

**Eduardo Alfredo Adami**

**Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe  
pandêmica A(H7N9)**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação Interunidades em  
Biotecnologia USP / Instituto Butantan /  
IPT para obtenção do título de Mestre  
em Biotecnologia.**

**Área de concentração: Biotecnologia**

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Lee Ho**

**Versão original**

**São Paulo  
2017**

## RESUMO

ADAMI, E. A. **Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

No mês de março de 2013 foram reportados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) os primeiros casos de infecções humana pelo vírus Influenza aviário A(H7N9). Em maio de 2017 já haviam sido registrados 1439 casos. As infecções em humanos causadas por esse vírus são associadas a consideráveis níveis de mortalidade e morbidade. A vacinação é atualmente o meio mais efetivo para prevenir as infecções e as severas complicações na saúde humana causada pelo vírus da Gripe. Desenvolver e produzir vacinas contra a Gripe pandêmica é a estratégia principal para uma resposta contra a pandemia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). Este projeto produziu os bancos de vírus H7N9, um lote piloto e três lotes industriais em condições (BPF) dos monovalentes utilizados para a produção da vacina candidata contra a gripe pandêmica, A(H7N9). Esses lotes foram caracterizados, avaliados em relação aos padrões de qualidade e testados quanto à imunogenicidade em ensaios com camundongos.

**Palavras-chave:** A(H7N9). Pandemia. Vacina contra A(H7N9).

## ABSTRACT

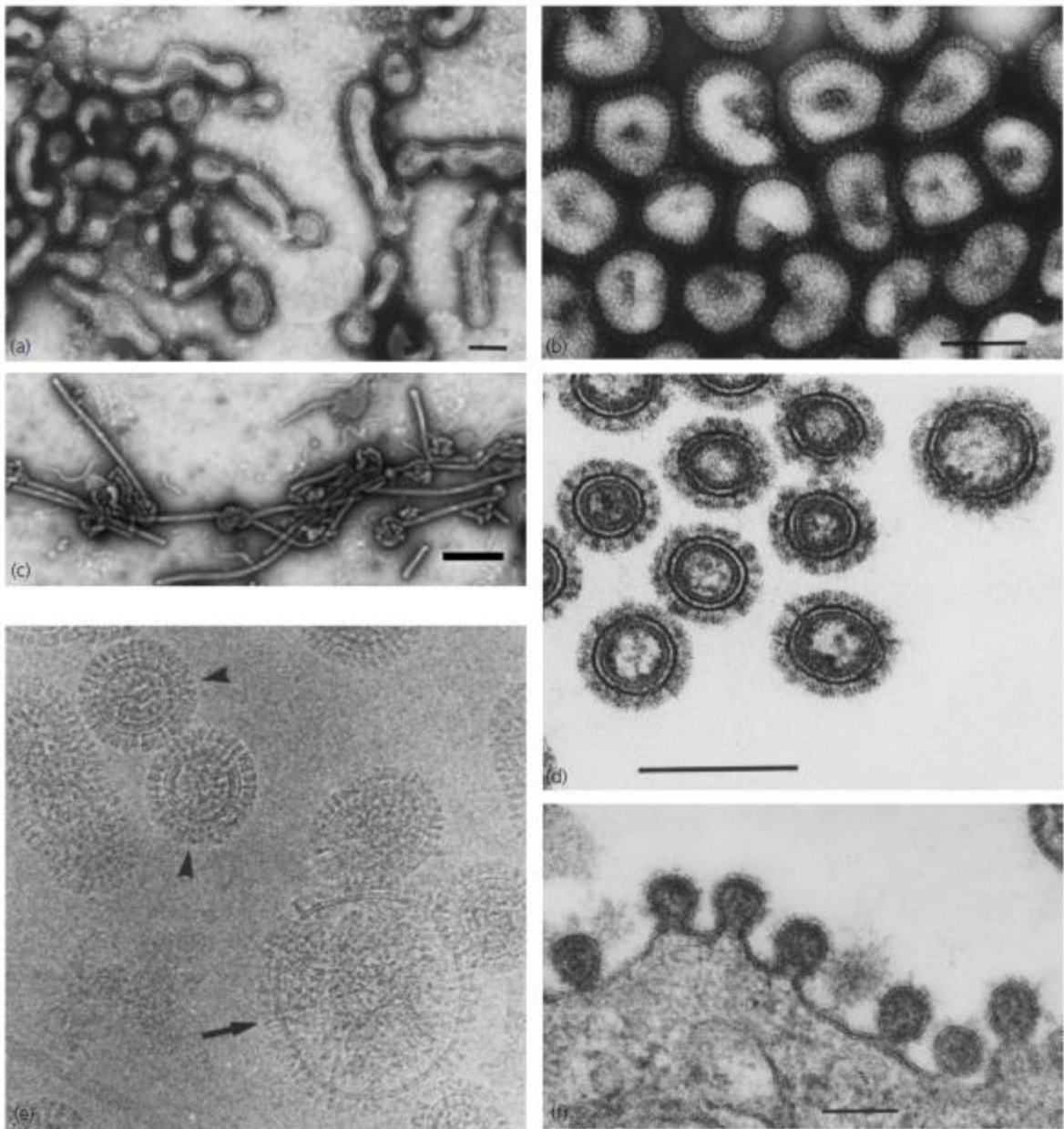
ADAMI, E. A. **Desenvolvimento da produção da vacina contra uma possível gripe pandêmica A(H7N9)**. 2017. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

In March 2013 it was reported by the World Health Organization (WHO) the first cases of human infections with avian influenza virus A (H7N9). In May 2017, 1439 cases have been reported. The infections in humans caused by this virus are associated with considerable morbidity and mortality levels. Vaccination is currently the most effective way to prevent infections and severe complications on human health caused by the flu virus. Developing and producing vaccines against pandemic influenza is the main strategy for a response to the pandemic (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2005). This project produce the seeds virus A(H7N9), a pilot batch and three industrial lots (GMP) of the monovalents used to produce the pandemic influenza vaccine candidate against A(H7N9). These batches were characterized, evaluated for quality standards and tested for immunogenicity in mouse assay.

**Keywords:** A (H7N9). Pandemic. Vaccine against H7N9.

## 1 INTRODUÇÃO

A gripe ou *influenza* é uma infecção viral que afeta principalmente as vias respiratórias, o nariz, a garganta, brônquios, e ocasionalmente os pulmões. Os sintomas geralmente duram cerca de uma semana, caracterizados pelo aparecimento súbito de febre alta, dores musculares, cefaleia, mal-estar, tosse, dor de garganta e rinites (WORLD HEALTH ORGANIZATION, (WHO) 2014a).



(a) Vírus filamentosos. (b) Vírus esférico (escala 100 nm). (c) Vírus filamentosos. (d) Vírus seccionado para captura da imagem interna. (e) Vírus em alta resolução de microscopia eletrônica. (f) Vírus brotando pela membrana celular.

Figura 1- Vírus da gripe visualizado por microscopia eletrônica

Fonte: Cox et al.(2009)

O vírus da gripe pode infectar homens e animais, pertence à família *Orthomyxoviridae*, composta por cinco gêneros, sendo os mais importantes o *Influenza vírus A*, *Influenza vírus B* e *Influenza vírus C*. Apresenta massa molecular aproximadamente de 250000 KDa e densidade em solução de sacarose na faixa de 1,19 g/cm<sup>3</sup>. São sensíveis ao calor, solventes lipídicos, detergentes não iônicos, formaldeído, irradiação e agentes oxidantes (COX et al., 2009).

