neutralizantes para febre amarela obtidos do plasma quando comparados com os títulos obtidos dos soros, revelando uma baixa correlação ( $R^2 = 0,48$ ). Os resultados obtidos das amostras de soros hemolisados, no entanto, apresentaram títulos mais próximos daqueles obtidos dos soros, com uma





correlação mais alta ( $R^2 = 0,73$ ). As interferências do plasma e do soro hemolisado no título de anticorpos neutralizantes ficaram mais evidenciadas quando analisamos apenas as amostras negativas, em que 13% das amostras de soro classificadas como negativas foram classificadas como falso-positivas nas amostras de plasma ou soro hemolisado. A mesma abordagem foi realizada para pesquisa de anticorpos neutralizantes para sarampo. A análise dos resultados revelou uma alta correlação das dosagens entre soro e plasma ( $R^2 = 0,8552$ ) e soro e soro hemolisado ( $R^2 = 0,823$ ). Mas, houve uma queda na correlação quando avaliamos apenas as amostras negativas, com um aumento de aproximadamente 34% de amostras falso-negativas quando avaliamos o plasma e de 10% quando avaliamos soro hemolisado.

**CONCLUSÃO** Este estudo demonstrou que amostras biológicas diferentes de soro podem interferir na quantificação de anticorpos neutralizantes para febre amarela e sarampo por micro PRNT, aumentando as chances de se obter resultados falsos-positivos e falsosnegativos, respectivamente. Especialmente, para o micro PRNT de febre amarela, em que os dados gerados de plasma apresentam uma baixa correlação com os dados gerados de soro.

**PALAVRAS-CHAVE** PRNT, soro, soro hemolisado, plasma, anticorpos neutralizantes, Febre Amarela, Sarampo.



### OTRI3. COMPARATIVE MOLECULAR DOCKING ANALYSIS AMONG SIX SCFV MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HEPATITIS B VIRUS SURFACE ANTIGEN.

Artur Hermano Sampaio Dias<sup>1</sup>; Márcia Arissawa<sup>2</sup>; Alexandre Bezerra Conde Figueiredo<sup>2</sup>; João Hermínio Martins da Silva<sup>1</sup>.

1 Fiocruz-CE;  
2 BM.

**INTRODUÇÃO** Hepatitis B figures as one of the biggest public health problems worldwide. Thereafter, some effort should be dedicated in order to develop efficient diagnostic and therapeutic tools as based on the monoclonal antibodies technology. In this context, monoclonal antibody fragments, as scFv, present some advantages in immunotherapeutical applications. The scFv format consists of variable regions of heavy (VH) and light (VL) chains, which are joined together by a flexible peptide linker. The length of the flexible DNA linker and their amino acid composition plays an important role in the design of a viable linker peptide. The study of these aspects can lead to the improvement of the scFv activity.

**OBJECTIVE** This study aimed to evaluate the contribution of different linkers on the conformational structure of scFv fragments in order to evaluate the best *in silico* performance in a docking against HBsAg.

**METODOLOGIA** In this study, we carried out an *in silico* homology modeling of two distinct primary structures of mABs: two scFv having the same Complementarity Determining Regions (CDRs) named clones A and B. The comparative modeling was carried out by the software Modeller 9.15, using Protein Data Bank tridimensional structures as templates. To each constructed clone, 3 different linkers were added separately: a small one, 8 residues long (GGGSGGGG) – HBCLA1 e HBCLB1 –, a large one, 15 residues long (GGGGSGGGSGGGGS) – HBCLA2 e HBCLB2 – and an intermediate, 10 residues long (GGGGSGGGGS) – HBCLA3 e HBCLB3. The POPS server was used to determine which CDR residues were active. The HBsAg active residues were identified by the 3DLigandSite server. All active residues were used as input in a molecular protein-protein docking in HADDOCK 2.2 server. Thus, HADDOCK score and Root Mean Square Deviation (RMSD) were compared





amongst all six scFv-HBsAg clusters, aiming to find the lowest values for both parameters.

**RESULTS** The results showed that clone A, with a 10 residues-long linker (HBCLA3), was the best combination among all others: its score and RMSD were the lowest, respectively:  $-134.2 \pm 0.7$  and  $0.9 \pm 0.5$ . Additionally, the second best score was also from a clone A combination: HBCLA1, whose score was  $-133.2 \pm 8.8$ , but this combination (with a 8 residues-long linker) showed the worst RMSD:  $24.4 \pm 0.0$ . The lower scores depicts better interaction with the antigen.

