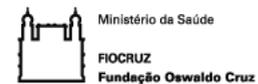


Anais do VI Seminário Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos



VI Seminário Anual
Científico e Tecnológico
de Bio-Manguinhos

A stylized graphic logo composed of several vertical and horizontal lines of varying lengths, creating a geometric, abstract shape that resembles a building or a network structure.

Anais do VI Seminário Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos

Rio de Janeiro
8, 9 e 10 de maio de 2018

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS**Projeto Gráfico e Diagramação**

Gisele Corrêa Miranda

Revisão Final

Cristina de Albuquerque Possas

Apoio Legal

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

Produção

Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos

Rio de Janeiro, RJ - 21040-360

Telefone: (21) 3882.7182

email: sact@bio.fiocruz.br

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

S471

Seminário Anual Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos (6. : 2018 : Rio de Janeiro, RJ).

Anais do VI seminário anual científico e tecnológico [recurso eletrônico] : 8-10 de maio de 2018 / Organização: Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos. – Rio de Janeiro: Bio-Manguinhos, 2018.

192 p.

Edição Digital.

ISBN:

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

CDD 303.483

CRÉDITOS**PRESIDENTE DE HONRA DO VI SACT**

Nísia Trindade de Lima, Presidente da Fundação Oswaldo Cruz

DIRETORIA DE BIO-MANGUINHOS

Maurício Zuma Medeiros, diretor

Rosane Cuber Guimarães, vice-diretora de Qualidade

Luiz Alberto dos Santos Lima, vice-diretor de Produção

Sotiris Missailidis, vice-diretor de Desenvolvimento Tecnológico

Priscila Ferraz Soares, vice Diretora de Gestão e Mercado

COMITÊ EXECUTIVO

Akira Homma, Cristiane Frensch Pereira, Gisele Corrêa Miranda, Maurício Zuma, Renata Ribeiro Gómez de Souza, Vinícius Bezerra de Melo.

COORDENAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

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

MEMBROS DA COMISSÃO CIENTÍFICA

Ana Paula Cossenza, Antonio Barbosa; Beatriz de Castro Fialho, Daniel Pacheco, Darcy Akemi Hokama, Elezer Monte Blanco Lemes, Isabella Manjud Maluf, Ivna Alana Silveira, José Procópio Moreno Sena, Luciane Pinto Gaspar, Marcia Arissawa, Marco Alberto Medeiros, Marcos da Silva Freire, Maria da Luz Fernandes Leal, Maria de Lourdes Sousa Maia, Martha Suarez-Mutis, Marilda Siqueira, Martín Hernán Bonamino, Patrícia Cristina da Costa Neves, Priscila Ferraz Soares, Rodrigo Coelho Ventura Pinto; Sotiris Missailidis, Tania Petraglia, Elba Lemos, Hilton Nascimento, João Miguel Estephano, José Cerbino, Milton Ozorio Moraes, Salvatore Giovanni De-Simone, Patricia Alvarez, Rosane Cuber, Renato Marchevsky.

COMISSÃO JULGADORA DE PRÊMIOS

João Baptista Risi, José Victor Bomtempo Martins, Marco Antonio Stephano, Maria Notomi Sato, Paulo Lee Ho.

CONTEÚDO**APRESENTAÇÃO..... 13****INTRODUÇÃO..... 14****VACINAS..... 17**

VAC.01 - Molecular characterization of tetanus toxoid used in conjugate vaccines produced by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ 18

VAC.02 - Perfil epidemiológico de cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C circulantes no Brasil no período pré e pós vacinal 20

VAC.03 - Estudo de fase 1, de segurança, e imunogenicidade, da vacina dupla viral para sarampo e rubéola, em adultos jovens 22

VAC.04 - Estudo comparativo da imunogenicidade da vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) nas apresentações monodose e multidoses, em lactentes 24

VAC.05 - Avaliação da resposta imune humoral contra proteína TRAP (*Thrombospondin-Related Adhesive Protein*) de *Plasmodium vivax* em populações de área endêmica brasileira 26

VAC.06 - Study of a Critical Process Parameter in the meningococcal C conjugate vaccine manufacturing developed by Bio-Manguinhos 28

VAC.07 - Montagem de controles internos para ensaios de PRNT: Uma necessidade e um grande desafio 30

VAC.08 - Yellow fever vaccine: development of an optimized freezing dryer cycle in industrial scale 32

VAC.09 - Avaliação da incerteza de medição como ferramenta para delineamento da zona cinza na determinação de anticorpos neutralizantes anti-Febre Amarela 34

VAC.10 - Mapeamento completo dos epítomos IgM e IgG do vírus da febre amarela e cinética de reconhecimento temporal por anticorpos humanos 36

VAC.11 - Padronização da tecnologia multiparamétrica de detecção de níveis de anticorpos induzidos pelos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* por citometria de fluxo 38

VAC.12 - Distribuição dos antígenos de superfície incluídos na vacina meningocócica 4CMenB em amostras brasileiras no período de 2010 a 2015 40

VAC.13 - Ultrasound and heterogenous catalysis assisted length reduction of *Neisseria meningitidis* serogroup C capsular polysaccharide 42

BIOFÁRMACOS..... 45

BIO.01 - Propostas de metodologias alternativas ao MTT para ensaio de potência do biofármaco Filgrastim 46

BIO.02 - Desenvolvimento de metodologia de obtenção e caracterização de lipossomas para uso em tratamento alternativo de tumores de mama 48

BIO.03 - Predição de epítomos lineares de células B pan- e genótipo-específicos em nucleoproteína de Hantavírus de importância clínica 50

BIO.04 - Expressão transiente e caracterização de construções biossimilares e *biobetter* do rituximabe 52

BIO.05 - Inhibitory effect of microalgae and cyanobacteria extracts on influenza virus replication and neuraminidase activity 54

BIO.06 - Estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de mama para avaliação do receptor ativado por protease como alvo terapêutico 56

BIO.07 - Modulação da expressão de IFITM3 via agonistas dos receptores CCR5 e CXCR4 e sua implicação na replicação dos vírus influenza 58

BIO.08 - Production of a scFv antagonistic to VLA-4 protein as a potential biopharmaceutical for chronic inflammatory diseases 60

BIO.09 - Expressão de um anticorpo monoclonal anti-PD-1 biossimilar ao Nivolumab 62

REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO..... 65

REA.01 - Identificação de epítomos lineares de célula-B específicos das proteínas de Envelope e Não-Estrutural 1 de vírus ZIKA 66

REA.02 - Seleção e avaliação de aptâmeros para detecção sorológica da proteína NS1 do vírus Zika 68

REA.03 - Preliminary evaluation of a novel rapid test for the diagnostic of chikungunya virus infection 70

REA.04 - Avaliação de proteínas recombinantes para uso no diagnóstico da hepatite C 72

REA.05 - High density peptide microarrays – an essential tool for fast development of serological assays: example of Hepatitis E Virus	74
REA.06 - Expressão e purificação das proteínas NS1 e NS5 do vírus Zika para utilização na seleção de aptâmeros	76
REA.07 - Diagnóstico sorológico e molecular para Zika vírus	78
REA.08 - Seleção e avaliação de aptâmeros para a proteína NS5 do vírus Zika.....	80
REA.09 - Mapeamento de epitopos de seis proteínas da membrana externa de <i>Leptospira interrogans</i> usando tecnologia de síntese peptídica de alto rendimento.82	
REA.10 - Padronização da microplataforma automatizada e de alto desempenho para análise de soroneutralização do vírus Zika baseada em apoptose (micro CRNT)....	84
REA.11 - Seleção e caracterização de aptâmeros contra proteína PBP2a para o diagnóstico de infecção por <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à metilina	86
REA.12 - Desenvolvimento de teste rápido para diagnóstico <i>point-of-care</i> de hepatite A	88

GESTÃO 91

GES.01 - Pregão eletrônico e melhoria das compras governamentais: evidências sobre as compras de material hospitalar e a percepção dos pregoeiros.....	92
GES.02 - Reengenharia de processos de gestão de documentos e informações: o caso Bio-Manguinhos	94
GES.05 - Impacto de grandes empreendimentos: proposição de modelo de avaliação de impacto durante a fase de implementação.....	96
GES.04 - Estudo exploratório do cenário mundial de biossimilares e comparação entre agências regulatórias nos temas: intercambialidade, extrapolação de indicação e nomenclatura.....	98
GES.05 - Cenário brasileiro e mundial do biofármaco L-asparaginase.....	100
GES.06 - Avaliação do impacto de uma ferramenta tecnológica inovadora de gerenciamento de dados na Pesquisa Clínica	102
GES.07 - Modelagem e análise dos processos como habilitadora da prestação de serviços biotecnológicos: o caso LATAM.....	104
GES.08 - Incremento da produção de metano em reator anaeróbio tratando mistura de resíduos gerados em Bio-Manguinhos/Fiocruz.....	106

GES.09 - Redesenho do processo de auditoria interna baseado em risco	108
GES.10 - Mapeamento e Avaliação dos Perigos e Pontos Críticos de Controle da produção do IFA de rubéola para vacina tríplice viral.....	110
GES.11 - Manutenção centrada em confiabilidade (MCC): a aplicação da análise de falhas para uma bomba centrífuga na Fundação Oswaldo Cruz	112
GES.12 - Projeto de implantação de um sistema de gerenciamento de informações laboratoriais – LIMS	114
GES.13 - <i>Data Science</i> aplicada ao planejamento operacional: um estudo de caso	116
GES.14 - Controle da contaminação por partículas viáveis e não viáveis, no envase asséptico de vacinas líquidas, baseado em risco	118
GES.15 - Proposta de alteração da frequência das análises <i>off line</i> de água purificada baseada em risco.	120

OUTROS TEMAS RELACIONADOS 123

OTR.01 - Combinando análises de citações de patentes e TRIZ em um método simples para a identificação de grandes inovações biotecnológicas	124
OTR.02 - Monitoramento dos surtos de Parotidite no município do Rio de Janeiro, 2014 a 2017	126
OTR.03 - Screening of proteins related to the immunological checkpoint Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) through the BioID method.....	128
OTR.04 - Traces of immunoediting during myeloproliferative neoplasm to secondary acute myeloid leukemia transition	130
OTR.05 - <i>Outsourcing</i> e Regulação Sanitária: Análise Comparativa de Requisitos e de Impactos na Indústria Farmacêutica	132
OTR.06 - Importância da Biossegurança na prevenção de incidentes/acidentes com perfurocantes ou escarificantes no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos / Fiocruz.....	134
OTR.07 - Avaliação de modelo murino de infecção por via intranasal para <i>Acinetobacter baumannii</i>	136
OTR.08 - Novo composto de calcona como um medicamento promissor anti-leishmania para uma doença idosa negligenciada: avaliação biológica usando a biodistribuição radiomarcada	138

OTR.09 - Desenvolvimento de ensaio baseado em qPCR para determinação de carga bacteriana em órgãos infectados por MRSA (methicilin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)	140
OTR.10 - Evaluation of neutralizing anti-HIV-1 response in individuals infected by viral subtypes prevalent in Brazil in relation to <i>env</i> gene	142
OTR.11 - Teste de Neutralização por Redução de Focos Virais (FRNT) como ferramenta para dosagem de anticorpos neutralizantes para Dengue	144
OTR.12 - Padronização de teste de neutralização por redução de focos (FRNT) para Zika como alternativa ao teste padrão-ouro PRNT	146
OTR.13 - Avaliação da suplementação do meio Earle 199 com bicarbonato de sódio em pó: aplicabilidade e impacto de custos	148
OTR.14 - Avaliação da expressão da osteopontina e suas isoformas de <i>splicing</i> alternativo na infecção pelo vírus influenza A	150
OTR.15 - Detecção e quantificação do vírus oncogênico Herpesvírus humano 8 em amostras de fluido oral utilizando curva padrão sintética	152
OTR.16 - Characterization of Respiratory Syncytial Viruses circulating in the northeast Brazilian region: epidemiological and molecular surveillance within the Influenza surveillance program	154
OTR.17 - Desenvolvimento de vetores lentivirais para inibição do vírus da hepatite B, via RNA de interferência	156
OTR.18 - Establishing a lyophilized presentation for mAb 4G2	158
OTR.19 - TET2 mutation in cellular reprogramming and hematopoietic differentiation	160
OTR.20 - Production of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells for preclinical testing using non-viral transposon vectors and a lymphoblastoid cell line (LCL) .	162
OTR.21 - Diversity change of Influenza A (H3N2) strains circulating in Brazil during 2017-2018: what expect for the next coming winter?	164
OTR.22 - Immune landscape in esophageal squamous cell carcinoma	166
OTR.23 - Experimental strategy form identifying membrane targets to diagnostic and treatment for breast cancer	168
OTR.24 - Clinical, laboratory and sonographic follow-up of Zika virus (ZIKV) infection in <i>Macaca mullata</i> pregnant rhesus macaque treated with sofosbuvir ...	170

OTR.25 - Diagnóstico clínico e sorológico de pacientes com suspeita clínica de arboviroses (Dengue, Zika vírus e Chikungunya)	172
OTR.26 - Screening of monogenic obesity gene <i>MC4R</i> in Brazilian patients with morbid obesity	174
OTR.27 - Screening for rearrangements in <i>RB1</i> / 13q14 through real-time PCR ...	176
OTR.28 - Targeted Next Generation Sequencing for <i>CFTR</i> gene analysis in a Brazilian cohort of cystic fibrosis patients	178
OTR.33 - Avaliação do método de floculação para recuperação viral de lixiviado de aterro sanitário	180

APRESENTAÇÃO

Prezado participante,

É com muito orgulho que estamos realizando o VI Seminário Científico e Tecnológico de Bio-Manguinhos. Este seminário foi idealizado por Akira Homma e Reinaldo Menezes Martins como uma oportunidade de reunir profissionais de diversas entidades de referência na produção, no ensino, no desenvolvimento tecnológico e na pesquisa e também especialistas de instituições nacionais e internacionais para discutir temas relevantes para a saúde pública brasileira e mundial na área de vacinas, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos.

Além de promover o debate em temas atuais, o seminário incentiva a produção técnica e científica na área, com novos espaços e oportunidades para jovens talentos, promove o intercâmbio de informações, propicia a formação de novas parcerias e a formação de redes colaborativas de pesquisa científica e tecnológica, criando um ambiente favorável à inovação.

Agradeço a comissão científica e a comissão independente de premiação pelo excelente trabalho que vem desenvolvendo ao longo desses anos e permitindo o sucesso do seminário.

Que as discussões e os resultados dos trabalhos apresentados neste seminário tragam resultados expressivos e possam ser revertidos para a sociedade brasileira.

Aproveitem ao máximo!



Maurício Zuma
Diretor de Bio-Manguinhos

INTRODUÇÃO

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, como parte das comemorações do seu aniversário de 42 anos, organiza este VI Seminário Anual Científico e Tecnológico (VI SACT). E vem organizando também, a cada 5 anos, um Simpósio Internacional. Ambos os eventos focalizam temas relacionados às áreas abrangidas pela instituição, ou seja, desenvolvimento tecnológico e produção de vacinas, reativos para diagnóstico laboratorial e biofármacos necessários para os programas de saúde do país.

São palestras de especialistas de diferentes instituições do país e do mundo que nos trazem informações atualizadas e permitem antever o estado da arte, as tendências, o futuro desenvolvimento e os novos produtos para estas áreas. As apresentações de peritos são complementadas com apresentações de trabalhos selecionados pela Comissão Científica e Tecnológica, 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 Independente de Avaliação de Prêmios, com os prêmios Oswaldo Cruz, Carlos Chagas e Alcides Godoy e de Jovem Talento Científico, com os prêmios Henrique de Azevedo Penna, Evandro Chagas e Sérgio Arouca, e que são contemplados inclusive com premiação em dinheiro.

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

Precedem o SACT, os 4 workshops, com participação de especialistas da área, apresentando, discutindo e tratando de temas específicos e de grande interesse para a área.

Este Simpósio, com mais de 400 inscrições e com 78 resumos aprovados, mostra o interesse da sociedade e da comunidade de imunobiológicos em alcançar o desiderato maior: ampliar o acesso da população a imunobiológicos importantes para a Saúde Pública.

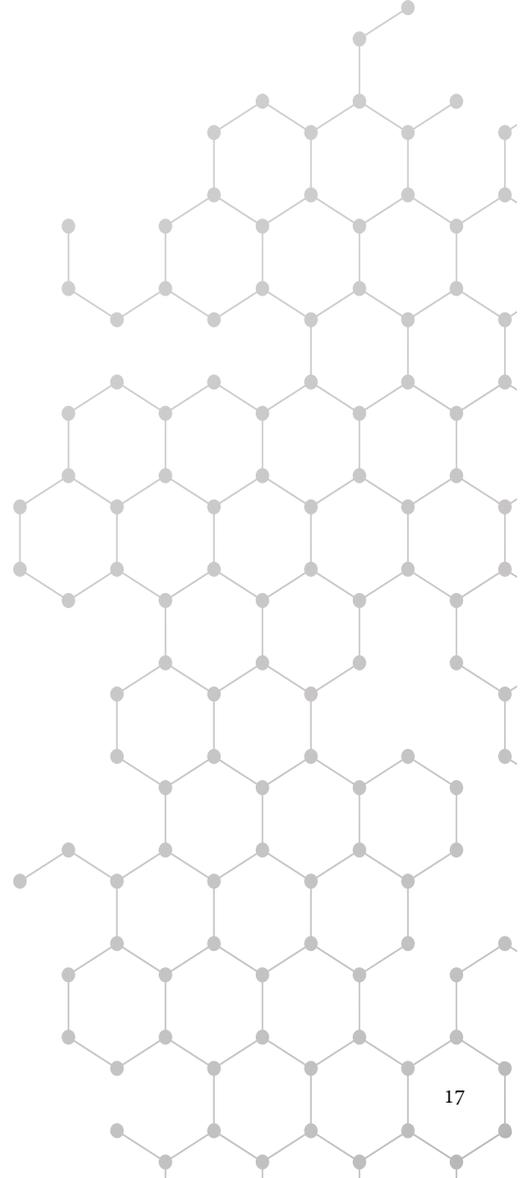
Agradecemos a todos que fizeram possível a organização deste evento, à Diretoria de Bio-Manguinhos, aos apresentadores das sessões, aos participantes estrangeiros e nacionais, aos patrocinadores e parabenizamos os premiados.



Akira Homma

Pela Comissão Científica e Tecnológica do VI SACT

VACINAS



VAC.01 - Molecular characterization of tetanus toxoid used in conjugate vaccines produced by Bio-Manguinhos/FIOCRUZ

Izabella Buty da Silva Corrêa¹; Rayane de Oliveira Guerra Marques¹; Renata Chagas Bastos^{1*}; Patrícia Barbosa Jurgilas¹; Hilton Jorge Nascimento¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introduction:

Tetanus Toxoid (TT) is a widely used protein to confer T-dependent immune response in polysaccharide conjugate vaccines. In this sense, the TT molecular characterization is important to obtain a profile of this carrier in order to optimize the conjugation process and to ensure biosafety of the product once it is an injectable product.

Objective:

Structural and molecular characterization of TT used in Bio-Manguinhos conjugated vaccine using physico-chemical and biochemical methods.

Methodology:

TT was submitted to size exclusion chromatography-SEC (Zorbax GF450) and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (4-12%). Isoelectric point was estimated using polyacrylamide gel isoelectric focusing (IEF) with a pH range 3-9 and the stability of the secondary and tertiary structure were analyzed by spectropolarimetry of circular dichroism and fluorescence spectroscopy, varying temperature between 25°C-85°C.

Results:

TT presented two protein peaks by SEC with 262.7 ± 0.1 kDa (17.2±4.5 % area) and 143.5 ± 7.1 kDa ($82.88 \pm 4.5\%$ area) suggesting dimeric and monomeric forms. By electrophoresis TT showed two bands with 141.62 and 115.17 kDa in the absence of DTT, and three bands with 147.42, 111.91 and 50.96 kDa using DTT. By IEF, TT presented a diffuse band with pI ranging from 4.75 to 5.0. Such data could be explained by the presence of truncated TT forms generated during detoxification process. The spectroscopic analysis showed that TT maintained its conformational stability until 60°C and its secondary structure over 85°C, as expected to a vaccine carrier.

Conclusion:

These data showed that TT is a stable protein. The presence of truncated forms of TT makes it mandatory to use different techniques to characterize the carrier to be used in polysaccharide conjugation processes. The methodologies applied were useful in the characterization of TT used in this study.

Keywords: conjugated vaccines; carrier proteins; tetanus toxoid

VAC.02 - Perfil epidemiológico de cepas de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C circulantes no Brasil no período pré e pós vacinal

Aline Carvalho de Azevedo^{1*}; Ivano de Filippis¹.

¹Fiocruz/INCQS.

Introdução:

A doença meningocócica (DM) é uma infecção grave causada pela bactéria *Neisseria meningitidis*, também conhecida como meningococo. A DM invasiva pode se manifestar como meningite ou septicemia. A doença é fatal em até 80% dos casos não tratados. A DM é uma doença de grande preocupação para a saúde pública, principalmente pela sua epidemiologia global.

A diversidade e a dinâmica das populações de *N. meningitidis* necessitam de sistemas de tipificação de alta resolução para a vigilância da DM. Estudos por tipificação molecular como a metodologia do MLST (Multilocus Sequence Typing) têm permitido um melhor entendimento da disseminação do meningococo, assim como nas relações existentes entre doença endêmica e epidêmica e na determinação das relações entre isolados em surtos localizados.

Objetivo:

Determinar o perfil epidemiológico de cepas de *N. meningitidis* circulantes no Brasil nos períodos pré e pós vacinal, atendendo às exigências de constante aperfeiçoamento na formulação de vacinas.

Metodologia:

1) Cepas de *N. meningitidis* - foram analisadas 120 cepas de origem clínica no período de 2007 a 2016, provenientes dos estados Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco e Bahia, todas classificadas como sorogrupo C.

2) MLST - amplificação e sequenciamento de fragmentos internos de 450-500 pares de base de sete genes constitutivos: *abcZ* (transportador putativo ABC), *adk* (adenilato-quinase), *aroE* (chiquimato desidrogenase), *fumC* (fumarato hidratase), *gdh* (glicose-6-fosfato desidrogenase), *pdhC* (piruvato desidrogenase), *pgm* (fosfoglucomutase). Utilização de um banco de dados (pubmlst.org/neisseria/) para determinação de alelos, tipos sequenciais (STs) e complexos clonais (cc).

Resultado:

Uma grande diversidade de tipos sequenciais foi observada, totalizando 39 diferentes ST. O mais prevalente foi o ST-3780, pertencente ao complexo clonal ST-103 e normalmente associado ao sorogrupo C, que é atualmente o sorogrupo mais frequente no Brasil. Até o presente momento, 13 STs ainda não foram associados a nenhum complexo clonal. Quatro cepas apresentaram perfil clonal que não se relacionou a nenhum ST depositado no banco de dados. Assim, dois novos ST serão sugeridos ao banco. Os complexos clonais ST-11 e ST-8 normalmente associados ao sorogrupo C não foram identificados no período pós vacinal, sugerindo que a introdução da vacina MenC conjugada em 2010 pode ter contribuído para a seleção de cepas do cc103, alterando a epidemiologia da DM no Brasil. O fenótipo circulante mais prevalente no Brasil no período estudado foi: C: P1.22, 14-6: F3-9: ST-3780 (cc103).

Conclusão:

Os dados gerados são essenciais para a gestão nacional mais eficaz da DM, além de serem inestimáveis nos estudos de biologia e evolução da população de meningococos. A constante atualização de informações referentes ao microrganismo responsável por uma doença grave é importante para a confirmação da eficácia da vacina atualmente disponibilizada no país.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*; Epidemiologia molecular; MLST

VAC.03 - Estudo de fase I, de segurança, e imunogenicidade, da vacina dupla viral para sarampo e rubéola, em adultos jovens

Eliane Matos dos Santos^{1*}; Tatiana Noronha¹; Isabelle Alves¹; Deborah Araujo¹; Ricardo Brum¹; Marisa Xavier¹; Maria de Lourdes de Sousa Maia¹; Jose Cerbino²; Marilda Siqueira³; Luiz Camacho⁴.

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2Fiocruz/INI;

3Fiocruz/IOC;

4Fiocruz/ENSP.

Introdução:

Apesar da existência de vacinas para sarampo e rubéola, alguns países não as introduziram em seus calendários de vacinação. Devido a este cenário, a Organização Mundial de Saúde propôs um plano para eliminação global do sarampo e da rubéola até 2020. Bio-Manguinhos/Fiocruz iniciou o desenvolvimento de uma vacina para sarampo e rubéola, por possuir expertise na produção da vacina tríplice viral.

Objetivo:

Avaliar a segurança e a reatogenicidade e, secundariamente, a imunogenicidade da vacina para sarampo(cepa Schwarz) e rubéola(cepa Wistar RA27/3) de Bio-Manguinhos/Fiocruz, como etapa de validação clínica exigida pela autoridade nacional reguladora.

Metodologia:

Ensaio clínico de fase I, não controlado, da vacina dupla viral, administrada em 30 adultos, do sexo masculino, os quais receberam duas doses da vacina dupla viral experimental, com intervalo de 42 a 51 dias entre as doses. A segurança e a reatogenicidade foram avaliadas através do diário de eventos adversos para registrar a ocorrência e a intensidade dos eventos solicitados do dia da vacinação até o 10º dia após a vacinação. Foram feitas coletas de sangue antes da primeira dose, 42-51 dias após cada uma das 2 doses, para avaliação da imunogenicidade, e 48 a 120 horas após a 1ª dose a fim de avaliar alterações laboratoriais que pudessem ter sido causadas pela vacina.

Resultado:

Os resultados de segurança da vacina não evidenciaram eventos adversos graves. Dos eventos adversos solicitados e não solicitados, 2 participantes tiveram eventos adversos intensos, aumento de CK e dor retroorbitária. Das alterações laboratoriais, 1 participante apresentou plaquetopenia, moderada, evento adverso esperado, e 2 participantes apresentaram neutropenia leve, não esperado. Os resultados de imunogenicidade evidenciaram um aumento do nível de anticorpos aos componentes da vacina, em relação ao teste pré-vacinal. No teste pré-vacinal, 83,3% eram soropositivos para sarampo e 100% para rubéola. Todos os participantes tiveram sorologias positivas para sarampo após as 2 doses.

Conclusão:

Os eventos adversos solicitados tiveram frequência e intensidade esperadas, segundo a Brochura do Investigador. A reatogenicidade é compatível com a resposta induzida pela vacina. Muitas das manifestações clínicas são inespecíficas e não podem ser inequivocamente atribuídas à vacina. Estes resultados permitem que a avaliação da vacina prossiga à fase II/III, visando o registro e a comercialização de uma vacina segura para a população

Palavras-chave: vacina; dupla viral; fase I

VAC.04 - Estudo comparativo da imunogenicidade da vacina tríplice viral (sarampo, caxumba e rubéola) nas apresentações monodose e multidoses, em lactentes

Eliane Matos dos Santos^{1*}; Reinaldo Martins¹; Tatiana Noronha¹; Robson Cruz¹; Marilda Siqueira³; Ana Luiza Pavão²; Maria de Lourdes de Sousa Maia¹; Mariza Cristina Lima¹.

1 Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2 Fiocruz/ICICT;

3 Fiocruz/IOC.

Introdução:

O componente caxumba da vacina tríplice viral (TVV) é menos imunogênico que o sarampo e a rubéola. Muitos estudos realizados com a vacina TVV apresentaram resultados de imunogenicidade diferentes dos encontrados nos estudos realizados com a vacina TVV de Bio-Manguinhos. Foram feitas investigações de fatores que pudessem interferir na imunogenicidade do componente caxumba, como os kits utilizados para o método do ensaio imunoenzimático, e a potência da vacina, porém nenhuma explicação foi encontrada. Este estudo avaliou a hipótese de que a menor imunogenicidade do componente caxumba, da vacina TVV de Bio-Manguinhos, se devesse à apresentação multidoses.

Objetivo:

Avaliar a imunogenicidade da vacina TVV, comparando-se as apresentações multidoses e monodose.

Metodologia:

Ensaio clínico de fase IV, randomizado, simples cego, com 240 crianças saudáveis, na faixa etária de 12 a 23 meses e 29 dias de idade, sendo que 120 crianças tomaram a vacina TVV produzida em Bio-Manguinhos com bulkviral da GlaxoSmithKline (GSK), apresentação multidoses, e 120 tomaram a vacina TVV produzida pela GSK, apresentação monodose. Foram feitas 2 coletas de sangue, pré vacinação, e de 30 a 60 dias, ideal 42 dias, após a vacinação para avaliação da imunogenicidade. Foram considerados como critério de soroconversão os resultados dos testes ELISA que passaram de não reativo antes da vacinação para reativo após a vacinação.

Resultado:

Na análise da coorte por intenção de tratar, a soroconversão do componente sarampo foi de 99,1% para a vacina multidoses e 98,3% na monodose; a soroconversão do componente rubéola na multidoses foi de 100%, enquanto a vacina monodose apresentou soroconversão de 98,3%; a soroconversão do componente caxumba de 90,4% na multidoses, ligeiramente maior que a vacina monodose, que foi de 89,6%, mas todas as diferenças não foram estatisticamente significativas. Em relação ao título médio geométrico (TMG) do sarampo, a vacina monodose apresentou TMG maior que a vacina multidoses (3.210,9 mUI/mL e 3.141,9 mUI/mL, respectivamente), para rubéola, a vacina multidoses apresentou título médio geométrico (TMG) maior que a vacina monodose (48,22 UI/mL e 42,18 UI/mL, respectivamente); para caxumba, a vacina monodose apresentou título médio geométrico (TMG) maior que a vacina multidoses (1.145,9 U/mL e 1.059,7 U/mL, respectivamente), todos sem diferenças estatisticamente significativas.

Conclusão:

A vacina multidoses foi considerada não inferior à vacina monodose, para os três componentes vacinais, tendo em vista que os dois critérios de não inferioridade, diferença nas soroconversões e razão multi/mono, foram atendidos, não havendo também diferenças estatisticamente significativas entre as vacinas para os parâmetros calculados.

Palavras-chave: vacina; tríplice viral; fase IV

VAC.05 - Avaliação da resposta imune humoral contra proteína TRAP (*Thrombospondin-Related Adhesive Protein*) de *Plasmodium vivax* em populações de área endêmica brasileira

Ada da Silva Matos^{1*}; Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva¹; Isabela Ferreira Soares¹; Barbara de Oliveira Baptista¹; Paulo Renato Rivas Totino¹; Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro¹; Cesar Lopez Camacho²; Arturo Reyes-Sandoval²; Lilian Rose Pratt Riccio¹; Josué da Costa Lima Junior¹.

¹Fiocruz/IOC;

²University of Oxford, United Kingdom.

Introdução:

O *Plasmodium vivax* é a principal espécie causadora de malária no Brasil, nas Américas e no sudeste asiático. Embora ainda não haja vacina disponível para o *P. vivax*, algumas proteínas presentes na superfície do esporozoítio têm obtido êxito nas etapas que precedem os ensaios clínicos. Dentre estas proteínas, a TRAP (thrombospondin-related adhesive protein) se destaca por estar envolvida na invasão, infecção e aderência aos hepatócitos pelos esporozoítos. Contudo, ainda não existem estudos que avaliem a resposta imune humoral naturalmente adquirida em áreas endêmicas da América do Sul, bem como a correlação da resposta observada com indicativos de proteção/exposição.

Objetivo:

Caracterizar as respostas imunes humoral e celular frente à PvTRAP em indivíduos naturalmente expostos à infecção e avaliar a eventual relação dessas respostas específicas com a indicativos de exposição e proteção.

Metodologia:

Foram coletados dados clínicos e epidemiológicos, amostras de sangue total e plasma de 299 indivíduos provenientes dos municípios de Cruzeiro do Sul (AC), Mâncio Lima (AC) e Guajará (AM). Amostras de sangue total foram utilizadas para diagnóstico de malária (parasitológico e molecular). O plasma foi utilizado no ELISA para avaliação da reatividade de anticorpos (IgG e subclasses) frente à PvTRAP recombinante. Os resultados obtidos foram cruzados com os dados epidemiológicos e demográficos dos indivíduos estudados.

Resultado:

A população de estudo é naturalmente exposta à malária, visto que 81% dos indivíduos reportaram ao menos um episódio de malária por *P. vivax* durante a vida e 25,7% (n=77) estavam infectados com *P. vivax* no momento da coleta. Em relação à resposta humoral, a PvTRAP se mostrou naturalmente imunogênica em populações naturalmente expostas, uma vez que 49% dos indivíduos avaliados apresentaram anticorpos específicos contra esta proteína. Os índices de reatividade dos indivíduos respondedores variaram de 1,01 a 3,29 (Média=1,55 ± 0,48). Além disso, indivíduos respondedores apresentaram um tempo de residência em áreas endêmicas de malária superior aos indivíduos não respondedores (p= 0,0178), sugerindo um efeito cumulativo da exposição na resposta humoral específica para a PvTRAP. Acerca do perfil de subclasses de IgG, observamos uma prevalência significativamente maior do anticorpo citofílico IgG1 (66%) quando comparada às das demais subclasses de anticorpos IgG2 (44%, p<0,0001), IgG3 (49%, p<0,0001) e IgG4 (16%, p<0,0001). Por fim, em relação a indicativos de proteção mediada pela resposta PvTRAP específica, observamos que indivíduos IgG3-positivos apresentaram um tempo passado desde a última malária significativamente maior do que os indivíduos IgG3-negativos (p= 0,0147).

Conclusão:

Os nossos dados sugerem que a PvTRAP seja um promissor candidato vacinal, visto que é naturalmente imunogênica em populações expostas à malária, os níveis de anticorpos IgG estão associados à exposição e anticorpos IgG3 específicos contra a PvTRAP parecem participar na aquisição da imunidade protetora. Entretanto, estudos adicionais são necessários para confirmar esta proteína com candidata vacinal.

Palavras-chave: *Plasmodium Vivax*; Resposta Imune Humoral; PvTRAP

VAC.06 - Study of a Critical Process Parameter in the meningococcal C conjugate vaccine manufacturing developed by Bio-Manguinhos

William Rodrigues da Conceição Silva¹; Flávia de Paiva Silva¹; Felipe Rodrigues da Silva^{1*}; Iaralice Medeiros de Souza¹; Milton Neto da Silva¹; Marilza Batista Corrêa¹; Camila da Silva Faria¹; Maria de Lourdes Leal¹; Renata Chagas Bastos¹; Ivna Alana da Silveira¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introduction:

Neisseria meningitidis is one of the most important pathogens as causes of meningitis and other clinical manifestations worldwide. Bio-Manguinhos has developed all steps to produce, purify and control an effective Brazilian meningococcal C conjugate vaccine by modified reductive amination where oxidized polysaccharide (PSC) was coupled to hydrazide-activated monomeric tetanus toxoid used as carrier protein. Nowadays this vaccine is under Phase II/III clinical trials. The first step involves a mild oxidation of native PSC by sodium periodate, leading to terminal aldehyde moieties. Currently the reaction is carried out at a range for the oxidation reaction that allows a gain of flexibility in obtaining the oxidized polysaccharide. Therefore, several reaction times must be studied, considering the critical process parameters (CPPs), to avoid the obtention of a molecule with different physico-chemical characteristics from the one established and minimize the risks of losing intermediate product.

Objective:

Determine the range of reaction time that allows oxidized polysaccharide obtention with similar critical quality attributes (CQAs) capable to be used in conjugation reaction.

Methodology:

In this study three oxidized PSC batches were produced, in pilot scale, using three different reaction times for quenching by glycerol addition. After purification using ultrafiltration, these batches were analyzed following the WHO recommendations as sialic acid content, SEC-HPLC profile, ¹HNMR spectra for identity and qNMR for aldehyde moiety content, molecular weight by SEC-MALLS and residual glycerol content.