Os genomas dos vírus do tipo A e B possuem oito segmentos que codificam pelo menos 11 proteínas, enquanto o genoma do tipo C possui sete segmentos que codificam nove proteínas (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

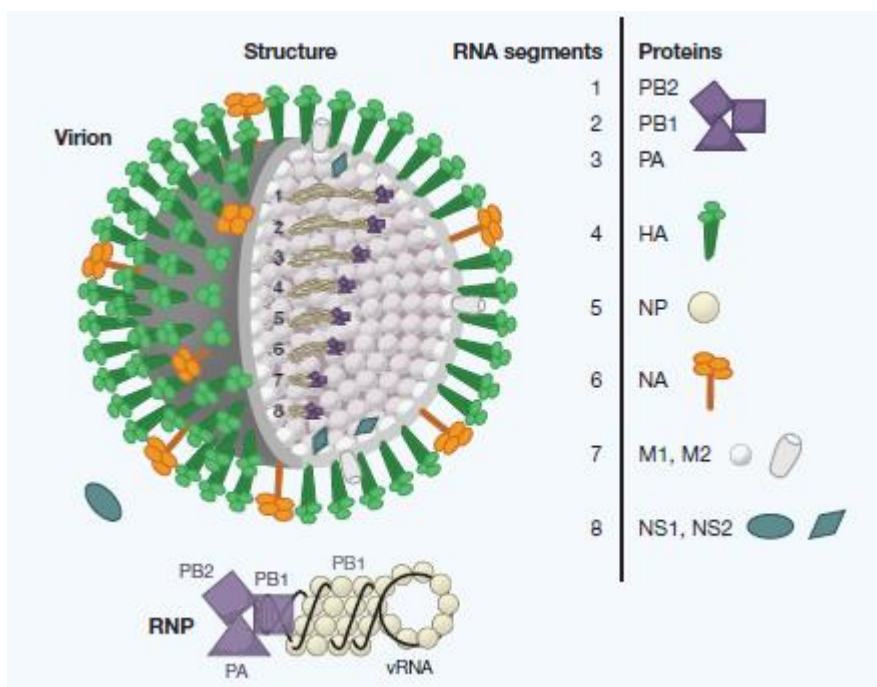


Figura 2 - O vírus da gripe e seus componentes  
 Fonte: Wendel; Matrosovich; Klenk (2015)

As partículas virais possuem de oito a nove proteínas estruturais diferentes, dependendo do gênero do vírus, dentre essas: Polimerase básica 2 (PB2) com massa molecular de 85,7 KDa (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009), Polimerase básica 1 (PB1), 86 KDa (LAMB; CHOPPIN, 1976), Polimerase ácida (PA), 85 KDa (FODOR et al., 2002), NP (Núcleo Proteína), 56 KDa. A NP é usada para distinguir os três gêneros: *Influenza A*, *B* e *C* (MARTINS, 2001). As proteínas M1, 27,8 KDa também são utilizadas para distinção dos três gêneros assim como a M2, 11 KDa, que participa da inserção das NP no núcleo da célula hospedeira (SCHROEDER et al., 1994), e as proteínas Proteína Não Estrutural 1 (NS1), 26,8 KDa, (HALE et al.,

2008), Proteína Não Estrutural 2 (NS2), 14,2 KDa (ROBB et al., 2009). A Hemaglutinina (HA) com 76 KDa que é muito estudada devido a sua importância na patogenicidade do vírus e para resposta imunológica no indivíduo (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009) e a Neuraminidase (NA) 50 KDa que é responsável pelo processo de clivagem de ácidos siálicos, impedindo que as partículas virais geradas no processo de infecção fiquem imobilizadas na superfície das células infectadas (MARTINS, 2001).

Tabela 1 - Organização do genoma do vírus da influenza

Número do segmento <sup>a</sup>	Tamanho RNA viral (nt)	Proteína codificada		Peso Molecular	Descrição e Função
		IA	IB		
1	2341	PB2	PB2	85.700	Componentes da polimerase viral
2	2341	PB1, PB1-F2	PB1	86.500	
3	2233	PA	PA	84.200	
4	1778	HA	HA	61.500	Glicoproteína de superfície, medeia a fixação do vírus às células; é ativado por clivagem, e possui atividade de fusão em pH ácido.
5	1565	NP	NP	56.100	Associada ao RNA viral e às polimerases. Estrutura helicoidal.
6	1413	NA	NA, NB	50.000	Enzima neuraminidase. Permite a expansão da infecção por facilitar o acesso da partícula viral à superfície das células alvo.
7	1027	M1	M1	27.800	Proteína da matriz, principal componente do vírion, reveste o lado interno do envoltório.
		M2	BM2	11.000	Proteína de membrana integral, canal de íons, de mRNA processado.
8 <sup>*c</sup>	890	NS1	NS1	26.800	Não estrutural, inibe a exportação nuclear de mRNA
		NS2 <sup>*b</sup>	NS2	14.200	Componente menor de vírions, função desconhecida.

\*a. Os segmentos de RNA são numerados de acordo com seus tamanhos decrescentes.

\*b. As massas moleculares das glicoproteínas HA e NA podem sofrer variações chegando a 76,000 e 56,000 KDA respectivamente.

Fonte: Adaptado de Brooks et al. (2013)

Atualmente já foram reconhecidos dezesseis tipos de HA e nove tipos de NA. A combinação dessas duas proteínas da superfície viral dá origem aos diferentes subtipos virais. Esses subtipos virais em sua maioria podem ser encontrados em seus hospedeiros naturais (reservatório): as aves terrestres e aquáticas. Esses vírus podem adaptar-se para infectar seres humanos (RESA-INFANTE, P. et al., 2011).

A análise de variantes virais possibilitou a identificação de cinco sítios antigênicos na região HA1 da hemaglutinina, denominados pelas letras A a E, que são passíveis de sofrer mutações, sendo, portanto, as regiões de maior variabilidade da HA. Esses sítios estão dispostos sobre a sua superfície e estão envolvidos na neutralização viral pelos anticorpos. Já outras regiões são mais conservadas em todos os vírus isolados, cuja sequência foi estabelecida, concluindo-se que são necessárias para que a molécula mantenha a sua estrutura e função (BROOKS et al. 2013; MARTINS, 2001; MURPHY; WEBSTER, 2001; WILEY; WILSON; SKEHEL, 1981) (Figura 3).



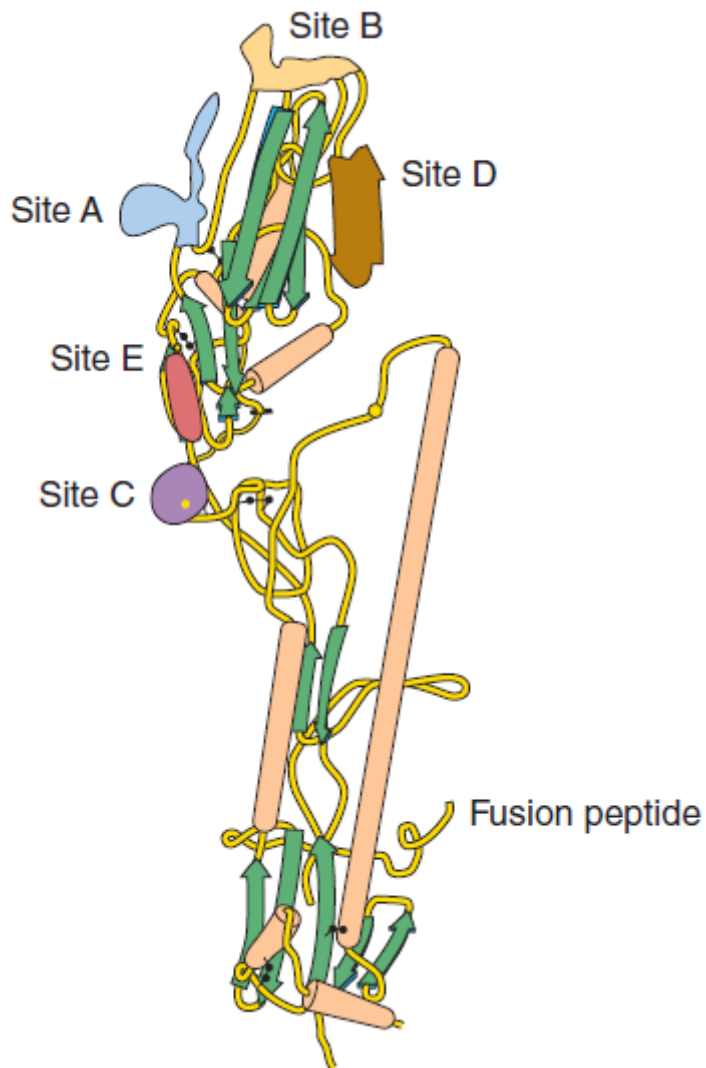


Figura 3 – Estrutura primária da hemaglutinina. A a E representam os cinco principais sítios antigênicos  
Fonte: Brooks et al. (2013)