**CONCLUSION** Based on the comparison among three different linkers in the scFv fragment by *in silico* analysis, it can be concluded that an intermediate-length linker is a good fit for the coupling between our scFv and HBsAg, favouring the coverage of the binding pockets on HBsAg surface. Molecular dynamic analysis and alanine scanning are to be done in order to identify other structural features that can contribute to the improvement of the antibody-antigen interaction.

**KEYWORDS** scFv, Hepatitis B, linker peptide, molecular docking.





## **OTRI4. IL28B POLYMORPHISMS: POPULATION GENETICS AND RELEVANCE IN THE CONTEXT OF BRAZILIAN ADMIXED POPULATIONS.**

Lucia Elena Alvarado-Arnez<sup>1</sup>; Isabelle de Oliveira Moraes<sup>1</sup>; Andrea Marques Vieira da Silva<sup>2</sup>; Fernanda Kehdy<sup>1</sup>; Giordano B. Soares-Souza<sup>3</sup>; Wagner C. S. Magalhães<sup>3</sup>; Thiago P. Leal<sup>3</sup>; Nathalia M. Araujo<sup>3</sup>; Eduardo Tarazona-Santos<sup>3</sup>; Milton Ozório Moraes<sup>1</sup>.

1 Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz;

2 Bio-Manguinhos / Fiocruz;

3 Departamento de Biologia Geral / UFMG.

**INTRODUCTION** It has been demonstrated the relevance of host genetic polymorphisms in IL28B as predictors of therapeutic failure during HCV treatment with pegylated interferonribavirin

**OBJECTIVE** To better understand the genetic architecture of IL28B single nucleotidepolymorphisms (SNPs) in Brazilian populations, which could result in more informative markers for drug response in HCV patients undergoing treatment.

**METHODOLOGY** We selected eight IL28B SNPs from literature associated with failure during HCV treatment. Two other tag-SNPs flanking IL28B were included. Data for the 10 polymorphisms was extracted from populations included in the 1000Genomes Project European (EUR, N=503), African (AFR, N=661), Admixed (AMR, N=347), Asian (ASN, N=993) and from the three Brazilian populations included in EPIGEN Project Bambui-MG, Pelotas-RS and Salvador-BA (N=1442, 3736 and 1309 respectively). We also genotyped these 10 SNPs in a population of healthy donors from a blood bank in Rio de Janeiro (RIO, N=135) using TaqMan SNP genotyping assays (ThermoFisher Scientific, USA). Allelic discrimination was performed in StepOnePlus RealTime-PCR. Using Haploview software we determined linkage disequilibrium (LD), and populations were compared through the  $r^2$  statistic and haplotype frequencies. To increase the number of potential markers of interest, annotation was performed on the SNPs genotyped in EPIGEN using MASSA tool (Multi-Agent System for SNP Annotation).

**RESULTS** Individuals from RIO had an intermediate LD pattern compared to





ancestral EUR and AFR populations from 1000Genomes dataset. We observed a LD block of 5 SNPs in EUR ( $r^2 > 0.5$ ) that could be inferred by rs12979860; in comparison RIO had lower values of  $r^2$  between the same pairs of markers. Concordantly,  $r^2$  between rs12979860 and rs8099917 in RIO was 0.34 in the same trend as for EUR ( $r^2 = 0.42$ ). The most frequent haplotype was the same between RIO, 1000G and EUR (frequency between 0.20-0.28). When evaluating haplotype combinations for rs12979860/rs8099917 that simultaneously carry the alleles associated with HCV therapeutic failure (T/T), RIO population displayed higher frequency (18%) compared to 1000G and EUR (both 14%). Out of 10 SNPs, the EPIGEN dataset had information for 5 polymorphisms including rs8099917. LD patterns for Salvador showed a marked difference with lower  $r^2$  values compared to Bambui and Pelotas. RIO showed similar  $r^2$  values compared to Bambui and Pelotas. MASSA annotation showed other four SNPs reported in the Pharmacogenomics Knowledge Base (PKGB) associated with drug responses outcomes in HCV. Based on EPIGEN populations we observed that these candidate SNPs had no LD with rs8099917.

**CONCLUSION** Of the 10 SNPs initially evaluated, we observe that RIO has a characteristic structure that resembles with EUR, Bambui and Pelotas, but slightly differs towards Salvador, highlighting the importance of depicting genetic structure in Brazilian populations. Annotation and LD analysis suggests that other SNPs should be evaluated in the IL28B region for the Brazilian population.