Results:

Oxidation reaction was very reproducible since all batches showed similar results in all quality control tests. Sialic acid content was 97.5 mg/mL, 97.67 mg/mL and 101.04 mg/mL for batches 1, 2 and 3, respectively. SEC-HPLC profiles were similar showing Kav acceptable (0.40-0.55) and residual glycerol was lower than 0.5 g/L according to established specifications for all batches. ¹HNMR spectra showed typical assignments confirming the identity of PSC and the aldehyde moiety relative content (CHO) was around 8% as measured in the range of 5.0 a 5.3 ppm by qNMR. Finally the preliminary molecular weight data obtained by SEC-MALLS were =12.26 KDa, =10.19 KDa and =12.59 KDa for batches 1, 2 and 3, respectively, without significant differences (Mann Whitney test, p≥0.05). These results were comparable to a previous one when a batch produced and quenched with the established reaction time was studied (=10.09 KDa).

Conclusion:

All results showed that oxidized PSC batches have similar physico-chemical properties and consequently similar CQAs. However, these oxidized PSC must be used to produce conjugates in order to evaluate if they will have appropriate polysaccharide-protein ratios and similar immunogenicity in mice as observed previously. This further improvement in this study is essential to assume a range of oxidation reaction time that could promote flexibility in the production process of meningococcal C conjugate vaccine.

Keywords: Meningococcal conjugate vaccines; Critical Process Parameters (CPPs); Critical Quality Attributes (CQAs)

VAC.07 - Montagem de controles internos para ensaios de PRNT: Uma necessidade e um grande desafio

Sheila Maria Barbosa de Lima¹; Emily Hime Miranda¹; Marisol Simões¹; Renata Carvalho Pereira¹; Caio Bidueira Denani^{1*}; Nathalia dos Santos Alves¹; Ingrid Siciliano Horbach¹; Ygara da Silva Mendes¹; Felipe Soares Figueiredo¹; Waleska Dias Schwarcz¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

O teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) é considerado o padrão-ouro para a detecção e quantificação dos anticorpos neutralizantes para a avaliação da resposta imune protetora após a vacinação. Para a realização do teste, é necessária a utilização de soros-padrão internacionais ou outros soros-referência como controles internos. Porém, fatores como logística de compra e altos custos são limitantes para a aquisição e uso contínuos dos soros-padrão internacionais. Neste contexto, uma produção interna de soros controle mostra-se como uma alternativa sustentável, dando autonomia ao Laboratório de Tecnologia Viroológica (Bio-Manguinhos/Fiocruz) e maior confiabilidade aos resultados gerados.

Objetivo:

Avaliar o perfil sorológico das amostras de voluntários para a criação racional de controles internos (positivos e negativos) para utilização em ensaio de PRNT de Dengue (DENV), Febre Amarela (YFV) e Caxumba (MV), definir faixas dos controles para aceitação do teste e acompanhar as flutuações dos títulos dos controles.

Metodologia:

Trezentas amostras previamente analisadas por PRNT₅₀ para YFV, para os quatro sorotipos de DENV e para MV foram classificadas conforme a distribuição dos títulos. Em seguida, uma análise criteriosa foi realizada para selecionar as amostras utilizadas na composição dos controles internos. Para estabelecer a faixa de aceitação foram realizadas 30 análises para cada controle.

Resultado:

Aproximadamente 60% das amostras foram negativas para presença de anti-corpo de YFV e o critério de escolha para produzir os controles foi selecionar soros negativos para presença de anticorpos para dengue. Sete e oito soros foram selecionados para compor os controles negativo e positivo, respectivamente. Cerca de 21% das amostras foram negativas para MV. Dentre os soros positivos, treze foram selecionados para a montagem do controle baixo e sete para o médio, e apenas um para o alto. Posteriormente, foi estabelecida uma faixa de aceitação para os títulos dos controles. Em relação à Dengue, aproximadamente 20% das amostras mostraram-se negativas para os quatro sorotipos e suas frequências foram calculadas. As amostras positivas mostraram uma boa dispersão por toda a faixa de títulos e foram classificadas como positivas baixas, médias e altas. A partir da análise dos dados obteve-se controles de Dengue que atendam às demandas durante cinco anos.

Conclusão:

Os controles produzidos para YFV e MV foram inseridos na rotina dos testes de PRNT e a distribuição dos títulos encontra-se dentro da faixa de aceitação pré-estabelecida. O desenho racional de controles para Dengue encontra-se em fase final de execução. A seleção de controles internos é um processo laborioso, pois envolve etapas que vão desde a autorização do Comitê de Ética em Pesquisa para captação de soros até a análise do perfil sorológico. A montagem dos controles internos mostra-se relevante para monitorar a estabilidade do teste ao longo do tempo e aumentar a confiabilidade dos resultados gerados.

Palavras-chave: PRNT; controle interno; perfil sorológico

VAC.08 - Yellow fever vaccine: development of an optimized freezing dryer cycle in industrial scale

Alexander da Silva Neves^{1*}; Darcy Akemi Hokama¹; Antonio de Padua Risolia Barbosa¹; Elezer Monte Blanco Lemes¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introduction:

Although Brazil is the biggest Yellow Fever Vaccine (YFV) producer worldwide, there is still a risk of supply discontinuity to meet the demand in the country and Africa if the epidemiological scenario gets worse. Fiocruz YFV production needs a lyophilization process step to stabilize the final product, however, in terms of process management, it is a bottleneck constraining the increase of the production of YFV during outbreaks. To decrease the lead-time from production to the market of YFV, this work aims to demonstrate the results of an accelerated and 41 months stability study of an optimized freeze-drying cycle time. Three experiments in industrial scale were carried out with a lyophilization cycle 15 hours shorter than the original cycle.

Objective:

Demonstrate the results of an optimized lyophilization cycle in industrial scale of YFV decreasing the manufacturing lead-time and increase production capacity.

Methodology:

The methodology is based on three industrial scale batches produced in 2014 with a 15h less lyophilization cycle that were performed following the same YFV raw materials, production procedures and validations times used in commercial batches. Modifications were done only in physical properties of the current freeze-drying cycle temperature and time. The batches were analyzed by Bio-Manguinhos Quality Control Department and a six months accelerated stability studied and a 41 months of real time stability study were conducted.

Results:

Cake appearance was approved after 100% visual inspection. Thermo stability (14 days at 37°C) results range from 4,56 to 4,74 Log₁₀ UI/dose.

Six months accelerated stability test at 25°C, the minimum potency result was 4,73 Log₁₀ UI/dose and maximum residual moisture 1,64% among the batches.

Real time stability study from 2°C to 8°C and -20°C was conducted up to 41 months and results from aspect, pH, residual moisture, potency were within the specifications and average residual moisture presents a maximum value of 1,6% and potency a minimum value of 4,11 Log₁₀ UI/dose among the batches. Maximum potency loss was 0,53 log₁₀ UI/DH for real time stability study.

All the results are within the specifications and no tendency was observed when compared with the real time stability results from commercial batches.

Conclusion:

All batches in industrial scale are within the specifications of ANVISA and WHO. The results from stability studies demonstrate the viability of the optimized lyophilization cycle and confirm no changes in safety, quality and efficiency of YFV. The development of an optimized lyophilization cycle 15h shorter than the original one can improve Fiocruz capacity at the yellow fever production facility, decreasing the product time to market. These improvements are aligned with the strategies of Bio-Manguinhos/Fiocruz, contributing to increase the global stockpile of vaccines for emergency outbreaks, especially in African Countries and Latin American countries to contain the spread of the disease.

Keywords: Yellow Fever Vaccine; Freeze Dryer; Optimization

VAC.09 - Avaliação da incerteza de medição como ferramenta para delimitação da zona cinza na determinação de anticorpos neutralizantes anti-Febre Amarela

Victor de Oliveira Silva Ferreira^{1*}; Marisol Simões¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹; Erika Martins Carvalho²; Maria Denise Neves Borges³; Rodrigo Borges de Oliveira⁴.

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2Fiocruz/Farmanguinhos;

3Fiocruz/ENSP;

4INMETRO.

Introdução:

A epidemia de Febre amarela em 2018 se tornou a mais severa das últimas sete décadas com risco de ressurgência da doença, levando à adoção de políticas de ampliação da vacinação e da utilização de doses fracionadas por parte do Ministério da Saúde. O ensaio de neutralização por redução de placas de lise em 96 orifícios (micro-PRNT) é o método de referência para a avaliação da resposta imune protetora após a vacinação, onde os seus resultados numéricos são classificados em negativos ou positivos, se estiverem abaixo ou acima da linha de corte de 794 mUI/ml. Valores numéricos iguais ou próximos a linha de corte têm uma grande chance significativa de serem inconclusivos, este intervalo de incerteza é designado como “zona cinza”. Conseqüentemente, o laboratório deve aplicar uma classificação ternária aos seus resultados garantindo confiabilidade. A determinação dos títulos de anticorpos neutralizantes é de extrema importância em estudos epidemiológicos e em estudos de imunogenicidade vacinal.

Objetivo:

Determinar a zona cinza do ensaio micro-PRNT de Febre Amarela por meio da avaliação da incerteza de medição, visando elaborar um algoritmo decisório para estabelecer critérios para repetição do ensaio e indicação da revacinação.

Metodologia:

A incerteza foi determinada seguindo os princípios do Guia para a Expressão de Incerteza de Medição e do QUAM (Quantificação da incerteza em medições

analíticas). Foram avaliados dados obtidos na validação, de acordo com a RDC da Anvisa nº 27 de 2012, da calibração do soro “*in-house*” contra o soro de referência internacional e de outros estudos. A zona cinza foi delimitada através da incerteza expandida a 95,45% sob o valor da linha de corte do ensaio.

Resultado:

Durante o estudo, foi observado que a variação do micro-PRNT não está relacionada com a quantidade de anticorpos presentes nos soros denominados alto, médio e baixo e sim, com uma variação existente no processo de obtenção dos seus resultados. A incerteza expandida, com um fator de abrangência de 95,45%, do ensaio micro-PRNT foi de $\pm 0,41 \log_{10}$ mUI/mL, onde foram considerados os maiores componentes avaliados. Considerando a linha de corte de $2,90 \log_{10}$ mUI/mL, a zona cinza foi delimitada entre $2,49 \log_{10}$ mUI/mL a $3,31 \log_{10}$ mUI/mL, equivalente a 309,03 mUI/mL a 2041,74 mUI/mL. O algoritmo decisório foi ilustrado por meio de um fluxograma em que, para os resultados com valores compreendidos dentro da zona cinza, é indicada a realização de três novos ensaios e caso pelo menos dois apontarem resultados com a mesma classificação, o indivíduo deverá ser revacinado ou não.

Conclusão:

Por meio da determinação da incerteza foi possível definir a zona cinza de maneira metrologicamente consistente e classificar os resultados como negativos, indeterminados, ou positivos. Obtendo-se, como principal benefício, a segurança quanto à decisão de revacinação e uma avaliação mais criteriosa dos soros analisados.

Palavras-chave: Febre Amarela; Imunogenicidade; Incerteza de medição

VAC.10 - Mapeamento completo dos epítomos IgM e IgG do vírus da febre amarela e cinética de reconhecimento temporal por anticorpos humanos

Michelle Pacheco de Lima^{1*}; Paloma Napoleão-Pêgo¹; Andre Luis Almeida Souza²; Gabriel de Vasconcelos Sixas F. da Silva¹; Patricia Fernandes Ferreira³; Salvatore Giovanni De-Simone³.

1Fiocruz/CDTS;

2Fiocruz/IOC;

3Fiocruz/CTDS.

Introdução:

A febre amarela (FA) é causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae*, doença enzoótica na África e nas Américas. Um recente surto epidêmico silvestre de FV tem se espalhado pela região sudeste do Brasil, atingindo regiões populosas onde a cobertura vacinal é baixa. Como a FA apresenta sintomatologia semelhante à dengue e outras doenças febris, incluindo hemorragias, e como ainda não existem estudos definitivos sobre a estrutura do repertório dos epítomos protetores, é importante realizar o mapeamento completo dos epítomos IgM e IgG de todas as proteínas estruturais e não estruturais virais e estudar algumas das suas propriedades antigênicas e protetoras.

Objetivo:

Mapear todos os epítomos IgM e IgG da poliproteína (3 proteínas estruturais e 7 não estruturais) do vírus da FA, identificando os epítomos de reação cruzada e específicos e caracterizando o padrão cinético temporal de reconhecimento de alguns epítomos específicos.

Metodologia:

Quatro bibliotecas peptídicas (total de 4.124 peptídeos) com um comprimento de 14-15aa e 9-13 resíduos sobrepostos foram sintetizadas e avaliadas para a reatividade de anticorpos IgM e IgG por metodologia de alto rendimento de microarranjos peptídicos. Seis epítomos específicos foram selecionados, sintetizados sob a forma de quimeras multiméricas (MAPs) usando a técnica F-moc, purificados por HPLC e avaliados cineticamente por ELISA com um painel de soros de indivíduos pós-vacinados (5 dias a 20 anos; vacina completa) e indivíduos com outras síndromes hemorrágicas (ZIKAV, CHYV, DENV).

Resultado:

Foram identificados 22 epítomos IgM e 89 epítomos IgG abrangendo toda a extensão da poliproteína viral. Sessenta e nove estão localizados nas proteínas não estruturais e 20 nas proteínas estruturais e 44 são FA específicos. A proteína NS3 foi a que apresentou o maior índice de antigenicidade. A especificidade de seis epítomos foi confirmada por ELISA-MAP usando um painel de soros de pacientes com várias doenças febris (ZIKA, CHYV, DENV1-4) e soro de pacientes vacinados com FA. A análise temporal mostrou que anticorpos protetores contra alguns dos epítomos analisados têm início com 5 dias e permanecem por mais de 20 anos pós vacinação

Conclusão:

Pela primeira vez foi revelado o padrão completo dos epítomos IgM e IgG do vírus da FA, incluindo os epítomos FA específicos e os de reação cruzada, principalmente com dengue. Um padrão descendente de reconhecimento imunológico foi identificado, no entanto a resposta a alguns epítomos permanece por mais de 20 anos. A reatividade cruzada e a especificidade de um grupo de epítomos revelados neste trabalho têm implicações para a compreensão do mecanismo de neutralização viral mediada por anticorpos IgM e IgG. Além disso, esses dados podem ser úteis para projetos de desenvolvimento de novas vacinas para FA baseadas em tecnologia de DNA-recombinante e ajudar no desenvolvimento de novos ensaios diagnóstico mais específicos contra a FA e outras síndromes febris.

Palavras-chave: febre amarela; vacina; epítomos

VAC.II - Padronização da tecnologia multiparamétrica de detecção de níveis de anticorpos induzidos pelos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* por citometria de fluxo

Denise S. G. Pereira^{1*}; Flávia de Paiva Silva¹; Marta de Almeida Santiago²; Álvaro Luiz Bertho²; Thaize Quiroga²; Fernanda Otaviano Martins¹; Ana Cristina Fonseca Melo¹; Maria de Lourdes Moura Leal¹; Ivna Alana da Silveira¹; Ana Paula dos Santos¹.

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2Fiocruz/IOC.

Introdução:

O ensaio imunoenzimático (ELISA) é utilizado para a avaliação da resposta imunológica aos polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A, C e W em vacinas conjugadas combinadas submetidas a ensaios pré-clínicos e clínicos. Além de ser um ensaio laborioso, apresenta uma alta variabilidade (30%) e dependendo do número de análises a serem realizadas, exige uma quantidade considerável de soro do paciente ou camundongo.

Objetivo:

Padronizar um ensaio multiparamétrico por citometria de fluxo, para avaliar a resposta imunológica induzida por esses polissacarídeos conjugados e combinados, bem como comparar os resultados obtidos com o ELISA.

Metodologia:

Um teste de citometria de fluxo baseado em microesferas carboxiladas foi padronizado utilizando soros-padrão *in house* de camundongos, para os polissacarídeos dos grupos A, C e W de *Neisseria meningitidis*; e amostras negativas e positivas, de camundongos suíços imunizados com a vacina meningocócica ACWY conjugada da empresa X. Para padronização desse ensaio, foi realizada uma diluição seriada dos soros padrão (polissacarídeo C e A - 1:250 a 1:32000; polissacarídeo W - 1:100 a 1:12800) e das amostras positivas e negativas (1:400) e calculada a concentração de antígeno ideal para o acoplamento, o *cut-off* do teste e sua correlação com o ELISA. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa FlowJo® e transformados em unidades arbitrárias por mililitros (UA/mL) pelo programa SoftMaxPro (Molecular Devices).

Resultado:

Foi determinada a concentração de antígeno para acoplamento nas microesferas e estabelecidas as etapas do método após uma série de repetições dos soros padrão. As replicatas das curvas do soro-padrão dos três antígenos analisados (PSA, PSC e PSW) não apresentaram diferença estatística significativa, PSA $p=0,4136$, PSC $p=0,1812$ e PSW $p=0,4772$. O *cut-off* do método foi estabelecido para quantificação de anticorpos contra os polissacarídeos (PSC 130,31 UA/mL, PSA 91,65 UA/mL e PSW 319,31 UA/mL) e a quantificação de anticorpos por citometria de fluxo apresentou uma alta correlação com o ELISA (PSC $r=0,992$; PSA $r=0,993$ e PSW $r=0,918$).

Conclusão:

A citometria de fluxo baseada em microesferas tem se mostrado altamente eficiente para quantificação de anticorpos, pois é um método robusto e específico, combinando a sua facilidade e rapidez à alta precisão, sendo muito utilizado para pesquisa clínica. Os resultados para a quantificação do título de anticorpos se mostraram satisfatórios e altamente correlacionáveis com o ELISA, sem a alta variabilidade apresentada pelo método imunoenzimático. A metodologia proposta será de grande importância para a triagem de amostras em ensaios pré-clínicos e clínicos em vacinas combinadas.

Palavras-chave: Citometria de fluxo; Polissacarídeo conjugado; Vacinas

VAC.12 - Distribuição dos antígenos de superfície incluídos na vacina meningocócica 4CMenB em amostras brasileiras no período de 2010 a 2015

Nathércia Elena Chança Franco^{1*}; Aline Carvalho de Azevedo¹; Ivano de Filippis¹.

¹Fiocruz/INCQS.

Introdução:

Neisseria meningitidis (Nm), agente etiológico da Doença Meningocócica (DM), é classificada em 12 sorogrupos com base na variação antigênica do polissacarídeo capsular, sendo 6 sorogrupos patogênicos (A, B, C, W, X e Y). Estudos vêm sendo realizados para o desenvolvimento de uma vacina não-polissacarídica capaz de abranger estes 6 sorogrupos, principalmente por conta do sorogrupo B, cujo polissacarídeo apresenta pouca imunogenicidade. Foram selecionadas, por vacinologia reversa, proteínas potencialmente imunogênicas da membrana externa do meningococo para o estabelecimento de uma vacina contra o sorogrupo B. Formulou-se então a vacina 4CMenB, composta pelos antígenos “*factor H binding protein*” (fHbp), “*Neisseria adhesin A*” (NadA) e “*Neisseria heparin-binding antigen*” (NHBA), além da PorA P1.4 oriunda da vesícula de membrana externa. Esses antígenos são também expressos por cepas de outros sorogrupos e dados limitados indicam proteção vacinal contra essas cepas, porém, essa proteção ainda não está totalmente determinada. Em 2010, a companhia farmacêutica produtora da vacina (GSK) estimou uma cobertura vacinal de 81% no Brasil. A duração da proteção da 4CMenB, como uma nova vacina, ainda não está determinada.

Objetivo:

Analisar a variabilidade genética dos genes nadA, fHbp, nhba e porA em amostras de Nm dos sorogrupos B e C, isoladas de 3 estados brasileiros, no período de 2010 a 2015 e comparar com as variantes presentes na vacina 4CMenB.

Metodologia:

A amplificação dos genes foi realizada com auxílio dos iniciadores descritos no banco de dados PubMLST. O sequenciamento foi realizado na Plataforma

de Sequenciamento do PDTIS/FIOCRUZ. As sequências foram submetidas ao banco de dados “*Neisseria Sequence Typing Home Page*” para definição das regiões variáveis.

Resultado:

Foram incluídas 44 amostras, 81,8% pertencendo ao sorogrupo C e 18,2% ao sorogrupo B. Essas amostras foram isoladas de casos de DM de 3 estados brasileiros: Pernambuco (84%), Rio de Janeiro (13,7%) e São Paulo (2,3%). Das 44 amostras, foram observadas as seguintes variantes: alelos 1, 5, 25, 97, 109, 151, 169, 264, 277, 311, 650, 789, 832 e 1136 da fHbp, alelo 1 e 2/3 da nadA, alelos 4, 13, 15, 22, 32, 85, 87, 111, 123, 144, 334 e 628 da NHBA, alelos 7-1, 7-33, 7-4, 7-42, 18-1, 18-7, 19, 19-15, 19-36 e 22 da região variável 1 da PorA e alelos 1, 1-10, 14-6, 15-35, 15-39 e 34-2 da região variável 2 da PorA.

Das cepas do sorogrupo B e C analisadas, 25% e 8,3% apresentaram a V1 da fHbp, respectivamente.

Conclusão:

Os resultados obtidos até o momento sugerem que, entre os antígenos da vacina, apenas a variante 1 da proteína fHbp está presente nas cepas estudadas e fortemente associada ao sorogrupo B, demonstrando uma grande variabilidade genética dos alvos vacinais e sugerindo a inviabilidade da vacina 4CMenB sobre o sorogrupo C.

Palavras-chave: *Neisseria meningitidis*; Antígenos 4CMenB; Epidemiologia molecular

VAC.13 - Ultrasound and heterogenous catalysis assisted length reduction of *Neisseria meningitidis* serogroup C capsular polysaccharide

Marilza Batista Corrêa^{1*}; Izabel Azevedo de Lemos¹; Renata Chagas Bastos¹; Maria de Lourdes M. Leal¹; Ivna Alana da Silveira¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introduction:

Neisseria meningitidis C capsular polysaccharide (NMC) is a homopolymer of α -N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) containing α -(2-9) glycosidic linkages; It is an important component in conjugation process used for production of meningococcal serogroup C conjugate vaccine. Its use requires a previous mild oxidation stage, by sodium periodate; leading to the formation of oligosaccharide chains with an average of (10kDa), containing an aldehyde moiety in terminal sugar. The NMR assignment of the aldehyde moieties faces the difficulty of the low relative intensity of these signals (5%). The signal intensity should increase with the reduction of the oligosaccharide length, which favors its observation. The previous reduction of native polysaccharide length, followed by sodium periodate oxidation, appears as an alternative for obtention of a small oligomeric chain, facilitating the observation of hydrogens interaction and determining their sequential connectivities.

Objective:

The aim of this study was the development of a synthetic methodology for the reduction of *Neisseria meningitidis* C capsular polysaccharide length by assisted ultrasound and heterogeneous catalysis, in order to achieve small oligomers, which after oxidation, would generate high-quality NMR spectra.

Methodology:

Strong acid cation exchange resin was regenerated with 5% HCl and then dried. To 10mL of PSC solution (10mg/mL) was added 1g of regenerated resin. The mixture was sonicated (40Hz), for 3 and 5 hours (HPSC-3 and HPSC-5), filtered, dialyzed against water and freeze-dried. The resulting polysaccharides were analyzed with TSK gel G5000PW (TOSOH Bioscience) column, by exclusion chromatography (SEC), equilibrated with 0.2 mol/L sodium chloride, at a flow

rate of 0.5 mL / min. The total and column exclusion volumes were determined by the injection of acetone (58Da) and Blue dextran mass standards (~2,000 kDa). The complete proton and carbon NMR assignments of this compound were determined by a series of 1D and 2D NMR experiments including (1H, 1H, 1H-COSY, HSQC and HMBC).

Results:

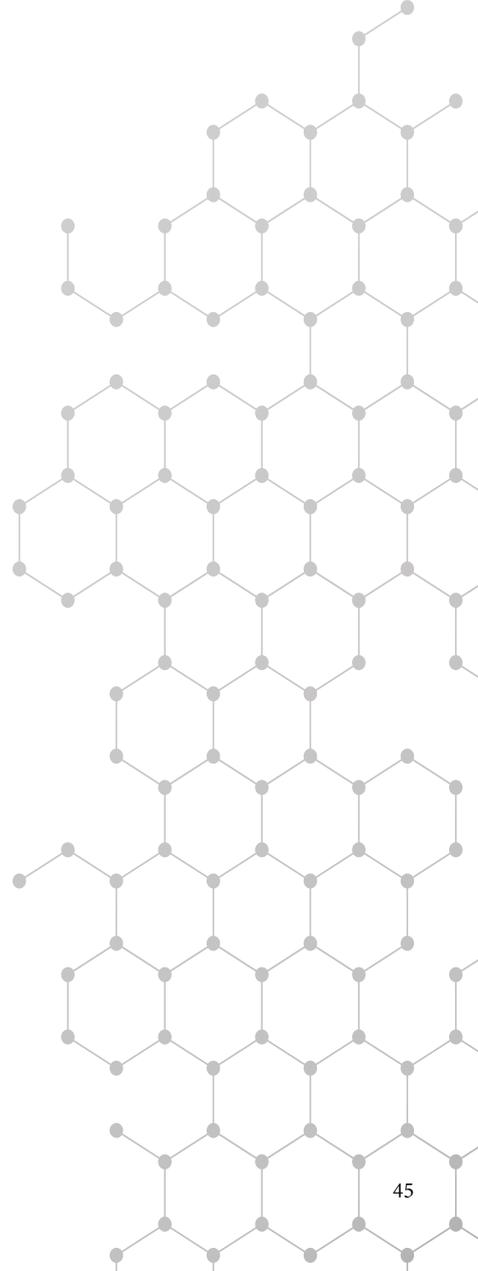
The reduction of polysaccharide length was qualitatively evaluated comparing their K_{av} values, obtained by SEC analysis. The native PSC (K_{av} – 0.10) and the hydrolysates (HPSC-3 K_{av} – 0.62 and HPSC-5 K_{av} – 0.60) demonstrated a significant variation. The ¹H NMR data showed that the O,N-acetylation were preserved under the applied conditions; the signal of methyl groups were observed at 2.19 to 1.94ppm. HPSC-3 and HPSC-5 were then oxidized by NaIO₄ and analyzed by two-dimensional NMR (1H, 1H, 1H, COSY, HSQC). The assignment of aldehyde hydrogen, in its hydrated form, was observed, with good resolution.

Conclusion:

In conclusion, the methodology of polysaccharide hydrolysis assisted by ultrasonic and heterogeneous catalysis is a simple, efficient and selective methodology for oligosaccharides reduction chain. Making it possible to obtention of small oligosaccharide that would facilitate the structural characterization by NMR.

Keywords: Heterogenous catalysis; ultrasound; polysaccharide

BIOFÁRMACOS



BIO.01 - Propostas de metodologias alternativas ao MTT para ensaio de potência do biofármaco Filgrastim

Nathália Vinagre^{1*}; Fausto Ferraris¹; Ana Cristina Almeida Nogueira¹.

¹Fiocruz/INCQS;

²Fiocruz/IOC.

Introdução:

O Filgrastim é um biofármaco constante na lista de medicamentos excepcionais adquiridos pelo SUS e está entre os imunobiológicos importados de alto custo. Este biofármaco é uma proteína recombinante humana altamente purificada, baseada no fator estimulador de colônias de granulócitos humano (G-CSF), que tem como ação principal estimular a proliferação e ativação de granulócitos, através de um receptor específico, conhecido como G-CSFR (receptor do G-CSF). Atualmente, este biomedicamento não possui monografia na Farmacopeia Brasileira.

Objetivo:

Os objetivos deste trabalho foram estabelecer o método para controle de qualidade biológico do Filgrastim preconizado pela Farmacopeia Europeia (FE) no INCQS, desenvolver métodos alternativos ao descrito nesta farmacopeia através da utilização de citometria de fluxo por ensaios de proliferação e marcação intracelular e testar uma linhagem humana (Kasumi-1) como alternativa à linhagem murina (M-NFS-60) sugerida pela FE.

Metodologia:

Foram realizados ensaios padronizados pela FE de MTT com a linhagem M-NFS-60 e com a linhagem sugerida Kasumi-1.

Ensaio de CFSE com diferentes concentrações do produto e submetidos à citometria de fluxo com ambas as linhagens.

Ensaio de ativação do receptor do Filgrastim por citometria de fluxo com ambas as linhagens.

Comparação dos métodos através de análises estatísticas.

Resultado:

Os resultados dos ensaios de MTT com ambas as linhagens satisfizeram os critérios de regressão como linearidade e coeficientes de determinação (R^2).

Quando comparados entre os ensaios através da inclinação da reta, ambas as linhagens se encontram dentro dos limites, mostrando que para ambas as linhagens os ensaios com MTT apresentaram precisão intra e inter ensaio, sendo assim possível o seu estabelecimento no INCQS.

Quando realizados ensaios de proliferação com CFSE, não foram observadas diferenças significativas de proliferação entre as células sem estímulo e tratadas com Filgrastim para a linhagem M-NFS-60, demonstrando que talvez estes ensaios não sejam adequados para ensaios de potência com esta linhagem. Já a linhagem Kasumi-1 no tempo de 48h de estímulo, apresentou diferença entre as diferentes concentrações de Filgrastim, apresentando uma regressão significativa e determinação de 0,9 no ensaio de CFSE. Para ambas as linhagens nos ensaios de ativação dos fatores de transcrição do G-CSFR a quantificação de STAT3 e STAT5 com diferentes concentrações de Filgrastim apresentou uma boa correlação ($R^2 > 0,7$) e com uma relação concentração-resposta visível.

Conclusão:

Os ensaios de proliferação por CFSE foram padronizados, porém os mesmos não foram capazes de apresentar uma dose-resposta em relação a proliferação das células, considerados portanto não adequados para ensaio de potência deste biofármaco. Os ensaios de ativação dos fatores de transcrição apresentaram tendências promissoras a uma concentração-resposta, confirmando a hipótese de que o ensaio de MTT visualiza para este biofármaco mais a ativação celular do que a proliferação. Além disso, este ensaio seria capaz de reduzir o tempo de ensaio de 48h para apenas 2h.

Palavras-chave: Ensaio de potência; Controle de qualidade; Biofármaco

BIO.02 - Desenvolvimento de metodologia de obtenção e caracterização de lipossomas para uso em tratamento alternativo de tumores de mama

Alice Sampaio Barreto da Rocha^{1*}; Helvécio Vinícius Antunes²; Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio²; Livia Deris Prado²; Kattyta Gyselle de Holanda e Silva³; Tatiana Martins Tilli⁴; Ana Paula Dinis Ano Bom¹.

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2Fiocruz/Farmanguinhos;

3URJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro;

4Fiocruz/CDTS.

Introdução:

O câncer de mama apresenta o maior índice de incidência e mortalidade no mundo. Levando-se em consideração a ineficácia e falta de seletividade dos tratamentos atuais, que ocasionam muitos efeitos colaterais, existe uma necessidade de minimizar danos ao paciente e aumentar a especificidade para as células tumorais da mama. Neste contexto, o nosso grupo de pesquisa aposta no desenvolvimento de lipossomas capazes de carrear RNA de interferência (RNAi) para silenciamento de genes-alvo. Assim é possível (1) caracterizar uma nova abordagem terapêutica, (2) aumentar a especificidade de entrega e (3) ação. No entanto, devido à sua instabilidade na corrente sanguínea se faz necessário o encapsulamento desta molécula. Dentre os carreadores de RNAi, os lipossomas têm se destacado devido à biocompatibilidade e possibilidade de alteração das propriedades da superfície lipossomal como adição da carga superficial, peguilação e inclusão/modificação de ligante para aumento de eficiência e especificidade de entrega da carga terapêutica no tecido-alvo.

Objetivo:

Obter e caracterizar lipossomas visando o uso como carreadores de RNAi para a entrega em células tumorais de mama.

Metodologia:

Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico. Os lipídios utilizados foram a fosfatidilcolina (L- α -fosfatidilcolina 95%) e colesterol. A solução foi preparada com a mistura lipídica em clorofórmio e

metanol na proporção 3:1 na proporção molar de 8:3. O solvente orgânico da mistura foi evaporado em rotaevaporador IKA RV8 por 30 minutos (40 °C, 80 rpm). O filme lipídico formado foi hidratado com solução tampão PBS 1x pH 7,2 e submetido à sonicação por um minuto no processador ultrassônico (QSonica®). Posteriormente, as amostras foram filtradas em filtro de poro 0,22 μ m (Millex®) e armazenadas a 4 °C. A determinação do tamanho e o índice de polidispersão (PDI) dos lipossomas foi realizada empregando-se a técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS - *Dynamic Light Scattering*) no equipamento Nano-Zetasizer ZS (*Malvern Instruments*®). Alíquotas de 1,0 mL de cada amostra em triplicata foram analisadas para a obtenção do tamanho médio dos lipossomas, totalizando 30 leituras de tamanho de 10 experimentos.

Resultado:

Foram obtidas preparações lipossomais uniformes com parâmetros compatíveis a vesículas unilamelares pequenas (SUVs). As análises indicaram que o valor de tamanho de partículas e PDI médios são de respectivamente; 151,9 nm e 0,2890. Para avaliar a estabilidade dos lipossomas após estocagem a 4°C, foram realizadas medidas de DLS e PDI após uma semana. Os nossos resultados indicaram a manutenção dos valores médios de tamanho e PDI indicando que o lipossoma se manteve estável após armazenamento por até 1 semana.

Conclusão:

Os resultados preliminares do desenvolvimento da metodologia para obtenção de lipossomas indicam que as formulações se mostraram dentro do padrão esperado de tamanho e PDI possibilitando o uso desse sistema como carreador de RNAi para tratamento do câncer.

Palavras-chave: Câncer de mama; Lipossomas; RNA de interferência

BIO.03 - Predição de epítomos lineares de células B pan- e genótipo-específicos em nucleoproteína de Hantavírus de importância clínica

Fernando de Paiva Conte^{1*}; Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva¹; Renata Carvalho de Oliveira¹; Patrícia Cristina da Costa Neves¹; Elba Regina Sampaio Lemos¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Hantavírus são patógenos virais com grande impacto na saúde pública, causando quadros clínicos com elevada letalidade em humanos, tais como: febre hemorrágica com síndrome renal (FHSR) e síndrome cardiopulmonar por Hantavírus (SCPH). Atualmente existem mais de 80 genótipos de hantavírus descritos no mundo, sendo seis reconhecidos causadores de SCPH no Brasil: Juititaba, Araraquara, Laguna Negra-*like*, Castelo dos Sonhos, Anajatuba e Rio Mamoré. Além destes, o Hantavírus Seoul, associado a casos de FHSR e endêmico na Europa e Ásia, pode representar um risco negligenciado para saúde pública no Brasil, uma vez que os sintomas clínicos se assemelham a doenças tropicais e, apesar da ausência de notificações de FHSR, anticorpos específicos contra este genótipo foram detectados em pacientes com diagnóstico de leptospirose em Recife e no Rio de Janeiro. Atualmente, o diagnóstico de Hantavírus é feito pela pesquisa sorológica de anticorpos IgM/IgG, tendo a Nucleoproteína do vírus como principal alvo, por ser conservada e capaz de induzir resposta imune precoce e de longa duração. No entanto, os kits de diagnóstico sorológicos disponíveis em nosso país parecem ser incapazes de detectar genótipos associados a FHSR, tais como Seoul. Dessa forma, torna-se necessário a identificação de novos alvos capazes de detectar epítomos pan- e genótipo-específicos, com o intuito de aprimorar o diagnóstico viral e monitorar a entrada e a circulação de novos genótipos de Hantavírus em território brasileiro.

Objetivo:

Identificar *in silico* epítomos lineares de célula-B na Nucleoproteína dos genótipos Juititaba e Seoul de Hantavírus, buscando alvos direcionados aos genótipos associados especificamente aos quadros de SCPH e FHSR.

Metodologia:

Utilizando-se algoritmos de predição *in silico* (BepiPred, NetSurP), identificar epítomos lineares de célula B na Nucleoproteína dos genótipos Juititaba e Seoul. Comparar a similaridade dos epítomos encontrados com as sequências de outros genótipos associados a quadros de SCPH (Laguna Negra-*like*, Andes, Rio Mamore, Anajuba) e FSHR (Gou, Amur, Dobrava-Belgrade, Hantaan).