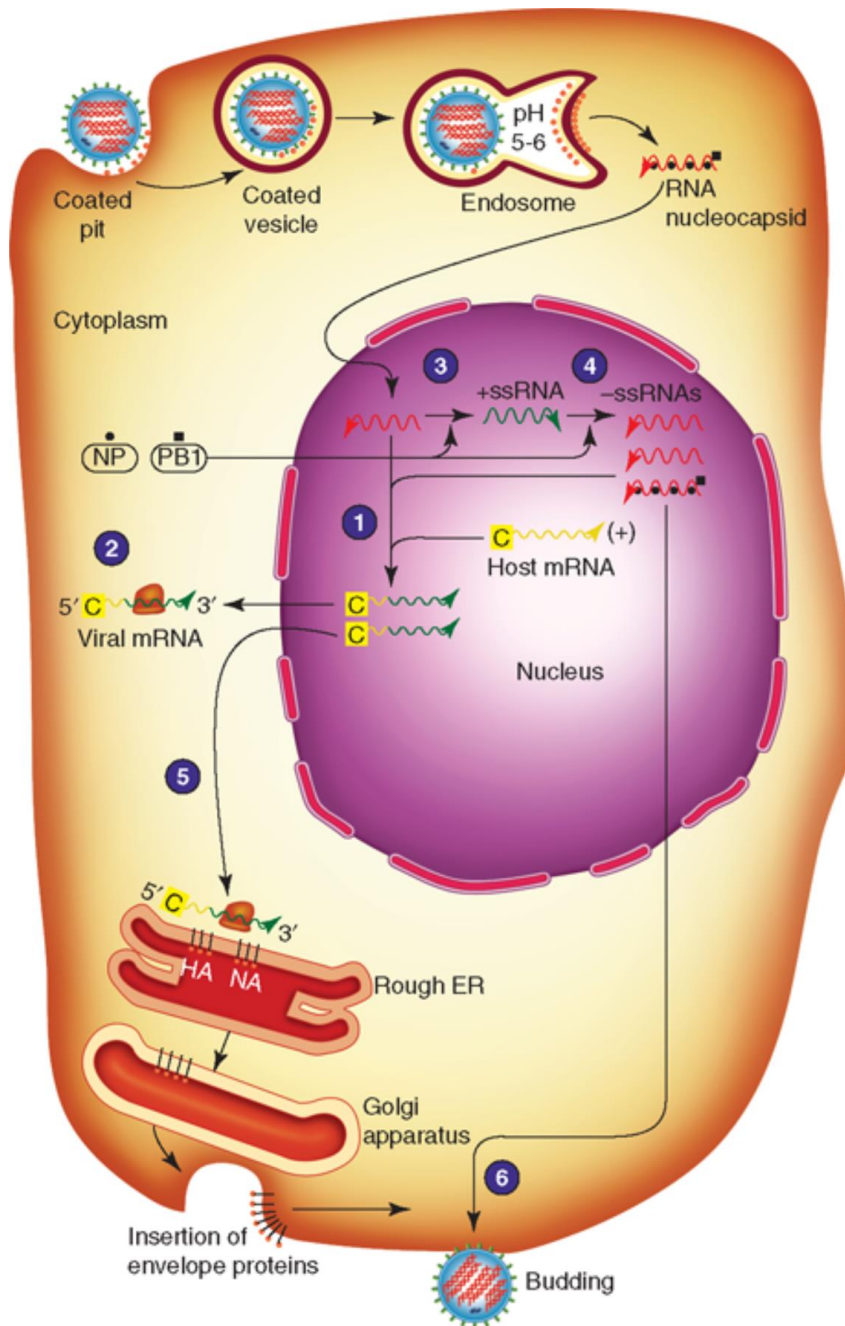
A hemaglutinina e a neuraminidase são proteínas imunogênicas (ZHOU et al., 2017), sendo a hemaglutinina o primeiro alvo da neutralização por anticorpos (FORLEO-NETO et al., 2003; PONTORIERO et al., 2003).

Os vírus da gripe são parasitas intracelulares obrigatórios e só podem se replicar em células vivas uma vez que utilizam todo o maquinário celular para realizar a replicação. Este é um processo que ocorre em várias etapas nas células dos hospedeiros: em primeiro lugar, o vírus precisa entrar na célula; em seguida, produzir cópias de ribonucleoproteínas (RNA) e proteínas, montar os

componentes das novas partículas virais e então sair da célula hospedeira (SMITH; HELENIUS, 2004).

O início do ciclo replicativo ocorre quando o vírus entra em contato e liga-se com a célula alvo através da afinidade da hemaglutinina com a mucoproteína (receptor) presente na superfície das células epiteliais, geralmente da mucosa nasal, garganta e pulmões, que possuem ácido siálico (SMITH; HELENIUS, 2004).

A ligação entre o vírus e a célula se dá devido à capacidade de a hemaglutinina viral reconhecer as moléculas de Ácido 5-N-acetilneuramínico (ácido siálico) presente na superfície celular. Após essa ligação, a partícula viral é internalizada na célula por meio da formação de endossomas. Ao ser formado o endossoma começa um processo natural de acidificação (pH~5,0). Essa alteração de pH provoca uma alteração na conformação da hemaglutinina, que rompe o envelope viral assim como a superfície da parede do endossoma, expondo no citoplasma celular as proteínas e ribonucleoproteínas virais (vRNA). A acidificação do meio também tem um papel fundamental na ruptura do complexo formado pela proteína M1 e os vRNA virais que são grandes demais para passar pelos poros do núcleo celular. A passagem dos ions H<sup>+</sup> para a parte interna do vírus é possibilitada pelo canal iônico presente no envelope viral, M2. Após expostos no citoplasma celular, os vRNA são importados para o núcleo celular, onde se inicia a replicação, formando as ribonucleoproteínas mensageiras (mRNA) (RNA mensageiro) que dependem da catálise de polimerases, e após essa formação é exportado do núcleo para o citoplasma e servirá de base para a síntese proteica nos retículos endoplasmáticos rugosos. Concomitante ao processo descrito, e também no núcleo celular, ocorre a formação das ribonucleoproteínas complementares (cRNAs) que formarão os novos vRNAs. Os vRNAs são exportados do núcleo para o citoplasma, onde ocorre a formação das novas partículas virais que se unem à membrana plasmática da célula, finalizando a formação do capsídeo viral e pela saída da célula (WHITTAKER, 2001).



(1) Após a ligação mediada por receptores entre o vírus e a célula, ocorre a endocitose da partícula viral e posterior exposição do RNA viral no citoplasma. A seguir, ocorre o rompimento do capsídeo viral e da membrana do endossoma pela hemaglutinina, o material genético viral é então internalizado no núcleo celular. (2) Proteínas necessárias para a transcrição do RNA são sintetizadas no citoplasma e internalizadas no núcleo, principalmente a NP e PB1. A PB1 é fundamental para a síntese de novas partículas de RNA (-ssRNA). (4) Parte dessas moléculas de RNA serve como modelo para a síntese de mais moléculas que mais tarde servirão para formação de partículas virais, e parte é transcrita como RNAm, que realiza a síntese de proteínas estruturais no retículo endoplasmático celular. (5) Tradução e inserção das proteínas virais na parede celular, estas que farão a formação de novas partículas virais. (6) Genoma viral sendo “empacotado” e a liberação das novas partículas virais.

Figura 4 - Diagrama esquemático do ciclo de replicação viral

Fonte: Brooks et al. (2013)

Por possuir RNA segmentado, o vírus da gripe é extremamente passível de sofrer mutações e gerar cepas com variações antigênicas que podem não apresentar nenhuma proteção por anticorpos gerados por cepas anteriores. Para esses casos somente quando estão envolvidas as sequências genéticas da HA e NA. Essas alterações podem ocorrer por duas vias, *drift* ou *shift*. A primeira delas, a alteração tipo *drift*, engloba alterações menores que podem levar um longo prazo para estabelecer mudanças capazes de alterar uma cepa, basicamente tratam de alterações acumuladas no código genético viral que podem ocorrer durante as replicações por erros nas sequências de aminoácidos nas formações das novas proteínas. Já as alterações tipo *shift* compreendem alterações maiores, que podem ocorrer quando há infecção conjunta de uma mesma célula por diferentes cepas virais. Nesses casos pode haver troca de vRNA entre espécies, gerando novas espécies com mistura dos oito segmentos. Esses casos normalmente ocorrem em um curto espaço de tempo e misturam cepas virais de humanos com cepas aviárias ou suínas (BROOKS et al., 2013).

Transmitido facilmente, o vírus pode passar de pessoa a pessoa por meio de aerossol, gotículas de saliva e secreções, produzidas por pessoas infectadas quando tosse ou espirram. A gripe tende a se espalhar rapidamente em epidemias sazonais (WHO, 2014a).