**KEYWORDS** IL28B, polymorphism, linkage disequilibrium, haplotype, Brazilian populations.





## **OTR15. DESENVOLVIMENTO DA CULTURA PRIMÁRIA DE HEPATÓCITOS DE EMBRIÃO DE *Gallus gallus domesticus* PARA DETECÇÃO DE AGENTES ADVENTÍCIOS EM VACINAS VIRAIS.**

Mariana Nogueira da Silva Teixeira<sup>1</sup>; Jaline Coutinho Silvério Antunes<sup>1</sup>; Pedro Augusto Alves<sup>1</sup>; Marcelo Alex de Carvalho<sup>2</sup>; Renata Soares Dias de Souza<sup>3</sup>; Natália Pedra Gonçalves<sup>1</sup>; Daniel da Silva Guedes Jr.<sup>1</sup>.

1 Bio-Manguinhos / Fiocruz;

2 Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro;

3 Instituto Oswaldo Cruz.

**INTRODUÇÃO** A utilização de cultura de células para a produção de imunobiológicos apresenta possíveis riscos à biossegurança do produto, dentre eles a presença de vírus ou agentes oriundos dos insumos utilizados no preparo e manutenção da cultura, modelo animal, ambiente, equipamentos, manipuladores, dentre outros. Classifica-se como agente adventício qualquer microrganismo ou vírus contaminante de cultura de células ou matérias-primas que tenham sido introduzidos não intencionalmente durante o processo produtivo. As diretrizes regulamentares que norteiam as análises mandatórias ao Controle de Qualidade incluem a realização de testes de detecção através de substratos celulares, que oferece vantagens quando comparados aos métodos imunológicos e biomoleculares, contudo sem excluí-los. A implementação da cultura primária de hepatócitos consiste em uma plataforma que permite a multiplicação destes agentes, aumentando assim as chances de detecção por efeito citopático e hemadsorção. A literatura científica descreve casos de contaminação por agentes adventícios, enfatizando a relevância da compreensão do processo produtivo para identificar possíveis fontes de contaminação, bem como a importância de um controle de qualidade extensivo para resguardar a eficácia e pureza do produto antes de ser lançado no mercado. Ademais, o desenvolvimento desta cultura em Bio-Manguinhos contribuiu para o cumprimento de uma das etapas da transferência de tecnologia para nacionalização da vacina contra Sarampo, Caxumba e Rubéola, com a implementação desta análise *in house*.

**OBJETIVO** Este trabalho teve como objetivo padronizar a metodologia para a cultura primária de hepatócitos de embriões SPF de *Gallus gallus domesticus* a ser implementada no Controle de Qualidade de Bio-Manguinhos como mais uma plataforma de pesquisa de agentes adventícios, garantindo assim a segurança viral







do produto final.

**METODOLOGIA** Para a obtenção do fígado, foram utilizados 4 ovos SPF embrionados de 16 a 18 dias. Os embriões foram eutanasiados por decapitação e em seguida a cavidade celomática foi aberta para excisão do fígado e posterior fragmentação. Procedeu-se com a digestão enzimática com colagenase a 0,05% e separação celular por sucessivas centrifugações e posterior decantação. A suspensão celular obtida foi quantificada e ajustada para  $1,5 \times 10^6$  células/mL, e em seguida inoculada em placa de 6 poços revestida com colágeno. A cultura primária foi incubada em estufa a  $37^\circ\text{C}$  e monitorada diariamente para verificar a formação da monocamada.

**RESULTADOS** Imediatamente após a inoculação em placa, foi observada presença predominante de células arredondadas, com vesículas de lipídeo, correspondentes aos hepatócitos. Estas células espalharam no substrato após 4h de adesão, formando ilhotas de hepatócitos após 48h com presença de alguns fibroblastos. Em aproximadamente 4 dias, foi possível obter uma monocamada confluenta de hepatócitos poligonais com vesículas lipídicas nos citoplasma e núcleo contendo de 1 a 2 nucléolos.

**CONCLUSÃO** A metodologia para o isolamento e cultura primária de hepatócitos foi padronizada, com tempo de sobrevivência da cultura em até 10 dias.