Resultado:

Em ambas as Nucleoproteínas (genótipos Juititaba e Seoul), doze epítomos lineares foram preditos em posições similares. Este achado reforça a similaridade estrutural das proteínas, uma vez que seus alvos antigênicos se encontram distribuídos de maneira similar. Contudo, comparando as sequências identificadas com genótipos associados aos quadros de FSHR e SCPH, observamos que os epítomos preditos na Nucleoproteína-Juititaba apresentaram maior similaridade quando comparados a genótipos associados a SCPH (69% a 100%) que a genótipos associados a FSHR (0 a 93%)($p < 0.0001$). Do mesmo modo, os epítomos identificados Nucleoproteína-Seoul apresentaram maior similaridade quando comparados a genótipos associados a quadros de FSHR (20-100%) do que genótipos associados a SCPH (43-100%)($p < 0.0001$).

Conclusão:

Identificamos epítomos lineares de célula-B pan-específicos, capazes de identificar genótipos virais clinicamente relevantes, e epítomos genótipos-específicos associados a quadros de FSHR e de SCPH, que poderão ser utilizados a fim de refinar os métodos de diagnóstico sorológico existentes.

Palavras-chave: epítomo linear; diagnóstico clínico; Hantavírus

BIO.04 - Expressão transiente e caracterização de construções biosemelhante e *biobetter* do rituximabe

Ana Beatriz Teixeira Frederico^{1*}; Maria da Glória Martins Teixeira¹; Eneida Almeida Santos¹; Carlos Otávio Alves Vianna¹; Martín Hernán Bonamino²; Aline de Almeida Oliveira¹.

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

Introdução:

O rituximabe (anti-CD20) foi o primeiro anticorpo monoclonal (mAb) terapêutico aprovado contra o câncer. A partir deste sucesso, diversos mAbs foram aprovados para o tratamento de câncer aumentando a sobrevida. Entretanto, um grande número de pacientes não responde (cerca de 70%). Portanto, existe uma necessidade de melhorar a atividade biológica destes mAbs, através do desenvolvimento dos chamados “*biobetters*”, que são anticorpos que possuem a mesma especificidade do produto original, mas apresentam alteração na molécula para melhorar o seu desempenho terapêutico. Um ligante do receptor NKG2D (NKG2DL) foi selecionado como alvo para o desenvolvimento de um *biobetter*. Este receptor é expresso em células NK e linfócitos T, portanto, os NKG2DLs ativam a resposta celular tanto da imunidade inata quanto da adquirida. Assim, representam um alvo terapêutico promissor para melhorar a resposta celular dependente de anticorpos (ADCC), que é um dos efeitos biológicos mais relevantes para os mAbs antitumorais. Futuramente, esses anticorpos serão analisados quanto à sua funcionalidade através de ensaios de atividade biológica.

Objetivo:

Expressar de forma transiente, purificar e caracterizar os anticorpos monoclonais anti-CD20, biosemelhante e *biobetter*, obtidos em Bio-Manguinhos.

Metodologia:

A partir da sequência nucleotídica do rituximabe descrita na patente foram sintetizados três genes: um biosemelhante e dois *biobetters* adicionados do NKG2DL (um com adição na porção N-terminal da cadeia pesada e o outro na porção C-terminal). Os genes sintetizados de cadeia leve e pesada foram subclonados

em vetor pcDNA3 (Invitrogen), para expressão em células de mamíferos. Após confirmação das sequências gênicas (por sequenciamento nucleotídico), foram realizados os ensaios de transfecção utilizando o Sistema Expi293F (Expi293 Expression System Kit). Os sobrenadantes foram purificados utilizando-se cromatografia de alta afinidade com coluna HiTrap MabSelect SuRe. O material purificado e sobrenadantes obtidos nas transfecções foram avaliados por ELISA para a identificação e quantificação das construções e para detecção da presença do ligante. Para quantificação, também foi utilizada espectrometria (Nanodrop 1000). Os ensaios de SDS-PAGE e *Western Blot* foram empregados para avaliar a integridade da molécula.

Resultado:

O Sistema Expi293F proporcionou rendimento médio de 0,120 mg/mL para as avaliações de caracterização. Os resultados obtidos nos ensaios de ELISA e *Western Blot*, sugerem a correta expressão das construções, com expressão de cadeia leve e pesada e a presença do ligante. Nos ensaios de SDS-PAGE e de *Western Blot* foi observado que as cadeias leves e pesadas do biosemelhante são semelhantes ao rituximabe comercial, já os *biobetters* apresentaram um pequeno aumento no peso molecular da cadeia pesada, conforme o esperado, devido à presença do ligante.

Conclusão:

Este estudo mostrou que o Sistema de expressão Expi293F apresenta rendimento satisfatório para análises de caracterização de anticorpos recombinantes. As construções de anticorpos obtidas se mostraram estruturalmente corretas durante as análises de caracterização.

Palavras-chave: anticorpo monoclonal; anti-CD20; expressão de anticorpos

BIO.05 - Inhibitory effect of microalgae and cyanobacteria extracts on influenza virus replication and neuraminidase activity

Milene Miranda^{1*}; Thauane Silva¹; Paulo Salomon²; Lidilhone Hamerski²; Fabiano Thompson²; Aline Santos¹; Jéssica Morais¹; Marilda Siqueira¹.

¹Fiocruz/IOC;

²UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introduction:

The influenza virus can cause seasonal infections with mild to severe symptoms, circulating worldwide and can affect people in any age group. Therefore, this infection is a serious public health problem that causes severe illness and death in high risk populations. Every year, 0.5% of the world's population is infected by this pathogen. This percentage can increase up to ten times during pandemics infection. Influenza vaccination is the most effective way to prevent disease. In addition, anti-influenza drugs are essential for prophylactic and therapeutic interventions. The oseltamivir (OST, a neuraminidase inhibitor) is the primary antiviral used in the clinic during outbreaks. However, the pressure imposed by OST on this virus has led to the selection of OST-resistant mutants, with a prevalence of 1-2% in different countries. Thus, the search for new anti-influenza drugs is extremely important. Currently, several groups have been developing studies describing the biotechnological potential of microalgae and cyanobacteria, including antiviral activity of their extracts. In Brazil, this potential is poorly known and exploited.

Objective:

The aim of this study is to evaluate the antiviral activity of natural extracts against influenza A and B, oseltamivir-sensitive and -resistant strains and lineages.

Methodology:

With the aim of fulfilling this gap in the knowledge, 38 extracts from microalgae and cyanobacteria isolated from marine and freshwater biomes in Brazil were tested against cellular toxicity; replication and neuraminidase activity of influenza virus OST-sensitive and resistant strains.

Results:

For this purpose, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-infected cells were treated with 200 µg/mL of each extracts. A total of 17 extracts (45%) inhibited influenza A replication, with 7 of them causing more than 80% inhibition. Moreover, functional assays performed with viral neuraminidase revealed 2 extracts (from *Leptolyngbya sp.* and *Chlorellaceae*) with IC₅₀ mean < 200 µg/mL for influenza A and B, and also OST-sensitive and -resistant strains. Furthermore, MDCK cells exposed to 1 mg/mL of all the extracts showed viability higher than 80%.

Conclusion:

Our results suggest that extracts of microalgae and cyanobacteria have promising anti-influenza properties. Further chemical investigation should be conducted to isolate the active compounds for the development of new anti-influenza drugs. The data generated contribute to the knowledge of the biotechnological potential of Brazilian biomes that are still little explored for this purpose.

Keywords: influenza virus inhibition; neuraminidase inhibition; microalgae and cyanobacteria extracts

BIO.06 - Estabelecimento de um modelo *in vitro* de câncer de mama para avaliação do receptor ativado por protease como alvo terapêutico

Luciana Neves Tubarão^{1*}; Carolina de Almeida Lindenberg¹; Patrícia Cristina da Costa Neves¹; Tamiris Azamor da Costa Barros¹; Jane da Silva¹; Camilla Bayma Fernandes¹; Vitor Hugo Luna Rocha de Almeida²; Robson de Queiroz Monteiro²; Denise Cristina de Souza Matos¹.

1Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz;
2UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução:

Câncer é um termo genérico dado para um grande grupo de doenças que podem afetar qualquer parte do corpo, cuja característica principal é o surgimento de células anormais que se dividem sem controle, podendo invadir outros tecidos em um processo denominado metástase. Atualmente, este vem se tornando um dos mais importantes problemas de saúde pública, e neste cenário, o câncer de mama configurou-se como o mais frequente entre as mulheres. Sendo assim, é relevante o estudo de novos alvos para desenvolvimento de drogas que auxiliem no tratamento destes tumores. Os receptores ativados por protease (PAR) são receptores acoplados à proteína G, possuindo sete domínios transmembranas. PAR1 está diretamente relacionado ao crescimento das células tumorais, invasão e metástase de vários tipos de cânceres malignos, incluindo o de mama. O medicamento Vorapaxar, utilizado para o tratamento de eventos cardiovasculares trombóticos, é um antagonista de PAR1 cuja ligação é irreversível. Após a sua aprovação, diversos outros análogos vêm sendo desenvolvidos, dentre eles o SCH79797. Os efeitos deste inibidor sobre as vias de ativação do PAR1 ainda não foram descritos para o câncer de mama.

Objetivo:

Estabelecer um modelo experimental *in vitro* para a avaliação do receptor PAR1 como alvo terapêutico para o câncer de mama.

Metodologia:

Foram utilizadas duas linhagens celulares: a MCF-7 e a MCF-7 transfectada com PAR1. A demonstração da expressão de PAR1 foi realizada por RT-qPCR

e por citometria de fluxo. Os ensaios funcionais foram realizados através de *western blotting* fosfo-ERK, ensaios de proliferação com marcação de BrDU, expressão gênica de citocinas por RT-qPCR e microarranjo líquido.

Resultado:

Foi possível demonstrar uma maior expressão do receptor PAR1 na linhagem celular MCF-7 PAR1+ em relação à MCF-7. Foi observado que a linhagem MCF-7 PAR1+ promove uma maior ativação da via de sinalização ERK, comparada à linhagem MCF-7, havendo uma ligeira inibição da fosforilação de ERK no tempo de 60 minutos de incubação com SCH 79797. As células tumorais MCF-7 PAR1+ apresentaram maior capacidade proliferativa e, após incubação com SCH 79797, foi observada uma tendência à diminuição da proliferação desta célula em 48 h. Houve uma tendência ao aumento da expressão de fatores de agressividade e invasividade nas células MCF-7 PAR1+ em relação às células MCF-7 avaliadas por RT-qPCR. Foi observado um aumento significativo no nível de IL-8 no sobrenadante das células MCF-7 PAR1+ avaliadas por microarranjo líquido quando comparadas com a MCF-7.

Conclusão:

Foi possível iniciar o estabelecimento de um modelo experimental *in vitro* para o estudo de PAR1 como alvo terapêutico no câncer de mama, sendo demonstradas diferenças no comportamento das linhagens celulares utilizadas. Porém, mais estudos deverão ser realizados para observar os efeitos do agonista e do antagonista de PAR1.

Palavras-chave: câncer de mama; receptor ativado por protease 1 (PAR1); modelo *in vitro*

BIO.07 - Modulação da expressão de IFITM3 via agonistas dos receptores CCR5 e CXCR4 e sua implicação na replicação dos vírus influenza

Thauane dos Santos Correia da Silva¹; André Costa Ferreira¹; Aline Santos¹; Jéssica Morais¹; Thiago Moreno Lopes e Souza²; Marilda Siqueira¹; Milene Dias Miranda^{1*}.

¹Fiocruz/IOC;

²Fiocruz/CTDS.

Introdução:

Durante a co-infecção *in vitro* entre o influenza e o HIV-1, ou apenas a exposição a gp120, responsável por se ligar ao CD4 e aos receptores celulares CCR5 e CXCR4 (durante a infecção por HIV), promove inibição da replicação do influenza. Este efeito inibitório pode ser explicado pelo aumento dos níveis da proteína transmembranar induzida por interferon, IFITM3, que é um fator restritivo a diferentes replicações virais.

Objetivo:

Deste modo, estamos investigando o papel dos receptores celulares, CCR5 e CXCR4, sobre os níveis de IFITM3, e qual sua influência na replicação dos vírus influenza.

Metodologia:

Inicialmente, células MDCK foram tratadas com o dobro do ED50 dos agonistas endógenos para o receptor CCR5 (CCL3/MIP1 α , CCL4/MIP1 β e CCL5/Rantes). Após 24 horas, as células foram infectadas com o vírus influenza A(H1N1)pdm09 no MOI de 0,05 e 0,5 por 1 hora, a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, o sobrenadante foi recolhido e o título viral avaliado por atividade neuraminidase (NA). Posteriormente, para avaliar a cinética dos níveis proteicos de IFITM3, células MDCK foram tratadas com as quimiocinas citadas acima, além de SDF-1(agonista endógeno do receptor CXCR4) e os agonistas exógenos dos receptores CCR5 e CXCR4 (gp120-Bal e gp120-IIIB a 5 μ g/mL). A monocamada celular foi lisada com tampão para *western blot* nos tempos de 3, 6, 18, 24 e 48 horas após exposição aos agonistas. Além disso, células MDCK foram tratadas com as mesmas concentrações dos agonistas

endógenos e exógenos anteriores. Após 18h, as células foram infectadas com o vírus A(H1N1)pdm09 no MOI de 0,05 por 1 hora, a 37 °C e 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, o sobrenadante foi recolhido e o título viral avaliado por atividade NA.

Resultado:

No primeiro ensaio, observamos que a exposição aos agonistas do receptor CCR5 foi capaz de inibir a replicação do vírus influenza, de uma maneira dependente de MOI. No segundo ensaio, vimos que o IFITM3 tem seus níveis proteicos aumentados em 18 horas após exposição aos agonistas endógenos e exógenos. No terceiro ensaio, observamos que os agonistas de ambos os receptores foram capazes de inibir a replicação do vírus influenza. Podemos destacar uma inibição da replicação viral em 90% com a pré-exposição ao MIP1 α . Estamos avaliando as vias de sinalização que levam ao aumento de IFITM3.

Conclusão:

Contribuímos com estudos na área da pesquisa básica sobre estratégias do sistema imune inato, que podem ser usadas no controle de importantes infecções virais. Além disso, estamos avaliando o papel de uma importante proteína do HIV-1, gp120, como um modulador da expressão de IFITM3, que restringe a replicação de diferentes vírus de grande importância clínica como influenza, vírus da hepatite C, *West Nile*, dengue e Febre Amarela.

Palavras-chave: IFITM3; agonistas endógenos e exógenos de CCR5 e CXCR4; influenza

BIO.08 - Production of a scFv antagonistic to VLA-4 protein as a potential biopharmaceutical for chronic inflammatory diseases

Beatriz Chaves^{1*}; Carolina Lessa Aquino¹; João Hermínio Martins da Silva²; Marco Alberto Medeiros¹; Wilson Savino³; Ingo Riederer³; Vinícius Cotta-de-Almeida³.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²Fiocruz Ceará;

³Fiocruz/IOC.

Introduction:

VLA-4 (Very Late Antigen 4, $\alpha 4\beta 1$ integrin) is a transmembrane heterodimeric protein present mainly on the surface of T lymphocytes and monocytes. As it mediates the transmigration of those cells from the endothelium to the inflammatory site, VLA-4 is critically related with most of the chronic inflammatory diseases, as multiple sclerosis and Duchenne muscular dystrophy. There is one therapeutic antibody, Natalizumab, able to recognize VLA-4, which is used for multiple sclerosis treatment. However, in some patients, this treatment might result in the recrudescence of a disease called progressive multifocal leukoencephalopathy. Besides, Natalizumab is also reported to interact with LPAM-1 ($\alpha 4\beta 7$ integrin). Therefore, Natalizumab is not totally safe. In this work, we search for the developed a scFv (*single chain variable Fragment*) able to specifically recognize VLA-4, employing *in silico* tools for the rational design of the molecule, recombinant technology for scFv production and *in vitro* functional assays.

Objective:

The aim of this work is to produce and evaluate a scFv specific for VLA-4.

Methodology:

The scFv was designed through molecular modelling, docking and dynamics and site-directed mutation. Then, the scFv was cloned in pET-28a plasmid and sequenced. It was expressed in *Escherichia coli* Shuffle strain. The expression conditions were optimized, the protein purification step was performed using immobilized metal ion affinity chromatography and purified protein was

detected and quantified. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), transmigration and adhesion assays were performed using Jurkat T-Cell line, which is a VLA-4 expressing cell.

Results:

According to *in silico* tools, the interaction of the constructed scFv with VLA-4 was favorable, compared with the integrins VLA-5 and LPAM-1. The recombinant plasmid sequencing confirmed the nucleotide sequence corresponding to the scFv on the vector. The best condition for the scFv expression was growth in high cell density in Bioreactor with TB medium at 30°C and induction with 0.5mM IPTG for 4h, with a yield of 24mg/L of protein. It was expressed in inclusion bodies and then recovered and solubilized in buffer containing urea 8M. After chromatography and desalting, the final purity was higher than 90%. ELISAs showed that the scFv can recognize VLA-4 on the cell surface. Functional assays revealed that the scFv was able to promote cell adhesion on scFv-coated plates and reduce the cell migration in a fibronectin-driven *in vitro* transmigration, which is desirable for its application an inflammatory context.

Conclusion:

At present, a scFv designed as potential antagonist to VLA-4, produced by recombinant technology, revealed to be able to bind VLA-4 expressing cells and to partially inhibit VLA-4-mediated migration. As perspectives, new functional assays and complementary optimization steps will be performed, aimed at further assessment of this scFv as a potential new treatment for chronic inflammatory diseases.

Keywords: scFv; VLA-4; development

BIO.09 - Expressão de um anticorpo monoclonal anti-PD-1 biosimilar ao Nivolumab

Michael Bernardes Ramos^{1*}; Ana Paula Dinis Ano Bom¹; Anna Erika Vieira de Araujo¹; Aline de Almeida Oliveira¹; Patrícia Cristina da Costa Neves¹; Haroldo Cid da Silva Junior¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer representa a segunda causa de mortalidade na população mundial. No Brasil, as doenças neoplásicas estão entre as três principais causas de morte, com estimativa de 600.000 novos casos por ano, para o biênio 2018-2019. O sistema imunológico desempenha um papel importante no controle e na erradicação do câncer. Entretanto, no cenário de malignidade, diversos mecanismos de supressão imunológica podem estar presentes, reduzindo a imunidade antitumoral do hospedeiro. Desta forma, a terapia com anticorpos dirigidos contra *checkpoints* imunológicos, como a via de morte celular programada 1 (PD-1), tem mostrado sucesso na reversão do quadro de imunossupressão. Os bio similares são medicamentos biológicos que apresentam o mesmo perfil de segurança e eficácia dos medicamentos de referência já licenciados. A substituição de produtos biológicos de referência por bio similares pode aumentar o acesso dos pacientes a estes medicamentos bem como reduzir os gastos públicos com saúde.

Objetivo:

Expressar um anticorpo monoclonal anti-PD-1 bio similar ao Nivolumab (OPDIVO™).

Metodologia:

As sequências nucleotídicas dos genes de cadeia leve e cadeia pesada do anticorpo anti-PD-1 foram obtidas a partir da patente do Nivolumab (US2013173223) e sintetizadas pela empresa IDT DNA Technologies. Em seguida, os genes foram clonados no vetor de expressão pCI-neo. As construções obtidas foram sequenciadas e utilizadas para transfectar células de mamífero Expi293F. A expressão do anticorpo anti-PD1 foi avaliada por ELISA e SDS-PAGE. Então, realizou-se a purificação do anticorpo por cromatografia de afinidade utilizan-

do-se proteína A imobilizada em fase sólida. Por fim, foi realizado um novo ensaio de Elisa para avaliar se o anticorpo se ligava ao receptor PD-1.

Resultado:

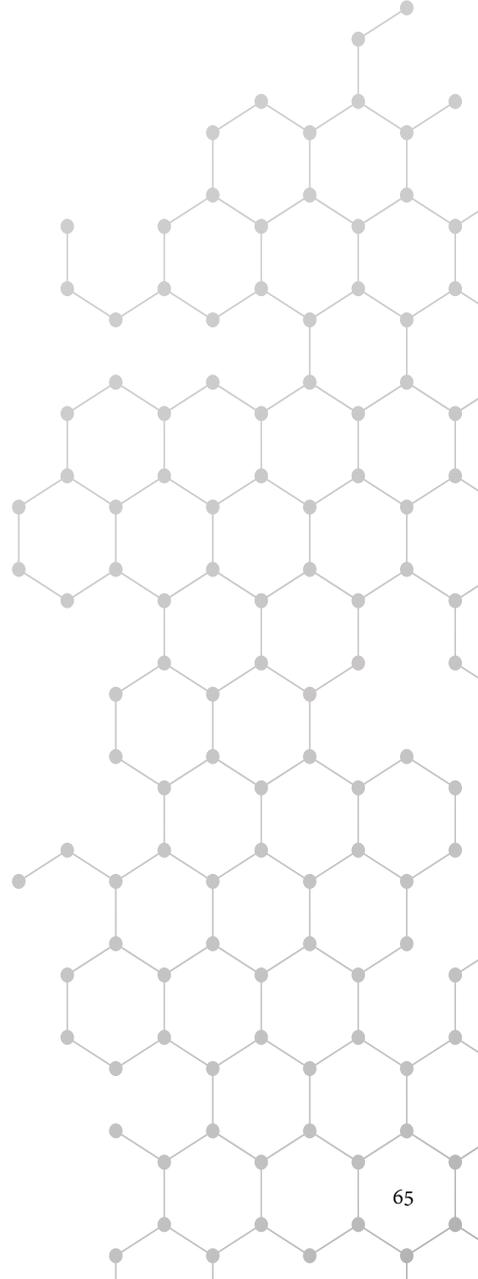
Foram obtidos 6 clones contendo o gene de cadeia leve e 5 clones com o gene de cadeia pesada. Após o sequenciamento destas construções, os clones 4 (cadeia leve) e 1 (cadeia pesada) foram selecionados para a etapa de transfecção. O anticorpo anti-PD-1 foi detectado no sobrenadante de células Expi293F na concentração de 50 µg/mL. A análise do sobrenadante por SDS-PAGE, sob condições redutoras, permitiu a visualização de bandas de aproximadamente 25kDa e 50kDa, correspondentes às cadeias leve e pesada do anticorpo, respectivamente. Já em condições não-redutoras, verificou-se a presença de uma banda com massa molecular de aproximadamente 150kDa, correspondente ao esperado para uma IgG4. Após a etapa de purificação, o anticorpo anti-PD-1 apresentou alto grau de homogeneidade e mostrou perfil eletroforético similar ao Nivolumab. O rendimento final de anticorpo purificado foi de 20 mg por litro de cultura transfectada. Observou-se que o anti PD-1 se liga ao receptor PD-1.

Conclusão:

Estes resultados demonstram que foi possível obter o anticorpo anti-PD-1 a partir de células de mamífero Expi293F. Ensaios de caracterização físico-química e atividade biológica serão realizados para garantir a bio similaridade do anticorpo anti-PD-1 ao Nivolumab.

Palavras-chave: Anticorpo anti-PD-1; bio similar; nivolumab

REATIVOS PARA DIAGNÓSTICO



REA.01 - Identificação de epítomos lineares de célula-B específicos das proteínas de Envelope e Não-Estrutural 1 de vírus ZIKA

Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva^{1*}; Rodrigo Muller¹; Hilton Nascimento¹; Fernando de Paiva Conte¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

Introdução:

Embora a infecção pelo vírus ZIKA (ZIKV) resulte na maioria das vezes em quadros assintomáticos ou de sintomatologia autolimitada, a exposição ao vírus durante a gravidez pode levar a efeitos devastadores no desenvolvimento fetal, resultando em casos de microcefalia, patologias oculares e anormalidades cardíacas em neonatos; além de complicações neurológicas como meningoencefalite, mielite aguda e síndrome de Guillain-Barré. Neste cenário, considerando a sintomatologia indistinguível entre outras arboviroses, o desenvolvimento de um diagnóstico sensível e específico permitiria uma melhor estimativa das da incidência de infecções assintomáticas, sintomáticas, síndromes neurológicas e complicações neonatais associadas a infecção pelo vírus.

Atualmente, o diagnóstico do ZIKV é realizado por técnicas moleculares, sendo empregado em pacientes sintomáticos. Paralelamente, apesar do menor custo, métodos de diagnóstico sorológicos são dificultados pela alta reatividade cruzada com outros *Flavivirus*, especialmente em áreas endêmicas para doenças como Dengue e Febre amarela. Neste cenário, este trabalho visa o desenvolvimento de anticorpos monoclonais específicos contra o ZIKV.

Objetivo:

Identificar *in silico* e validar epítomos de célula-B, com potencial alvo diagnóstico, nas proteínas de Envelope (Proteína-E) e Não-Estrutural-1 (NS-1) de ZIKV.

Metodologia:

(1) Através da combinação de diferentes algoritmos de identificação *in silico* (BepiPred, NetSurP, EMINI-Surface-Accessibility, TepiToll), identificar epítomos lineares de célula B e epítomos T-CD4, em camundongos BALB/c, nas proteínas E e NS1 de ZIKV; (2) validar os epítomos preditos, utilizando amostras de pacientes infectados por ZIKV e animais imunizados com ZIKV (ELISA).

Resultado:

Resultados preliminares: inicialmente, identificamos sete epítomos lineares de célula-B na proteína-E e seis na NS-1. Cada sequência identificada foi comparada as sequências de proteínas homólogas de outros Flavivirus, variando em similaridade de 17% a 60% na proteína-E e de 8% a 77% de similaridade nas sequências preditas para NS-1. Adicionalmente, buscando obter sequências com maior potencial imunogênico, realizamos a predição de epítomos T-CD4, considerando os alelos murinos H2-IAe e H2-IEd, encontrando onze epítomos de célula T na proteína-E e seis na proteína NS-1. Dentre estes, oito epítomos T-CD4 preditos se encontram parcialmente inseridos ou próximos a epítomos de célula-B, podendo ser utilizados na construção de peptídeos de maior potencial imunogênico.

Conclusão:

Identificamos 13 sequências como potenciais alvos de célula -B nas proteínas de Envelope e NS-1 de ZIKV. Considerando a baixa similaridade observada entre parte das sequências encontradas nas proteínas de ZIKV e seus homólogos nas proteínas de Dengue e Febre amarela, acreditamos que será possível a validação de alvos específicos para ZIKV. Para validar os alvos identificados *in silico*, as sequências obtidas serão produzidas como peptídeos sintéticos e testadas por ELISA contra amostras de camundongos imunizados com ZIKV inativado; amostras de macacas *Rhesus* infectadas com o vírus e amostras de pacientes diagnosticadas com ZIKV durante a gestação.

Palavras-chave: Zika virus; Epítomos; *in silico*

REA.02 - Seleção e avaliação de aptâmeros para detecção sorológica da proteína NS1 do vírus Zika

Liliane Monteiro de Morais^{1*}; Laís Nascimento Alves¹; Ana Paula Corrêa Argondizzo¹; Henrique Francisco Rocha¹; Dilson Silva²; Sheila Maria Barbosa de Lima¹; Sotiris Missailidis¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;
²UERJ - Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Introdução:

O vírus Zika (ZIKV) é um Arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*. No Brasil, a circulação autóctone vem ocorrendo desde 2015. A maioria das infecções são assintomáticas ou apresentam manifestações clínicas leves, semelhantes às causadas por outros *Flavivirus*, dificultando o diagnóstico clínico. O diagnóstico laboratorial é realizado principalmente a partir de técnicas moleculares, uma vez que testes sorológicos podem apresentar reação cruzada com outros *Flavivirus*. O genoma viral é formado por uma molécula de RNA fita simples, polaridade positiva, apresentando uma única região de leitura aberta (ORF) que codifica uma poliproteína, posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). A proteína NS1 é expressa na superfície de células infectadas e também é secretada para o meio extracelular, possuindo um papel importante na indução de anticorpos. Essa proteína pode ser encontrada na corrente sanguínea antes ou durante o início dos sintomas, permitindo o diagnóstico precoce da infecção. Os aptâmeros são ferramentas moleculares inovadoras e sofisticadas, selecionadas “*in vitro*” através do método de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). Eles têm alta capacidade de reconhecimento, afinidade e especificidade aos alvos para os quais foram selecionados, possibilitando o desenvolvimento de testes diagnósticos altamente específicos e sensíveis.

Objetivo:

Obter aptâmeros específicos para a proteína NS1 do vírus Zika.

Metodologia:

As proteínas NS1 recombinantes foram obtidas por dois sistemas de expressão: em *Escherichia coli* (rNS1z), fornecida pelo LATER, e em baculovírus (rNS1zg),

comercialmente adquirida. A seleção de aptâmeros foi realizada através do processo de seleção SELEX, utilizando-se microplacas para imobilização da proteína. Uma biblioteca de DNA fita simples foi submetida à interação com a proteína rNS1, onde foram selecionados aptâmeros ligantes. Após lavagem para retirada dos não ligantes, as sequências foram eluídas utilizando concentrações crescentes de sal. Em seguida foi realizada a dessalinização em coluna de 5 kDa e amplificação por PCR unidirecional usando oligonucleotídeos específicos. Este ciclo de seleção foi repetido por sete vezes, com um ciclo de seleção negativa para proteína NS1 de febre amarela. Ao final do último ciclo, foi realizada PCR bidirecional, o produto foi clonado no vetor pCR2.1 TOPO e transformado em *Escherichia coli* TOP10. Os plasmídeos dos clones obtidos foram extraídos, quantificados e sequenciados. As sequências foram analisadas utilizando-se programa de alinhamento (*Muscle*) e as estruturas secundárias foram avaliadas pelo programa mfold. Os aptâmeros foram avaliados por espectroscopia de fluorescência e os dados obtidos estão sendo analisados utilizando-se o programa *Microcal Origin 6*. Os resultados serão expressos pela constante de *Stern Volmer*.

Resultado:

Foram obtidas 16 sequências de aptâmeros para a proteína rNS1z e 3 aptâmeros para rNS1zg.

Conclusão:

Todas as sequências apresentaram perfil promissor, foram sintetizadas e estão sendo avaliadas para verificar a interação aptâmero-alvo.

Palavras-chave: vírus Zika. ; NS1; aptâmeros

REA.03 - Preliminary evaluation of a novel rapid test for the diagnostic of chikungunya virus infection

Karen Trinta^{1*}; Eliane Couceiro¹; Dhammika Gunasekera²; Rafael Macedo¹; Pedro Ribeiro¹; Javan Esfandiari²; Edimilson da Silva¹; Antonio G P Ferreira¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²CHEMBIO Diagnostic Systems, INC.

Introduction:

Chikungunya virus (CHIKV) infection is a severe public health problem, especially in tropical and subtropical countries. Over the past three years, Brazil is experiencing a triple epidemic caused by Dengue, Chikungunya and Zika viruses, in addition, one of the major outbreaks of yellow fever in the last 76 years. These events have changed the way health professionals diagnose and treat infected patients. Clinical diagnosis of these infections is difficult since the signs and symptoms are very similar. Currently, there are several EIA tests, which diagnose these viruses separately. EIA, while efficient, requires a laboratory structure and trained personnel. In this epidemiological situation, the use of a point-of-care (POC) test has a great advantage over EIA. POC tests do not need laboratory structure and can be performed in the field, in places of difficult access and without refrigeration chain. Furthermore, results can be delivered in up to 20 minutes.

Objective:

The aim of this study was to evaluate a rapid immunochromatographic test in a Dual Path Platform® (TR DPP CHIKV IgM/IgG - Chembio, USA) used to investigate, simultaneously, CHIKV-specific IgM and IgG antibodies.

Methodology:

We used 60 CHIKV IgM positive samples and 53 IgG positive samples, from Feira de Santana - BA and 50 negative samples from blood bank. In addition, we tested nine IgM and IgG dengue positive samples and nine IgG and IgM Zika positive samples. All CHIKV positive samples were characterized by testing IgM and IgG antibodies against CHIKV using a commercial EIA, according to manufacturer's instructions (Euroimmun, Germany). Samples from blood bank were also tested against CHIKV IgM and IgG antibodies, using the same commercial test.

Results:

Sixty out of 60 (100%) IgM positive samples were positive on the TR DPP® CHIKV IgM/IgG. Fifty-three out of 53 (100%) IgG positive samples were also positive. Among the negative samples, 49 out of 50 (98%) were negative. None of the IgM and IgG positive samples for dengue and Zika was reagent in the rapid test.

Conclusion:

Our evaluation was a pilot study using a small number of samples; however, the findings show that the TR DPP® CHIKV IgM/IgG has excellent potential for use in the diagnostic of *Chikungunya virus* infection, both active and past. If the chikungunya epidemic in Brazil continues to increase, surveillance and diagnostic laboratories, all over the country, must have a quality rapid diagnostic test available for a prompt reply.

Keywords: Chikungunya; Diagnostic; Rapid Test

REA.04 - Avaliação de proteínas recombinantes para uso no diagnóstico da hepatite C

Christiane Teixeira Pinto^{1*}; Cristina Shaik de Oliveira¹; Felipe Rodrigues Semcovici Ramos¹; Keila Gisele Azevedo Figueiredo dos Santos¹; Edimilson Domingos da Silva¹; Aline Rodrigues Bernardo¹; Nara Mazarakis Rubim¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Grave problema de saúde pública no Brasil e no Mundo, a Hepatite C é uma doença silenciosa que, geralmente, é diagnosticada décadas depois da infecção e tende a evoluir para a forma crônica. A Organização Mundial da Saúde estima que 71 milhões de pessoas em todo mundo convivam com a doença na forma crônica, correspondendo à prevalência global de 1,0%, porém, a maioria delas desconhece o seu diagnóstico, constituindo elo fundamental na cadeia de transmissão dessa infecção.

Objetivo:

Este trabalho tem por objetivo avaliar o desempenho de proteínas recombinantes visando ao desenvolvimento futuro de um teste rápido nacional para detecção da Hepatite C.

Metodologia:

Foram avaliadas sete proteínas recombinantes quanto ao desempenho na plataforma de teste rápido imunocromatográfico de fluxo lateral: A(HCVS401), B(4.8), C(4.7), D(4.5), E(HCV207), F(HCV241) e G(HCV255). Inicialmente, realizou-se uma triagem utilizando eletroforese e MAPIA (*Multi Antigen Print Immunoassay*) para avaliação do perfil e da reatividade dessas proteínas, respectivamente. As proteínas selecionadas foram avaliadas na plataforma de teste rápido de fluxo lateral, cada uma com três tipos diferentes de membrana de nitrocelulose (3µm, 10µm e 15µm). As proteínas foram inicialmente impregnadas na concentração de 40ng em membranas de nitrocelulose sobre cartão adesivo e secas em estufa (37°C) para a posterior adição das membranas da amostra, conjugado (proteína A/Ouro coloidal) e residual que compõem o teste. O cartão completo foi cortado em tiras e estas encaixadas em suportes plásticos. Amostras caracterizadas como positivas e negativas para HCV foram

testadas utilizando diferentes tampões de corrida e concentrações das proteínas para seleção da melhor condição.

Resultado:

A avaliação pela eletroforese mostrou proteínas com peso molecular, pureza e integridade de acordo as especificações dos fornecedores. No entanto, pela avaliação do MAPIA, as proteínas F e G não apresentaram reatividade necessária e foram eliminadas nessa triagem. As cinco proteínas restantes foram testadas em diferentes configurações do teste rápido, totalizando 15 combinações e foram escolhidas as condições: A1, B1, B2, C2, D2 e E1. Em seguida foram realizados inúmeros testes com maior número amostral utilizando-se diferentes formulações do tampão de corrida. Os resultados mostraram que as proteínas A e E foram as mais promissoras, apresentando índices preliminares de sensibilidade 80,5% e 75,5%, respectivamente e especificidade de 100% em ambas.

Conclusão:

Dentre as proteínas avaliadas, duas mostraram-se promissoras. Serão realizados ensaios complementares utilizando-se simultaneamente ambas as proteínas no mesmo teste com o intuito de ampliar a capacidade de detecção de anticorpos anti-HCV. Novas análises com maior número amostral serão necessárias para definição dos índices de sensibilidade e especificidade do teste, a fim de concluir em quais condições as proteínas recombinantes serão utilizadas para que sejam consideradas boas candidatas a alvos em um kit de imunocromatografia de fluxo lateral – Teste Rápido para diagnóstico da hepatite C.