Em humanos o vírus da gripe sazonal normalmente tem seu ciclo de infecção na parte superior do sistema respiratório. Contudo, em humanos com doenças causadas por bactérias pode ocorrer a infecção do trato respiratório inferior, ocasionando, por exemplo, bronquite crônica ou enfisemas. Bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* e diversos bacilos gram negativos produzem proteases extracelulares e inflamações que podem potencializar a ação da HA, causando um agravamento da infecção no trato superior, podendo assim gerar infecções mais sérias, como a mortal pneumonia (WHITTAKER, 2001).

Salvo casos de epidemias nas quais o tempo de produção da vacina pode comprometer a imunização, a vacinação anual contra a gripe é o mais efetivo método para prevenção da doença. A vacinação com o tipo viral mais

atualizado definido pelos setores de vigilância é recomendada para todos os indivíduos maiores de 6 meses que não tenham contraindicação (FIORE et al., 2010).

Estudos de ordem econômica sobre a vacinação contra a gripe indicam que ela reduz ou minimiza os custos com tratamentos de saúde, como pronto atendimento e internações hospitalares, perdas de produtividade e morbidade dos indivíduos infectados (FIORE et al., 2010).

Foi estimado que o custo econômico anual da gripe sazonal nos Estados Unidos pode ser de US\$ 87,1 bilhões, incluindo US\$ 10,4 bilhões em custos médicos diretos. Estudos sobre a vacinação contra a gripe nos Estados Unidos, entre pessoas com idade  $\geq 65$  anos, têm estimado uma redução substancial em hospitalizações e mortes (FIORE et al., 2010). A maioria dos infectados recupera-se dentro de 1-2 semanas, sem a necessidade de tratamento médico (WHO, 2014a).

O vírus da gripe pode causar doença entre pessoas de todos os grupos etários, contudo, as taxas de infecções são maiores entre as crianças. Durante os meses de epidemias, os riscos de problemas com saúde mais agudos e mortes por gripe sazonal são mais elevados entre os adultos com idade  $\geq 65$  anos, crianças menores de 2 anos e pessoas de qualquer idade que estejam sob tratamento médico severo e que sofram complicações nas condições de saúde devido à gripe (FIORE et al., 2010).

Os casos de gripe estimados nos EUA são de 25 a 50 milhões por ano, gerando 150 mil casos de hospitalização e 30 a 40 mil mortes. Se essas estimativas fossem extrapoladas para o cenário mundial, os casos de gripe estariam na ordem de 1 bilhão de infectados, 3 a 5 milhões de casos severos que requerem hospitalizações e 300 a 400 mil casos de morte (WHO, 2014b).

Epidemias e surtos de gripe ocorrem com diferentes padrões sazonais, dependendo da região do mundo. Em zonas de clima temperado, as epidemias sazonais geralmente começam no final do outono e têm o pico no final do inverno. Nas zonas tropicais, os padrões sazonais parecem ser menos pronunciados (WHO, 2014b).

## **1.1 As pandemias causadas pelo vírus da gripe**

As principais pandemias do vírus da gripe do século XX ocorreram em 1918, 1957 e 1968. Os locais prováveis do aparecimento desses vírus foram, respectivamente, Espanha, alguns países da Ásia, principalmente Hong Kong. Os subtipos virais caracterizados nessa época foram: H1N1, H2N2 e H3N2 (KILBOURNE, 2006).

A grande pandemia de 1918, que ficou conhecida como Gripe Espanhola, causou aproximadamente 50 milhões de mortes pelo mundo todo, mas o impacto dessa pandemia não ficou limitado somente aos anos de 1918-1919. Todos os vírus do tipo A que acometem humanos (com exceção das infecções causadas pelos subtipos aviários H5N1 e H7N9) que causaram e causam doenças atualmente são descendentes do vírus H1N1 dessa época (TAUBENBERGER; MORENS, 2006).

As pandemias de 1957 e 1968 foram responsáveis por aproximadamente um milhão de mortes cada.

A mais recente epidemia ocorreu no ano 2009 com a cepa A/H1N1, que se espalhou por praticamente todo o mundo em poucas semanas. Em 11 de junho de 2009, a Organização Mundial de Saúde (OMS) elevou o nível de alerta pandêmico mundial para a fase 6 (última fase), caracterizando uma pandemia, com evidência de transmissão comunitária disseminada do vírus da gripe A/H1N1, novo subtipo viral em pelo menos dois continentes. Essa ação foi motivada pela rápida propagação do vírus e não pela gravidade da doença (DUARTE et al., 2009).

A sazonalidade de ocorrências de pandemias relacionadas ao vírus da gripe na nossa história demonstra que pandemias futuras são inevitáveis. Dessa forma, hoje há uma preocupação mundial sobre como poderemos responder a uma crise dessa magnitude. Uma forma de se preparar é poder prever qual cepa seria a causadora da pandemia, ganhando assim tempo para combater as infecções com a administração de vacina que necessariamente precisa ser preparada com o tipo específico de vírus.

A vacinação é atualmente o meio mais efetivo para prevenir as infecções e as severas complicações na saúde humana causadas pelo vírus da gripe.

Desenvolver e produzir vacinas contra a gripe pandêmica é a estratégia principal para uma resposta contra a pandemia (WHO, 2016b).

Dessa forma a OMS tem desenvolvido programas de vigilância sanitária mundiais para acompanhar a prevalência dos vírus da gripe. Relatórios dessas vigilâncias têm demonstrado que há cepas prevalentes em aves que têm infectado humanos com frequência, tornando-se potenciais cepas pandêmicas.

Em março de 2013, por exemplo, foram reportados pela OMS os primeiros casos de infecções humanas pelo vírus Influenza aviário A(H7N9). Em março de 2017 já haviam sido registrados 1307 casos e destes foram associados 489 casos fatais (WHO, 2014b).

Quatro picos de infecção por H7N9 foram reportados entre 2013 até setembro de 2016. Estudos mostraram que as características do vírus e sua epidemiologia não sofreram alterações significativas. Houve, inclusive, declínios na quantidade de casos durante esse período. Mas, a partir de setembro de 2016, observou-se, além de uma antecipação das infecções em humanos, um aumento no número de casos. Em 9 de Janeiro de 2017 já haviam sido reportados pela WHO 106 casos ocorridos somente em dezembro, número muito acima aos 4 períodos anteriores de vigilância similares (Figura 5).

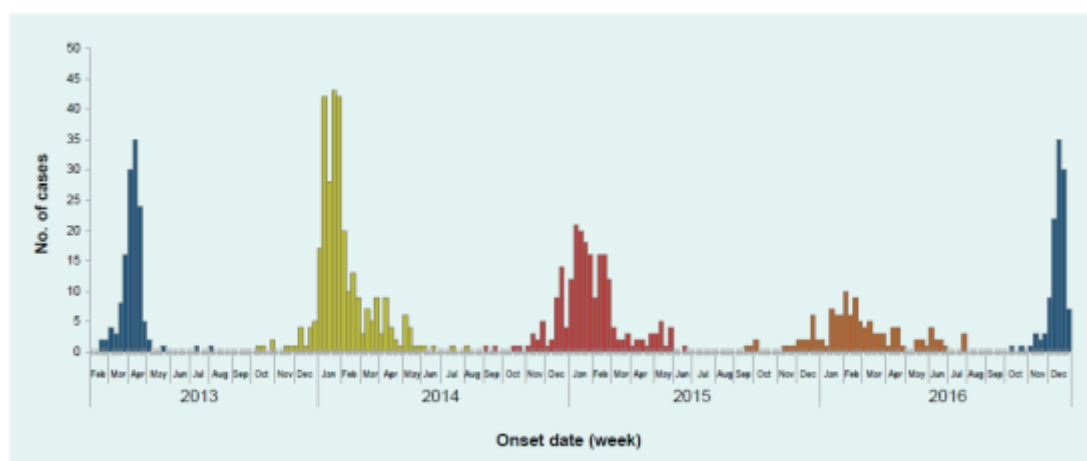


Figura 5 - Curva epidêmica de infecção em humanos pelo H7N9 na China  
Fonte: Zhou et al. (2017)

Esse aumento de casos verificado em dezembro de 2016 tem sido intensivamente investigado, mas estudos recentes não encontraram um fato que justifique por completo. Em relação à transmissão entre humanos não foram encontradas alterações significativas que suportem essa hipótese. Os casos de infecções em aves passam por uma vigilância menos eficiente, e tampouco foram encontradas alterações significativas. Uma hipótese é a de que o Ano Novo Chinês, que ocorreu próximo ao período relatado, possa ter aumentado o consumo de carne de aves, aumentando assim a exposição da população (WHO, 2016a).