**PALAVRAS-CHAVE** agentes adventícios, controle de qualidade, cultura primária, hepatócitos, tríplice viral.



## OTRI6. IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GÊNICAS COM UTILIDADE CLÍNICA EM CÂNCER.

Fabricio K. Marchini<sup>1</sup>; Karla Santos Souza<sup>2</sup>; Fabiana Poerner<sup>2</sup>; Elizabeth Sousa da Cunha<sup>2</sup>; Marco A. Krieger<sup>3</sup>.

1 Fiocruz Paraná;

2 IBMP - Instituto de Biologia Molecular do Paraná;

3 Fiocruz Paraná; Instituto de biologia molecular do Paraná (IBMP).

**INTRODUÇÃO** O câncer é uma doença heterogênea que surge a partir do acúmulo de mutações e outras alterações genéticas e epigenéticas, como amplificações, inserções e deleções, ativando oncogenes ou desativando genes supressores de tumor. A classificação dos tumores por características moleculares tem sido utilizada para estratificar os tipos tumorais buscando abordagens terapêuticas mais eficientes, com a prescrição de drogas mais adequadas para cada perfil molecular e menos efeitos indesejados. Utilizando painéis de primers para amplificação e sequenciamento para identificar as variantes gênicas presentes no tumor é possível, através de um único teste, a detecção do perfil molecular presente em um tumor de um paciente.

**OBJETIVO** O objetivo do trabalho é desenvolver um kit diagnóstico com especial interesse na seleção de regiões gênicas que possam permitir ao oncologista escolher a terapia adequada para o tratamento do câncer baseado nas características moleculares do tumor.

**METODOLOGIA** O desenvolvimento inclui a seleção de regiões gênicas de interesse, desenho de primers para estas regiões, teste em software para identificação de dímeros, padronização de uma reação de PCR multiplex para a amplificação das regiões e sequenciamento dos amplicons, que será realizado utilizando a plataforma Ion Torrent PGM, juntamente com o desenvolvimento de scripts computacionais para análise das sequências.

**RESULTADOS** Até o momento foram desenhados, testados para dímeros e validados em pcr individuais, 77 pares de primers para 22 genes. Estas regiões possibilitam identificar 335 variantes e assim direcionar a escolha de 32 drogas existentes.

**CONCLUSÃO** As próximas etapas do projeto compreendem a padroniza-





ção das reações de PCR em multiplex e o sequenciamento de DNA de amostras de pacientes, frescas e parafinadas, para validação do teste. O mapeamento genético de cada tipo de tumor possibilita sua classificação molecular, fundamental para o diagnóstico individual, e a escolha de terapia mais adequada para cada paciente.

**PALAVRAS-CHAVE:** câncer, ngs, diagnóstico, medicina personalizada.





## **OTRI7. DIAGNÓSTICO UNIVERSAL, OU PANDIAGNÓSTICO, DE TODOS OS PATÓGENOS HUMANOS POR PCR MULTIPLEX E SEQUENCIAMENTO MASSIVO PARALELO.**

Fabricio K. Marchini<sup>1</sup>; Aline Castro Rodrigues<sup>2</sup>; Carla de Paula Lima<sup>2</sup>; Fabiana Poerner<sup>2</sup>; Lígia Cristina Kalb<sup>2</sup>; Luciano Luna<sup>2</sup>; Marco A. Krieger<sup>1</sup>.

- 1 Fiocruz Paraná; Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP);
- 2 Instituto de Biologia Molecular do Paraná (IBMP).

**INTRODUÇÃO** O espectro de doenças que acometem o homem, na sua maioria infecções respiratórias e entéricas, é responsável por considerável morbidade e mortalidade. Essas infecções são causadas por uma enorme variedade de microrganismos eucariotos, procariotos e virais. Com o desenvolvimento de métodos de diagnóstico molecular e sequenciamento de nova geração, é possível detectar e identificar de forma rápida e precisa esses agentes. Da mesma forma, a propagação desses microrganismos foi acentuada com as facilidades de deslocamento aéreo e a aglomeração de grande número de indivíduos provenientes de vários países em eventos internacionais.

**OBJETIVO** Diante deste panorama, o presente trabalho tem o objetivo de desenvolver um método universal de diagnóstico, ou pandiagnóstico, para detecção e identificação de todos os patógenos humanos conhecidos, para ser utilizado como ferramenta de vigilância epidemiológica durante grandes eventos internacionais.