Palavras-chave: Hepatite C; Teste rápido de fluxo lateral; Diagnóstico

REA.05 - High density peptide microarrays – an essential tool for fast development of serological assays: example of Hepatitis E Virus

Benjamin Meyer¹; Pedro S. R. Simonini^{1*}; Volker Stadler¹; Victor Max Corman²; Christian Drosten².

¹PEPperPRINT GmbH, Heidelberg, Germany;

²Institute of Virology, Charité, Universitätsmedizin, Berlin, Germany.

Introduction:

Serological diagnosis of viral diseases often remains challenging either due to cross-reactivity towards protein antigens, heterogeneous immune responses or poorly defined antigenic properties of proteins used in serological assays. A single or multiple well-characterized epitopes can present a much better specificity. However, it is more expensive and time-consuming to develop such assays. We present here a platform for the fast and inexpensive identification of multiple peptide epitopes for the development of highly specific serological assays. As an example, we chose to identify Hepatitis E Virus (HEV) epitopes. HEV is increasingly recognized as an emerging pathogen which can cause fatal disease in pregnant woman and immune-compromised patients, such as organ transplant recipients. While acute stages of the disease can be diagnosed using nucleic acid amplification techniques, the overall burden of the disease in the general population can only be estimated using state of the art serological assays.

Objective:

HEV serological assays of different manufacturers vary considerable due to differences in the antigen content. Serological assays based on carefully selected peptides are ideally suited to overcome these problems. The objective of this study is to show that high density peptide microarrays can be used as a tool to carefully select highly specific and sensitive epitopes in HEV in a very inexpensive and fast way.

Methodology:

We translated the whole proteomes of prototype strains of all human pathogenic genotypes of HEV into linear or cyclic peptides. In total, we synthesized 5.426

peptides on a single microarray. We incubated the microarrays with sera of patients infected with HEV and compared their IgG binding profile to samples of non-infected patients in order to identify HEV specific antibodies.

Results:

We analyzed 6 IgG-positive and 3 IgG-negative sera both using linear and cyclic peptides. Overall, we found a very heterogenic immune response towards HEV proteomes. We identified clear differences between seropositive and seronegative individuals in the overall humoral response pattern, as well as at a single peptide level. Discriminatory immunogenic regions were specially identified in the N-terminal part of the capsid protein and at the C-terminal end of ORF3. In these regions, a couple of peptides could clearly discriminate between HEV positive and negative patients. In total, these results were obtained in only 4 weeks: 1 day for HEV peptide library design, 3 weeks for microarrays production, 4 days for immunoassay and data analysis.

Conclusion:

Although the results shown here do not present a ready-to-use serological test, our data show that high density peptide microarrays can identify disease specific epitopes in a very fast and inexpensive way. Our platform enables the discovery of novel linear and conformational epitopes that can lead to the development of innovative and multiplexed serological assays with a higher sensitivity and specificity.

Keywords: Development of serological tests, High density peptide microarrays; Viral proteome

REA.06 - Expressão e purificação das proteínas NS1 e NS5 do vírus Zika para utilização na seleção de aptâmeros

Ana Paula Corrêa Argondizzo^{1*}; Alessandra Alves Abalo¹; Laís Nascimento Alves¹; Henrique Francisco Rocha¹; Liliane Monteiro de Moraes¹; Sotiris Missailidis¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

O vírus ZIKV é um vírus de RNA do gênero *Flavivirus*. Inicialmente isolado na África e Ásia, atualmente encontra-se difundido nas Américas, com o primeiro caso reportado no Brasil em 2015. A infecção causada por ZIKV pode ser assintomática ou apresentar sintomas similares com aqueles causados por outros vírus da família *Flaviviridae*. O RNA do ZIKV é traduzido em uma poliproteína, que é processada resultando na formação de três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS). A NS1 pode ser segregada e encontrada na corrente sanguínea durante a fase aguda da infecção. A NS5 (RNA polimerase RNA dependente) pode desempenhar papel importante na regulação do processo de *splicing* de genes em células hospedeiras, além de interagir com outros fatores e ativar a secreção de interleucina 1- β .

Objetivo:

Expressar as proteínas NS1 e NS5 de ZIKV e purificá-las, para seleção de aptâmeros e MAbs a serem utilizados no desenvolvimento de diagnósticos específicos.

Metodologia:

O gene codificante para NS1z foi amplificado e clonado no vetor pET100-D/TOPO. A região correspondente à porção C-terminal da proteína NS5z foi sub-clonada no vetor pET28a, a partir do pQE30/NS5z. Ambos os plasmídeos recombinantes foram inseridos em *Escherichia coli* BL21 Star (DE3) e as proteínas recombinantes expressas a partir da indução com IPTG. A fim de melhorar a solubilidade proteica, foram testadas diferentes temperaturas de indução (15°C, 20°, 25°C e 37°C) e tampões, contendo sais, detergentes e agentes caotrópicos, no processo de lise celular por sonicação. As proteínas foram purificadas por IMAC (coluna HisTrap HP) e dialisadas em tampões específicos para permitir enovelamento.

Resultado:

As proteínas rNS1z e rNS5z foram expressas, nas 4 temperaturas descritas, de forma insolúvel. A rNS5z solubilizou quando empregado tampão HEPES 25mM/NaCl 200 mM/triton x-100 0,1%/glycerol 10%/n-lauril-sarcosil 3%. Na IMAC os contaminantes foram eluídos com 10, 30 e 50 mM imidazol e a rNS5z com 500 mM. Subsequentemente, a proteína foi dialisada em tampão PBS/glicerol 5% pH7,4. Diferentemente da rNS5z, a rNS1z foi solubilizada apenas com a adição de 6 M de ureia. Para a purificação de rNS1z o precipitado bacteriano foi lisado em Tris 20 mM pH 8,0. Em seguida, o corpo de inclusão foi lavado com Tris 20 mM pH 8,0 contendo 2 e 4 M ureia e solubilizado com Tris 20 mM/ureia 6 M pH 8,0. No processo de purificação os contaminantes foram eluídos nas concentrações de 20, 80, 100 e 120 mM de imidazol, e rNS1z com 500 mM. Após purificação, a proteína foi dialisada em tampão Tris 20 mM pH 8,0 com redução de ureia de 6 M para 2 M.

Conclusão:

As proteínas rNS1z e rNS5z, foram expressas e purificadas com sucesso e subsequentemente empregadas na seleção de aptâmeros que poderão ser utilizados no desenvolvimento de ensaios diagnóstico para ZIKV.

Palavras-chave: expressão e purificação de proteínas recombinantes; NS1 e NS5; Zika vírus

REA.07 - Diagnóstico sorológico e molecular para Zika vírus

Daniele Bilac^{1*}; Diana P. B. Freire¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Atualmente os arbovírus mais prevalentes nas Américas são os vírus da Dengue (DENV), vírus Chikungunya (CHIKV) e o Zika Vírus (ZIKV), transmitidos para humanos por mosquito do gênero *Aedes*. São agentes causadores de infecções clínicas e subclínicas em humanos, representando umas das mais importantes preocupações de saúde pública nas regiões tropicais e subtropicais. Nos países latino-americanos os testes de laboratório estão restritos ao DENV para confirmar arboviroses. O diagnóstico diferencial entre esses arbovírus é muito amplo, não sendo possível distinguir o vírus causador durante a fase aguda da doença com base nos sinais ou sintomas clínicos. Visando um melhor atendimento à saúde pública, Bio-Manguinhos (BM), sob a coordenação do Ministério da Saúde (MS) desenvolveu para diagnóstico sorológico de ZIKV o TR DPP-ZikaIgM/IgG[®] e para diagnóstico molecular o Kit Molecular ZDC[®] (ZIKV, DENV e CHIKV).

Objetivo:

Descrever e demonstrar a importância dos métodos para o diagnóstico laboratorial de ZIKV produzidos por BM.

Metodologia:

Levantamento bibliográfico incluindo livros e artigos sobre a doença, bulas de kits de diagnóstico, bem como artigos e fontes do MS que demonstram a doença e as formas de diagnóstico.

Resultado:

Foi possível identificar, na literatura pesquisada, que o diagnóstico sorológico de ZIKV é geralmente baseado na detecção de anticorpos IgM usando o Ensaio Imuno Enzimático (EIE), uma vez que a viremia é bastante curta. Além disso, testes moleculares têm sido utilizados com frequência e com sucesso para diagnosticar doenças infecciosas e mostram maior sensibilidade e especificidade do que testes sorológicos. No entanto, nos estágios posteriores da

doença, a sensibilidade dos métodos moleculares diminui devido ao início de uma resposta imune rápida e correspondente ocorrendo a redução da carga viral. Nesta fase, o teste de diagnóstico EIE IgM é mais sensível. Dos kits de diagnóstico produzidos por BM, a metodologia do Kit Molecular ZDC[®] baseia-se na detecção de RNA viral através da técnica de transcriptase reversa seguida de reação de cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR), em um sistema triplex capaz de detectar e identificar em uma mesma reação o RNA de ZIKV, CHIKV e controle interno e um sistema duplex discriminatório para DENV e controle interno. Enquanto que, o TR DPP ZikaIgM/IgG[®] é um teste rápido de triagem qualitativa de uso único, para detectar anticorpos IgM e IgG para ZIKV em sangue total venoso, de punção digital, soro ou plasma humano. Seu princípio é uma combinação de antígenos de ZIKV ligados a uma membrana (fase sólida), anticorpos específicos e conjugado de proteína A com partículas de ouro coloidal.

Conclusão:

A busca de BM por ferramentas de diagnóstico confiáveis é fundamental para apreciar melhor o peso global da ZIKV e alcançar uma resposta efetiva à saúde pública.

Palavras-chave: Diagnóstico sorológico; Diagnóstico molecular; Zika vírus

REA.08 - Seleção e avaliação de aptâmeros para a proteína NS5 do vírus Zika

Alessandra Alves Abalo^{1*}; Ana Paula Corrêa Argondizzo¹; Laís Nascimento Alves¹; Henrique Francisco Rocha¹; Liliane Monteiro de Moraes¹; Ethel Valdez²; Dilson Silva²; Sotiris Missailidis¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;
²UERJ - Universidade Estadual do Rio de Janeiro.

Introdução:

O vírus ZIKA (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* e a infecção pode causar quadros febris e de *rash* cutâneo semelhante a doenças causadas por outros vírus da mesma família. O RNA do ZIKV apresenta polaridade positiva, sendo traduzido em uma poliproteína posteriormente processada resultando na formação de três proteínas estruturais e sete não estruturais (NS). A NS5 é uma RdRp que sintetiza o RNA viral através de um mecanismo de síntese de novo e está localizado principalmente no núcleo. Os aptâmeros são ferramentas moleculares sofisticadas selecionadas *in vitro* através do método de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX). Eles têm alta capacidade de reconhecimento, afinidade e especificidade aos alvos para os quais foram selecionados.

Objetivo:

Selecionar e avaliar aptâmeros específicos para detectar a proteína NS5 de ZIKV em teste de diagnóstico.

Metodologia:

Para a seleção dos aptâmeros foi utilizada uma biblioteca de ssDNA e as técnicas de seleção realizadas em microplaca ou em coluna HiTrap NHS (GE Healthcare), sendo a proteína alvo rNS5z imobilizada nestas. Após retirada do material não ligado e eluição das sequências de ssDNA ligadas ao alvo com NaCl e NaSCn, as amostras foram dessalinizadas e amplificadas por PCR. Este ciclo foi repetido sete vezes (seleção em placa) ou dez vezes (seleção em coluna), e as amostras dessalinizadas foram submetidas a PCR ssDNA usando *primers* específicos. Cada amostra foi clonada no vetor pCR2.1 TOPO e transformado em *Escherichia coli* TOP10. Clones foram selecionados e os plasmídeos recom-

binantes extraídos, quantificados e sequenciados. As seqüências dos aptâmeros foram alinhadas e as estruturas secundárias avaliadas no programa mfold. Para caracterizar as afinidades de ligação dos aptâmeros ao alvo, a técnica de espectroscopia de fluorescência foi empregada utilizando rNS5z e titulações com os aptâmeros em concentrações de 0,3, a 3,3 μ M. Os espectros de emissão foram adquiridos entre 300 e 400 nm com um comprimento de onda de excitação de 290 nm a temperatura de 25°C. Os dados da fluorescência foram analisados utilizando-se o modelo de Stern-Volmer no programa Origin para estabelecer uma ordem de afinidades e selecionar a molécula com a maior afinidade, que será escolhida para desenvolvimento.

Resultado:

Utilizando a técnica de SELEX em microplaca, um total de 11 seqüências de aptâmeros foram obtidas e sintetizadas. Para a seleção em coluna foram obtidas 24 seqüências, sendo 6 sintetizadas após avaliações incluindo repetitividade e estrutura secundária. Utilizando a metodologia de “*quenching*” da fluorescência e sua afinidade expressa em constante de Stern-Volmer identificada, foi realizado um ranqueamento dos aptâmeros por ordem de afinidade.

Conclusão:

A seletividade dessas moléculas vai ser testada por sua interação com proteínas séricas (HSA) para podermos definir nosso “*lead-molecule*” para uso em testes de diagnóstico para identificação do vírus durante o período de infecção aguda.

Palavras-chave: aptâmeros; NS5; Zika vírus

REA.09 - Mapeamento de epítomos de seis proteínas da membrana externa de *Leptospira interrogans* usando tecnologia de síntese peptídica de alto rendimento

Priscila de Simone Gonçalves^{1*}; Paloma Napoleão-Pêgo¹; Patricia Fernandes Ferreira¹; Andre Luis Almeida Souza²; Salvatore Giovanni De-Simone¹.

¹Fiocruz/CDTS;

²Fiocruz/IOC.

Introdução:

A leptospirose é uma zoonose emergente de nível global e de grande importância, causada por infecção com espécies de *Leptospira* patogênicas, merecendo destaque principalmente nos países em desenvolvimento. Recentemente, casos endêmicos e epidêmicos de hemorragia pulmonar grave têm sido reconhecidos como mais uma importante manifestação relacionada à leptospirose. O diagnóstico precoce na fase aguda da infecção é importante e necessário para se iniciar a antibioticoterapia. Vários ensaios de ELISA foram desenvolvidos para o diagnóstico em humanos e animais. Entretanto estes testes são frequentemente empíricos e apresentam baixas sensibilidade e especificidade, principalmente na fase aguda da infecção. As proteínas de membrana externa (OMPs) predominam na membrana externa da bactéria e são altamente conservadas entre as diferentes espécies de *Leptospira*. Portanto, essas OMPs são importantes alvos para o desenvolvimento de novos testes de diagnóstico.

Objetivo:

Mapear todos os epítomos IgG de 6 proteínas de *L. interrogans*, identificando os epítomos de reação cruzada e específicos para compor insumo para o desenvolvimento de um novo teste de diagnóstico sorológico rápido e específico.

Metodologia:

Uma biblioteca de 321 peptídeos cobrindo toda a extensão de 6 proteínas (LipL32, LipL41, LipL49, ISD, LigB e LigS), com um comprimento de 15aa e sobreposição de 9 resíduos foi sintetizada em membranas celulósicas através da técnica de *Spot-synthesis* e confrontada em banco de proteínas, usando ferramentas de bioinformática, para identificar possíveis reações cruzadas. A especificidade foi confirmada através de ELISA, usando quimeras sintéticas

produzidas por síntese química e soros de pacientes com diversas doenças hemorrágicas febris.

Resultado:

Foram identificados 34 epítomos IgG abrangendo toda a extensão das 6 proteínas de *L. interrogans*, entretanto a LipL49 (10) foi a OMP que apresentou maior antigenicidade seguida da serino protease (9) e peptidase sinal (7). A LipL32 foi a proteína com maior número de epítomos específicos. O ELISA usando três quimeras sintéticas mostrou a especificidade frente a soros de pacientes com diversas patologias hemorrágicas.

Conclusão:

A reatividade cruzada revelada por algumas das OMP analisadas e a especificidade de outro pequeno, mas significativo, número de epítomos indicam a possibilidade concreta de serem obtidos insumos com potencial de desenvolvimento de novos ensaios diagnósticos imunológicos mais específicos para o desenvolvimento de testes diagnósticos para a Leptospirose. Esforços estão sendo empreendidos para a construção de uma quimera molecular através de tecnologia de DNA recombinante para uso diagnóstico.

Palavras-chave: *Leptospira interrogans*; epítomos; diagnóstico

REA.10 - Padronização da microplataforma automatizada e de alto desempenho para análise de soroneutralização do vírus Zika baseada em apoptose (micro CRNT)

Amanda Torrentes de Carvalho^{1*}; Stephanie Almeida da Silva²; Emily Hime Miranda²; Pedro Paulo de Abreu Manso³; Sheila Maria Barbosa de Lima²; Zilton Farias Meira de Vasconcelos¹.

1Fiocruz/IFF;

2Fiocruz/Bio-Manguinhos;

3Fiocruz/IOC.

Introdução:

O teste de Neutralização por Redução de Placas de Lise (PRNT) é empregado na quantificação de anticorpos neutralizantes e apresenta, frente a outros testes virológicos, maior especificidade. Entretanto o mesmo é laborioso e demanda tempo. O PRNT adotado no laboratório utiliza placa de 24 poços para o vírus Zika (ZIKV), o que limita a análise simultânea de um número elevado de amostras. Além disso, a quantificação dos títulos de anticorpos é feita pela contagem manual de “placas”, estando sujeita a variações intra e inter-operador. Como o ZIKV regularmente causa efeitos citopáticos e consequente morte de células altamente permissivas à infecção, nos perguntamos se eventos iniciais desta propriedade viral poderiam ser utilizados para otimizar o ensaio.

Objetivo:

Desenvolver uma plataforma de ensaio biológico automatizado e com alto desempenho baseada nos princípios do PRNT ZIKV utilizando microplaca e cuja quantificação do bloqueio da infecção pelos anticorpos seja dada através da detecção de fluorescência emitida por um substrato permeável à membrana celular, projetado para detectar apoptose.

Metodologia:

Para avaliar se seria viável a contagem automatizada de células no nosso ensaio, utilizamos o PRNT Febre Amarela (FA), já padronizado pelo LATEV, que também é feito em microplaca. Neste ensaio a contagem é feita manualmente via operador com utilização do Biospot. Portanto, comparamos as duas formas de contagem. O coeficiente de correlação (r^2) descreveu a linha em que melhor se

dispõem os dados comparativos e a correlação entre os tipos de contagem para PRNT FA foram feitas através do teste de Spearman. Para a padronização do micro CRNT, estabelecemos a concentração celular e os controles apoptóticos (Brefeldina A) e necróticos (Triton X), utilizando marcação para DAPI e Iodeto de propídeo através de imagens por microscopia de fluorescência.

Resultado:

A comparação estatística dos títulos de anticorpos para PRNT FA usando corte de 90 indivíduos demonstrou correlação direta entre os valores obtidos pela contagem automatizada, em comparação à contagem manual feita pelo operador 1 (0,9394) e operador 2 (0,9451). Também observamos boa correlação entre os dois métodos de contagem, tanto inter-operadores (0,9830) quanto entre estes e o método automatizado (Op1 0,9204; Op2 0,9290). Para estabelecimento da concentração e quantificação celular do micro CRNT e respectivos controles de morte celular, utilizamos rastreamento de núcleos individualizados de células vero cultivadas por 48 horas e padronizamos a cinética ideal para apoptose (48 horas pós tratamento) e necrose (24 horas pós tratamento).

Conclusão:

Estabelecemos uma plataforma de ensaio biológico com células vero em microplaca para análise da viabilidade celular. Além disso, a comparação da acurácia da contagem automatizada de PRNT em placa de 96 poços demonstra uma boa equivalência além de uma rápida análise em comparação ao método manual podendo, futuramente, ser utilizado como abordagem analítica para o PRNT ZIKV e o micro CRNT.

Palavras-chave: Microplataforma automatizada; Soroneutralização; Apoptose

REA. I I - Seleção e caracterização de aptâmeros contra proteína PBP2a para o diagnóstico de infecção por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

Laís Nascimento Alves^{1*}; Sotiris Missailidis²; José Procópio Moreno Senna²; Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida¹.

¹Instituto de Radioproteção e Dosimetria;

²Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais frequentes que existem, tanto dentro dos hospitais como na sociedade, sendo uma das principais causadoras de infecções hospitalares. A meticilina, um antibiótico β -lactâmico que pertence ao grupo das penicilinas, tem sido muito utilizada no tratamento de pacientes infectados por este microorganismo. Este tipo de antibiótico atua, de forma geral, inibindo as proteínas que se ligam à penicilina (PBP) presentes na membrana destas bactérias. No entanto, a *S. aureus* pode se tornar resistente à meticilina (MRSA) e a outros β -lactâmicos, através do aumento da expressão de uma isoforma das PBP não sensível a este medicamento, a PBP2a. Devido às opções limitadas de tratamento, o diagnóstico acurado e precoce faz-se extremamente importante para determinar o melhor curso terapêutico antes do avanço grave da infecção. O diagnóstico dessas infecções é baseado atualmente na análise *in vitro* de amostras, o que não oferece uma identificação clara da situação geral do paciente. Aptâmeros são ferramentas moleculares sofisticadas selecionadas *in vitro* com capacidade de ligarem-se com grande afinidade e especificidade a alvos, sendo assim, uma opção viável para o estudo de nova proposta de diagnóstico da infecção por MRSA.

Objetivo:

Seleção e caracterização de aptâmeros anti-PBP2a para radioimunodiagnóstico *in situ* de infecções por MRSA.

Metodologia:

Usando a metodologia SELEX, conforme protocolo descrito por Simmons *et al* (2012), 100 μ L de biblioteca de aptâmeros em cadeia simples amplificados foram incubados no poço com fragmento da proteína PBP2a adsorvido em

placa de ELISA, durante 1 h com agitação. Os aptâmeros desacoplados e espécies ligadas com baixa afinidade foram removidos por incubação de 100 μ L de PBS com 0.5 M de NaCl, num agitador durante 5 minutos. Os aptâmeros que permaneceram ligados foram eluídos usando um gradiente de NaCl que variou de 1.0 M a 1.5 M, em incrementos de 100 mM coletados separadamente, e uma eluição final de 3.0 M NaSCN. Os materiais coletados foram dessalinizados utilizando-se filtros Microcons (Millipore, Life Sciences) com um peso molecular limite de 5 kDa, e, em seguida, amplificados com PCR cadeia dupla para visualização em gel de agarose para verificar a presença dos aptâmeros.

Resultado:

Foram identificados aptâmeros em todas as bandas de interesse. Como eram esperados de apresentar a maior afinidade e especificidade para a PBP2a, as amostras das eluições 1.5M NaCl e 3.0M NaSCN foram utilizadas para clonagem em *E. coli* Top10 usando vetor pCR 2.1-TOPO (Invitrogen). Após sequenciamento, três sequências dominantes foram identificadas e analisadas por MFold para a predição das suas estruturas secundárias. Por fim, os aptâmeros foram avaliados por espectroscopia de fluorescência para estabelecer lista de candidatos para desenvolvimento, baseado na constante de Stern-Volmer para determinação de afinidade.

Conclusão:

Os aptâmeros foram identificados com sucesso.

Palavras-chave: aptâmeros anti-PBP2a; MRSA; diagnóstico *in situ*

REA.12 - Desenvolvimento de teste rápido para diagnóstico *point-of-care* de hepatite A

Luciane Almeida Amado Leon^{1*}; Gabriel Menezes Costa dos Santos¹; Vinícius da Motta de Mello¹; Michel Vergne Sucupira²; Edmilson Da Silva²; Antonio G P Ferreira²; Vanessa S de Paula¹.

¹Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz;

²Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Mudanças na epidemiologia da hepatite A vêm ocorrendo em diversos países do mundo. No Brasil, a incidência da hepatite A passou de 11,7 em 2005, para 0,6 casos por 100 mil habitantes em 2016. A redução da exposição ao vírus da hepatite A (HAV) durante a infância tem como consequências o aumento das ocorrências de surtos epidêmicos e o deslocamento da faixa etária infectada pelo HAV para indivíduos adultos, quando a morbidade e letalidade da doença são maiores. Outro aspecto relevante é a recente inclusão da vacina contra o HAV na rede pública de saúde apenas para crianças de 15 meses a 5 anos, e, portanto, uma grande parcela da população ainda permanece suscetível à esta infecção. No Brasil, o aumento de indivíduos suscetíveis, aliado à circulação do vírus no ambiente, potencializa a ocorrência de surtos epidêmicos. Diante deste cenário, o emprego de testes rápidos representa uma poderosa ferramenta para o diagnóstico rápido de hepatite A aguda, inclusive em regiões de difícil acesso onde os diagnósticos laboratoriais e dados epidemiológicos são escassos, contribuindo assim para a prevenção e controle desta infecção em toda a extensão territorial do país

Objetivo:

Desenvolver um teste rápido (TR) baseado em imunocromatografia de fluxo lateral para detecção de anticorpos anti-HAV IgM e IgG em amostras de soro.

Metodologia:

A proteína VP1-2A do HAV foi sintetizada por clonagem e expressão em sistema bacteriano, purificada e concentrada por técnicas cromatográficas. A mesma foi dosada por fluorimetria, caracterizada por SDS-Page e avaliada sua especificidade por *Western blotting*. Protótipos de testes rápidos utilizando a

proteína VP1-2A recombinante foram desenvolvidos pelo LATED/ Bio-Manguinhos e padronizados através de um painel de amostras de Controle de Qualidade Interno (CQI) considerando-se diferentes parâmetros: concentração e volume de proteína (5,0 e 10,0uL) e formulação de tampões de corrida. Também foram avaliados diferentes tempos de leitura dos resultados: 10, 15 e 20 minutos.

Resultado:

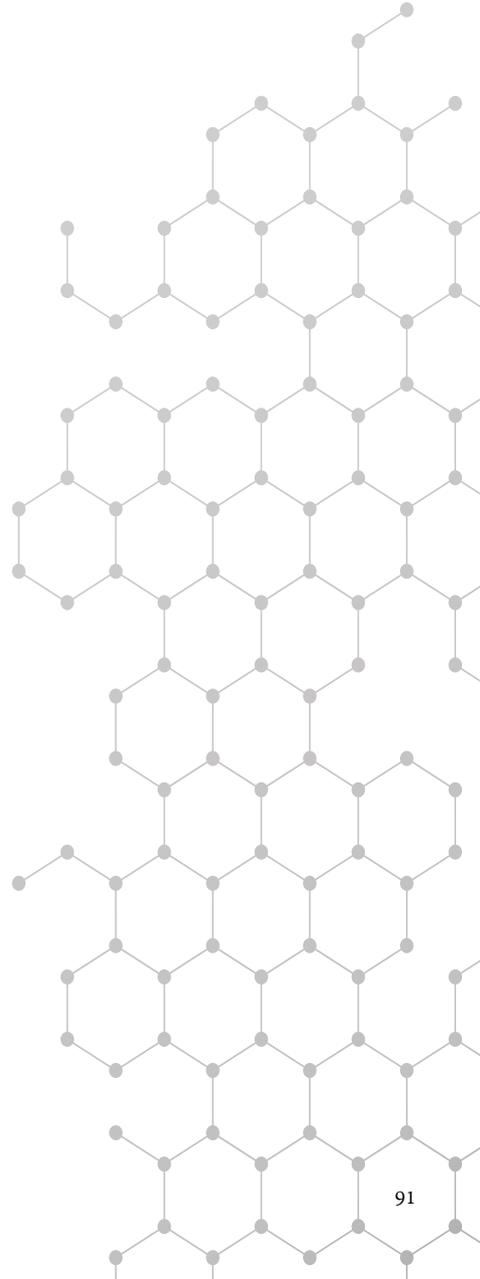
Após a purificação, a proteína VP1-2A foi obtida com uma concentração de 1.26mg/mL. Através da técnica de SDS-Page foi possível caracterizar a proteína pelo seu peso esperado (51kDa). Por *Western Blotting* a especificidade da proteína VP1 foi confirmada pela capacidade de detectar amostras reativas e não-reativas para anti-HAV IgG. Na avaliação preliminar do desempenho do teste rápido, utilizando um painel de amostras de soro anti-HAV positivas (n=14) e anti-HAV negativas (n=22), o teste apresentou uma boa sensibilidade (86%), utilizando 10uL de proteína em uma concentração de 1.0mg/mL e realizando a leitura do resultado após 10 minutos. Entretanto, foram obtidos resultados falso-positivos.

Conclusão:

Estes resultados indicam que o teste rápido apresenta uma potencial aplicação para o diagnóstico de hepatite A entretanto, ainda precisa de aprimoramento

Palavras-chave: hepatite A; Diagnóstico; teste rápido

GESTÃO



GES.01 - Pregão eletrônico e melhoria das compras governamentais: evidências sobre as compras de material hospitalar e a percepção dos pregoeiros

Carmen Priscila de Andrade Alves^{1*}; Marcelino José Jorge¹; Alejandro Marcel Hasslocher-Moreno¹; Jacques Sochaczewski¹; Daniela de Souza Ferreira¹; Patrícia Santos Cavalheiro Silva¹; Valdir Sérgio Ermida¹.

¹Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz.

Introdução:

A reforma pró-competição nas compras da Administração Pública brasileira introduziu a modalidade Pregão Eletrônico (PE) em 2005: a sessão pública, via Internet, de comunicação entre Pregoeiros e fornecedores. A estratégia de promoção da pesquisa clínica associada à assistência em doenças infecciosas do INI/Fiocruz vincula a adoção do PE às prescrições da gestão orientada para resultados sobre os efeitos da “Nova Administração Pública” no desempenho da Fiocruz.

Objetivo:

Apresentar evidências em confirmação da hipótese de melhoria do desempenho em compras através da adoção do PE e prescrições sobre a efetivação dos resultados dele esperados.

Metodologia:

Estudo de caso sobre compras de material hospitalar no INI/Fiocruz, contemplando: pesquisa bibliográfica sobre avaliação do desempenho nas compras governamentais; pesquisa documental sobre definição e quantificação de variáveis do desempenho em compras, um tema rarefeito na literatura; e análise exploratória de dados obtidos da aplicação de questionário, com tabelas de frequência e análise de ranqueamento, para identificar a importância das características da percepção de 51 Pregoeiros da Fiocruz sobre desempenho, problemas e oportunidades de melhoria dos PE.

Resultado:

A pesquisa bibliográfica evidenciou critérios de avaliação de desempenho em compras validados na literatura: transparência e qualidade (efetividade do “ajuste” entre solicitantes e fornecedores), economicidade e celeridade na con-

dução dos Processos Administrativos de Compras (PAC). A documental, sobre os oito PAC com 225 tipos de itens de material hospitalar do INI em 2015, que mostrou que houve em termos de: transparência e qualidade no mínimo, 5 fornecedores por item terminado e cancelamentos limitados a 32% dos itens; economicidade, o valor adjudicado foi 16% inferior ao valor *ex-ante*; e celeridade, diminuindo o período decorrido entre a pesquisa de mercado e a adjudicação de 184 para 72 dias ao final de 2015. A das percepções dos Pregoeiros, a concordância sobre: 6 tipos de efeitos do treinamento no desempenho profissional entre 65% dos participantes; 11 características da percepção sobre a contribuição do PE à melhoria da condução dos PAC (81% deles); e 21 problemas-alvo para promovê-la (79%).

Conclusão:

Contribuições da pesquisa ao conhecimento: o efeito do PE é associado à transparência, qualidade, celeridade e economicidade na condução dos PAC; e a métrica apropriada na análise dos dados amostrais confirma a hipótese de ganhos de desempenho resultantes do PE. Contribuições gerenciais: constata o afastamento das prescrições do arcabouço normativo do PE como problema para melhorar o desempenho nos PAC; e ratifica o efeito do grau de instrução, treinamento e conhecimento do arcabouço normativo do Pregoeiro nas melhorias decorrentes do PE. Seus resultados têm implicações na efetividade do diagnóstico dos problemas e oportunidades para a convergência ao desempenho esperado do PE.

Palavras-chave: Pregão Eletrônico; Licitação; Compras Governamentais

GES.02 - Reengenharia de processos de gestão de documentos e informações: o caso Bio-Manguinhos

Chayana Leocádio da Silva^{1*}; Carina Duim Gonçalves¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

A gestão documental e a proteção aos documentos de arquivo são deveres do poder público exigidos pela lei 8.159/91 e regulamentadas pelo decreto 4.073/02 que prevê a política nacional de arquivos públicos e privados. Além dos aspectos regulamentais mandatórios, o contexto atual de mudanças vertiginosas das ferramentas de tecnologia de informação e comunicação e de organizações cada vez mais dinâmicas e exigentes, que necessitam de agilidade em seus atos e decisões, as informações e os documentos têm papel fundamental como recurso organizacional, ativo informativo e intangível, uma vez que eles são o reflexo da própria administração, são fonte de dados, informações e conhecimento dos processos, das atividades e funções da instituição.

Objetivo:

Estruturar os processos de gestão de documentos e informações técnicas, identificando oportunidades de melhoria em aspectos legais, eficiência e eficácia.

Metodologia:

Para esta análise foram realizadas atividades sistemáticas e racionais que, com maior segurança e economia, permitiram alcançar o objetivo – conhecimentos válidos e verídicos – traçando o caminho a ser seguido, auxiliando nas decisões das pesquisadoras. Para tanto, foram utilizadas pesquisa documental de fonte primária, ou seja, documentos e normativas do Arquivo Nacional, Resoluções publicadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), decretos de lei publicados no Diário Oficial da União e normativas internas da Fundação Oswaldo Cruz. Aliados à esta pesquisa documental, foram realizados mapeamentos de processos *in loco*, entrevistas com executores das atividades-chave do processo de gestão de documentos, bem como de seus *stakeholders*, *brainstorm* com os envolvidos direta e/ou indiretamente, *benchmarking* com grandes empresas, como por exemplo o SistemaFIRJAN e a Rede D'Or de Hos-

pitais.

Resultado:

Após análise dos parâmetros legais regulamentares e do cenário atual de gestão documental da Instituição, considerando-se os processos documentais físicos e eletrônicos, foram identificadas necessidades de adequações para cumprimento de todos os requerimentos legais. Quanto ao método de arquivamento físico e eletrônico, foram diagnosticadas: dificuldade de rastreabilidade dos documentos técnicos, baixa padronização, inconsistências de versionamento, baixa confiabilidade nos dados, dada a quantidade de sistemas envolvidos (Rede, SOS, Portal, ECM, Sharepoint, e-mail, dentre outros) o que também impacta em duplicidade de documentos em áreas que não têm a competência de gerir documentos.

Conclusão:

Foi possível inferir que a reengenharia dos processos em questão, considerando principalmente os sistemas de tecnologia envolvidos, a proficiência das equipes e as experiências adquiridas nos *benchmarks* realizados culminarão em recursos (materiais, equipamentos e pessoas) identificados e otimizados, aumento da maturidade da rastreabilidade de informações e documentos, maior confiabilidade, disponibilidade e completude das informações e documentos para auditorias, redução de custo de retrabalho e de ineficiência da equipe de gestão de documentos – SIGDA que é diretamente envolvida e demandada e, sobretudo, atendimento aos aspectos legais dos órgãos regulatórios.

Palavras-chave: Reengenharia de Processos; Gestão de Documentos; Gestão da Informação

GES.05 - Impacto de grandes empreendimentos: proposição de modelo de avaliação de impacto durante a fase de implementação

Juliana Bezerra de Souza^{1*}; Beatriz de Castro Fialho¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Este trabalho discute a importância de se pensar o processo de avaliação de políticas públicas ainda na fase de sua implementação, em particular no caso de grandes empreendimentos. O planejamento do modelo de avaliação em momento anterior ao início da ação permite que o avaliador possa escolher entre uma maior gama de opções de modelos e técnicas avaliativas existentes na literatura. Este aspecto favorece a aplicação de modelos que utilizam técnicas quantitativas que, ao serem combinadas com uma análise qualitativa, geram resultados mais confiáveis em relação à efetividade da política sob avaliação, contribuindo para promover a transparência e a prestação de contas das ações governamentais.