As infecções em humanos causadas por esse vírus são associadas a consideráveis níveis de mortalidade e morbidade. Esse rápido aumento nos números de casos em um curto período de tempo alarmou os centros de vigilância sobre o potencial pandêmico do vírus A(H7N9). Atualmente não há registros de transmissão do vírus de humanos para humanos, mas, em contrapartida, a imunidade da população contra o vírus é considerada praticamente nula e o vírus demonstrou considerável habilidade em causar doença severa (TANNER; TOTH; GUNDLAPALLI, 2015).

A contínua prevalência do vírus H7N9 no meio ambiente, até o momento contido na China, mesmo que não comprovada a transmissão entre humanos, passou a ser considerada preocupante principalmente após os trabalhos de Herfst (2012). Esse estudo mostrou que a cepa de A/H5N1 de alta patogenicidade que gerou mortes devido à contaminação de humanos pelas aves, principalmente na China nos anos 2003 e 2004, em que ainda não foram diagnosticadas transmissões entre mamíferos, adaptou-se a essa função após algumas alterações genéticas causada por mutações na HA e PB2 das cepas virais após passagens em ferretes. Concluiu-se que a cepa A/H5N1 pode adaptar-se por meio de mutações e passar a ser transmitida entre mamíferos, o que causaria uma pandemia com uma cepa letal.

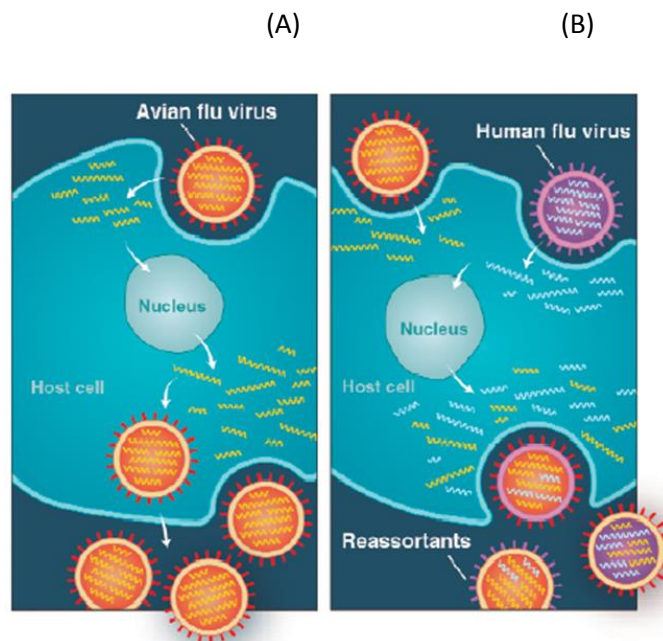
A adaptação que pode tornar um vírus aviário transmissível entre humanos está ligada principalmente ao início do ciclo de infecção viral com a interação da hemaglutinina do vírus da gripe com o ácido siálico celular; em função disso, essa interação tem sido intensivamente estudada.



A HA pode possuir sequências de aminoácidos que as deixam com conformações mais reativas a diferentes moléculas. No caso das infecções em aves, a HA da cepa viral aviária é mais susceptível a interagir com a molécula  $\alpha$ -2,3 galactose que se encontra ligada ao ácido siálico das células de aves (SHINYA et al., 2006).

Tem sido demonstrado que as cepas virais que acometem humanos possuem afinidade de interação com a molécula  $\alpha$ -2,6 galactose. Essa molécula está presente nas células do epitélio do trato respiratório superior, o que faz com que as cepas virais adaptadas dessa forma sejam transmitidas mais facilmente por gotículas de espirros ou contato. Porém, também é descrita a presença da molécula  $\alpha$ -2,3 galactose em células do trato respiratório humano inferior, traqueia e brônquios. Tal fato faz com que os humanos possam infectar-se tanto por cepas aviárias como por cepas humanas (VAN RIEL et al., 2006).

A ligação ao receptor celular humano parece ocorrer preferencialmente em unidades de ácido siálico (5-N-Acetil Neuramínico), enquanto que em porcos e cavalos, a ligação é mediada por unidades de N-Glicolil Neuramínico. Também foi descrito que a ligação aos ácidos siálicos terminais podem ocorrer em resíduos ligados a galactoses por ligação  $\alpha$ 2,6 ou  $\alpha$ 2,3 (SHINYA et al., 2006; VAN RIEL et al., 2006) e que essa especificidade está ligada ao aminoácido da posição 226 da proteína HA. Quando o aminoácido nessa posição é uma Leu, a HA tem uma especificidade para a ligação  $\alpha$ 2,6 (humanos), e quando é um Glu, a preferência é para a ligação  $\alpha$ 2,3 (aves e cavalos). Ácidos siálicos com ligação  $\alpha$ 2,6 e  $\alpha$ 2,3 estão presentes na traqueia de porcos, fazendo que este animal possa ser infectado tanto por linhagens humanas como aviárias da gripe (WHITTAKER, 2001). É importante também destacar que a co-infecção de distintos vírus em uma única célula hospedeira poderá gerar novas linhagens virais por mecanismo de combinação genética entre os diversos segmentos genômicos virais (*reassortants*), podendo levar à criação de uma cepa pandêmica em potencial (Figura 6).



- (A) Quando um único vírus da influenza infecta uma célula, os oito segmentos genômicos do vírus são replicados e transmitidos novamente para os novos vírus. (B) Quando dois vírus diferentes infectam a mesma célula, pode ocorrer a combinação dos oito segmentos de cada vírus, resultando na formação de novos vírus (reassortants).

Figura 6 – Demonstração da infecção viral única ou por dois vírus  
 Fonte: Baseado em Enserink (2004)

O vírus da gripe A(H7N9) estudado nesta dissertação tem circulado entre humanos e aves desde 2013, sendo até o momento considerado uma zoonose transmitida por aves. O vírus da gripe é extremamente mutante, e a constante exposição em humanos pode ocasionar uma alteração genética que torne a hemaglutinina mais suscetível a infecções no trato respiratório superior, ou seja, possibilitaria a interação com a  $\alpha$ -2,6 galactose, podendo assim ocasionar o início de uma pandemia.

## 1.2 Principais ações contra uma pandemia

A OMS estabelece um plano que classifica a sequência de fatos que podem ocorrer em uma pandemia. As fases são divididas em números de 1 a 6 que estabelecem níveis mais baixos, 1 e 2 quando são identificados vírus da gripe que prevalecem em animais (reservatórios naturais) e os primeiros casos

de infecções humanas. As fases 3 e 4 compreendem períodos nos quais já são verificados casos em que há humanos contaminados que conviveram com humanos que possuíam o vírus (*cluster*) até a comprovação de transmissão entre humanos. Para as fases 5 e 6 são feitas avaliações geográficas estabelecendo os limites de contágio entre países e, no caso mais severo, entre continentes (WHO, 2017).

As classificações dessas fases têm o principal intuito de estabelecer uma sequência de ações para o combate à pandemia, que irá exigir, além da vacinação, uma combinação de estratégias em métodos farmacêuticos e profiláticos. Dentre os principais meios profiláticos podemos destacar desde atitudes mais simples, como o hábito de lavar as mãos frequentemente, até a utilização de máscaras e uma mobilização social para o isolamento das pessoas, como, por exemplo, o fechamento de creches e escola, centros de saúde e outras situações que possam aglomerar as pessoas. Protocolos de isolamentos em quarentena também podem ser adotados. Dentre os métodos farmacêuticos, além da vacinação, podemos destacar o uso de antivirais. Em casos de epidemias existem duas classes de antivirais principais que podem ser utilizados como alternativa emergencial para o tratamento e/ou profilaxia das infecções causadas pelo vírus da gripe (SINGH; PANDEY; MITTAL, 2010).