**METODOLOGIA** O método baseia-se na amplificação por PCR em único tubo, e sequenciamento massivo paralelo, de sequências específicas para cada patógeno humano, sendo eucarioto, procarioto e vírus, presentes em diferentes tipos de amostras biológicas como sangue, secreções respiratórias, saliva, aspirado pulmonar, urina, fezes e líquor.

**RESULTADOS** Até o momento, foram desenhados 2575 primers para a detecção de 830 espécies (180 eucariotos, 248 procariotos e 402 vírus), compreendendo cerca de 95% de todos os patógenos humanos conhecidos, além do desenho de genes sintéticos para servirem de controle dos alvos nesta metodologia diagnóstica.

**CONCLUSÃO** O desenvolvimento deste projeto permitirá a criação de uma





central analítica de alta tecnologia e biossegurança para ser utilizada no diagnóstico de patógenos humanos em grandes eventos internacionais, como os Jogos Olímpicos e Copa do Mundo de Futebol.

**PALAVRAS-CHAVE** diagnóstico, ngs, doença infecciosa, pcr multiplex.





## OTRI8. SECRETOME ANALYSIS OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII MICROALGAE IN RESPONSE TO AUTOPHAGY INDUCING CONDITIONS.

Freire, D.P.B.<sup>1</sup>; Costa, T.D.<sup>2</sup>; Santos Silva, G.<sup>2</sup>; Aguilar, C.<sup>3</sup>; Zingali, R.B.<sup>2</sup>; Rodrigues, S.P.<sup>2</sup>.

1 Bio-Manguinhos; IBqM - UFRJ;

2 IBqM - UFRJ; Pólo Xerém - UFRJ;

3 The University of Texas MD Anderson Cancer Center.

**INTRODUCTION** *Chlamydomonas reinhardtii* (Cr) microalgae secretes extracellular vesicles (EVs) but factors affecting EVs formation and release are unknown. In mammals, these processes are associated with autophagy. In Cr, autophagy is triggered by nitrogen deprivation and exposure to rapamycin. However, the correlation between autophagy and EVs formation in photosynthetic cells is unexplored.

**OBJECTIVE** Evaluate the effects of nitrogen deprivation and rapamycin exposure on Cr protein secretion.

**METHODOLOGY** A prediction of Cr proteins potentially secreted in EVs using 23,000 non-redundant protein sequences known to be present in other organisms' EVs (EVpedia database) to interrogate the Cr proteome (19,526 sequences from Phytozome v5.5). 3,600 (18.4% of Cr proteome) positive blast hits (Cr EVs-predicted proteins, Cr-EVs-PP) were obtained. To verify the actual secretion of the Cr-EVs-PP, mid-log phase cc-124 cells were cultured ( $5.5 \times 10^6$  cells/mL, n=3) in TAP medium (+N), TAP containing 5  $\mu$ M rapamycin (+R) or TAP without nitrogen (-N). After 17 hours, a portion of each culture supernatants obtained by centrifugation were freeze-dried and the other part were ultracentrifuged (EVs secretome) and evaluated by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) technique.

**RESULTS** Cr derived-proteins accumulated in -N (25 mg/mL) and +R (3 mg/mL) compared to +N (< 1 mg/mL). 10% SDS-PAGE protein separation and Sypro Ruby staining revealed complex electrophoretic profiles of proteins ranging from 250 to 20 kDa. Preliminary *in gel* trypsin protein digestion and LC-MS/MS allowed the confident (at least 2 peptides, P < 0.05, FDR < 1%) identification of 24 proteins in +R, and 38 proteins in -N samples, out of which 13 and 12, respectively, are

198





Cr-EVs-PP including the EVs' marker HSP70A. The NTA revealed a higher number of 90 to 100 nm particles in the supernatant of +R ( $3.8 \times 10^8$  part/mL) compared to -N ( $5.8 \times 10^7$  part/mL) and +N ( $6.0 \times 10^7$  part/mL) cultures.

**CONCLUSION** The supernatant of Cr cultures deprived of nitrogen or supplemented with rapamycin presented more proteins than control cultures. The NTA suggested more exosomes (90 to 100 nm particles) in the supernatant of +R than -N and + N cultures. The correlation between autophagy and EVs formation have been indicating proteins, which can open up new possibilities for biotechnological research in *Chlamydomonas*. The proteomic analysis of TAP, TAP+Rap and TAP-N is still in progress.

**KEYWORDS** algae, secretome and vesicles.





**40**  
ANOS



Ministério da Saúde  
**FIOCRUZ**  
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da  
Saúde