Objetivo:

Neste contexto, este trabalho apresenta uma proposta de modelo de avaliação do impacto da implantação de um grande empreendimento, o Polo Industrial e Tecnológico da Saúde (PITS), em Eusébio-CE, com indicadores de desenvolvimento local sustentável da região. O modelo foi elaborado ainda na fase de implantação do empreendimento. O PITS é uma iniciativa do poder público, que possui a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) como instituição âncora, e onde será implantado um Centro Tecnológico que realizará pesquisa e produção de biofármacos e imunobiológicos para o SUS.

Metodologia:

Para desenvolver a proposta, foram identificados os indicadores de desenvolvimento sustentável relacionados com os objetivos do PITS; e definidas duas abordagens para estimar seu impacto, ambas considerando a comparação entre área diretamente afetada pela intervenção com áreas similares não afetadas pela intervenção. A primeira abordagem consistiu na comparação da Região Metropolitana de Fortaleza com uma região metropolitana sintética à de For-

taleza, que foi construída pelo balanceamento de outras regiões metropolitanas do país. Já a segunda abordagem compara as Unidades de Desenvolvimento Humano (UDH's) imediatamente adjacentes ao Polo, com UDH's com perfil socioeconômico semelhantes no país.

Resultado:

A proposta de modelo resultante é, desta forma, um modelo de avaliação de impacto caracterizado como *ex post* e quantitativo, e que pode ser implementado de forma relativamente direta, uma vez que os dados pós-intervenção estejam disponíveis. Ressalta-se que o presente trabalho consiste apenas em apresentar o desenho do modelo de avaliação de impacto, pois a aplicação da avaliação só poderá ser realizada quando os dados pós-intervenção forem disponibilizados pelas fontes secundárias.

Conclusão:

Como contribuição prática, a ferramenta poderá ser aplicada, no futuro, por qualquer parte interessada na obtenção desses dados. Além disso, a metodologia utilizada na ferramenta poderá ser adaptada a outros casos, dependendo do tipo de impacto que se queira avaliar. O trabalho também pode contribuir para a disseminação dos conceitos e noções sobre avaliação de impacto de intervenções públicas, considerando que o tema ainda não é amplamente disseminado entre as entidades públicas. Dessa forma, o trabalho gera uma ferramenta aplicada inovadora para formuladores de políticas.

Palavras-chave: Políticas públicas; Avaliação de impacto; Desenvolvimento sustentável local

GES.04 - Estudo exploratório do cenário mundial de biossimilares e comparação entre agências regulatórias nos temas: intercambialidade, extrapolação de indicação e nomenclatura

Hugo G. T. Defendi^{1*}; Monique C. de M. Stávale¹; Sheila B. Matsuoka¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Biossimilares, conceitualmente, possuem a mesma sequência de aminoácidos dos seus produtos biológicos de referência, porém considera-se que são produzidos a partir de diferentes clones, podendo ter processos de manufatura distintos. Estes são comercializados após a expiração das patentes dos medicamentos de referência. A somatropina foi o primeiro biossimilar a ser registrado no mundo (2006), abrindo precedente para muitos outros. Desde então, este mercado cresce virtuosamente, da mesma maneira que suscita questões importantes. A relevância dos biossimilares é indiscutível, pois promove maior acessibilidade aos produtos de base biotecnológica, que por terem processo de desenvolvimento complexo e serem geralmente de uso contínuo, tornam-se tratamentos de alto custo. Diante deste cenário dinâmico, que envolve a participação de vários atores, torna-se indispensável a discussão sobre o tema e ações que possibilitem maior entrada dos biossimilares no mercado.

Objetivo:

Realizar análise exploratória do cenário mundial de biossimilares e levantamento comparativo das posições das principais agências regulatórias acerca da intercambialidade, extrapolação de indicação e nomenclatura.

Metodologia:

Para análise exploratória do cenário mundial de biossimilares, utilizou-se a base de dados MedTrack, e consulta dos biossimilares aprovados nas páginas das agências regulatórias: ANVISA, FDA e EMA. A comparação das posições das agências sobre os temas propostos foi realizada através de busca em artigos, guias e documentos técnicos elaborados pelas próprias agências, consulta nos sítios eletrônicos e participação de debates técnicos sobre o assunto em fóruns variados.

Resultado:

Foram identificados 891 produtos classificados como biossimilares, mundialmente, sendo 353 aprovados. Destes, a classe terapêutica predominante é a oncológica, com 322 no total, dos quais 115 receberam aprovação. Os biossimilares aprovados pelas agências europeia (38) e americana (9) representam uma parcela pequena, porém considerada mais regulada. A ANVISA, seguindo bases similares aprovou 3 biossimilares. No que diz respeito à intercambialidade, a ANVISA entende que a política e diretrizes sobre este tema deverão ser definidas pelos médicos e MS. A posição do EMA é não regular a intercambialidade, deixando esta decisão para os países, enquanto que o FDA foi a única agência que publicou um guia, orientando as empresas em como alcançarem o status de intercambialidade. Em relação à nomenclatura, o FDA adotou nomenclatura diferente para os biossimilares, enquanto o EMA e ANVISA mantêm as nomenclaturas não proprietárias internacionais e nomes de marca como medida de rastreabilidade e farmacovigilância. A extrapolação de indicação terapêutica para biossimilares é possível nas três agências, com limitações de acordo com a população e PK/PD.

Conclusão:

A presente análise demonstra um grande esforço de empresas no desenvolvimento de biossimilares. Quanto aos aspectos abordados neste estudo, nota-se pouca normatização e harmonização entre as agências regulatórias, refletindo as diferentes opiniões dos vários atores envolvidos nestas discussões, o que torna a compreensão e estudo sobre o tema ainda mais relevantes.

Palavras-chave: biossimilar; intercambialidade; agências regulatórias

GES.05 - Cenário brasileiro e mundial do biofármaco L-asparaginase

Mariana P. Borges^{*1*}; Ricardo C. Brum¹; Diana P. B. Freire¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

A L-asparaginase é utilizada no tratamento de leucemias linfoblásticas agudas (LLA). Atua diminuindo a concentração da L-asparagina livre no plasma e, dessa forma impede a proliferação de células cancerígenas. Este medicamento utilizado no Brasil é importado, o que gera problema com o custo e abastecimento. Com a elevada incidência de câncer, a necessidade de novas enzimas é de grande interesse tanto na biotecnologia quanto no setor da indústria e da saúde no Brasil.

Objetivo:

Analisar o cenário do biofármaco L-asparaginase no Brasil, levando-se em consideração aspectos científicos, tecnológicos e mercadológicos.

Metodologia:

Levantamento do número de publicações científicas por país e das preparações farmacêuticas principais da L-asparaginase nos últimos 4 anos (2014 – 2017), utilizando a ferramenta WEB OF SCIENCE e os termos “l asparaginase” OR “l-asparaginase” AND “protein expression” (tópico). Além deste, foram obtidos levantamentos referentes a importação anual da L-asparaginase no Brasil no período de 2012 a 2016 e dos fabricantes e fornecedores deste medicamento no período de 2011 a 2017, utilizando os portais ALICEWeb e Ministério da Saúde (MS) do Brasil, respectivamente.

Resultado:

Das 590 publicações científicas encontradas nos últimos 4 anos, o Brasil está em 10º lugar com 20 publicações. Os países líderes no ranking foram Estados Unidos (124), China (101) e Índia (77) que obtiveram o 1º, 2º e 3º lugar, respectivamente. Foi possível identificar tecnologicamente que três preparações farmacêuticas principais de L-asparaginase são obtidas através dos micro-organismos: *E. coli* e *E. chrysanthemi*, que incluem proteínas nativas purificadas e *E. coli* conjugada ao polietilenoglicol. Dentre os aspectos mercadológicos,

observamos que até 2013, com recursos federais, os hospitais adquiriam o medicamento Elspar®. Em 2013, O MS assumiu então a compra do medicamento Aginasa®, provendo para o país estoques suficientes para um ano. Em 2017, devido ao aumento do valor de importação, o MS mudou o fabricante e passou a adquirir o medicamento de nome comercial Leuginase®. Em junho de 2013, o MS estabeleceu uma parceria entre a Fiocruz e dois laboratórios privados para que a L-asparaginase passasse a ser produzida no Brasil, pois não existe patente vigente no país que proteja o princípio ativo da L-asparaginase.

Conclusão:

Os países Estados Unidos, China e Índia representam os principais mercados competitivos com grande interesse e potencial tecnológico de produção em L-asparaginase. Porém, o Brasil vem se destacando em números de publicações científicas, indicando um crescente potencial tecnológico. A produção de biossimilares a partir de biofármacos com patente já expirada pode representar para o Brasil uma importante oportunidade de avanço no tratamento de diversas doenças. Deve-se ressaltar que o ano de 2013 se destacou devido ao aumento na importação da L-asparaginase no Brasil e que este medicamento carece de fontes nacionais de produção para atender ao SUS.

Palavras-chave: L-asparaginase; Biofármaco; Mapeamento

GES.06 - Avaliação do impacto de uma ferramenta tecnológica inovadora de gerenciamento de dados na Pesquisa Clínica

Tatiana Jorge Fernandes^{1*}; Janaina Reis Xavier¹; Isabelle Soares Alves¹; Thalita da Matta de Castro¹; Tatiana Sanjuan Ganem Waetge¹; Maria de Lourdes de Sousa Maia¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Avaliação do impacto de uma ferramenta tecnológica inovadora de gerenciamento de dados na Pesquisa Clínica

Objetivo:

Primário: Avaliar a utilização de um sistema de formulário de relato de caso online (eCRF) na qualidade do gerenciamento de dados dos estudos clínicos executados pela Asclin/Bio-Manguinhos em comparação com a ferramenta em papel. Secundário: Avaliar o impacto da implementação desde sistema na adequação dos procedimentos e documentos ao novo guia das diretrizes internacionais em BPC do ICH.

Metodologia:

A utilização do sistema de formulário de relato de caso online (eCRF) denominado Bioform foi avaliada, através de uma análise crítica, a partir de 11 estudos clínicos executados na Asclin/Bio-Manguinhos. Dentre eles, quatro finalizados, quatro em execução e três em construção. O impacto da utilização desta ferramenta foi avaliado quanto à adequação às exigências normativas atuais através da análise dos adendos da versão R2/2016 do guia das diretrizes internacionais em BPC do ICH.

Resultado:

O BioForm é o primeiro sistema de formulário de relato de caso *on-line* (eCRF) desenvolvido por instituições públicas, através de uma parceria entre Bio-Manguinhos e o Serviço Federal de Processamento de Dados (Serpro). A implementação do eCRF Bioform como uma ferramenta de gerenciamento de dados permitiu o preenchimento das fichas clínicas dos estudos clínicos e monitoramento das mesmas de forma rápida, segura e rastreável. Além disto, é possível a extração de dados para acompanhamento das inclusões nos estudos,

em tempo real, e também as análises estatísticas preconizadas pelos protocolos dos estudos clínicos. O Bioform foi implementado em dezembro de 2013 e validado por Bio-Manguinhos, seguindo as normas regulatórias vigentes (Guia de Validação de Sistemas Computadorizados, ANVISA, 2010), em junho de 2014.

Conclusão:

A incorporação de uma ferramenta tecnológica tornou possível um sistema de gerenciamento de dados de qualidade baseado em risco para identificar, avaliar, controlar, comunicar e analisá-los, assegurando a integridade dos dados associados aos estudos clínicos executados na Asclin/Bio-Manguinhos. A validação do Bioform através de um processo documental que utiliza uma metodologia aplicável é adotada desde junho de 2014 e está em consonância com as novas diretrizes internacionais de BPC do ICH de 2016, o que demonstrou o avanço tecnológico e inovador que a instituição apresenta na área da Pesquisa Clínica.

Palavras-chave: Gerenciamento de dados; Boas Práticas Clínicas; Pesquisa Clínica

GES.07 - Modelagem e análise dos processos como habilitadora da prestação de serviços biotecnológicos: o caso LATAM

Márcia Arisawa^{1*}; Aloysio Moreira Junior¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

O Laboratório de Tecnologia de Anticorpos Monoclonais (LATAM) de Bio-Manguinhos tem como premissa desenvolver, selecionar e produzir anticorpos monoclonais e aptâmeros para projetos nas áreas de desenvolvimento tecnológico, pesquisa e produção, atualmente sob forma de doação dentro de um cenário de cooperações técnico-científicas. Em um diagnóstico preliminar, observou-se que os processos produtivos e de negócios não se encontravam adequadamente modelados, formalizados e analisados, resultando na dificuldade de estabelecer o custo unitário dos anticorpos/aptâmeros fornecidos, bem como a viabilidade econômica de fornecimento desses produtos externamente, impactando na análise de custos e do real potencial de atendimento aos parceiros. Deste modo, a análise do cenário identificou que a informalidade dos processos implicava em um desconhecimento do potencial de prestação de serviços da área, representando um gargalo para o avanço de uma proposta de captação de recursos, mediante o uso de plataformas tecnológicas já existentes.

Objetivo:

Modelar e analisar os processos para suportar a identificação das oportunidades de melhoria das operações produtivas LATAM. Adicionalmente, procurou-se compreender as contribuições dessas melhorias interna e externamente a Bio-Manguinhos.

Metodologia:

Aplicou-se o método BPM (*Business Process Management*) em uma abordagem *top-down*, sendo dividido em 03 etapas: modelagem da situação atual, identificação das oportunidades de melhorias e análise crítica da situação atual. Para o desenho da situação atual, foram analisados os documentos relacionados às atribuições do LATAM, bem como de estudos prévios de

modelagem de processos. Foram realizadas entrevistas para modelagem e validação com o responsável principal da área. Essas atividades foram formalizadas e consolidadas para a Organização.

Resultado:

O método possibilitou a identificação dos processos primários, permitindo uma análise de custos baseada em processos, levando ao dimensionamento da capacidade produtiva, levantamento de oportunidades de melhoria internas, mapeamento das interfaces com outras áreas da Organização e formalização das operações e atividades, proporcionando uma maior interação com a Gestão do Conhecimento. Dessa forma, os resultados deste estudo evidenciaram os requisitos necessários para que o LATAM possa estruturar-se, visando a prestação de serviços tecnológicos para a Unidade.

Conclusão:

A partir da metodologia selecionada foi possível modelar, formalizar e analisar os processos do LATAM, fornecendo-se subsídios para a análise de custos, o dimensionamento da capacidade produtiva, bem como a análise da produtividade e eficiência. A investigação preliminar das oportunidades resultou na identificação das condições necessárias para viabilizar a prestação de serviços como modelo de captação de recursos, a fim de subsidiar as áreas de DT. O trabalho realizado resultou, ainda, em um modelo a ser utilizado para análise de outras áreas do Desenvolvimento Tecnológico, com foco na prestação de serviços.

Palavras-chave: Modelagem de processos; Melhoria; Prestação de serviços

GES.08 - Incremento da produção de metano em reator anaeróbio tratando mistura de resíduos gerados em Bio-Manguinhos/Fiocruz

Raul Gonçalves Severo^{1*}; Vinicius Mattos de Mello²; Tayane Miranda Silva de Castro²; Claudinei de Souza Guimarães²; Magali Christe Cammarota².

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;
2UFRJ/Escola de Química.

Introdução:

Os processos industriais desenvolvidos no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos - Bio-Manguinhos / Fiocruz geram efluentes de grande relevância, devido ao intenso uso da água na produção. Atualmente, tais efluentes, juntamente com os efluentes sanitários gerados pelos funcionários, são tratados e descartados para atender às exigências das leis ambientais. Assim, o presente trabalho pretende contribuir para o manejo sustentável dos resíduos gerados em Bio-Manguinhos através da digestão anaeróbia, uma alternativa para o correto gerenciamento de resíduos orgânicos, com a vantagem de gerar metano, uma fonte de energia sustentável.

Objetivo:

Propor o tratamento biológico anaeróbio de efluentes gerados em Bio-Manguinhos em conjunto com resíduos sólidos da produção para atingir o padrão de lançamento e aproveitar o metano produzido.

Metodologia:

Antes da amostragem foram mapeados os poços de visita que recebem efluentes sanitários e industriais. As amostragens foram realizadas no período de 06/07 a 16/09/2016, e realizadas de forma composta, com coletas de 4 amostras em um intervalo de 4 h, com a medição de pH, temperatura e vazão. Após as coletas, as amostras foram encaminhadas para caracterização no Laboratório de Tecnologia Ambiental (LTA) da Escola de Química/UFRJ. Os ovos descartados na produção da vacina tríplice viral foram coletados em 02/2017, triturados e peneirados para separação de sólidos. Os ovos batidos foram separados em diferentes proporções e diluídos no efluente equalizado (mistura de todas as correntes geradas na indústria) para ensaio em respirômetro anaeróbio AMPTS II.

Resultado:

As correntes dos efluentes em Bio-Manguinhos estão divididas em 80% efluente sanitário, 14% efluente de processo e 7% efluente do restaurante. O efluente equalizado apresenta vazão de 216 m³/d e as seguintes características: 216 m³/d, 35,6°C, pH 7,3, DQO (demanda química de oxigênio) 579 mg/L, DBO (demanda bioquímica de oxigênio) 312 mg/L, N-NH₄⁺ 30 mg/L, P-PO₄³⁻ 4,6 mg/L, sólidos sedimentáveis 8,2 mL/L, sólidos suspensos totais 41 mg/L. Estimou-se 15 kg/semana de ovos de galinha descartados, e com as seguintes características: pH 6, DQO 557 g/L, Nitrogênio total 46 g/L e P-PO₄³⁻ 2 g/L. Nos ensaios de biodegradabilidade anaeróbia em respirômetro, observou-se um aumento considerável na produção de metano após a adição de 1%, 2% e 4% (v/v) dos resíduos de ovos ao efluente, com produção específica de metano (PEM) de 161, 215 e 261 NmL CH₄/g DQO removida.

Conclusão:

Os resultados indicam que os ovos descartados na produção seriam bons substratos na digestão anaeróbia do efluente em reatores anaeróbios. A adição de maiores proporções de ovos na mistura com efluente permite maior produção de metano nos reatores anaeróbios, e sua utilização como insumo energético, além de subsidiar o projeto de reatores anaeróbios em escala industrial

Palavras-chave: digestão anaeróbia; metano; mistura de resíduos

GES.09 - Redesenho do processo de auditoria interna baseado em risco

Guilherme dos Santos Mulé^{1*}; Aline Louzada Santos¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Anteriormente ao redesenho do processo a auditoria interna tinha como objetivo único a verificação da adesão regulatória. Mediante a percepção de que a adesão regulatória é escopo de um processo de auto inspeção e de que havia a carência de iniciativas que valorizassem a melhoria contínua aos processos, o processo de auditoria interna foi revisto com o compromisso da inclusão de uma abordagem baseada em riscos nas diferentes etapas deste processo, visando desta forma a priorização e concentração de recursos em ações que de fato são relevantes e mitigam os riscos existentes em processos da instituição e alavancando a melhoria contínua.

Objetivo:

Propor melhorias aos processos a partir do redesenho do processo de auditoria interna utilizando-se uma abordagem baseada em riscos.

Metodologia:

Estruturação do processo em etapas: Programação, Execução e Análise de indicadores. Estruturação de cada etapa com base na ferramenta de análise de riscos: Etapa Programação: Realizada anualmente, define quais processos serão auditados. Conceitos de risco utilizados: Complexidade de cada processo (severidade). Número de desvios e mudanças (ocorrência). Número de inspeções por órgão externo (detecção). Etapa Execução: Definida pelas seguintes sub etapas: planejamento (uso de ferramentas de risco - severidade e ocorrência), auditoria *in loco* e plano de ação. Pré requisitos: Definição de um processo de qualificação de auditores internos.

Resultado:

Em 2017 foi executado o primeiro ciclo de auditorias após redesenho do processo. Os indicadores analisados mostram: nível de satisfação dos auditados, 96%; adesão à programação, 70%. Ainda, de forma qualitativa, o conteúdo dos relatórios atuais em comparação a relatórios anteriores, demonstra atualmente

um diagnóstico que direciona a priorização de recursos visando a mitigação de riscos que, por consequência, evitará em futuro próximo, retrabalhos, e perdas em processos. Além do objetivo principal, aumento da eficácia no diagnóstico prematuro de achados potenciais de auditorias regulatórias.

Conclusão:

Já no primeiro ano de implementação (2017) conclui-se o resultado obtido através da análise dos indicadores como satisfatório, principalmente no que se refere à qualidade do diagnóstico e ações propostas. Contudo, serão necessárias ações para aumento do indicador de aderência aos planos de ação.

Palavras-chave: Auditoria interna; Abordagem de Risco; Melhoria contínua

GES.10 - Mapeamento e Avaliação dos Perigos e Pontos Críticos de Controle da produção do IFA de rubéola para vacina tríplice viral

Celina Vieira da Cunha Guedes Alvarenga^{1*}; Madalena de Jesus Vieira¹; Adriana Erler Vaccari¹; Cintia Helena M. Souza¹; Carolina Campos Mendes¹; Jaline Coutinho Silvério¹; Wania Renata dos Santos¹; Marília Stella Vaz Costa Belart¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

O cumprimento das Boas Práticas de Fabricação está orientado primeiramente à diminuição dos riscos inerentes a qualquer produção farmacêutica, os quais não podem ser detectados somente pela realização de ensaios nos produtos terminados. Estes podem culminar em desvios na qualidade do produto, acarretando em danos ao paciente, em ações fiscalizatórias e punitivas das autoridades regulatórias, além de significativos prejuízos financeiros e à imagem institucional. O Gerenciamento de Riscos à Qualidade (GRQ) surge como um componente do Sistema da Qualidade Farmacêutico e destaca a necessidade de avaliação e controle / prevenção dos riscos potenciais, auxiliando na tomada de decisão e promovendo maior consistência na qualidade dos produtos. Existem diversas ferramentas de GRQ, como a Análise de Modos de Falha e Efeitos (FMEA) e a Análise dos Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP). A utilização da ferramenta FMEA pela instituição para o processo produtivo do Insumo Farmacêutico Ativo (IFA) de rubéola da Vacina caxumba, caxumba e rubéola (atenuada) contribuiu para previsão de possíveis falhas, causas e meios de detecção no processo. Todavia, ainda é necessário um maior conhecimento em relação aos controles e perigos biológicos, químicos e físicos relacionados a cada etapa de fabricação, o que pode ser detectado de forma eficiente pela ferramenta HACCP, empregada nesta pesquisa.

Objetivo:

Identificar e analisar os perigos e pontos críticos de controle na fabricação do IFA monovalente de rubéola – componente da vacina sarampo, caxumba, rubéola (atenuada).

Metodologia:

A fim de aprofundar o conhecimento sobre a fabricação da vacina sarampo, caxumba, rubéola (atenuada), inicialmente foi realizada a análise documental do processo produtivo do IFA de rubéola. Protocolos, procedimentos operacionais, fluxogramas, modelagem de processo, laudos de controle de qualidade e relatórios de análise de risco (FMEA) foram avaliados. Em seguida, realizou-se o acompanhamento das etapas de produção de modo a verificar, *in loco*, seu desenvolvimento. Com base nestes dados e com o auxílio de uma equipe multidisciplinar envolvendo especialistas das áreas de produção, garantia da qualidade e controle de qualidade, foi realizada a aplicação da ferramenta HACCP, identificando-se os possíveis perigos relacionados a cada etapa e, por meio da árvore de decisão, foram determinados os pontos críticos de controle (PCCs).

Resultado:

No total 395 perigos foram identificados, sendo 278 nas etapas de expansão celular e 117 nas etapas de produção viral. Os perigos mais encontrados foram os biológicos (53,4%), seguido pelos perigos físicos (45,2%) e químicos (1,4%). Na análise global 123 PCC foram mapeados.

Conclusão:

A utilização da ferramenta HACCP de forma complementar ao FMEA já institucionalizado, se mostrou versátil e aplicável, sendo eficaz em identificar os perigos relacionados a cada etapa do processo produtivo e em determinar quais as etapas necessitam de maior controle.

Palavras-chave: Gerenciamento de riscos à qualidade; HACCP; Vacina sarampo, caxumba, rubéola (atenuada)

GES.II - Manutenção centrada em confiabilidade (MCC): a aplicação da análise de falhas para uma bomba centrífuga na Fundação Oswaldo Cruz

Gabriel Castro Ribeiro Ferreira e Silva^{1*}; Fabiano Ferreira Matias Neto¹; Márcio Junger Amadeu Vidaurre¹; Carlos de Souza Almeida².

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução:

A Fundação Oswaldo Cruz/Bio-Manguinhos, é responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, reativos e biofármacos voltados para atender prioritariamente às demandas da saúde pública nacional, possuindo um complexo tecnológico de vacinas altamente produtivo, garantindo autossuficiência em vacinas essenciais para o calendário básico de imunização do Ministério da Saúde (MS). Neste contexto, o trabalho apresenta um estudo de Confiabilidade aplicado em Bombas Centrífugas, justificado pelo fato de que se esses equipamentos falharem, podem impactar na capacidade operacional do sistema de alimentação de água potável das autoclaves do Laboratório de Febre Amarela, influenciando diretamente no processo produtivo. Por essa razão é relevante a realização de um trabalho para melhorar da confiabilidade das bombas utilizadas nesse contexto, aumentando sua confiabilidade e disponibilidade, e consequentemente a produtividade do Laboratório de Febre Amarela.

Objetivo:

O objetivo deste artigo visou definir uma estratégia de manutenção mais adequada para uma bomba centrífuga instalada no sistema de alimentação de água potável para alimentação das Autoclaves do Laboratório de Febre Amarela da Fundação Oswaldo Cruz, tendo como parâmetros os resultados obtidos na análise de Confiabilidade e Disponibilidade.

Metodologia:

O método proposto para esse desenvolvimento foi a Manutenção Centrada em Confiabilidade (MCC), através de análises quantitativas para gerar a definição, que nos proporcionasse conhecer a melhor estratégia de manutenção. Para

essa pesquisa, foram coletados dados de novembro 2015 até novembro 2017, referentes ao tempo médio até o reparo (MTTR) e o tempo médio entre falhas (MTBF). Esses tempos foram modelados através do *software* ProConf 2000, lognormal (MTTR) e Weibull (MTBF). De posse dos valores obtidos e tratados, foi possível calcular a disponibilidade, o tempo até o reparo, o tempo entre falhas, a *Life Cycle Cost* (LCC) e a função risco.

Resultado:

Através dessas evidências, foi possível posicionar o ativo ao longo do seu ciclo de vida na curva da banheira, como o seu resultado foi crescente, admitiu-se que o ativo está na fase de mortalidade senil, ou seja, final da vida útil, da mesma forma, a LCC demonstrou que esse ativo se substituído por um novo equipamento, além de atender à necessária performance, teria seu custo minimizado pelo aumento da disponibilidade, acrescido da redução dos custos de manutenção.

Conclusão:

Pelo referencial do MCC, tal fase, se enquadra na estratégia de manutenção preventiva e a preparação de um eventual e custoso *retrofit* ou substituição do ativo como apresenta o indicador LCC, assim, por se tratar de um ativo crítico ao processo produtivo, o Departamento de Engenharia e Manutenção optou pela substituição desse ativo, entendendo que dessa forma, manterá uma excelente performance, manterá o ativo em plena produção, gerando disponibilidade e confiabilidade em alta, utilizando uma nova tecnologia para a atividade a que se propõe esse tipo de ativo.

Palavras-chave: Manutenção; Confiabilidade; Disponibilidade

GES.12 - Projeto de implantação de um sistema de gerenciamento de informações laboratoriais – LIMS

Felipe Mendes de Luca^{1*}; André Queiroz da Silveira¹; Michele Cristina Peixoto da Silva¹; Ricardo Cristiano Brum¹; Ana Claudia Machado Duarte¹; Waleska Dias Schwarcz¹; Cristiana Melo Couto¹; Renato Ferreira Dib¹; Maria Beatriz Borges¹; Paulo Martins Garchet Junior¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Gerenciamento e manutenção da rastreabilidade e confiabilidade de dados são essenciais para o ciclo de vida do produto farmacêutico: desenvolvimento, transferência de tecnologia, produção e descontinuidade, sendo sua integridade parte fundamental do Sistema da Qualidade. Os processos laboratoriais em cada fase demandam grande custo e mão de obra, porém, apresentam eficiência aquém do potencial, além de alto risco de retrabalho e não conformidade com as exigências regulatórias - consequência direta da baixa informatização, elevado número de planilhas eletrônicas e registros em papel. A necessidade de aquisição do LIMS foi identificada em análise de risco executada pela GSK no Projeto Dengue.

Objetivo:

A implantação do Sistema de Gerenciamento de Informações Laboratoriais (LIMS), capaz de gerenciar os dados gerados no ciclo de vida de amostras no âmbito do Projeto Dengue-GSK, desde a recepção das amostras nos centros de pesquisa até a emissão dos resultados de ensaios de *read-outs*.

Metodologia:

Análise de processos: As equipes DIBOP, ASCLIN, LATEV e ESPRO mapearam os processos existentes (*as is*) de logística de amostras, assim como a execução dos testes de RT-PCR e μ -PRN, através da Gestão de Processos de Negócio. Análise de risco: Os processos foram analisados pela DIBOP, ASCLIN e LATEV através do *Failure Mode and Effect Analysis* (FMEA) para identificar, classificar e mitigar os riscos à rastreabilidade, qualidade da amostra e integridade dos dados para geração de suas versões (*to-be*) otimizadas. Implementação: As representações dos processos otimizados no sistema foram agrupadas

nos seguintes módulos: gestão de amostras, RT-PCR e μ -PRN. A implementação de cada módulo dividida em: desenvolvimento e validação, ambas executadas pela Abbott Informatics e suportadas pela SEDES e LAMEV.

Todas as etapas do projeto foram coordenadas pela equipe do Projeto Dengue.

Resultado:

A Análise de Processos permitiu às partes interessadas identificar as atividades influentes na rastreabilidade, integridade dos dados e qualidade das amostras. A Análise de Riscos evidenciou diversos riscos, dos quais baixa adesão aos procedimentos devido à alta demanda de trabalho e risco à integridade de dados e qualidade na manipulação das amostras e resultados, devido ao uso de planilhas Excel e documentos em papel. Na Implementação, os riscos foram mitigados através de configurações no sistema em cada módulo. Temos como exemplos: criação de *Workflows* que guiam os usuários pelas etapas do processo, não permitindo que nenhuma dessas etapas seja ignorada; transferência automatizada de dados e resultados de análises; impressão de etiquetas com código de barras para amostras, equipamentos, reagentes e padrões, minimizando o *input* manual de dados; consolidação de informações em relatórios.

Conclusão:

O LIMS permitirá controle total da gestão das informações geradas no ciclo de vida dos produtos em Bio-Manguinhos, garantindo a rastreabilidade através da informatização de processos, acessibilidade e portabilidade da informação, resultando em potencial redução de custo dos processos.

Palavras-chave: LIMS; Rastreabilidade; Informática

GES.13 - Data Science aplicada ao planejamento operacional: um estudo de caso

Felipe Figueiredo^{1*}; Maria Beatriz Borges¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

O paradigma *Model Informed Drug Development* tem sido utilizado para reduzir o custo e tempo de desenvolvimento de diversas drogas. Um modelo adequado a um processo fisiológico pode ser usado para simular estudos clínicos, diminuindo a necessidade de grandes estudos exploratórios. No Laboratório de Tecnologia Viroológica de Bio-Manguinhos/Fiocruz, diversas técnicas utilizam painéis de amostras clínicas para Controle de Qualidade e monitoramento da estabilidade do ensaio. O ensaio de RT-qPCR de Dengue Genérico teve seu painel desenhado antes dos parâmetros de validação serem determinados, de modo que algumas amostras testadas foram não quantificáveis (NQ). A metodologia estatística também requer que a distribuição dos dados seja Gaussiana, o que não ocorria neste painel. Para auxiliar o desenho de um novo painel, foi feito um estudo de modelagem computacional exploratório para obter *insights* para a solução deste problema, sem a necessidade de diversos ensaios exploratórios.

Objetivo:

Demonstrar a viabilidade de um estudo de modelagem computacional no planejamento operacional de um novo painel de amostras para o ensaio de RT-qPCR.

Metodologia:

Foram considerados dois cenários para modelagem, o Painel corrente, e uma proposta para o novo painel. Para representar o painel em cada cenário foram executados 10000 experimentos simulados. Todas as réplicas assumiram a variabilidade global do ensaio, de forma homogênea ao longo de toda a faixa analítica. Para o critério de normalidade, cada réplica foi submetida ao teste de *Shapiro-Wilk*, e considerou-se o número de réplicas com p-valor não significativo. O número de amostras NQ foi estabelecido pelos limites de quantificação do ensaio (LOQ). Esta análise foi realizada utilizando-se o software R versão 3.4.3.

Resultado:

As simulações do painel de PCR Dengue Genérico representaram as observações de experimentos anteriores. Apenas 0.14% das réplicas foram consistentes com a premissa de normalidade dos dados. Foram observadas de 2 a 3 alíquotas NQ abaixo do LOQ e de 1 a 2 alíquotas acima deste. A proposta do novo painel atende aos critérios estabelecidos. 100% das réplicas atendem ao critério de normalidade. O número de alíquotas NQ foi zero, indicando que a proposta produz consistentemente amostras quantificáveis.

Conclusão:

O modelo baseado nos parâmetros obtidos na validação do ensaio foi capaz de reproduzir o comportamento típico do painel em uso, e uma proposta para um novo painel foi avaliada. Uma recomendação geral para o planejamento de um novo painel de amostras foi elaborada com base na teoria e nos resultados empíricos obtidos. Com implementação de baixo custo e resposta rápida, este estudo indica a viabilidade e eficiência do uso de modelagem estatística computacional no planejamento operacional de experimentos, sem o custo de ensaios exploratórios. Propõe-se que o paradigma de modelagem pode ser utilizado para embasar a tomada de decisão baseada em evidências em outros contextos estratégicos.

Palavras-chave: modelagem computacional; planejamento operacional; redução de custos

GES.14 - Controle da contaminação por partículas viáveis e não viáveis, no envase asséptico de vacinas líquidas, baseado em risco

Carolina Campos Mendes Arêas^{1*}; Gisele Cotias Netto Penco¹; Poliana Vita Schettini¹; Ricardo da Costa Lopes¹; Jéssica Goulart Garcia¹; Frank Eduardo de Moraes Rego Fairbairn Coelho¹; Carla Cristina Velasco do Nascimento Freixo¹; Maria Cecília Galacho Quaresma de Oliveira¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

A fabricação asséptica de vacinas é considerada um desafio para as indústrias farmacêuticas, visto que os riscos de contaminação por partículas viáveis e não viáveis precisam ser estritamente controlados, reduzidos ou eliminados, de forma a garantir a qualidade do produto e a segurança do paciente. Neste contexto, vale destacar que alguns fatores podem influenciar na qualidade destas operações, sendo eles: instalação, equipamentos, procedimentos, parâmetros ambientais e operadores. Considerando a abordagem acima, o gerenciamento de riscos à qualidade é uma importante ferramenta de Boas Práticas de Fabricação para identificar, controlar e revisar os riscos à qualidade dos produtos no seu ciclo de vida, permitindo o fornecimento consistente e seguro dos mesmos.

Objetivo:

Demonstrar, através da aplicação dos princípios e ferramentas de gerenciamento de riscos à qualidade, que os riscos de contaminação por partículas viáveis e não viáveis, para os processos de envase de vacinas líquidas em Bio-Manguinhos, estão sob controle.

Metodologia:

Para construção deste trabalho realizou-se um levantamento das medidas de controle de contaminação microbiológica e por partículas previstas na RDC 17/2010, verificando, posteriormente, o cumprimento das mesmas por Bio-Manguinhos através da leitura dos procedimentos vigentes e do conhecimento de uma equipe multidisciplinar, formada por colaboradores da produção, engenharia e qualidade. Para este levantamento considerou-se os itens: pessoal, superfícies críticas, *holding time*, instalações e utilidades. À posteriori, aplicou-se, para os GAP encontrados, a ferramenta de gerenciamento de riscos

à qualidade FMECA, de forma a avaliar os possíveis riscos e, propor ações de melhoria, quando necessário.

A avaliação da eficácia das medidas de controle da contaminação foi realizada através de informações de 2015 a 2017, sobre: monitoramento ambiental, monitoramento da sanitização, *media fill*, esterilidade, sistemas de água e qualificações.