A primeira classe de antivirais são inibidores dos canais formados pela proteína viral M2, como a amantadina (Symmetrel; EndoPharmaceuticals, Chads Ford, PA) e a rimantadina (Flumadine; Forest Pharmaceuticals, St Louis, MO), que só possuem efeito contra os vírus da gripe tipo A. Nos últimos anos, o vírus da gripe vem demonstrando uma resistência aos inibidores dos canais M2, com um aumento da taxa de resistência verificado em escala mundial de 1,9% para 12,3% (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, (CDC) 2010a). A segunda classe é formada por inibidores de Neuraminidase, oseltamivir (Tamiflu; Roche Laboratories, Nutley, NJ) e zanamivir (Relenza; GlaxoSmith-Kline, ResearchTriangle Park, NC), que possuem efeito sobre os *Influenza virus A e B* (OXFORD; LAMBKIN, 1998).

O tratamento antiviral ainda é considerado uma técnica cara quando utilizada em larga escala, além disso, apresenta restrições para crianças e mulheres grávidas por manifestar efeitos colaterais (CDC, 2010b). Entretanto,

em casos de epidemias provocadas por vírus emergentes, a manufatura e a distribuição das vacinas podem demorar de 6 a 8 meses, sendo mais eficaz, nesses casos, o uso dos antivirais para a contenção das epidemias (LONGINI JUNIOR et al., 2004).

As análises de novos vírus subtipos do H7N9 demonstraram alterações genéticas em sítios da Neuraminidase específicos para a ação dos antivirais demonstrando assim que esses subtipos virais possuem baixa sensibilidade ao medicamento (WHO, 2016a).

Considerando que a vacinação é atualmente o meio mais efetivo para prevenir as infecções e as severas complicações na saúde humana causadas pelo vírus da gripe, desenvolver e produzir rapidamente vacinas contra a gripe pandêmica é a estratégia principal para uma resposta contra a pandemia (WHO, 2016b).

### **1.3 História e evolução da vacina contra a gripe**

Pesquisas para o desenvolvimento da vacina contra gripe iniciaram-se desde o isolamento do vírus humano da gripe em 1933. Em 1945, a primeira licença para produção de vacina contra a gripe foi concedida nos Estados Unidos da América (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

As primeiras vacinas licenciadas utilizavam cepas de vírus cultivadas em ovos de galinha embrionados, que eram inativadas com formol. Eram purificadas e concentradas por meio da técnica de adsorção/eluição em eritrócitos. Essa técnica não possibilitava a expansão da escala de produção e outros métodos utilizados não apresentavam rendimento satisfatório (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

Novas técnicas de produção foram desenvolvidas, dentre elas, os métodos de clarificação do líquido alantoico colhido dos ovos embrionados que continham o vírus cultivado por centrifugação, e o método de purificação por meio de centrifugações zonais de fluxo contínuo em gradiente de sacarose, que possibilitaram o aumento da escala de produção e pureza das suspensões virais preparadas (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

As primeiras vacinas licenciadas que continham a suspensão viral inativada por formol foram chamadas de *inactivated whole-virus* e demonstravam uma boa tolerância entre adultos e idosos, mas provocavam reações em crianças e adolescentes. Devido a isso, foi licenciada a vacina chamada de *split-virus vaccines* em 1968 nos Estados Unidos da América. Nesse tipo de vacina, as partículas virais são rompidas pela ação de detergentes e a composição da vacina é formada por fragmentos do vírus, RNA, proteínas do núcleo viral e proteínas residuais dos ovos; essa vacina provoca uma satisfatória imunização com reduzidas reações adversas (ZUCKERMAN et al., 2009).

Durante a década de 1960, a vacina do tipo *live attenuated influenza vaccines*, que utiliza cepas virais atenuadas por meio da variação de temperaturas – *cold-adapted temperatura-sensitive (ca/ts)* - foi largamente utilizada na Rússia (CHURSOV et al., 2012).

Novas gerações de vacinas licenciadas, produzidas a partir da cultura do vírus da gripe em células, têm apresentado boa tolerância e satisfatória imunogenicidade quando comparadas a vacinas cultivadas em ovos embrionados (FREY et al., 2010).

As vacinas derivadas de cultura em células apresentam algumas vantagens, tais como a opção de se estocar congeladas as células utilizadas para o cultivo, possibilitando um suprimento estratégico em casos de pandemias, o que seria mais rápido que a obtenção de ovos para a produção tradicional (FREY et al., 2010).

A adaptação das cepas virais em células é mais rápida do que a adaptação em ovos: leva em torno de um a três meses para a finalização contra cinco a seis meses para adaptação em ovos (SINGH; PANDEY; MITTAL, 2010).

Outras vantagens são o fato de que vacinas derivadas de cultura em células não possuem contraindicação para pacientes alérgicos a ovos, e o menor risco de contaminação química e microbiana (FREY et al., 2010).

Por outro lado, o cultivo em células ainda não possui processos bem estabelecidos de padronização na produção de reagentes e apresenta o risco

de inserção de agentes adventícios, tais como resíduos de DNA celular (SINGH; PANDEY; MITTAL, 2010).

Além da utilização da cultura em células na produção da vacina, essa técnica permitiu no passado a adaptação de cepas vacinais de alta patogenicidade em aves como o A/H5N1 a ovos embrionados (utilizados na produção da vacina), pois o vírus é letal aos embriões e provoca baixos rendimentos da vacina (ANDRADE et al., 2009).

Esse tipo de adaptação das cepas vacinais H5N1 foi feito por meio da metodologia de genética reversa. Para tanto, são selecionados plasmídeos codificadores de proteínas estruturais de vírus, adaptados para o crescimento em ovos, como o vírus A/PR8/34 e plasmídeos de codificação do HA e NA do vírus selvagem H5N1. Esses plasmídeos selecionados são transfectados em células VERO, onde ocorre a formação da nova cepa. Após seleção da cepa vacinal, o vírus é amplificado por meio de passagens em ovos embrionados (WHO, 2003).

Após comprovações de que basicamente duas proteínas da superfície viral – Hemaglutinina e Neuraminidase – induzem a imunidade protetora necessária, criou-se a vacina chamada *subunit-virus vaccine*, composta somente por essas duas proteínas. Essas vacinas possuem uma grande tolerância entre todas as faixas etárias, mas um reduzido poder de imunogenicidade (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

Atualmente, a vacina majoritariamente utilizada no mundo é do tipo *split-virus vaccine*, administrada anualmente em populações de maior risco no início do inverno em países do hemisfério norte e sul (ZUCKERMAN et al., 2009).

Na produção desse tipo de vacina, o vírus é inoculado em ovos de galinha embrionados de 10-11 dias e o líquido alantoico é colhido, clarificado, purificado e concentrado em gradiente de sacarose por centrifugações zonais. A suspensão viral purificada é fragmentada com detergente e inativada com formaldeído (MIYAKI et al., 2010).

As vacinas contra a gripe produzidas em ovos contêm quantidades variáveis de proteínas residuais do ovo. Por ser uma das proteínas mais importantes nos ovos embrionados, a ovoalbumina pode ser usada como marcador, representando a quantidade de proteínas derivadas dos ovos

presentes na vacina. No entanto, quantidades residuais da proteína no produto final podem estar associadas a reações adversas, visto que se trata de um agente sensibilizante do sistema imune. Assim, vacinas contra a gripe produzidas em ovos embrionados acabam não sendo apropriadas para indivíduos com histórico de alergia a componentes do ovo (JAMES et al., 1998; KÜRSTEINER et al., 2006).

A imunização anual com a vacina contra a gripe pode causar imunidade contra a ovoalbumina devido à repetida administração de doses que contêm as proteínas dos ovos, o que pode provocar irritação local, reações sistêmicas e a redução da tolerância ao produto (KÜRSTEINER et al., 2006).

Junto com a evolução das vacinas contra a gripe, os métodos para a avaliação da pureza da vacina também têm sido constantemente atualizados, limitando cada vez mais os níveis de ovalbumina contaminante (CROVARI; ALBERTI; ALICINO, 2011).

#### **1.4 Geração das cepas pandêmicas**

A técnica mais tradicional para a geração das cepas para a produção da vacina de gripe sazonal é a técnica *reassortant*.

Essa técnica consiste em infectar ovos de galinha embrionados com cepas diferentes, normalmente a cepa que se tem interesse em gerar imunidade e outra cepa com adaptação para crescimento em ovos. Esse método produz novas cepas, pois quando há infecção conjunta de diferentes tipos virais ocorrem mutações do tipo **shift** que geram partículas virais com os diferentes segmentos de vRNA misturados.

A cepa de interesse deve conter principalmente as informações genéticas para a formação da HA e NA, que são as proteínas reconhecidas primordialmente pelo sistema imune, e as quais se deseja proteger com a vacinação, e os demais segmentos de vRNA que possuam a origem da melhor cepa adaptada em ovos de galinha, por exemplo, a cepa A/Puerto Rico/34.

Portanto, a combinação genética ideal esperada é a 6:2, na qual seis genes seriam provenientes da cepa melhor adaptada para crescimento em ovos e os outros dois principais (expressam a HA e NA) provenientes da cepa

circulante de interesse para a produção da vacina. Após esse processo, os vírus formados são caracterizados e isolados de forma a prover a melhor cepa com as características desejadas (WEBBY et al., 2004)

No caso de pandemias nas quais a geração das cepas vacinais necessita ser em um curto prazo de tempo para o adiantamento do início da produção da vacina, a técnica *reassortant* acaba tornando-se inviável devido ao tempo de seleção das cepas, que podem chegar a 254 tipos diferentes ( $2^8 - 2 = 254$ , sendo 2 tipos virais e oito diferentes segmentos), podendo esse processo chegar a 6 meses. Outro fator é a alta patogenicidade das cepas em ovos, pois apresentam os segmentos de vRNA da HA e NA que normalmente são isolados de aves, o que pode dificultar a sua replicação.

Devido a isso novas técnicas têm sido avaliadas e a mais relevante até o momento é a técnica de genética reversa, que possibilita a obtenção de cepas para a produção da vacina em um menor prazo (aproximadamente 3 meses).

A técnica de genética reversa consiste em isolar o vírus de interesse vacinal e extrair o seu RNA viral. O RNA viral dos genes da Hemaglutinina e Neuraminidase da cepa pandêmica e os demais genes da cepa atenuada são então clonados por meio de RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) para um cDNA (DNA complementar). Por meio dessa técnica também é possível reduzir a virulência dessas cepas durante a etapa de clonagem na qual são utilizados *primers* específicos para a remoção de aminoácidos polibásicos do gene da hemaglutinina, que são associados a maior virulência destas cepas, quando existentes, possibilitando assim a obtenção de cepas mais atenuadas e melhores adaptadas em ovos de galinha. Os clones de cDNAs são então transfectados em células VERO e após a formação das cepas vacinais clonadas, são amplificadas em ovos embrionados de 10 – 11 dias (HOFFMANN et al., 2002; WEBBY et al., 2004).



## 4 CONCLUSÃO

Este trabalho produziu os bancos de vírus H7N9, a vacina em escala piloto e na escala industrial que foi realizada em condições de boas práticas de fabricação, podendo assim ser utilizada nos ensaios pré-clínicos e clínicos, fase I, para conclusão da validação do processo de produção da vacina. Foram avaliadas todas as etapas necessárias para a produção da vacina contra o H7N9.

Demonstrou-se, através das análises dos dados obtidos, testes de controle e caracterizações que a vacina possui a qualidade necessária para atender às farmacopeias vigentes e, portanto é passível de utilização em ensaios clínicos. Os dados obtidos também foram comparados com os dados obtidos com a produção sazonal, para a produção da qual o instituto possui certificação desde 2012, apresentando similaridade.

Com o banco trabalho produzido e a importação prévia dos reagentes, nas condições mais favoráveis para a produção, é possível realizar a disponibilização do primeiro lote de vacina em 35 dias.

Comprovamos, portanto, que a vacina é funcional, pois foi capaz de gerar anticorpos específicos contra o H7N9 em camundongos. Neste experimento também foram avaliadas diferentes dosagens, bem como formulações com adjuvantes e desta forma foi possível estimar a capacidade produtiva teórica do Instituto Butantan em 2.264.667 doses por lote considerando-se formulações com 7,5 µg de HA. Além disso possibilitou-se a discussão de diferentes estratégias para a resposta a uma pandemia e estabeleceram-se os prazos necessários para a produção da vacina.

## REFERÊNCIAS\*

ACHARYA, T. **Hemagglutination Inhibition Test (HAI)**: principle, procedure, result and interpretations. 2014. Disponível em: <<https://microbeonline.com/hemagglutination-inhibition-test-hai-principle-procedure-result-interpretations/>>. Acesso em: 23 set. 2016.

ANDRADE, C. R. et al. Gripe aviária: a ameaça do século XXI. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, São Paulo, v. 35, n. 5, p. 470-479, maio, 2009.

ANDRADE, J. C. **Química analítica básica**: os instrumentos básicos de laboratório. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2011/12/02/quimica-analitica-basica-os-instrumentos-basicos-de-laboratorio/>>. Acesso em 08 jun. 2012.

BEYER, W. E. et al. Seroprotection rate, mean fold increase, seroconversion rate: which parameter adequately expresses seroresponse to influenza vaccination? **Virus Research**, Amsterdam, v. 103, n. 1-2, p. 125-132, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 7, de 10 de março de 2006. Brasília, **Diário Oficial da União**, 20 de março de 2006. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1103714460>>. Acesso em: 23 de maio, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 56, de 04 de dezembro de 2007. Brasília, **Diário Oficial da União**, 06 de dezembro de 2007. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1152449158>>. Acesso em: 23 de maio, 2017.

BROOKS, G. F. (Ed.) et al. **Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology**. New York: McGraw-Hill, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **CDC recommends against the use of amantadine and rimantadine for the treatment or prophylaxis of influenza in the United States during the 2005–06 influenza season**. Disponível em: <<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/25151>>. Acesso em: 20 out. 2010a.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Prevention and control of influenza with vaccines recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP)**. Atlanta, 2010b. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/rr/rr5908.pdf>>. Acesso em: 8 abr. 2011.

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referência: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CHURSOV, A. et al. Specific temperature-induced perturbations of secondary mRNA structures are associated with the cold-adapted temperature-sensitive phenotype of influenza A virus. **RNA Biology**, Georgetown, v. 9, n. 10, p. 1-9, Oct., 2012.

COX, N. J. et al. *Orthomyxoviruses: influenza*. In: MAHY, B. W. J.; COLLIER, L. (Eds.). **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. 10<sup>th</sup>ed. New York: Oxford University Press, 2009. p. 385-433.

CROVARI, P.; ALBERTI, M.; ALICINO, C. History and evolution of influenza vaccine. **Journal of Preventive Medicine and Hygiene**, Genova, v. 52, n. 3, p. 91-94, Sept., 2011.

DUARTE, P. A. D. et al. Pacientes com infecção por vírus A (H1N1) admitidos em unidades de terapia intensiva do Estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 3, p. 231-236, 2009.

ENSERINK, M.; KAISER, J. Avian flu finds new mammal hosts. **Science**, Washington, v. 305, n. 5689, p. 1385a, Sept. 2004

EUROPEAN COMMISSION. **EudraLex**: the rules governing medicinal products in the European Union. Brussels, 2008.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 5<sup>th</sup> ed. Strasbourg: Council of Europe, 2004.

FIORE, A. E. et al. **Prevention and control of influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP)**, 2010. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention, 2010.

FODOR, E. et al. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. **Journal of Virology**, Washington, v. 76, n. 18, p. 8989-9001, Sept., 2002.

FORLEO-NETO, E. et al. Influenza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 36, n. 2, p. 267-274, mar./abr., 2003.

FREY, S. et al. Clinical efficacy of cell culture-derived and egg-derived inactivated subunit influenza vaccines in healthy adults. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 51, n. 9, p. 997-1004, Nov., 2010.

HALE, B. G. et al. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. Review. **The Journal of General Virology**, London, v. 89, n. 10, p. 2359-2376, Oct., 2008.

HEINIG, K.; VOGT, C. Determination of Triton X-100 in influenza vaccine by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Berlin, v. 359, n. 2, p. 202-206, Sept., 1997.

HERFST, S. et al. Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. **Science**, Washington, v. 336, n. 6088, p. 1534-1541, Jun., 2012.

HIRST, G. K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 75, n. 1, p. 49-64, Jan., 1942.

JAMES, J. M. et al. Safe administration of influenza vaccine to patients with egg allergy. **The Journal of Pediatrics**, Milan, v. 133, n. 5, p. 624-628, Nov., 1998.

JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. Ortomixovírus (vírus da influenza). In: BROOKS, G. F. et al. **Jawetz, Melnick & Adelberg's microbiologia médica. 24. ed.** Rio de Janeiro: Mc Graw Hill Interamericana do Brasil, 2009. p. 533-545.