Resultado:

Com base nas informações levantadas, as medidas de mitigação de contaminação por partículas viáveis e não viáveis, adotadas nos processos de envase asséptico de vacinas líquidas, estavam, em sua maioria, aderentes à RDC 17/2010. Assim sendo, através do FMECA, identificou-se apenas três riscos de nível alto, cujas ações sugeridas reduziriam (à níveis baixos) ou eliminariam os mesmos.

Por fim, a avaliação da eficácia das medidas de controle da contaminação demonstrou:

- Média de 99,97% de satisfatoriedade nos resultados de monitoramento ambiental e 100% no monitoramento da sanitização;
- Conformidade nas últimas três corridas de *media fill*;
- 100% de satisfatoriedade nos testes de esterilidade;
- Desempenho satisfatório dos sistemas de água;
- Resultados conformes nas últimas três qualificações de área limpa;
- Resultados conformes para certificação de operadores.

Conclusão:

Os riscos de contaminação por partículas viáveis e não viáveis encontram-se estritamente controlados para os processos de envase de vacinas líquidas em Bio-Manguinhos, proporcionando qualidade aos produtos fabricados e segurança aos pacientes. Vale destacar, que o controle dos processos é fundamental para credibilidade e confiabilidade dos parceiros tecnológicos e das agências regulatórias.

Palavras-chave: fabricação asséptica; avaliação de riscos; controle da contaminação

GES.15 - Proposta de alteração da frequência das análises *off line* de água purificada baseada em risco.

Poliana Vita Schettini^{1*}; Carolina Campos Mendes¹; Gisele Cotias Netto Penco¹; Marcelo Allemand Mancebo¹; Bruno Lima Vieira¹; Fabio Carlos do Nascimento Lage¹; Matheus Fernandes Guimarães de Oliveira¹; Janaína Duque de Souza¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

A água é de importância fundamental para indústria farmacêutica pois, além de participar dos processos de limpeza de equipamentos, utensílios, superfícies e testes laboratoriais, pode ser utilizada como veículo em formulações. Por se tratar de um solvente universal, a água pode carregar consigo substâncias que comprometem não somente a qualidade dos produtos, mas também a vida útil dos sistemas de tratamento. Os equipamentos de tratamento de água devem ser inspecionados regularmente bem como a água tratada deve ser monitorada regularmente, por meio de análises *on line* e *off line*, quanto à presença de contaminantes químicos e biológicos. A frequência de análise *off line* da água purificada é determinada na 3ª fase da qualificação de desempenho e, conforme subsídios técnicos de boas práticas de fabricação, esta frequência pode ser alterada mediante uma revisão do sistema que deve incluir representantes de engenharia, garantia da qualidade, operações e manutenção.

Objetivo:

Avaliar a possibilidade de alteração da frequência das análises *off line* de água do Sistema de Geração, Armazenamento e Distribuição de Água Purificada do Pavilhão Rockefeller através da aplicação dos princípios e ferramentas do gerenciamento de riscos à qualidade com vistas a otimizar as atividades do controle de qualidade através da redução do número de análises.

Metodologia:

O desenvolvimento do trabalho deu-se mediante o estudo do sistema de água e contemplou a utilização da ferramenta FMECA para avaliar as tendências apresentadas pelos parâmetros de natureza físico-química e microbiológica em cada ponto de uso. Através de um *brainstorming* com colaboradores *experts* do

processo produtivo, foi possível avaliar os riscos e propor ações que possibilitassem a alteração da frequência de análise em cada ponto.

Resultado:

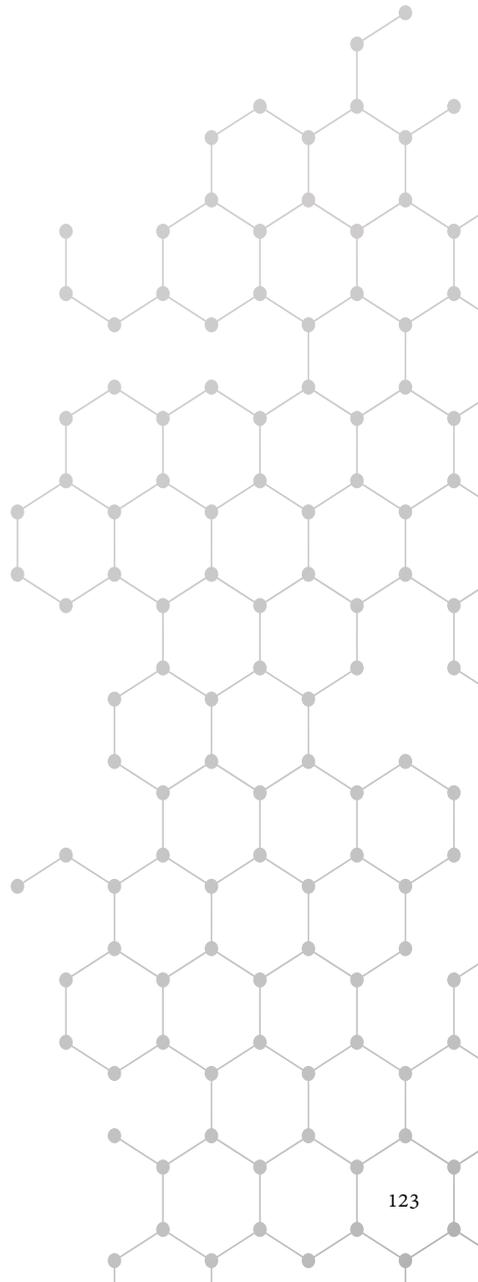
A revisão do sistema demonstrou que as manutenções preventivas e calibrações apresentaram-se conformes, os controles de mudanças não apresentaram impacto à qualidade de produto e desempenho do sistema, as sanitizações foram realizadas regularmente conforme proposta, e a análise de tendência indicou que o sistema apresentou desempenho satisfatório e sem tendências negativas durante o período avaliado. Contudo, é necessário que seja realizado uma avaliação mais robusta para adequações relacionadas à qualificação de desempenho, validação de sistemas computadorizados e integridade de dados, bem como implementação de auditorias da qualidade.

Conclusão:

O trabalho demonstrou a viabilidade de alteração da frequência com espaçamento entre as análises, desde que sejam realizadas as adequações apontadas. A implementação da proposta contribuirá para otimizar as atividades do departamento de controle de qualidade, uma vez que permitirá o direcionamento de esforços e recursos para outras atividades de igual ou maior importância.

Palavras-chave: Água purificada; Gerenciamento de riscos; Frequência das análises

OUTRO TEMAS RELACIONADOS



OTR.01 - Combinando análises de citações de patentes e TRIZ em um método simples para a identificação de grandes inovações biotecnológicas

Christiane de Fátima Silva Marques^{1*}; Marcus Vinicius de Araújo Fonseca².

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução:

A análise das citações de patentes é uma das ferramentas mais comuns para medir sua influência sobre desenvolvimentos tecnológicos subsequentes. As citações têm sido altamente correlacionadas com importância técnica e retornos sociais da inovação. Essa análise pode ser usada para assessorar projetos de P&D, monitorar tecnologias, identificar alternativas técnicas e fontes de expertise, ajudando a entender as relações entre tecnologias e suas consequências para a organização e a indústria, bem como avaliar o impacto das políticas de inovação. Desenvolvida por Genrich Altshuller na década de 1940, a Teoria da Solução de Problemas Inventivos (TRIZ) é um dos métodos heurísticos modernos para ideação de novos produtos, seguindo regras e padrões presentes no processo criativo. Baseia-se em um número reduzido de possibilidades universais para resolver problemas, amplamente aplicáveis a campos distintos, e resulta da análise de milhares de documentos de patentes de diversas áreas. Os elementos da TRIZ compõem um método sistemático para resolução de problemas e aprendizado organizacional, que leva a soluções satisfatórias para gargalos técnicos, bem como identifica tendências e oportunidades tecnológicas como cenário de base para novas invenções.

Objetivo:

O presente estudo combina a contagem de citações de patentes e TRIZ em um método para a identificação das principais invenções de impacto em um campo de tecnologia específico. A biotecnologia moderna foi o modelo de estudo, por ser área altamente dinâmica, densa tecnologicamente e baseada no conhecimento, onde patentes são um instrumento crucial para a proteção da propriedade intelectual.

Metodologia:

A combinação da análise de citações e nível inventivo foi aplicada a 0,3% das patentes mais citadas em biotecnologia aplicada à saúde humana, focalizando o nicho de reagentes de diagnóstico *in vitro*. A base de dados *on-line* da Thomson Innovation (Derwent Innovations Index) foi fonte dos documentos. A análise incluiu a perspectiva dos princípios inventivos, parâmetros de engenharia e níveis inventivos TRIZ.

Resultado:

Todas as invenções significativas na biotecnologia moderna compuseram o grupo resultante, confirmando que o método proposto foi capaz de identificar as melhores e mais inovadoras patentes em uma área específica de P&D. A lista robusta de patentes fornece informações básicas sobre as tecnologias, sem uma quantidade esmagadora de documentos e necessidade de aplicativos caros e complexos. A metodologia proposta e a lista gerada também podem ser utilizadas em estudos patentométricos mais aprofundados sobre tecnologias ou campos técnicos específicos.

Conclusão:

A combinação dessas informações de análise de patentes como ferramenta para gerenciamento de inovação também pode ser adaptada a outras áreas do conhecimento e ajudar estudos acadêmicos, corporativos e governamentais, por exemplo, aumentando o impacto da inovação em iniciativas de pesquisa e desenvolvimento em todo o mundo e, conseqüentemente, o desempenho da indústria.

Palavras-chave: TRIZ; patentometria; biotecnologia

OTR.02 - Monitoramento dos surtos de Parotidite no município do Rio de Janeiro, 2014 a 2017

Paula Fernanda Soares Pinto de Oliveira Rodrigues e Silveira^{1*}; Carla Côrte Real do Nascimento Magarão¹; Luciana de Almeida Pinto¹; Adriana Maria Leite de Macedo¹; Paulo Roberto de Almeida Barbosa¹; Maria Cristina Ferreira Lemos¹.

¹Secretaria Municipal de Saúde do Rio de Janeiro.

Introdução:

A Coordenação de Informação Estratégica em Vigilância em Saúde do município do Rio de Janeiro – CIEVS RIO monitora os surtos ocorridos na cidade. Diante do aumento no número de casos e aglomerados de Parotidite no ano de 2014 e 2015 foi necessário intensificar e ampliar o monitoramento dos surtos, a fim de estabelecer medidas de controle oportunas.

Objetivo:

Descrever o perfil epidemiológico e monitoramento dos surtos de Parotidite Infeciosa no município do Rio de Janeiro nos anos de 2014 a 2017.

Metodologia:

Desde 2014 foi estabelecido o monitoramento sistemático surto a surto através de fluxo de informações com as 10 Áreas Programáticas do município, com a notificação em 24h dos surtos à CIEVS RIO, a elaboração de uma planilha de monitoramento com dados relevantes não disponíveis no SINAN com atualização em tempo real, coordenação da resposta e ações de prevenção e controle, além de produção de material técnico para apoio as atividades das vigilâncias locais.

Resultado:

No ano de 2014 foram monitorados 36 surtos envolvendo 455 casos, em 2015 foram 281 surtos envolvendo 2.423 casos, já em 2016 foram monitorados 44 surtos com 295 casos e em 2017, 19 surtos com 138 casos. Os surtos aconteceram em todas as regiões do município, principalmente entre adolescentes de 10 a 19 (76,7%) e em escolas (65%), com redução de ocorrências nesse local no último ano (47,4%). Dos 3.311 casos notificados no período, em 811 casos (24,5%) há o registro de duas doses da vacina tríplice viral, e em 2.114 casos (63,8%) a situação vacinal estava ignorada.

Conclusão:

O monitoramento dos surtos, através da consolidação de informações relevantes em tempo real e análise sistemática dos dados, permitiu o acompanhamento dos eventos e a orientação técnica às equipes locais no sentido de aprimoramento do processo de trabalho e contenção dos surtos, promovendo a detecção oportuna e resposta coordenada através de parcerias intersetoriais, com resultados observados pela queda no número de casos nos últimos dois anos.

Palavras-chave: surto; parotidite; vigilância em saúde

OTR.03 - Screening of proteins related to the immunological checkpoint Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) through the BioID method

Priscila Rafaela Ribeiro^{1*}; Leonardo Chicaybam²; Marco Antônio Pretti¹; Martín Hernán Bonamino¹.

¹INCa;
²Fiocruz/VPPLR.

Introduction:

Inhibitory receptors such as PD-1, LAG-3, TIM-3 and CTLA-4 have gained special attention as potential targets for immunotherapy, since manipulation of negative signals mediated by these receptors may provide new therapeutic forms for several diseases, as cancer. More recently, Lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) was described as a cell surface molecule interacting with MHC class II molecules. Identifying how proteins transduce the signal from these receptors has been a challenge. Once identified, these molecules can also be targets for novel therapeutics. In 2012, in order to identify interactions between proteins in a proximity-dependent manner, Roux et al (2012) created a method called BioID based on the fusion of a protein of interest to a mutated biotin ligase (R118G) (CHOI-RHEE et al., 2004; CRONAN, 2005; ROUX *et al.*, 2012) which has the ability to add biotin to molecules that are at 20 nm or less from the protein of interest. Once biotinylated, the proteins can be recovered by binding to beads conjugated to streptavidin and identified by mass spectrometry.

Objective:

To perform a screening of proteins interacting with LAG-3 through the BioID method as well as to identify the possible signaling pathways modulated by LAG-3 signaling

Methodology:

Chimeric antigen receptors (CARs) were constructed with the anti-CD20 scFv fused to the intracellular domains consisting of: Lag-3 WT, Lag-3 Kmut (K=> A mutation in the KIEELE domain), Lag3 EPdel (deleted EP domain), all fused to the BirA domain, with further induction of expression of these CARs in the HEK293T and Jurkat (CD4+ T lymphocyte) cell lines. Biotin at

a final concentration of 50uM will be added directly to the culture medium and subsequently the cells will be lysed; the proteins recovered through beads conjugated to streptavidin and, after trypsin digestion, analyzed in mass spectrometer. In silico analysis of possible signaling pathways involved downstream to LAG-3 will also be performed based on the labeled proteins identified in mass spectrometry.

Results:

CAR based receptors were synthesized and cloned into pcDNA3.1 vector MCS-BirA (R118G) -HA, using the AgeI and BamHI sites, in frame with the BirA domain. The CAR anti-CD20 / Lag3Wild Type-BirA was electroporated in the HEK293T cell lineage, presenting 80% of expression. CARs Ep del and Kmut were also electroporated into HEK 293T cell lineage showing 39% and 41% of CAR expression. Analysis of the biotinylation pattern by Western blotting was performed (incubation with Pierce™ High Sensitivity Streptavidin-HRP) for CAR anti-CD20 / Lag3Wild Type-BirA, and the expected ladder pattern of biotinylation was observed.

Conclusion:

The constructed CARs were expressed in the target cell lines leading to the expected biotinylated patterns.

Keywords: LAG3; Chimeric antigen receptor; BioID

OTR.04 - Traces of immunoediting during myeloproliferative neoplasm to secondary acute myeloid leukemia transition

Marco Antônio Pretti¹; Luciana Carvalho Barros^{1*}; Jackline Ayres²; Nicole Scherer¹; Adelmo Dumas³; Cristiana Solza⁴; Esteban Braggio⁵; Ilana Zalberg Renault¹; Mariana Boroni¹; Martín Hernán Bonamino⁶.

1INCa;

2Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz;

3Hospital Universitário Antônio Pedro;

4Hospital Universitário Pedro Ernesto;

5Mayo Clinic;

6INCa / Fiocruz.

Introduction:

Immunological response against transformed cells are antigen specific and capable of controlling tumor development. However, in some cases, tumors escape immunologic surveillance by losing the more immunogenic variants. This impacts the neoantigen (NeoAg) burden, the amount of new antigens generated by coding change somatic mutations. Myeloproliferative neoplasm (MPN) are diseases impacting the myeloid compartment in which mutations in driver genes and/or epigenetic modulators lead to expansion of mature myeloid derived populations. Such diseases can eventually progress to secondary acute myeloid leukemia (sAML), having a dismal prognosis. Limited data has been generated regarding their neoantigen profile and how these profiles are modulated during the MPN→sAML transition.

Objective:

Search for immunoediting evidence in tumor progression analyzing the whole exome of samples collected before and after the leukemic transformation process to generate in silico predictions on neoantigen burden.

Methodology:

Whole exome of paired samples from three patients diagnosed with Essential Thrombocythemia that evolved to sAML were analyzed following GATK best practices. Variant calling was performed by VarScan2.4.3 using reference genome GRCh37. Variants were annotated with Annovar and peptide affinity

to HLA-I was predicted by netMHCpan. HLA-I allele identification was performed by Optitype. Expression data was obtained from TARGET-AML and CCLE (MPN).

Results:

We found a decrease in mutation burden (Unique Patient Number - UPN719: 162 to 109; UPN883: 167 to 123; UPN249: 182 to 110) and consequently in NeoAg burden (13 to 12; 21 to 16; 18 to 15) during the NMP→sAML transition. Unlike the other patients, UPN249 possess two NeoAg exclusive to sAML phase derived from a TP53 mutation, which may benefit tumor growth despite its immunogenicity. Binding affinity predictions didn't indicate any preferential loss of NeoAg with higher affinity. Clonality of NeoAg generating variants evidenced changes in clonal populations with reduction in variant allele frequency (VAF) of NeoAg with high HLA-I affinity (UPN719 and UPN249). The increase in VAF was preferentially observed in NeoAg with low affinity (UPN719 and UPN249) and/or driver genes (UPN719: JAK2; UPN249: CALR and TP53). As an additional potential immune escape mechanism, we found a NeoAg in one deleted region after transition in UPN249. UPN883 and UPN249 carry a frameshift mutation in CALR affecting NeoAg presentation. Additionally, other mutations in antigen processing and presenting pathways were detected in UPN719 and UPN883. Analysis of expression levels on databases indicates that most of the neoantigens identified are located in genes with low expression in AML samples.

Conclusion:

We found a reduction in NeoAg burden during MPN→sAML transitions as well as changes in VAF of NeoAg. These reductions advocate in favor of immune mediated impact on NeoAg repertoire, indicating potential ongoing immune editing process. Moreover, deficiency in antigen presentation proteins and chromosomal losses impacting NeoAg expression may impact the immunogenicity landscape of MPN→sAML transitions.

Keywords: Immunoediting; Myeloproliferative Neoplasms; Neoantigen

OTR.05 - Outsourcing e Regulação Sanitária: Análise Comparativa de Requisitos e de Impactos na Indústria Farmacêutica

Marília Vaz Belart^{1*}; Heitor Mansur Caulliriaux².

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introdução:

A indústria tem experimentado um movimento de desverticalização, especialmente *outsourcing*, que, a despeito das vantagens potenciais, acarreta aumento do risco à qualidade. Neste cenário, as empresas precisam lidar com novas demandas para o sistema da qualidade a fim de mitigar este risco, de garantir o desempenho desejado e de assegurar o cumprimento regulatório. Este processo afeta também as autoridades regulatórias, que precisam adequar sua atuação e seus requerimentos, o que, conseqüentemente, impacta as organizações.

Objetivo:

Analisar o posicionamento da autoridade brasileira sobre terceirização a partir da análise de seus regulamentos e documentos internos, de modo comparativo com requisitos internacionais, e discutir os impactos na indústria no âmbito da qualidade e na estratégia de operações.

Metodologia:

Este trabalho caracterizou-se como uma pesquisa documental e consistiu na busca e na análise dos atos em vigor, ou em publicação, sobre *outsourcing* da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e de autoridades selecionadas – *European Medicines Agency* (EMA), *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), Organização Mundial da Saúde (OMS) e de *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH). Buscou-se o regulamento de Boas Práticas de Fabricação (BPF) de cada fonte e a pesquisa foi complementada por guias sobre sistema da qualidade farmacêutico (SQF). Como o Brasil, diferentemente das demais organizações, dispõe de ato específico sobre terceirização, esta norma foi incluída. Tendo em vista que, no momento da pesquisa, este documento estava em revisão, foram analisados materiais produzidos pela agência durante

este processo, a fim de identificar os impactos das alterações. Também foram incluídos procedimentos da Anvisa que abordam o assunto.

Resultado:

Produziu-se um extenso, inédito e detalhado panorama sobre o entendimento da agência brasileira e de organismos internacionais a respeito da qualidade no contexto do *outsourcing*, contemplando a identificação e a análise comparativa dos requisitos, das recomendações e dos processos preconizados pelas organizações. A análise dos requerimentos nacionais frente aos internacionais apontou uma relevante convergência, mas mostrou desalinhamentos dos requisitos brasileiros, o que assinala a necessidade de atualização para incorporar orientações do ICH Q10 e avanços no quadro conceitual e nas práticas da indústria.

Conclusão:

A legislação brasileira impõe restrições que prejudicam a diversificação das estratégias de operações, o que busca reduzir riscos na perspectiva da agência, mas limita a exploração de oportunidades que poderiam ocasionar diminuição de custos, o que se refletiria em disponibilidade de medicamentos e redução de preços. O novo regulamento sobre terceirização, se aprovado como analisado, trará avanços, facultando maior flexibilidade. Internacionalmente, observa-se maior aceitação da terceirização, possivelmente porque o risco inerente às múltiplas contratações é mitigado ao se exigir maior vigilância do detentor do registro sobre os elos da cadeia.

Palavras-chave: *outsourcing*; indústria farmacêutica; regulação sanitária

OTR.06 - Importância da Biossegurança na prevenção de incidentes/acidentes com perfurocortantes ou escarificantes no Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos / Fiocruz

Bernardina Penarrieta Morales^{1*}; Arthur Stuart¹; Carlos José de Lima Barbosa Filho¹; Denise Torres da Silva¹; Érica Guerino dos Reis¹; Andressa Guimarães de Souza Pinto¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) faz parte da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Ministério da Saúde do Brasil, é responsável pelo desenvolvimento tecnológico e pela produção de vacinas, biofármacos e reagentes para diagnóstico de doenças. Os incidentes/acidentes com materiais perfurocortantes ou escarificantes são problema grave nas instituições de saúde. Este tipo de acidente ocorre com agulhas com lúmen, vidraria quebrada e outros materiais que podem provocar a exposição ocupacional a patógenos de transmissão sanguínea, associados principalmente à transmissão do vírus da hepatite B (HBV), do vírus da hepatite C (HCV) e do vírus da imunodeficiência humana (HIV). Os materiais perfurocortantes ou escarificantes apresentam riscos para os profissionais que os manipulam, realizam a descontaminação e que estão envolvidos em etapas do manejo desses resíduos. O Plano de Prevenção de Riscos de Acidentes com Materiais Perfurocortantes (PPRAMP) de Bio-Manguinhos visa atender à Norma Regulamentadora 32 do Ministério do Trabalho (MT) que, foi aprovada pela Portaria nº 1.748, de 30 de agosto de 2011, do MT. Esse plano de prevenção deve se integrar aos programas já existentes: plano de gestão de resíduos de serviço de saúde (PGRSS), programa de prevenção de riscos ambientais (PPRA) e do programa de controle médico de saúde ocupacional (PCMSO), como base em um modelo de melhoria contínua em Bio-Manguinhos.

Objetivo:

Realizar o levantamento de incidentes/acidentes com materiais perfurocortantes ou escarificantes nos laboratórios de Bio-Manguinhos e divulgar a comunidade de Bio-Manguinhos as situações em que estes ocorreram.

Metodologia:

Aplicação de questionário semiestruturados, com perguntas abertas e fechadas, para colaboradores de Bio-Manguinhos expostos ao risco de contaminação por agente biológico ou infectante e que manipulam material perfurocortantes ou escarificante.

Resultado:

A pesquisa sobre exposição dos colaboradores de Bio-Manguinhos a incidentes/acidentes com perfurocortantes teve um alto índice de adesão, dos 762 formulários entregues nas áreas alvo da pesquisa, 642 foram devolvidos e analisados. Dos 642 pesquisados, 80,0% manipulam perfurocortantes ou escarificantes, a frequência de manipulação é de 47,0% diariamente, 24,0% semanalmente, 3,0% mensalmente e 26,0% eventualmente. Do total de pesquisados 57 (11%) sofreram incidente/acidente com este material. As situações em que ocorreu o incidente/acidente foram de 50,0% durante a utilização de utensílios perfurocortantes; 3,0% ao descartar o material no coletor de perfurocortantes; 9,0% durante o preparo de material/resíduo para descontaminação/esterilização; 11,00% após autoclavação do material reutilizável/resíduo; 22,00% em outras situações. Apenas 19 (33%) procuraram atendimento médico.

Conclusão:

Tais dados evidenciam a necessidade de um trabalho de conscientização com os colaboradores, envolvendo educação continuada como cursos de biossegurança, semanas internas de prevenção de incidentes/acidentes, buscando conscientizá-los sobre a importância do acompanhamento médico pós-incidente/acidente e práticas biosseguras no ambiente laboratorial.

Palavras-chave: Biossegurança; Perfurocortantes; Práticas biosseguras

OTR.07 - Avaliação de modelo murino de infecção por via intranasal para *Acinetobacter baumannii*

Anna Erika Vieira de Araújo^{1*}; Leandro Barrio Napoleão¹; Bruno Jorge Duque da Silva¹; Mônica da Silva Nogueira¹; Luiz Eduardo Furtado Justiniano¹; Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef²; José Procópio Moreno Senna¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²Fiocruz/IOC.

Introdução:

Acinetobacter baumannii é um importante patógeno nosocomial. Recentemente, a OMS determinou como prioridade a busca de novas estratégias de tratamentos para essas infecções. O desenvolvimento de um modelo animal de infecção para este patógeno é importante na avaliação de novos tratamentos, resposta imune e identificação de fatores de virulência. Contudo, há uma dificuldade em reproduzir como o processo infeccioso acontece nos humanos. Para *A. baumannii* a principal via de infecção é a respiratória, acometendo os pulmões de pacientes sob ventilação mecânica. Assim, faz-se necessário o estabelecimento de um modelo animal que mimetize este tipo de infecção.

Objetivo:

Avaliação de um modelo murino de infecção por *A. baumannii* pela via intranasal.

Metodologia:

50 camundongos C57/Bl6 (ICTB/Fiocruz), fêmeas, 8 semanas, foram divididos em grupos (n=15), de acordo com a carga bacteriana a ser inoculada. Destes, 5 animais não receberam bactéria, apenas PBS (controle negativo). O inóculo bacteriano foi preparado previamente a partir de diluições seriadas provenientes de cultivo celular e cada sedimento bacteriano foi então ressuscitado em 50µL de PBS. Os animais foram previamente anestesiados com a associação via intramuscular de 150mg/kg de ketamina e 15mg/kg de xilazina, e o inóculo foi administrado com o auxílio de uma micropipeta nas narinas do animal, de modo que toda a solução bacteriana fosse absorvida pelo trato respiratório. Os animais foram submetidos à coleta de órgãos (pulmões e baço) para quantificação bacteriana (n=5) em placas de ágar Luria-Bertani com ampicilina e acom-

panhados por 7 dias para avaliação de sobrevida (n=10). Os procedimentos relatados possuem licença CEUA/Fiocruz n° LW45/14.

Resultado:

Foram aplicadas as doses infectantes de 10⁹, 10⁷ e 10⁶ UFC/animal. Para 10⁶ e 10⁷ não foram observados sintomas ou óbitos nos animais (n=10). Diferentemente, na dose de 10⁹ UFC/animal, 9 dos 10 animais apresentaram sintomatologia de infecção no primeiro dia de acompanhamento, com óbitos no segundo dia. Estima-se que a DL50 para esta via de infecção esteja entre 10⁸ e 10⁹ UFC/animal. Apenas no maior inóculo, 4 animais apresentaram entre 7 e 8 logs/g de bactéria no baço, demonstrando infiltração bacteriana na corrente sanguínea. Nos pulmões, para 10⁹ observou-se 9 logs/g, exceto em 1 animal que apresentou 4 logs/g, para 10⁷ quantificou-se entre 4 e 5 logs/g e 6 logs/g para apenas 1 animal no inóculo de 10⁶. Uma certa variabilidade é esperada em ensaios *in vivo*, visto que cada animal pode responder de forma diferente à infecção. Nenhum crescimento bacteriano foi observado no grupo controle negativo.

Conclusão:

Nossos estudos preliminares demonstraram um modelo de infecção capaz de gerar um quadro de infecção pulmonar e sistêmica por essa via de inoculação. A dose infectante de 10⁹ UFC/animal parece ser a mais adequada para esta finalidade. Estes estudos poderão ser utilizados para ensaios de desafio com imunoterapias para *A. baumannii*.

Palavras-chave: modelo animal; *Acinetobacter baumannii*; infecção intranasal

OTR.08 - Novo composto de calcona como um medicamento promissor anti-leishmania para uma doença idosa negligenciada: avaliação biológica usando a biodistribuição radiomarcada

Thamires de Oliveira Vieira^{1*}; Ariane de J. Sousa-Batista²; Cíntia I. M. Silva Philipon²; Marta de Souza Albernaz³; Suyene Rocha Pinto¹; Bartira Rossi-Bergmann²; Ralph Santos-Oliveira¹.

1IEN;

2UFRJ/Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho.

Introdução:

Atualmente a Leishmaniose pertence ao grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (NTDs), globalmente distribuída com aproximadamente 1,7 bilhão de pessoas em área de risco potencial. As formas clínicas mais comuns são a leishmaniose cutânea mórbida (CL), que provoca lesões cutâneas desfigurantes e a leishmaniose visceral potencialmente fatal (VL), que afeta os órgãos internos. O tratamento atual da leishmaniose continua sendo um desafio, especialmente devido à necessidade de múltiplas injeções dolorosas, a toxicidade dos medicamentos atuais contra a doença, a falta de eficácia e, ultimamente, os medicamentos resistentes. Neste contexto, é necessária a pesquisa de novos medicamentos, que sejam mais eficazes e seguros. A calcona demonstra um conjunto de atividades aplicáveis, porém existem déficits de informações no que diz respeito ao mecanismo de ação e às propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Torna-se interessante marcar a droga com um isótopo radioativo, o tecnécio-99m (^{99m}Tc), para estudar o comportamento biológico.

Objetivo:

Demonstrar o comportamento biológico da 3-nitro-2-hidroxi-4,6-dimetoxicocone (CH8) no modelo animal de leishmaniose cutânea (CL) e visceral (VL) foram investigados e comparados os perfis de biodistribuição obtidos por administração oral e subcutânea em camundongo saudável. Também avaliamos a biodistribuição de CH8-^{99m}Tc em um modelo experimental de leishmaniose visceral por via oral e para leishmaniose cutânea por via intralesional.

Metodologia:

O seu comportamento biológico foi avaliado a partir da marcação radioativa do composto CH8 com ^{99m}Tc. Grupos de animais infectados com leishmaniose visceral e cutânea foram tratados com CH8-^{99m}Tc administrados por via oral e via subcutânea, respectivamente. Grupos de animais saudáveis foram testados utilizando as mesmas vias e uma biodistribuição foi realizada.

Resultado:

A administração oral de CH8-^{99m}Tc demonstrou uma absorção fraca, no entanto, o fármaco absorvido teve uma absorção expressiva no sangue e no fígado, o órgão principalmente infectado em leishmaniose visceral (VL). Enquanto CH8-^{99m}Tc administrado por via subcutânea mostrou uma distribuição fraca e uma absorção significativa na orelha esquerda, o que sugere um efeito local na pele. Além disso, a infecção com modelos VL e CL não alterou consideravelmente o perfil de biodistribuição por rotas orais e subcutâneas, respectivamente. Comparando os resultados na biodistribuição de CH8-^{99m}Tc em camundongos saudáveis e infectados com VL nota-se que não há diferença significativa entre os grupos. O mesmo observa-se na CL.

Conclusão:

Os resultados sugerem que o CH8 é um candidato promissor para o tratamento oral da VL e para o tratamento intralesional do CL, mostrando um efeito local proeminente.

Palavras-chave: leishmaniose visceral; leishmaniose cutânea; Radiofarmácia

OTR.09 - Desenvolvimento de ensaio baseado em qPCR para determinação de carga bacteriana em órgãos infectados por MRSA (methicilin resistant *Staphylococcus aureus*)

Felipe Betoni Saraiva^{1*}; Cristiane Pinheiro Pestana¹; Leandro Barrio Napoleão¹; José Procópio Moreno Senna¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

MRSA é um patógeno envolvido em infecções nosocomiais, levando a altas taxas de morbidade e mortalidade mundialmente. Infecções com MRSA são de difícil tratamento devido à multi-resistência a antibióticos, conferida pela presença do gene *mecA* codificante para a PBP2a - uma proteína que se liga à penicilina com baixa afinidade a β -lactâmicos. Nosso grupo vem desenvolvendo projetos com biofármacos, para o tratamento desta comorbidade. Estes projetos utilizam ensaios de proteção em modelos animais que é avaliada através de metodologia padrão de cultura celular, a qual é demorada e laboriosa. Técnicas moleculares para detectar o *mecA* são consideradas padrão-ouro no diagnóstico do MRSA e estudos demonstram que a metodologia de qPCR é mais específica, sensível, reprodutível e segura quando comparada ao cultivo celular.

Objetivo:

O objetivo deste estudo é desenvolver um ensaio de qPCR para quantificar MRSA em órgãos infectados.

Metodologia:

As amostras de baço e rins utilizados neste estudo são provenientes de ensaios de infecção com MRSA em modelo murino. Para a construção das curvas padrão, MRSA foi pré-cultivado em meio LB/ampicilina a partir de uma colônia. Em seguida, 100 μ L foram cultivados em 40 mL até a fase exponencial. As bactérias foram centrifugadas e ressuspensas 3 vezes, sendo na última em 10% do volume. Após retirada de alíquota para quantificação (semeadura em placa), foram armazenadas à -80°C. Diluições seriadas de base 10 de MRSA foram adicionadas a 20 mg de homogenato de órgãos não infectados.

Para a obtenção do DNA utilizou-se um kit comercial seguindo protocolo do

fabricante (Promega). Para amplificar uma região do gene *mecA* por TaqMan qPCR, oligonucleotídeos específicos foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0. As reações foram conduzidas em triplicata no Sistema SteppOne em ciclagem padrão. A eficiência da reação foi calculada usando o *slope* das curvas padrões. Amostras positivas e negativas foram testadas para verificar a especificidade. Os resultados da quantificação nos tecidos por cultivo em placa e qPCR foram comparados.

Resultado:

Desenvolvemos com sucesso um método de TaqMan qPCR para quantificação de carga bacteriana em ensaios com MRSA. Este foi capaz de detectar de $2,52 \times 10^5$ à 10^9 e $4,19 \times 10^5$ à 10^9 bactérias viáveis e não-viáveis nos tecidos, baço e rins, respectivamente, com coeficiente de correlação de 0,99 e eficiência acima de 95%. Em comparação a técnica convencional de 3 diluições diferentes (10^{-1} à 10^{-3}) detectou de 1×10^2 à 3×10^6 bactérias viáveis.

Conclusão:

O método de quantificação baseado em TaqMan qPCR mostrou-se ser mais preciso, sensível, seguro e eficaz que o método convencional. A qPCR permitiu a realização de várias análises, mesmo após o congelamento do material, diferentemente do plaqueamento, que deve ser realizado imediatamente após a homogeneização dos órgãos. Portanto, a qPCR apresenta significativas vantagens para sua implementação.

Palavras-chave: MRSA; *mecA*; qPCR

OTR.10 - Evaluation of neutralizing anti-HIV-1 response in individuals infected by viral subtypes prevalent in Brazil in relation to *env* gene

Dalziza de Almeida^{1*}; Karine Venegas Macieira¹; Monick Lindenmeyer Guimarães¹.

¹Fiocruz/IOC.

Introduction:

It is expected that an HIV/aids vaccine be able to induce specific response in CD8+ T cells and neutralizing antibodies (nAb). However the high genetic variability of the HIV envelope gene (*env*) is one of the factors that can influence the ability of a vaccine. Thus, in order to assess humoral immune response against immunogens, HIV-1 neutralizing antibody detection assays was used with five pseudovirus (B, Bbr, C and F1 subtypes) and TZM-bl cells.