KILBOURNE, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 1, p. 9-14, Jan., 2006.

KON, T. C. et al. Influenza vaccine manufacturing: effect of inactivation, splitting and site of manufacturing. Comparison of influenza vaccine production processes. **PloS one**, San Francisco, v. 11, n. 3, e0150700, Mar., 2016.

KÜRSTEINER, O. et al. Inflexal<sup>®</sup> V— the influenza vaccine with the lowest ovalbumin content. **Vaccine**, London, v. 24, n. 44/46, p. 6632-6635, Nov., 2006.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 15, n. 227, p. 680-685, Aug., 1970.

LAMB, R. A.; CHOPPIN, P. W. Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription. **Virology**, v. 74, n. 2, p. 504-519, Oct., 1976.

LASSE, M. et al. The impact of pH, salt concentration and heat on digestibility and amino acid modification in egg white protein. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 38, p. 42-48, march 2015.

LI, C. et al. Collaborative studies on the development of national reference standards for potency determination of H7N9 influenza vaccine. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, Austin, v. 11, n. 6, p. 1351-1356, 2015.

LONGINI JUNIOR, I. M. et al. Containing pandemic influenza with antiviral agents. **American Journal of Epidemiology**, Baltimore, v. 159, n. 7, p. 623-633, Apr., 2004.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov., 1951.

MARTINS, N. R. S. Influenza aviária: uma revisão dos últimos dez anos. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 3, n. 2, p. 97-140, 2001.

MILLIPORE CORPORATION. **Protein concentration and diafiltration by tangential flow filtration**. Billerica, MA, 2003.

MINOR, P. D. Vaccines against seasonal and pandemic influenza and the implications of changes in substrates for virus production. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 50, n. 4, p. 560-565, Feb., 2010.

MIYAKI, C. et al. Production of H5N1 (NIBRG-14) inactivated whole virus and split virion influenza vaccines and analysis of immunogenicity in mice using different adjuvant formulations. **Vaccine**, London, v. 28, n. 13, p. 2505-2509, Mar., 2010.

MULLIGAN, M. J. et al. Serological responses to an avian influenza A/H7N9 vaccine mixed at the point-of-use with MF59 adjuvant: a randomized clinical trial. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 312, n. 14, p. 1409-1419, Oct. 2014.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomyxovirus. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M. (Ed). **Virology**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Raven Press, 2001.

NASH, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. **The Biochemical Journal**, London, v. 55, n. 3, p. 416-421, Oct., 1953.

OXFORD, J. S.; LAMBKIN, R. Targeting influenza virus neuraminidase – a new strategy for antiviral therapy. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 3, n. 10, p. 448-456, Oct., 1998.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds.). **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1647-1690.

PONTORIERO, A. V. et al. Antigenic and genomic relation between human influenza viruses that circulated in Argentina in the period 1995-1999 and the corresponding vaccine components. **Journal of Clinical Virology**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 130-140, Oct., 2003.

REED, S. G.; ORR, M. T; FOX, C. B. Key roles of adjuvants in modern vaccines. **Nature Medicine**, New York, v. 19, n. 12, p. 1597-1608, Dec. 2013.

REIS, R.; ZYDNEY, A. Bioprocess membrane technology. **Journal of Membrane Science**, Amsterdam, v. 297, n. 1-2, p. 16-50, July 2007.

RESA-INFANTE, P. et al. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. **RNA Biology**, Georgetown, v. 8, n. 2, p. 207-215, Mar., 2011

ROBB, N. C. et al. NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. **The Journal of General Virology**, London, v. 90, n. 6, p. 1398-1407, June 2009.

SALK, J. E. A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza-virus and the corresponding antibody. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 49, n. 2, p. 87-98, Aug., 1944.

SCHROEDER, C. et al. Functional reconstitution in lipid vesicles of influenza virus M2 protein expressed by baculovirus: evidence for proton transfer activity. **The Journal of General Virology**, London, v. 12, p. 3477-3484, Dec., 1994.

SHINYA, K. et al. Avian flu: Influenza virus receptors in the human airway. **Nature**, London, v. 440, p. 435-436, Mar., 2006.

SINGH, N.; PANDEY, A.; MITTAL, S. K. Avian influenza pandemic preparedness: developing pre-pandemic and pandemic vaccines against a moving target. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, v. 12, n. e14, Apr., 2010.

SMITH, A. E.; HELENIUS, A. How viruses enter animal cells. **Science**, Washington, v. 304, n. 5668, p. 237-242, Apr., 2004.

TANNER, W. D.; TOTH, D. J. A.; GUNDLAPALLI, A. V. The pandemic potential of avian influenza A(H7N9) virus: a review. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 143, n. 16, p. 3359-3374, July 2015.

TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 12, n. 1, p. 15-22, Jan., 2006.

VAN RIEL, D. et al. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. **Science**, New York, v. 312, n. 5772, p. 399, Apr., 2006.

VAZ, C. A. C. Interação antígeno/anticorpo *in vitro*. In: CALICH, V.; VAZ, C. (Orgs). **Imunologia**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001. p. 139–140.

WENDEL, I.; MATROSOVICH, M.; KLENK, H. D. Snapshot: evolution of human influenza A viruses. **Cell Host Microbe**, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 416-416.e1, Mar., 2015.

WHITTAKER, G. R. Intracellular trafficking of influenza virus: clinical implications for molecular medicine. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, Cambridge, Feb. 8, p. 1-13, 2001.

WILEY, D. C.; WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. **Nature**, London, v. 289, p. 373-378, Jan., 1981.

WONG, S. S. et al. A single dose of whole inactivated H7N9 influenza vaccine confers protection from severe disease but not infection in ferrets. **Vaccine**, Amsterdam, v. 32, n. 35, p. 4571-4577, July 2014.

WOOD, F. M. et al. An improved single-radial-immunodiffusion technique for the assay of influenza haemagglutinin antigen: application for potency determinations of inactivated whole virus and subunit vaccines. **Journal of Biological Standardization**, London, v. 5, p. 237-247, July 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Analysis of recent scientific information on avian influenza A(H7N9) vírus**. Disponível em: <[http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/avian\\_influenza/riskassessment\\_AH7N9\\_201702/en/](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/riskassessment_AH7N9_201702/en/)>. Acesso em: 11 out. 2016a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global influenza programme: Influenza virus infection in humans**. Disponível em: <[http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/virology\\_laboratories\\_and\\_vaccines/influenza\\_virus\\_infections\\_humans\\_feb14.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/virology_laboratories_and_vaccines/influenza_virus_infections_humans_feb14.pdf)>. Acesso em: 02 abr. 2014a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics: influenza**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/influenza/en/>>. Acesso em: 02 abr. 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Immunization, vaccines and biologicals: influenza**. Disponível em: <<http://www.who.int/immunization/topics/influenza/en/index.html>>. Acesso em: 05 abr. 2014b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Influenza at the human-animal interface**. Disponível em: <[http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/Influenza\\_Summary\\_IR\\_A\\_HA\\_interface\\_02\\_14\\_2017.pdf?ua=1](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IR_A_HA_interface_02_14_2017.pdf?ua=1)>. Acesso em: 16 fev. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Influenza: vaccines**. Disponível em: <<http://www.who.int/influenza/vaccines/en/>>. Acesso em: 13 jul. 2016b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Production of pilot lots of inactivated influenza vaccines from reassortant derived from avian influenza viruses**. Geneva, 2003. Disponível em: <[http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/influenzaRMD2003\\_5.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/influenzaRMD2003_5.pdf)> Acesso em: 8 abr. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Recommendations for the production and control of influenza vaccine (inactivated)**. Geneva, 2005. (WHO Technical Report Series).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance**. Geneva, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO pandemic phase descriptions and main actions by phase.** Disponível em: <[http://www.who.int/influenza/resources/documents/pandemic\\_phase\\_descriptions\\_and\\_actions.pdf](http://www.who.int/influenza/resources/documents/pandemic_phase_descriptions_and_actions.pdf)>. Acesso em 10 jan. 2017.

ZHOU, L. et al. Sudden increase in human infection with avian influenza A(H7N9) virus in China, September-December 2016. **Western Pacific Surveillance and Response Journal**, Manila, v.8, n.1, p. 1-9, Jan., 2017.

ZUCKERMAN, A. J. et al. **Principles and practice of clinical virology.** 6<sup>th</sup> ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009.