Objective:

This study aims to evaluate the humoral immune response in individuals infected with prevalent HIV-1 subtypes and map the *env* gene characteristics of HIV-1.

Methodology:

60 plasma samples from individuals infected with HIV-1 subtypes B, Bbr, C or F1 in Brazil were selected for evaluation of humoral immune response.

Results:

A greater breadth and potency of anti-Env neutralizing response in individuals infected with the F1 or B HIV-1 subtypes was observed when compared with the C subtype and variant B/Bbr ($p < 0,005$). The regions V1 from B/Bbr subtype had greater number of amino acids than the other subtypes and V4 region from F1 subtype had fewer amino acids ($p < 0.005$). Some subtype-specific signatures of F1 subtype and B/Bbr samples located in regions C2, V3 and gp41 may have influenced in the neutralizing response difference between them.

Conclusion:

These results indicate that a single amino acid substitution in the V3 loop may lead to a distinct conformational exposure or electrostatic load and interfere with the neutralizing response potency and has a significant implication for the vaccine design.

Keywords: pseudovirus; neutralizing antibodies; HIV

OTR.II - Teste de Neutralização por Redução de Focos Virais (FRNT) como ferramenta para dosagem de anticorpos neutralizantes para Dengue

Vanessa de Oliveira Santos^{1*}; José Henrique Rezende Linhares¹; Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville¹; Bruno Pimenta Setatino¹; Felipe Soares Figueiredo¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

Frente à co-circulação de diferentes flavivírus no país (Dengue, Zika e Febre Amarela) e suas naturezas antigênicas relacionadas, a avaliação de anticorpos neutralizantes em ensaios sorológicos tem se tornado um grande desafio para os estudos pré-clínicos e clínicos, bem como para o diagnóstico, devido às reações cruzadas. Desta maneira, frente à dificuldade de discernimento entre as respostas sorológicas específicas, muitas vezes se faz necessária a avaliação concomitante para os diferentes vírus em questão. O teste de neutralização por redução de placas de lise (PRNT) é um teste sorológico padrão empregado na quantificação de anticorpos neutralizantes. O PRNT desenvolvido para dengue apresenta algumas desvantagens como: período de 8 dias de incubação e número reduzido de amostras por ensaio, por ser realizada em placa de 6 poços. Somado a isso, a necessidade de realizar os testes com os diferentes sorotipos paralelamente constitui uma importante limitação na utilização desta técnica. Neste contexto, o ensaio de neutralização por redução de focos virais (FRNT) pode ser uma solução para aumentar a capacidade de testagem, uma vez que é realizado em placas de 96 poços, bem como para reduzir o tempo de incubação para 2 dias, sendo potencialmente uma ferramenta mais adequada para a avaliação sorológica em larga escala.

Objetivo:

Avaliar a capacidade do FRNT de solucionar as desvantagens apresentadas pelo PRNT, comparando os dois ensaios com um painel de amostras sorológicas.

Metodologia:

Para comparar os dois ensaios foram dosadas 67 amostras entre amostras positivas e negativas para dengue 1 e dengue 2. As amostras foram primeiramente

analisadas em PRNT e posteriormente analisadas em FRNT. Os títulos de anticorpos neutralizantes obtidos nos 2 métodos foram calculados por regressão linear e analisadas com o *endpoint* 90 e o *endpoint* 50. Para avaliar a correlação entre os dois testes foi usado um programa estatístico.

Resultado:

A avaliação dos títulos das amostras dosadas pelo FRNT frente ao PRNT apresentou uma boa correlação, sugerindo um possível emprego do teste em substituição ao PRNT clássico.

Conclusão:

O FRNT apresentou um ganho significativo para o laboratório, por triplicar a capacidade de testagem das amostras e reduzir o tempo de entrega do resultado em seis dias. O estabelecimento deste teste é uma ferramenta fundamental para a condução dos estudos pré-clínicos e futuros estudos clínicos dos diferentes candidatos vacinais para flavivírus em desenvolvimento na instituição.

Palavras-chave: FRNT; Anticorpos neutralizantes; Dengue

OTR.12 - Padronização de teste de neutralização por redução de focos (FRNT) para Zika como alternativa ao teste padrão-ouro PRNT

José Henrique Rezende Linhares^{1*}; Vanessa de Oliveira Santos¹; Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville¹; Ana Cláudia Machado Duarte¹; Patrícia Brasil²; Stephanie Almeida da Silva¹; Marta Cristina de Oliveira Souza¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹.

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2Fiocruz/IOC.

Introdução:

A Zika é causada por um arbovírus (ZIKV) pertencente à família *Flaviviridae*, transmitido principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti* em regiões tropicais causando um surto no Brasil em 2015 com infecções predominantemente assintomáticas. Apesar das infecções sintomáticas geralmente serem brandas, sua associação à síndrome de Guillain-Barré e microcefalia em neonatos tornou-a emergência de saúde pública. O desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas são essenciais para controle da zika. Dentre os testes sorológicos, o PRNT (*Plaque Reduction Neutralization Test*) é crucial para avaliação de eficácia vacinal, posto que é considerado padrão-ouro para detecção de anticorpos neutralizantes (nAbs), correlacionados à proteção para outros flavivírus (Dengue e Febre Amarela). Contudo, sendo laborioso e de limitada capacidade de análise, é necessário desenvolver ensaios de menor tempo de execução, maior capacidade de análise de amostras e alta sensibilidade para detecção de nAbs para ZIKV, visando atender à demanda por diagnóstico, avaliação vacinal e estudos epidemiológicos.

Objetivo:

Desenvolver teste de neutralização por redução de focos virais para detecção de nAbs para ZIKV em amostras de soro e comparar sua acurácia frente ao PRNT (padrão-ouro).

Metodologia:

Assim como no PRNT, amostras de soro são diluídas de forma seriada e desafiadas contra o ZIKV, sendo posteriormente inoculadas em placas com mono-

camada celular pré-formada e incubadas com meio semissólido. Entretanto, ao invés de esperar a formação dos plaques de lise provenientes do efeito citopático viral, o FRNT utiliza anticorpos monoclonais para marcar os focos de infecção mais precocemente. Para isso, decorrido o tempo de incubação, as placas então são lavadas (tampão PBS/Tween-20 0,05%), fixadas (paraformaldeído 4%), bloqueadas, marcadas com anticorpo monoclonal antilavírus conjugado a peroxidase (4G2-HRP) e reveladas com substrato *TrueBlue* (KPL). Para padronização e otimização do ensaio, foram avaliados diferentes parâmetros como densidade celular, meio e tempo de incubação final, ajuste do *input* viral e da diluição do anticorpo 4G2-HRP. Amostras humanas sabidamente positivas e negativas para ZIKV, assim como para DENV foram testadas em ambos os ensaios (PRNT e FRNT) para comparação dos resultados e análise estatística.

Resultado:

O FRNT apresenta tempo de incubação 50% menor e maior capacidade de análise de amostras quando comparado ao PRNT. O ponto de corte traçado preliminarmente obteve sensibilidade de 100% e especificidade de 93,18%, observando-se uma tendência a títulos mais altos das amostras positivas quando comparado ao PRNT (alta sensibilidade). Apesar das diferenças nas dosagens de títulos de nAbs entre as duas metodologias, observou-se uma ótima correlação entre os ensaios.

Conclusão:

O FRNT apresenta como vantagens a rapidez e maior capacidade de análise de amostras por ensaio em relação ao teste referência. Essas vantagens, somadas à alta correlação dos resultados obtidos nos diferentes ensaios possibilita a utilização do FRNT como alternativa ao PRNT em estudos epidemiológicos, desenvolvimento vacinais e diagnóstico.

Palavras-chave: Zika; FRNT; PRNT

OTR.13 - Avaliação da suplementação do meio Earle 199 com bicarbonato de sódio em pó: aplicabilidade e impacto de custos

José Henrique Rezende Linhares^{1*}; Vanessa de Oliveira Santos¹; Idevaldo Inácio Ferreira¹; Maria Carmem Bandeira de Mello¹; Kelly Araújo Lúcio¹; Bruno Pimenta Setatino¹; Marta Cristina de Oliveira Souza¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹.

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos.

Introdução:

O LATEV atende a vários projetos do Programa de Vacinas Virais e estudos clínicos realizados pela ASCLIN. Grande parte das atividades realizadas no laboratório envolvem o crescimento de células Vero em meio Earle 199. Atualmente, o meio Earle 199 em pó é comprado pela unidade e preparado 10X concentrado, necessitando de suplementação com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) gaseificado no momento do uso. Mensalmente, a demanda do LATEV é em média 40 L de meio Earle 199 e 500 frascos de NaHCO_3 gaseificado, para confecção de aproximadamente 15 L para placas (incubadas em CO_2 , em sistema aberto) e 24 L para garrafas (estufas BOD, em sistema fechado). Essas elevadas demandas concorrem em atendimento com a área fabril, onde esses insumos são preparados. Como primeira alternativa para que o abastecimento dos insumos não seja restritivo às necessidades do laboratório, avaliou-se o uso de meio de cultivo Earle 199 adquirido pronto para uso. No entanto, a implementação dessa solução implica na necessidade de incubação das células exclusivamente em estufa de CO_2 , sendo uma solução não aplicável imediata e integralmente, face à indisponibilidade de incubadoras em tamanho e quantidade suficientes. Assim sendo, avaliou-se a suplementação do meio Earle 199 com diferentes concentrações de NaHCO_3 em pó para cultivo para cultivo em da linhagem celular Vero, tanto em estufa BOD como em incubadora de CO_2 , visando analisar aplicabilidade, vantagens e redução de custos.

Objetivo:

Avaliar a suplementação do meio Earle 199 com NaHCO_3 em pó, sua aplicabilidade e impacto de custos para a unidade.

Metodologia:

Células Vero foram cultivadas em meio 199 Earle: 1) Suplementado com NaHCO_3 gaseificado; 2) Suplementado com NaHCO_3 em pó 1,1% e 2,2%; 3) meio 199 adquirido pronto para uso. O crescimento celular de cada condição experimental foi comparado ao final de 4 dias. Os custos para as condições experimentais propostas foram estimados a partir das demandas anuais do laboratório e comparados com a proposta de uso de meio comercial pronto para uso.

Resultado:

Não houve diferença no crescimento celular e morfologia nas condições experimentais testadas. Mesmo mais laboriosa, a suplementação com NaHCO_3 em pó é viável para o atendimento das demandas do laboratório, sem impactar a unidade fabril. Os custos do meio adquirido pronto para uso é cerca de 11,5 vezes maior quando comparado com a alternativa apresentada, apesar da necessidade de filtração esterilizante pós suplementação.

Conclusão:

A implementação uso do meio Earle 199 suplementado com NaHCO_3 em pó é viável para atender as demandas do LATEV, bem como outras unidades que utilizam o mesmo meio, com um custo consideravelmente menor se comparado à compra do meio pronto. Além disso, a alternativa proposta reduz a demanda de insumos do laboratório para a unidade fabril.

Palavras-chave: Meio de cultivo; Redução de gastos; Bicarbonato de sódio

OTR.14 - Avaliação da expressão da osteopontina e suas isoformas de *splicing* alternativo na infecção pelo vírus influenza A

Aline da Rocha Matos¹; Jéssica Santa Cruz de Carvalho Martins^{1*}; Cristiana Couto Garcia¹; Etel Rodrigues Pereira Gimba²; Marilda Mendonça Siqueira¹.

¹Fiocruz/IOC;

²INCa.

Introdução:

A infecção pelo vírus influenza A (IAV) é responsável por altas taxas de morbi-mortalidade em todo o mundo, afetando principalmente idosos, crianças, indivíduos imunocomprometidos ou com comorbidades. O agravamento da infecção está associado à presença de co-morbidades do hospedeiro, fatores genéticos do vírus e fatores intrínsecos do hospedeiro. A osteopontina (OPN) é uma glicoproteína que sofre *splicing* alternativo, gerando isoformas (OPN-SI) e possui potencial como biomarcador em infecções e em tumores. Na infecção por influenza, a OPN encontra-se aumentada, correlacionando-se com a patogenicidade e gravidade da lesão pulmonar. Cabe ressaltar que ainda não há relatos sobre os níveis de expressão durante a infecção pelo IAV.

Objetivo:

Avaliar o nível de expressão da osteopontina e suas isoformas na infecção por IAV.

Metodologia:

No modelo *in vitro*, foram utilizadas células A549 infectadas com o vírus influenza A(H1N1)pdm09 (A/California/07/2009) em crescentes multiplicidades de infecção (MOI). As células foram coletadas 24 horas após a infecção e armazenadas a -70 °C, para posterior extração de RNA. No modelo *in vivo*, foram utilizados camundongos C57/BL/6J (N=5, por grupo), infectados com IAV adaptado A/PR/8/34 H1N1 (PR8), com título viral de 5x10³ PFU. Os animais foram sacrificados 3 e 5 dias após a infecção e os pulmões foram coletados para extração de RNA. Para detecção e quantificação da OPN e das OPN-SI, o RNA total foi extraído das células e dos tecidos pulmonares dos camundongos. Após, foi realizada transcrição reversa (RT-PCR) e PCR em tempo real. A quantificação da expressão gênica relativa foi realizada através da metodologia

do $\Delta\Delta CT$. Os genes da β -actina humana e GAPDH murino foram utilizados como normalizadores. Para as análises estatísticas, utilizamos o teste exato de Fisher para as variáveis discretas e teste t de Student para variáveis contínuas. A significância foi considerada quando os valores de $p < 0.05$.

Resultado:

No modelo de infecção *in vitro*, observamos aumento de expressão da OPN total e de todas as OPN-SI analisadas (OPN A, OPN B, OPN C e OPN 4) de forma concentração dependente, em comparação com as células não infectadas. No modelo *in vivo* de infecção, detectamos aumento significativo da expressão da OPN total após 5 dias de infecção com título viral de 5x10³ PFU, comparando-se com o grupo controle sem infecção e com o nível de expressão 3 dias após a infecção.

Conclusão:

Os resultados encontrados sugerem que o aumento da expressão da OPN total e das OPN-SI está associado à gravidade da infecção por IAV, nos modelos estudados. Dados futuros sobre o nível de expressão destes alvos em amostras de pacientes infectados por influenza A(H1N1)pdm09 serão importantes para confirmar esta associação.

Palavras-chave: Influenza A; Osteopontina; Biomarcador

OTR.15 - Detecção e quantificação do vírus oncogênico Herpesvírus humano 8 em amostras de fluido oral utilizando curva padrão sintética

Amanda de Oliveira Lopes^{1*}; Lucas Ribeiro Teixeira¹; Natália Spitz Toledo Dias¹; Anderson Vicente de Paula²; Geovana Pereira²; Tania Regina Tozetto Mendoza²; Vanessa Salet de Paula¹.

¹Fiocruz/IOC;

²USP/Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

Introdução:

O herpesvírus humano 8 (HHV-8) é um vírus oncogênico que está associado à neoplasias, como o Sarcoma de Kaposi (SK). Esta neoplasia é mais agressiva em portadores do HIV favorecendo a progressão da AIDS e ocasionando alta mortalidade nesses indivíduos. O HHV-8 pode ser detectado em taxas mais altas em fluido oral de indivíduos com HIV/HHV-8 e esta detecção em fluido oral pode ser útil para confirmar e monitorar a infecção e o risco de suas complicações. A reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa (qPCR) é essencial por ser altamente sensível e específica, e por permitir a quantificação da carga viral. O método de quantificação absoluta depende de curva padrão eficiente para correta quantificação e monitoramento da infecção viral. Entretanto, as curvas utilizadas nos ensaios de qPCR para detecção e quantificação de HHV-8 são obtidas através de clonagem, método laborioso, que pode demandar muito tempo e custos. A curva sintética é uma alternativa a curva plasmidial por ser específica e sua produção precisar apenas da informação da sequência a ser amplificada, diminuindo, assim, o tempo e custo do processo.

Objetivo:

Avaliar o desempenho de uma curva padrão sintética para detecção e quantificação de HHV-8 em amostra de fluido oral.

Metodologia:

A curva sintética foi desenhada com 79 pares de bases referentes a uma região da ORF 26 do genoma do HHV-8. Para a utilização nos ensaios, a curva foi diluída de 10^{-1} até 10^{-14} e, após a otimização no sistema qPCR TaqMan[®],

foi utilizada para quantificar um painel de amostras composto por 8 amostras sabidamente negativas e 8 amostras sabidamente positivas de fluido oral de pacientes com HIV/SK. Anteriormente, as amostras de fluido oral de cada paciente (2mL) foram coletadas através de salivagem espontânea, que em seguida foram alíquotadas e estocadas à -70°C . As amostras positivas na qPCR foram submetidas ao Nested PCR e ao sequenciamento da ORF 26.

Resultado:

A curva padrão apresentou R^2 de 0,99, *slope* de -3,2, *y-intercept* de 40 e 104% de eficiência. O limite de detecção foi de 10^{10} até 10^2 cópias/mL. Além disso, HHV-8 foi detectado em 100% das amostras sabidamente positivas (8/8) pela qPCR, com carga viral variando de $1,7 \times 10^3$ cópias/mL a $1,4 \times 10^5$ cópias/mL. Em todas as amostras quantificadas a detecção de HHV-8 foi confirmada pelo sequenciamento. As amostras sabidamente negativas não apresentaram amplificação por nenhum dos testes.

Conclusão:

Desta forma, os resultados comprovaram o desempenho desta curva sintética na qPCR para detecção e quantificação de HHV-8 em amostras de fluido oral. A curva sintética é uma alternativa para substituição da curva plasmidial, e poderá ser utilizada para o monitoramento do Sarcoma de Kaposi.

Palavras-chave: Curva sintética; PCR em tempo real; Herpesvírus humano 8

OTR.16 - Characterization of Respiratory Syncytial Viruses circulating in the northeast Brazilian region: epidemiological and molecular surveillance within the Influenza surveillance program

Paola Cristina Resende^{1*}; Rosa Cavalcanti¹; Cliomar Santos²; Jonathan Lopes¹; Braulia Caetano¹; David Brown¹; Marilda Siqueira¹.

¹Fiocruz/IOC;

²Lacen SE.

Introduction:

According to the WHO, lower respiratory tract infection is the leading cause of hospitalization among children under 5 years of age and the human respiratory syncytial virus (hRSV) is the main virus responsible for these infections. However, Influenza and other respiratory viruses also infect this population. Currently, prophylactic treatment with the monoclonal antibody Palivizumab is the only available option for hRSV infection, due to cost it is limited for high-risk populations. Several hRSV vaccine candidates are in advanced clinical trials and it is possible that in the near future we will have a safe and effective vaccine against hRSV. Given its impact on public health and the epidemiological characteristics of hRSV, one of the current priorities for WHO is to look to adapt the use of the influenza surveillance network to capture and monitor hRSV cases.

Objective:

The aim of this study was to characterize the clinical, epidemiological and molecular profile of hRSV within the already established Brazilian influenza surveillance network to inform the adoption (or not) of combined surveillance of Influenza and hRSV viruses.

Methodology:

In Sergipe State from February 2016 to October 2017 Nasopharyngeal aspirates collected from children under 6 years of age (240 Influenza-like illness, ILI, and 156 Severe Acute Respiratory Infection, SARI) were screened for Influenza and hRSV by real time RT-PCR. The G gene from hRSV strains identified were sequenced and characterized phylogenetically.

Results:

The Sergipe influenza surveillance program was able to detect hRSV cases in two epidemic waves from April to August of each year during the period of study, mainly in first year of life. hRSV was the most commonly detected virus (n = 124) followed by Influenza A (8 H1N1pdm09 and 3 H3N2) and influenza B (4 B/Victoria and 2 B/Yamagata). Coinfection was identified in 6 hRSV with Influenza A or B. Of the 396 cases analyzed, 364 reported the presence or absence of fever. When fever was present, 31% (103/336) were positive for RSV and 5% (18/336) for Influenza virus. Among cases that reported absence of fever, 54% (15/28) were positive for hRSV. However, even screening the majority of cases with fever, we could detect the hRSV in 19% (43/226) of the ILI cases and in 51% (60/156) of the SARI cases. We characterised some hRSV strains genetically and observed a co-circulation of RSV-A, genotype ON1-like and RSV-B, genotype BA-like.

Conclusion:

This study highlights that it is possible to characterize the seasonality, and the epidemiological and molecular characteristics of hRSV using the influenza surveillance program, it can be a valuable sentinel scheme. However, to better understand the impact and burden of hRSV disease it will be necessary to establish reference units to better characterize hRSV cases not captured by the Influenza case definition.

Keywords: Human Respiratory Syncytial Viruses; Influenza and hRSV surveillance; Respiratory infection in children

OTR.17 - Desenvolvimento de vetores lentivirais para inibição do vírus da hepatite B, via RNA de interferência

Bárbara Vieira do Lago^{1*}; Nayhanne Tizzo de Paula²; Francisco Mello¹; Bruno Carneiro³; Vanessa de Paula¹; Francisco José Aragão²; Elisabeth Lampe¹.

¹Fiocruz/IOC;

²Empresa Brasileira em Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

³Universidade Estadual Paulista de São José do Rio Preto - Unesp.

Introdução:

Estima-se que a infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) seja responsável por aproximadamente mil óbitos ao ano no Brasil, devido a quadros graves de cirrose e carcinoma hepatocelular (HCC). Atualmente, diversos fármacos são utilizados no tratamento da hepatite B crônica, no entanto, a cura completa ainda é alvo de controvérsias. O principal desafio é a dificuldade do sistema imunológico em eliminar o DNA circular covalentemente fechado (cccDNA) viral presente no núcleo celular, bem como a capacidade que esse vírus tem de integrar seu DNA no genoma do hospedeiro, o que possibilita a reativação da infecção a qualquer momento da vida do paciente. O RNA de interferência (RNAi) é um mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional e demonstra ser uma alternativa promissora na eliminação do HBV.

Objetivo:

O objetivo desse estudo é obter um plasmídeo lentiviral efetivo no silenciamento de diferentes proteínas do HBV, via RNAi, visando o desenvolvimento de um produto para terapia gênica na infecção crônica pelo vírus da hepatite B.

Metodologia:

Os vetores lentivirais são obtidos através da co-transfecção transiente de plasmídeos contendo moléculas de *short-hairpin* RNA (shRNA), que irão atuar silenciando os genes do envelope (HBsAg), Polimerase e/ou Core (HBcAg), e de vetores de empacotamento do sistema lentiviral, contendo os genes GAG, Rev do HIV e a proteína do envelope VSV-G.

Resultado:

A construção de três vetores de silenciamento já foi realizada. Os vetores foram testado *in silico*, a fim de eliminar a possibilidade de efeitos *off-target*. A predição das estruturas secundárias e da estabilidade também já foram testadas. Células Huh7 expressando o DNA do HBV foram transfectadas com o primeiro plasmídeo lentiviral, demonstrando resultados promissores. A partir do terceiro dia pós transfecção, o HBsAg tornou-se indetectável nas células tratadas com o plasmídeo, enquanto os controles não tratados mantiveram a expressão protéica viral. A eficiência do silenciamento pelos siRNA, utilizados individualmente ou em associação, será avaliada também através da quantificação das proteínas HBeAg e do DNA do HBV durante o período pós transfecção.

Conclusão:

Com esse trabalho pretendemos obter vetores efetivos no silenciamento de proteínas importantes do HBV, via RNAi, e assim contribuir para o desenvolvimento dessa promissora modalidade terapêutica, que pode efetivamente atuar na eliminação do HBV em pacientes crônicos.

Palavras-chave: Vírus da hepatite B; RNA de interferência; vetores lentivirais

OTR.18 - Establishing a lyophilized presentation for mAb 4G2

Celso Crespo^{1*}; Márcia Arissawa¹; Sérgio Assumpção¹; Guillermo Marini¹; Ana Andrade¹; Hilton Nascimento¹; Patricia Jurgilas¹; Isabella Maluf¹; Veronica Calado².

¹Fiocruz/Bio-Manguinhos;

²UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introduction:

Monoclonal antibodies (mAbs) have highly efficient immune response for many diagnostic and therapeutic researches. Detection of flavivirus by using mAbs in diagnostic kits, for instance, can be lower cost and faster alternative, creating important autonomy in the production of this input to our country. Lyophilized presentations for mAbs should be more stable and suited to milder conditions of storage and distribution, 2 to 8°C instead of -70°C, as they are currently costly, provided to assure their quality.

Objective

This work intends to establish a lyophilized presentation for the mAb 4G2 assuring its physico-chemical and biological stability.

Methodology:

D1-4G2-4-15 murine hybridoma was grown in suspension in high glucose DMEM medium supplemented with fetal bovine serum and L-Glutamine, and supernatant harvested. Subsequently, downstream techniques were used to get mAb formulations in ranges from 0.54 to 3.00%. Differential scanning calorimetry and electric resistivity analysis were used to specify thermophysical properties. Preliminary lyophilization runs were carried out, followed by an evaluation over the final product for a set of quality parameters, including also a characterization by SEC on Superdex 200 Column, SDS-PAGE (8-25%) and IEF-PAGE (3-9). Tryptophan fluorescence spectra and circular dichroism were also evaluated to verify conformational modifications.

Results:

Results from electric resistivity and thermal analysis identified phase transitions, enthalpies and critical temperatures of interest for the lyophilization cycle design, which was based specially on the minimum temperatures that mAb

formulation should reach during freezing and the maximum temperature that mAb formulation should not reach during sublimation. Evaluation over final products showed a formation of homogeneous and pharmaceutically elegant cake, low residual moisture and rapid reconstitution in water for injection. The mAb 4G2 presented by SEC a major peak with average homogeneity corresponding to 98.2% peak area and a fronting peak with MW similar to a dimeric form (1.8% peak area), that was related to a reversible aggregation of 4G2. Samples of 4G2 lyophilized, stored for 6 and 12 months, showed an increase around 2.28% and 6.55% in the dimeric form and also presented a high MW aggregate (> 600kDa). Results from SDS-PAGE profiles suggest no degradation of the polypeptide chains and IEF-PAGE results indicate that the polysaccharide content was maintained with the lyophilization process. Circular dichroism and fluorescence spectra were identical, which suggest there were no conformational changes in the lyophilized monoclonal with the storage.

Conclusion:

After lyophilization process, the mAb 4G2 did not lose their physico-chemical and conformational characteristics, although the aggregation content was altered. Formulation studies by adding stabilizers, modifying the pH or even the ionic strength of the medium followed by an optimization of lyophilization cycle may decrease the aggregation content. Studies of the biological activity of 4G2 should be conducted to corroborate the stability of this monoclonal desirable in lyophilized presentation.

Keywords: Monoclonal antibody; Lyophilization; Dengue

OTR.19 - TET2 mutation in cellular reprogramming and hematopoietic differentiation

Cintia Elisabeth Gomez Limia^{1*}; Rafaela Reis¹; Cristiana Solza²; Adelmo H D Gabriel³; Ilana Zalcborg Renault¹; Antonio Di Stefano⁴; Isabelle Plo⁴; Stevens Rehen⁵; Barbara Monte Mor¹; Martín Hernán Bonamino⁶.

1INCa;

2Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ;

3Hospital Universitário Antônio Pedro;

4Institute Gustave Roussy, INSERM UMR1170;

5Laboratório Nacional de Células Tronco (LANCE), UFRJ, Instituto IDor;

6Vice Presidência de Pesquisa e Coleções Biológicas (VPPCB), Fiocruz.

Introduction:

Primary myelofibrosis (PMF) is a myeloproliferative neoplasm characterized by an clonal myeloproliferation. In PMF, driver somatic mutations occur in *JAK2*, *MPL* or *CALR* genes. Mutations in epigenetic regulators as *TET2* and *ASXL1* that could lead to loss-of-function were frequently identified. In this context, induced pluripotent stem cells (iPSC) could be used to study clonal heterogeneity and to recapitulate *in vitro* some hematological features of PMF. *Tet2* deletion in mouse embryonic fibroblast was shown to reduce cellular reprogramming efficiency.

Objective:

The main goal of this work was to assess the impact of somatic mutations in *CALR/TET2* in both cellular reprogramming and hematopoietic differentiation using iPSC

Methodology:

We used next generation sequencing to screen a cohort of Brazilian PMF patients for myeloid somatic mutations. One of the patients granulocytes (P1) were shown by Sanger sequencing to harbor *CALR*^{ins5} and *TET2*^{G898X} mutations. CD34+ primary cells were isolated from P1 or a healthy donor control (C1) and erythroblasts were differentiated *in vitro*. We generated iPSC from P1 (P1-iPSC) or from the control (C1-iPSC) erythroblasts using the Sendai virus system. The pluripotency was confirmed in iPSC colonies by the expression

of embryonic stem cells markers. The capacity to form germ layers was evaluated by embryonic body formation and layer specific markers detection by immunohistochemistry. Hematopoietic differentiation was performed on feeder-free culture supplemented with cytokines and CD43+CD34+ progenitors sorted at day 10-14. Myeloid Colony-Forming Units (CFU) were quantified in methylcellulose assays, under microscopic evaluation on day 12. CFU-Megakaryocytes were scored in plasma clots assays, after 9 days of culture and labeling with anti-CD41a antibody and alkaline phosphatase staining. Granulocytes were differentiated from CD34+CD43+ progenitors in liquid culture during 20 days.

Results:

After cellular reprogramming, 32 P1-iPSC clones were obtained, 20 *CALR*^{ins5}/*TET2*^{wt} and 12 *CALR*^{ins5}/*TET2*^{G898X} homozygous. The different genotypes observed for iPSC reflect the clonal diversity present in the PMF primary sample. We confirmed that *TET2*^{wt} as well as *TET2*^{G898X} iPSCs displayed pluripotency and all three germ layers markers. We next sought to study the role of these mutations in the hematopoietic differentiation. We observed that all type of myeloid colonies were generated in methylcellulose assays for P1-iPSC and C1-iPSC. Our preliminary results show that an increased number of granulocyte/monocyte colonies derived from CD34+CD43+ progenitors of P1-*TET2*^{G898X} iPSCs, when compared both with iPSC P1-*TET2*^{WT} iPSCs and C1-iPSC. Using plasma clot assay, we observed higher numbers of large CFU-MK colonies derived from P1-iPSC versus C1-iPSC.

Conclusion:

Our results suggest that the *TET2*^{G898X} did not impair cellular reprogramming, since iPSC harboring this mutation displayed all the features of bona fide iPSC and that mutations in *CALR* and *TET2* have an impact on hematopoietic differentiation of iPSC.

Keywords: iPSCs; Primary myelofibrose; epigenetic regulators

OTR.20 - Production of chimeric antigen receptor (CAR)-T cells for preclinical testing using non-viral transposon vectors and a lymphoblastoid cell line (LCL)

Leonardo Chicaybam^{1*}; Mayra Carneiro²; Bárbara Peixoto²; Luiza Abdo²; Luciana Barros Carvalho²; Martín Hernán Bonamino¹.

¹Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz;
²INCa.

Introduction:

CAR T cell immunotherapy for treatment of cancer is showing promising results in clinical trials targeting the B cell restricted CD19 antigen. Patients in clinical trials harboring B cell malignancies experienced overall response rates of 73%, with pediatric B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) patients showing the highest response rates (93%). However, there is no standard protocol for the generation of CAR-modified T cells, with different genetic modification vectors and expansion protocols being used. Viral vectors insert the transgene in the genome of the cell, providing long term CAR expression. However, their use is associated with high production costs and cumbersome quality controls, impacting on the final cost of CAR-T cell therapies. Sleeping Beauty (SB) transposon system consist of plasmid-based integrative vectors that, through a cut-and-paste mechanism catalyzed by a transposase, recognize inverted terminal repeats flanking the transgene and insert it in the target cell genome. We show here that this system, combined with LCL-based T cell expansion can be used to efficiently transfect primary T lymphocytes and induce long term CAR expression throughout T cell expansion.

Objective:

To develop a protocol to expand SB-transfected CAR T cells using a LCL.

Methodology:

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated using Ficoll and transfected using Nucleofector II electroporator. The plasmids encoding the anti-CD19 CAR and transposase (SB100X) used in the transfection were mixed based on a pre-defined optimized proportion. After transfection the cells were stimulated with the L388 LCL, a mature B cell line that expresses the target

antigen (CD19) and costimulatory receptors. CAR T cells were re-stimulated up to 3 times with L388 and T cell phenotype (CAR expression, memory markers) and effector function were evaluated at the end of each cycle.

Results:

Electroporation of PBMCs with transposon plasmid decreased viability and altered the frequency of memory subpopulations when compared to the mock (electroporated without plasmid) condition. However, CAR expression rescued the electroporated lymphocytes and these cells showed increased proliferation compared to mock control (28-fold vs 15-fold expansion; 19BBz vs mock). Moreover, CAR+ lymphocytes showed an increased frequency by the end of the stimulation cycle compared to d1 post electroporation, suggesting that CAR signaling enhances the activation and proliferation of these cells. NK cell depletion prior to L388 stimulation altered the composition of memory subpopulations, favoring the expansion of CD8+ CD62L- CCR7+ cells.

Conclusion:

The results showed that electroporation using the SB system is a simple and cost-effective method for inducing long-term CAR expression in T lymphocytes. Expansion of gene modified T cells was possible by using the L388, providing up to 3 cycles of stimulations and reaching the required cell number for preclinical testing. Experiments using B cell leukemia models in immunodeficient mice are underway to evaluate CAR T cell function *in vivo*.

Keywords: T lymphocytes; Immunotherapy; Chimeric antigen receptor

OTR.21 - Diversity change of Influenza A (H3N2) strains circulating in Brazil during 2017-2018: what expect for the next coming winter?

Paola Cristina Resende^{1*}; Braulia Caetano¹; Fernando Motta¹; Aline Matos¹; Priscila Born¹; Milene Miranda¹; Cristina Garcia¹; Jonathan Lopes¹; David Brown¹; Marilda M Siqueira¹.

¹Fiocruz/IOC.

Introduction:

Influenza A(H3N2) subtype was the predominant strain during the early months of the 2017 influenza epidemic in Brazil. In contrast with the regular influenza activity in Brazil, in Australia the A(H3N2) was responsible for a large and prolonged epidemic, not seen since the 2009 pandemic. Influenza A(H3N2) also caused a significant epidemic in 2017/2018 in the Northern hemisphere season. Several genetic and antigenic A(H3N2) variants were circulating, which made the decision about which strain to incorporate into the influenza vaccine challenging. For the 2018 Southern Hemisphere trivalent vaccine the WHO selected the new strain A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016-like (3C.2a1) to replace the strain A/HongKong/4801/2014-like (3C.2a).

Objective:

The aim of this study was to describe the genetic diversity of influenza A(H3N2) viruses circulating in Brazil between January 2017 and January 2018, checking the match between these circulating strains and vaccine strains. We also describe the Brazilian strains and strains circulating worldwide.

Methodology:

Genetic sequencing of the hemagglutinin gene of the influenza A(H3N2) were performed, followed by a phylogenetic reconstruction using sequences available in GISAID (Global Initiative on Sharing All Influenza Data) for comparison with our dataset.

Results:

During the study period we observed a large diversity of A(H3N2) genetic clusters, including 3C.2a, 3C.2a1 and 3C.3a and their subgroups. During

the 2016-2017 interepidemic and 2017 epidemic period the cluster most frequently detected belonged to genetic clade 3C.2a1 (148/185; 80,0%), a distinct group related to the 2017 vaccine strain A/HongKong/4801/2014-like (3C.2a). However, the genetic profile changed during the study period and in the interepidemic season 2017-2018 the most commonly detected genetic group was the 3C.2a cluster (43/58; 74,1%). Inside this cluster the majority (34/43; 79.1%) of strains belonged to a single genetic 3C.2a subgroup 2, bearing antigenic substitutions T131K and R142K (site A) and R261Q (site E). The dominance of this 3C.2a subgroup 2 in the 2017-2018 interepidemic period in Brazil was similar to the 2017-2018 season in Europe and Canada, according to their surveillance data. On the other hand, the strong 2017 epidemic season in Australia was characterized by a greater mix of genetic clusters and only 7% of viruses belonged to the 3C.2a subgroup 2. We saw a similar pattern in Brazil where we detected only (6/36; 16,7%) of this subgroup. For the 2018 Southern hemisphere vaccine, a new strain (3C.2a1) was chosen and it has 5-6 antigenic changes in comparison to the predominant 3C.2a subgroup 2 circulating in South America since September 2017 until now.

Conclusion:

It is possible that the vaccine mismatch will not protect the population against a majority of circulating strains. Surveillance of the vaccine effectiveness supported by antigenic and serological analysis is necessary to prove this hypothesis. However, this highlights the difficulty of vaccine strain selection and highlights the value of an universal influenza vaccine.

Keywords: Influenza vaccine; Influenza A (H3N2); Vaccine mismatch

OTR.22 - Immune landscape in esophageal squamous cell carcinoma

Luciana Rodrigues Carvalho Barros^{1*}; Paulo Thiago dos Santos¹; Sheila Coelho¹; Gustavo Fioravanti Vieira²; Nicole de Miranda Scherer¹; Luis Felipe Ribeiro Pinto¹; Martín Hernán Bonamino³.

¹INCa;

²UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

³Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz.

Introduction:

Esophageal cancer (EC) is one of the ten most incident and lethal neoplasms worldwide. The chemotherapy of choice still involves taxane and platinum-based regimens, without any molecular targets. Therefore, it is of utmost importance to better characterize these tumors in order to develop biomarkers and new therapeutical strategies. Esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) exhibits high intratumoral molecular heterogeneity that might favor immunotherapy, such as the immune checkpoints blockade. Nonetheless, the success of such therapies depends on the immune based microenvironment characteristics of the tumor.

Objective:

Describe the immune cell infiltrate in ESCC tumor, find prognosis biomarkers and propose new treatment strategies to ESCC patients.

Methodology:

RNA-seq from 14 tumor and adjacent normal tissue samples from ESCC patients without previous treatment (from BNT, INCA - CEP 116/11) were performed by Illumina Hi-Seq 2000. Mutations were analyzed by GATK best protocols. Neoantigens were predicted based on NetMHCpan 3.30 and HLA alleles by Optitype. CIBERSORT was used to calculate 22 immune cell subpopulations percentage. MiXCR and tcR package was applied to estimate TCR and BCR clonotypes. R packages were used for graphs and statistics.

Results:

We found 75 mutations per sample, resulting in 29 neoantigens in average. Tissue associated antigens (TAA) expression was evaluated and five genes

were specifically expressed in tumor samples, but not in surrounding healthy tissue. Peptides derived from these genes could be used as a vaccine. Immune cell infiltrate populations were evaluated resulting in a major population of macrophages and T cell within the tumor. Cytokines and chemokines gene expression also correlated with several immune subpopulations. B memory cells correlates with better prognosis both in INCA and TCGA cohorts. BCR repertoire were predominantly IgG whereas IgA was in surrounding area. We also found germinative centers within the tumor by immunohistochemistry staining. TCR and BCR number of clonotypes correlated with neoantigen burden. TCR alpha and beta chains were the most abundant. Several clonotypes of TCR and BCR were shared between tumor and surrounding tissue, with very few shared between samples. By *in silico* molecular model we found a TCR clone that recognized a TAA derived peptide from MAGEA11. Concerning immune checkpoint blockade molecules, we tested several inhibitors and stimulatory receptors as *lag3*, *pdcd1*, *pdl1* and *ctl4* that were more expressed in tumor and higher *lag3* expression correlated with a poor prognosis in INCA cohort.

Conclusion:

We described the complex role of several immune cell subsets, its inhibitory and stimulatory molecules in mucosa collaborating for the tumor microenvironment. Also, we found a TCR specific for a neoantigen. Altogether these results showed that each patient has its own collection of neoantigens derived from mutations, but shared peptides from TAA genes that can be proposed as a unique peptide vaccine for ESCC patients.

Keywords: Immune system; Esophageal Cancer; Neoantigen

OTR.23 - Experimental strategy form identifying membrane targets to diagnostic and treatment for breast cancer

Julia Badaró Mendonça^{1*}; Nicolas Carels²; Mariana Caldas Waghabi¹; Tatiana Martins Tilli².

¹Fiocruz/IOC;

²Fiocruz/CDTS.

Introduction:

The main limitations of effectiveness of drugs currently used for the treatment of cancer include systemic toxicity, drug resistance and debilitating side effects. Effective solutions to overcome these limitations are (i) to use membrane proteins to address the delivery system of encapsulated drugs in second generation biocompatible nanoparticles and (ii) the use of monoclonal antibodies directed against specific targets of tumor cells.

Objective:

In this context, this project outlined a strategy for optimized selection of membrane proteins in tumors with focus on the development of breast cancer therapy and diagnosis.

Methodology:

Our strategy involves the use of TCGA data (The Cancer Genome Atlas Data) using transcriptome data from tumor and non-tumor breast human tissue; and several healthy tissues, such as bladder, lung, pancreas, uterus, cervix and colon. By this strategy, it was possible to identify membrane proteins with increased expression levels in tumor tissue compared with healthy tissue.

Results:

A list of seven differentially expressed target proteins (patent pending) has been proposed from this inference to 95 patients of breast tumor that includes the different molecular subtypes; Luminal A, Luminal B, HER2+ and Triple Negative. The increased expression of two selected proteins were already confirmed by immunofluorescence assay.

Conclusion:

A proof-of-concept is the next step to confirm targets overexpression at protein level, and also their correlation with clinical and pathological data. Moreover, selected binding peptides will be synthesized to perform experimental validation of the nanoparticle functionality and internalization by tumor cells. Therefore, we expect that these proteins will be suitable targets for the therapy with a lower rate of undesirable side effects and for being more effective therapeutically.

Keywords: breast cancer; therapy ; nanoparticles

OTR.24 - Clinical, laboratory and sonographic follow-up of Zika virus (ZIKV) infection in *Macaca mullata* pregnant rhesus macaque treated with sofosbuvir

Noemi Rovaris Gardinali^{1*}; Juliana Gil Melgaço²; Sarah Beatriz Salamene Salvador²; Gisela Freitas Trindade¹; Marcia Christina Vasconcelos Archer da Motta¹; Sheila Maria Barbosa de Lima¹; Marcelo Alves Pinto².

1Fiocruz/Bio-Manguinhos;

2Fiocruz/IOC.

Introduction:

Recent *in vivo* studies using mice model have shown the antiviral activity of sofosbuvir, as a potential candidate for treatment of ZIKV infection.

Objective:

This study is aimed to evaluate the antiviral effect of sofosbuvir, pre and post inoculation, using the non-human primate (NHP) *Macaca mulatta* (rhesus macaque) as experimental model.

Methodology:

Nine females rhesus macaques were included, and divided in three groups numbered equally: 1) pregnant macaques, inoculated with ZIKV and orally treated with sofosbuvir 10 days before viral inoculation up to 30 days post inoculation (dpi); 2) pregnant macaques, inoculated and orally treated with sofosbuvir from the 2° to 30° dpi; and 3) pregnant macaques, inoculated with ZIKV, and not treated. So far, two monkeys (AE62 and AB18) became pregnant and started the experiment. These animals were subcutaneous inoculated with ZIKV Espírito Santo strain at 24-26 (AE62) and 30-32 (AB18) gestational days (gd). Macaque AE62 belonged to the non-treated group 3, while AB18 was allocated in group 2, and started the treatment with sofosbuvir (PO. 15 mg/kg/day) at 2 dpi. Macaque's evaluation were performed daily, and biological samples were collected for laboratorial tests.

Results:

ZIKV RNA was detected in AE62 plasma (at 2, 4 and 8 dpi), urine (from 2 - 9 dpi, and at 12 dpi), and vaginal fluid (2, 4, 8 and 12 dpi) but could not be detect in saliva. Sonographic images obtained at 53-55 gd (29 dpi) revealed fetal

death from AE62 macaque. Euthanasia followed by necropsy were performed, and tissues from mother and fetus were collected. Viral RNA was detected in the placenta, uterus, spleen and bladder, as well as in the fetus. Regard to the treated monkey, AB18, viral RNA was detected in plasma (2 and 8 dpi), urine (4 and 6 dpi), and vaginal fluid (2 and 8 dpi). AB18 monkey stopped treatment at 30 dpi and monitoring will continue until birth (scheduled for 20-24 March). The fetus had no evidence of microcephaly or other abnormalities on ultrasound examination.

Conclusion:

At the end of the experiment, we will know if sofosbuvir can be safely used in pregnant monkeys, as experimental model for pregnant women. Results could elucidate whether the drug was able to reduce viremia, as well as to prevent microcephaly and other neurological damages.

Keywords: Zika virus; sofosbuvir; rhesus macaque

OTR.25 - Diagnóstico clínico e sorológico de pacientes com suspeita clínica de arboviroses (Dengue, Zika vírus e Chikungunya)

Raphael Rangel das Chagas^{1*}; Viviane Camara Maniero¹; Paulo Sergio Cerqueira Rangel¹; Clarisse Salgado Benvido da Silva¹; Renato Santana de Aguiar²; Viveca Giongo³; Sergian Vianna Cardozo¹.

1UNIGRANRIO;

2UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro;

3Fiocruz/CDTS.

Introdução:

Dentre os vírus que apresentam maior circulação atualmente no Brasil estão o dengue (DENV), o chikungunya (CHIKV) e Zika vírus (ZIKV). DEN e ZIKV pertencem a família *Flaviviridae* e CHIKV à família *Togaviridae*. Os sintomas relacionados com as arboviroses causadas por estes agentes são bastante semelhantes, o que acaba interferindo no diagnóstico clínico preciso dessas doenças.

Objetivo:

O objetivo do presente trabalho foi realizar o diagnóstico clínico sugestivo e sorológico de pacientes com suspeita de arboviroses atendidos na Unidade Pré-Hospitalar Álvaro dos S. S. Figueira, Duque de Caxias, RJ.

Metodologia:

A análise dos prontuários foi realizada entre os meses de julho e outubro de 2017, de acordo com os critérios clínicos estabelecidos pelo Ministério da Saúde. Para a realização do diagnóstico sorológico, as amostras foram submetidas à testes sorológicos que permitam identificar a presença de anticorpos IgM e IgG para ZIKV e DENV utilizando testes de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) específicos para IgM e IgG (XGEN, Biometrix).

Resultado:

Foram coletadas 27 amostras sanguíneas de pacientes com diagnóstico clínico de arboviroses (DENV, CHIKV e ZIKV). Destas amostras, 21 (77.7%) foram identificadas como DENV, 03 (11.1%) como ZIKV e 03 (11.1%) tiveram diagnóstico clínico de CHIKV. Quanto aos sintomas apresentados pelos pacientes, entre os 21 casos suspeitos de DENV, a mialgia (14/21; 66.6%), artralgia leve

(11/21; 52.4%) e cefaleia (13/21; 61.9%) foram os mais observados. O exantema (3/3; 100%) e o prurido (3/3; 100%) foram observados apenas nos pacientes suspeitos de ZIKV, que apresentaram ainda conjuntivite (1/3; 33.3%). Assim como a artralgia acentuada (3/3; 100%) foi identificada somente nos casos suspeitos de CHIKV. Do total de 27 amostras com suspeita clínica de arboviroses, 18 foram analisadas através do teste sorológico para detecção de IgM e IgG para DENV e ZIKV. De acordo com os critérios sorológicos de detecção viral, 5/18 (27.7%) foram consideradas amostras negativas para DENV e ZIKV, e 1/18 (5.5%) foi dada como indeterminada. Devido à semelhança genética já conhecida entre o ZIKV com outros vírus da família *Flaviviridae*, possivelmente foram observadas reações cruzadas com DENV nas amostras do presente estudo. Isto porque 5/12 (41.7%) amostras que foram positivas para IgM e IgG de DENV apresentaram sororeatividade (IgG) também para ZIKV e outras 3/12 (25.0%) foram IgG positivas tanto para DENV quanto para ZIKV. Apenas 4/12 (33.3%) amostras apresentaram somente sororeatividade (IgG) para DENV. Tais resultados referentes à sororeatividade de IgM determinam uma identificação presuntiva para o DENV (5/18; 27.7%). As amostras positivas e/ou indeterminada não foram definitivas para o diagnóstico da infecção pelos Flavivírus estudados.

Conclusão:

Com os resultados expostos vemos que o diagnóstico clínico epidemiológico muitas vezes pode ser errôneo pela semelhança na sintomatologia das arboviroses, fazendo-se necessário o diagnóstico laboratorial.

Palavras-chave: arboviroses, diagnostico clínico; sorológico

OTR.26 - Screening of monogenic obesity gene *MC4R* in Brazilian patients with morbid obesity

Ana Carolina Proença da Fonseca^{1*}; Verônica Marques Zembrzuski¹; João Regis Ivar Carneiro²; Giselda Maria Kalil de Cabello¹; Pedro Hernan Cabello¹.

¹Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz;

²UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Introduction:

Obesity is defined as an increased in body fat mass (Body mass index, BMI \geq 30 kg/m²) that may impair health. The etiology of obesity is multifactorial, caused by an interaction of environmental factor with many genes variants of minor effect; however, rare monogenic forms were identified in human, which are caused by mutations with major effect in a single gene. Among the monogenic type of non-syndromic obesity, mutations in melanocortin-4 receptor gene (*MC4R*) are considered the most common cause of this disorder (OMIM^{*}155541). Therefore, the aim of this study was to determine the prevalence of *MC4R* mutations in a cohort of morbidly obese adults.

Objective:

The aim of this study was to determine the prevalence of *MC4R* mutations in a cohort of morbidly obese adults.

Methodology:

This study comprised 158 unrelated adult participants. The inclusion criteria were patients with morbid obesity (BMI \geq 40.0) and the onset of obesity during childhood (0-11 years) or adolescence (12–21 years). The exclusion criteria were pregnancy, lactation, the use of medication to lose or gain weight, and the presence of monogenic obesity syndromes. Genomic DNA was extracted from peripheral blood for each participant and the coding region of *MC4R* was performed by direct sequencing.

Results:

Six rare *MC4R* variants were detected in this study in which two were novel. All individuals were heterozygous for these mutations. Four previously described *MC4R* mutations (Ser36Trp, Val193Ile, Ile98I= and Phe202Leu) were identified in 14 individuals. Additionally, two novel mutations were identified in

patients with early-onset obesity. One of them was a variation which disrupts the initiation codon ATG (Met1?) and the other was a missense mutation (Ala27Gly). Potential impact of rare variants was interpreted according to current standards and guidelines or *in silico* softwares. Our results showed the start lost variant was classified as pathogenic and the others as benign.

Conclusion:

This study showed that *MC4R* variants were identified in morbidly obese participants. Our results suggested the first Brazilian patient with monogenic obesity caused by *MC4R* deficiency; however, additional functional testing of the start lost mutation is required to confirm the findings.

Keywords: Monogenic Obesity; *MC4R*; Mutations

OTR.27 - Screening for rearrangements in *RB1* / 13q14 through real-time PCR

Renata Mendes de Freitas^{1*}.

¹Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz.

Introduction:

Patients with deletion of chromosomal region 13q that includes the *RB1* gene show retinoblastoma (RB) and variable clinical features. About 5-15% of the patients with RB are heterozygous for a gross deletion that includes the whole or substantial parts of *RB1* gene.

We have designed a method based in real-time PCR for search of deletions / duplications of *RB1* gene. The specificity, sensitivity and clinical utility of the assay were demonstrated in detecting allele-specific copy number variation, and can be useful for analysis relative copy number.

Objective:

We have selected, in addition to the *RB1* gene, two other genes (*SUCLA2* and *MED4*) that are adjacently located to *RB1* in chromosomal region 13q14.2.

Methodology:

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples. The amplified segments were analyzed by relative quantification, relative copy number method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Each plate contained an internal control (*ALB* gene) and a trisomic sample. The CT's (cycle threshold) values obtained were used to calculate the relative copy number of each sample. All reactions were performed with Sybr Green (Invitrogen®). The $\Delta\Delta Ct$ and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of each sample were estimated.

Five samples of retinoblastoma patients with partial or total *RB1* deletion detected by MLPA were used for validation. All samples were validated by real-time quantitative PCR.

Results:

Nine retinoblastoma patients carried complete deletion of *RB1* gene were identified by the MLPA technique, among 66 retinoblastoma patients tested. These deletions comprise about 10.61% of the mutations identified in retinoblastoma.

Conclusion:

Thus, the relative quantification real-time PCR technique to investigate deletions in the *RB1* gene becomes advantageous.

Keywords: retinoblastoma; Real time PCR; 13q14

OTR.28 - Targeted Next Generation Sequencing for *CFTR* gene analysis in a Brazilian cohort of cystic fibrosis patients

Amanda Cambraia Alves Coelho^{1*}; Mário Campos Junior¹; Verônica Marques Zembrzuski¹; Pedro Hernan Acero Cabello¹; Giselda Maria Kalil de Cabello¹.

¹Fiocruz/IOC.

Introduction:

Cystic Fibrosis (CF) is an autosomal recessive disease, recognized as one of the most prevalent in Caucasoid populations. CF occurs due to mutations in the *CFTR* gene, located on chromosome 7q-31.2. This gene encodes the *CFTR* protein, a transmembrane channel responsible for the flow of chlorine, sodium and water. Patients with CF have mutations that affect normal function or cause the absence of this protein. To date, more than 2000 sequence variations have been described in the *CFTR* gene. The characterization of these mutations leads to the diagnosis and a possibility of a specific treatment for each patient from personalized therapies.

Objective:

The aim of this study was to perform the complete screening of the *CFTR* gene through next generation sequencing to increase the knowledge about the mutations that circulate in the population of Rio de Janeiro and to define a panel for the diagnosis of the disease.

Methodology:

The screening of mutations was performed throughout the entire length of the *CFTR* gene, including coding and no coding regions. We have used the Illumina Next Generation Sequencing (NGS) platform. For library preparation and sample enrichment we used the TruSeq® method with a custom panel of 990 amplicons designed by Illumina DesignStudio. Ninety-three individuals were divided into two groups according to the results previously observed in a routine screening of 30 known *CFTR* variants. Fifty patients had one mutated allele previously identified and 43 patients had no mutation observed. All 93 patients were then analysed by NGS.

Results:

A total of 93 patients were analyzed, and 38 mutations were identified, one of which was never described. Forty-seven patients had their diagnosis completed, one of whom was part of the group with no allele defined before the NGS. To date, forty-nine different pathogenic genetic variations define the panel of mutations of our laboratory.

Methodology:

Through the study of the *CFTR* gene by the NGS, we were able to increase the knowledge of the mutations that circulate in the population of Rio de Janeiro. In addition, the NGS also enabled the increase of the panel of mutations investigated by our laboratory, expanding the detection rate to 69% in this specific population.

Keywords: Cystic Fibrosis; *CFTR*; NGS

OTR.33 - Avaliação do método de floculação para recuperação viral de lixiviado de aterro sanitário

Natália Maria Lanzarini^{1*}; Camille Ferreira Mannarino¹; Jaime Lopes da Mota Oliveira¹; Daniele Maia Bila²; Josino Costa Moreira¹; Marize Pereira Miagostovich³.

¹Fiocruz/ENSP;

²UERJ - Universidade Estadual do Rio de Janeiro;

³Fiocruz/IOC.

Introdução:

O lixiviado de aterro de resíduos sólidos é um líquido escuro, de composição altamente variável, com características recalcitrantes que dificultam o tratamento biológico convencional e podem ser uma importante fonte de contaminação de águas subterrâneas e superficiais.

Objetivo:

Este estudo tem como objetivo avaliar o método da concentração viral com base na floculação por leite desnatado associada a diferentes métodos de extração de DNA/RNA para recuperação viral dessa matriz. Portanto, o adenovírus humano (HAdV), um indicador comum da contaminação fecal humana e o bacteriófago PP7, um controle interno, foram utilizados para avaliar a eficiência da recuperação viral.

Metodologia:

O lixiviado de um aterro sanitário localizado no Estado do Rio de Janeiro foi coletado em junho de 2017 e caracterizado por parâmetros físico-químicos como pH, cor, turbidez, alcalinidade, condutividade, cloreto, DQO, DQO, sólidos, amônia e fosfato. O método de floculação por leite desnatado foi realizado de acordo com o protocolo anteriormente descrito para amostras de esgoto. As inoculações foram realizadas inoculando-se 100 µL de HAdV (10^7 cg/mL) e 100 µL de PP7 (10^8 cg/mL). O controle negativo também foi processado. O DNA/RNA viral foi extraído utilizando-se cinco abordagens diferentes: (1) extração manual por tiocianato de guanidina/sílica; (2) *QIAamp viral RNA mini kit*[®] (Qiagen, EUA); (3) *QIACube* usando *QIAamp QIACube mini kit*[®] (Qiagen, EUA); (4) *QIAamp DNA Stool mini kit*[®] (Qiagen, EUA) e (5) extração de DNA

por *TRIZol* (Invitrogen[®], EUA). O cDNA foi sintetizado utilizando-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para detecção de PP7. O qPCR foi realizado pelo sistema *TaqMan*[®] (ABI PRISM 7500, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando-se *primers* e sondas específicas para HAdV e PP7 com a curva padrão.

Resultado:

A taxa de recuperação de PP7 foi obtida com sucesso para todos os métodos de extração, com exceção do *TRIZol*, com eficiência variando de 2,5% a 91,33%. Apenas dois métodos foram capazes de extrair o DNA de HAdV, com uma eficiência variando de 0,26% a 1,14%, na extração automatizada com o kit *QIACube* e no *DNA Stool mini kit*[®], respectivamente.

Conclusão:

Os resultados preliminares mostram que a extração com o *QIACube* e o *QIAamp DNA Stool mini kit* foram as melhores abordagens para recuperação de HAdV e PP7, embora mais experimentos serão realizados para validar esses protocolos. Apoio Financeiro: ENSP / FIOCRUZ. Este trabalho de pesquisa está dentro do escopo das atividades da FIOCRUZ como centro colaborador da Saúde Pública e Ambiental da OPAS / OMS.

Palavras-chave: virologia ambiental; lixiviado; aterro sanitário

Índice

A

Ada da Silva Matos 26
 Adelmo Daumas 130
 Adelmo H D Gabriel 160
 Adriana Erler Vaccari 110
 Alejandro Marcel Hasslocher-Moreno 92
 Alessandra Alves Abalo 76, 80
 Alexander da Silva Neves 32
 Alice Sampaio Barreto da Rocha 48
 Aline Carvalho de Azevedo 20, 40
 Aline da Rocha Matos 150
 Aline de Almeida Oliveira 52, 62
 Aline Louzada Santos 108
 Aline Matos 164
 Aline Rodrigues Bernardo 72
 Aline Santos 54, 58
 Aloysio Moreira Junior 104
 Álvaro Luiz Bertho 38
 Amanda Cambraia Alves Coelho 178
 Amanda de Oliveira Lopes 152
 Amanda Torrentes de Carvalho 84
 Ana Andrade 158
 Ana Beatriz Teixeira Frederico 52
 Ana Carolina dos Reis Albuquerque Cajaraville 144, 146
 Ana Carolina Proença da Fonseca 174
 Ana Cláudia Machado Duarte 114, 146
 Ana Cristina Almeida Nogueira 46
 Ana Cristina Fonseca Melo 38
 Ana Luiza Pavão 24
 Ana Paula Corrêa Argondizzo 68, 76, 80
 Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef 136
 Ana Paula Dinis Ano Bom 48, 62
 Ana Paula dos Santos 38
 Anderson Vicente de Paula 152
 André Costa Ferreira 58
 André Queiroz da Silveira 114

Andressa Guimarães de Souza Pinto 134
 Anna Erika Vieira de Araújo 62, 136
 Antonio de Padua Risolia Barbosa 32
 Antonio Di Stefano 160
 Antonio G P Ferreira 70, 88
 Ariane de J. Sousa-Batista 138
 Arthur Stuart 134
 Arturo Reyes-Sandoval 26

B

Barbara de Oliveira Baptista 26
 Barbara Monte Mor 160
 Bárbara Peixoto 162
 Bárbara Vieira do Lago 156
 Bartira Rossi-Bergmann 138
 Beatriz Chaves 60
 Beatriz de Castro Fialho 96
 Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio 48
 Benjamin Meyer 74
 Bernardina Penarrieta Morales 134
 Braulia Caetano 154, 164
 Bruno Carneiro 156
 Bruno Jorge Duque da Silva 136
 Bruno Lima Vieira 120
 Bruno Pimenta Setatino 144, 148

C

Caio Bidueira Denani 30
 Camila da Silva Faria 28
 Camilla Bayma Fernandes 56
 Carina Duim Gonçalves 94
 Carla Cristina Velasco do Nascimento Freixo 118
 Carlos de Souza Almeida 112
 Carlos Eduardo Bonacossa de Almeida 86
 Carlos José de Lima Barbosa Filho 134
 Carlos Otávio Alves Vianna 52
 Carmen Priscila de Andrade Alves 92
 Carolina Campos Mendes Arêas 110, 118, 120
 Carolina de Almeida Lindenberg 56
 Carolina Lessa Aquino 60

Celina Vieira da Cunha Guedes Alvarenga 110
 Celso de Farias Crespo 158
 Cesar Lopez Camacho 26
 Chayana Leocádio da Silva 94
 Christian Drosten 74
 Christiane de Fátima Silva Marques 124
 Christiane Teixeira Pinto 72
 Cintia Elisabeth Gomez Limia 160
 Cintia Helena M. Souza 110
 Cíntia I. M. Silva Philipon 138
 Clarisse Salgado Benvido da Silva 172
 Claudinei de Souza Guimarães 106
 Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro 26
 Cliomar Santos 154
 Cristiana Couto Garcia 150
 Cristiana Melo Couto 114
 Cristiana Solza 130, 160
 Cristiane Pinheiro Pestana 140
 Cristina Garcia 164
 Cristina Shaik de Oliveira 72

D

Dalziza de Almeida 142
 Daniela de Souza Ferreira 92
 Daniele Bilac 78
 Darcy Akemi Hokama 32
 David Brown 154, 164
 Deborah Araujo 22
 Denise Cristina de Souza Matos 56
 Denise S. G. Pereira 38
 Denise Torres da Silva 134
 Dhammika Gunasekera 70
 Diana Praia Borges Freire 78, 100
 Dilson Silva 68, 80

E

Edimilson Domingos da Silva 70, 72
 Edmilson Domingos da Silva 88
 Elba Regina Sampaio Lemos 50
 Elezer Monte Blanco Lemes 32

Eliane Couceiro 70
 Eliane Matos dos Santos 22, 24
 Elisabeth Lampe 156
 Emily Hime Miranda 30, 84
 Eneida Almeida Santos 52
 Érica Guerino dos Reis 134
 Erika Martins Carvalho 34
 Esteban Braggio 130
 Etel Rodrigues Pereira Gimba 150
 Ethel Valdez 80

F

Fabiano Ferreira Matias Neto 112
 Fabiano Thompson 54
 Fabio Carlos do Nascimento Lage 120
 Fausto Ferraris 46
 Felipe Betoni Saraiva 140
 Felipe Figueiredo 116
 Felipe Mendes de Luca 114
 Felipe Rodrigues da Silva 28
 Felipe Rodrigues Semcovici Ramos 72
 Felipe Soares Figueiredo 30, 144
 Fernanda Otaviano Martins 38
 Fernando de Paiva Conte 50, 66
 Fernando Motta 164
 Flávia de Paiva Silva 28, 38
 Francisco Campello do Amaral Mello 156
 Francisco José Aragão 156
 Frank Eduardo de Moraes Rego Fairbairn Coelho 118

G

Gabriel Castro Ribeiro Ferreira e Silva 112
 Gabriel Menezes Costa dos Santos 88
 Geovana Pereira 152
 Gisela Freitas Trindade 170
 Giselda Maria Kalil de Cabello 174, 178
 Gisele Cotias Netto Penco 118, 120
 Guilherme dos Santos Mulé 108
 Guillermo Marini 158
 Gustavo Fioravanti Vieira 166

H

Haroldo Cid da Silva Junior 62
 Heitor Mansur Caulliraux 132
 Helvécio Vinícius Antunes 48
 Henrique Francisco Rocha 68, 76, 80
 Hilton Jorge Nascimento 18, 66, 158
 Hugo G. T. Defendi 98

I

Iaralice Medeiros de Souza 28
 Idevaldo Inácio Ferreira 148
 Ilana Zalcborg Renault 130, 160
 Ingo Riederer 60
 Ingrid Siciliano Horbach 30
 Isabela Ferreira Soares 26
 Isabella Maluf 158
 Isabelle Alves 22
 Isabelle Plo 160
 Isabelle Soares Alves 102
 Ivano de Filippis 20, 40
 Ivna Alana da Silveira 28, 38, 42
 Izabel Azevedo de Lemos 42
 Izabella Buty da Silva Corrêa 18

J

Jackline Ayres 130
 Jacques Sochaczewski 92
 Jaline Coutinho Silvério 110
 Janaína Duque de Souza 120
 Janaina Reis Xavier 102
 Jane da Silva 56
 Javan Esfandiari 70
 Jéssica Goulart Garcia 118
 Jéssica Moraes 54, 58
 Jéssica Santa Cruz de Carvalho Martins 150
 João Hermínio Martins da Silva 60
 João Regis Ivar Carneiro 174
 Jonathan Lopes 154, 164
 Jose Cerbino 22

José Henrique Rezende Linhares 144, 146, 148
 José Procópio Moreno Senna 86, 136, 140
 Josué da Costa Lima Junior 26
 Julia Badaró Mendonça 168
 Juliana Bezerra de Souza 96
 Juliana Gil Melgaço 170

K

Karen Trinta 70
 Karine Venegas Macieira 142
 Katty Gyselle de Holanda e Silva 48
 Keila Gisele Azevedo Figueiredo dos Santos 72
 Kelly Araújo Lúcio 148

L

Laís Nascimento Alves 68, 76, 80, 86
 Leandro Barrio Napoleão 136, 140
 Leonardo Chicaybam 128, 162
 Lidilhone Hamerski 54
 Liliane Monteiro de Moraes 68, 76, 80
 Lilian Rose Pratt Riccio 26
 Livia Deris Prado 48
 Lucas Ribeiro Teixeira 152
 Luciana Barros Carvalho 162
 Luciana Carvalho Barros 130
 Luciana Neves Tubarão 56
 Luciana Rodrigues Carvalho Barros 166
 Luciane Almeida Amado Leon 88
 Luis Felipe Ribeiro Pinto 166
 Luiza Abdo 162
 Luiz Camacho 22
 Luiz Eduardo Furtado Justiniano 136

M

Madalena de Jesus Vieira 110
 Magali Christe Cammarota 106
 Marcelino José Jorge 92
 Marcelo Allemand Mancebo 120
 Marcelo Alves Pinto 170

Márcia Arissawa 104, 158
 Marcia Christina Vasconcelos Archer da Motta 170
 Márcio Junger Amadeu Vidaurre 112
 Marco Alberto Medeiros 60
 Marco Antônio Pretti 128, 130
 Marcus Vinícius de Araújo Fonseca 124
 Maria Beatriz Borges 114, 116
 Maria Carmem Bandeira de Mello1 148
 Maria Cecília Galacho Quaresma de Oliveira 118
 Maria da Glória Martins Teixeira 52
 Maria de Lourdes de Sousa Maia 22, 24, 102
 Maria de Lourdes Moura Leal 28, 38, 42
 Maria Denise Neves Borges 34
 Mariana Boroni 130
 Mariana Caldas Waghabi 168
 Mariana P. Borges 100
 Marilda Siqueira 22, 24, 54, 58, 150, 154, 164
 Marília Vaz Belart 110, 132
 Marilza Batista Corrêa 28, 42
 Mário Campos Junior 178
 Marisa Cristina 24
 Marisol Simões 30, 34
 Mariza Xavier 22
 Marta Cristina de Oliveira Souza 146, 148
 Marta de Almeida Santiago 38
 Marta de Souza Albernaz 138
 Martín Hernán Bonamino 52, 128, 130, 160, 162, 166
 Matheus Fernandes Guimarães de Oliveira 120
 Mayra Carneiro 162
 Michael Bernardes Ramos 62
 Michele Cristina Peixoto da Silva 114
 Michel Vergne Sucupira 88
 Milene Dias Miranda 58
 Milene Miranda 54, 164
 Milton Neto da Silva 28
 Mônica da Silva Nogueira 136
 Monick Lindenmeyer Guimarães 142
 Monique C. de M. Stávale 98

N

Nara Mazarakis Rubim 72
 Natália Spitz Toledo Dias 152
 Nathalia dos Santos Alves 30
 Nathália Vinagre 46
 Nathércia Elena Chança Franco 40
 Nayhanne Tizzo de Paula 156
 Nicolas Carels 168
 Nicole de Miranda Scherer 130, 166
 Noemi Rovaris Gardinali 170

P

Paola Cristina Resende 154, 164
 Patrícia Barbosa Jurgilas 18
 Patrícia Brasil 146
 Patrícia Cristina da Costa Neves 50, 56, 62
 Patricia Jurgilas 158
 Patrícia Santos Cavalheiro Silva 92
 Paulo Martins Garchet Junior 114
 Paulo Renato Rivas Totino 26
 Paulo Salomon 54
 Paulo Sergio Cerqueira Rangel 172
 Paulo Thiago dos Santos 166
 Pedro Hernan Acero Cabello 174, 178
 Pedro Paulo de Abreu Manso 84
 Pedro Ribeiro 70
 Pedro S. R. Simonini 74
 Poliana Vita Schettini 118, 120
 Priscila Born 164
 Priscila Rafaela Ribeiro 128

R

Rafaela Reis 160
 Rafael Macedo 70
 Ralph Santos-Oliveira 138
 Raphael Rangel das Chagas 172
 Raul Gonçalves Severo 106
 Rayane de Oliveira Guerra Marques 18
 Reinaldo Martins 24

Renata Carvalho de Oliveira 50
Renata Carvalho Pereira 30
Renata Chagas Bastos 18, 28, 42
Renata Mendes de Freitas 176
Renato Ferreira Dib 114
Renato Santana de Aguiar 172
Ricardo Cristiano Brum 22, 100, 114
Ricardo da Costa Lopes 118
Robson Cruz 24
Robson de Queiroz Monteiro 56
Rodrigo Borges de Oliveira 34
Rodrigo Muller 66
Rodrigo Nunes Rodrigues da Silva 26, 50, 66
Rosa Cavalcanti 154

S

Sarah Beatriz Salamene Salvador 170
Sergian Vianna Cardozo 172
Sérgio Assumpção 158
Sheila B. Matsuoka 98
Sheila Coelho 166
Sheila Maria Barbosa de Lima 30, 34, 68, 84, 116, 144, 146, 148, 170
Sotiris Missailidis 68, 76, 80, 86
Stephanie Almeida da Silva 84, 146
Stevens Rehen 160
Suyene Rocha Pinto 138

T

Tamiris Azamor da Costa Barros 56
Tania Regina Tozetto Mendoza 152
Tatiana Jorge Fernandes 102
Tatiana Martins Tilli 48, 168
Tatiana Noronha 22, 24
Tatiana Sanjuan Ganem Waetge 102
Tayane Miranda Silva de Castro 106
Thaize Quiroga 38
Thalita da Matta de Castro 102
Thamires de Oliveira Vieira 138
Thauane dos Santos Correia da Silva 54, 58
Thiago Moreno Lopes e Souza 58

V

Valdir Sérgio Ermida 92
Vanessa de Oliveira Santos 144, 146, 148
Vanessa de Paula 156
Vanessa Salete de Paula 88, 152
Verônica Calado 158
Verônica Marques Zembruski 174, 178
Victor de Oliveira Silva Ferreira 34
Victor Max Corman 74
Vinícius Cotta-de-Almeida 60
Vinícius da Motta de Mello 88
Vinicius Mattos de Mello 106
Vitor Hugo Luna Rocha de Almeida 56
Viveca Giongo 172
Viviane Camara Maniero 172
Volker Stadler 74

W

Waleska Dias Schwarcz 30, 114
Wania Renata dos Santos 110
William Rodrigues da Conceição Silva 28
Wilson Savino 60

Y

Ygara da Silva Mendes 30

Z

Zilton Farias Meira de Vasconcelos 84

