

EDITORIAL ESPECIAL

SPECIAL EDITORIAL

Influenza Aviária: questões centrais

Avian Influenza: main issues

Maria Rita Donalísio

Membro da Comissão de
Epidemiologia da ABRASCO e
da FCM-Unicamp

Departamento de Medicina
Preventiva e Social da
Faculdade de Ciências Médicas
da Unicamp

Caixa Postal 6111
Campinas - SP
13083-970

donalisi@fcm.unicamp.br

Embora a infecção humana pelo vírus influenza aviária A H5N1 tenha sido registrada desde 1997 na China, a incidência tem aumentado e casos sido identificados em vários países nos últimos anos, seguindo o trajeto de epidemias em aves, embora também detectada em outras espécies animais.

Infecções humanas confirmadas pelo vírus influenza H5N1 foram registradas no Vietnã e Tailândia em 2003 e 2004, aparecendo em 2005 e 2006 no Camboja, Tailândia, China, Turquia, Iraque e Egito. Desde as primeiras notificações até 6 de abril de 2006, foram 192 casos humanos com 109 óbitos, a quase totalidade relacionada com o contato direto com aves infectadas (Organização Mundial da Saúde).

A alta letalidade dos casos humanos (ao redor de 50%) traz uma forte inquietação sobre o risco real de uma possível pandemia de infecção grave, cuja susceptibilidade humana poderá ser alta e universal.

No entanto, não se pode prever quando uma pandemia ocorrerá, qual será sua gravidade, e nem mesmo a exata identidade do vírus a ela relacionado. Pode-se afirmar que, além da vacina e dos antivirais específicos, ainda não disponíveis no âmbito de saúde pública, uma das estratégias mais preciosas para o retardo da transmissão viral é a vigilância virológica e epidemiológica, isto é, a detecção precoce dos primeiros casos, o bloqueio da transmissão, a intervenção oportuna. O sistema de vigilância epidemiológica será novamente testado, com a tarefa de modificar os caminhos da transmissão e o impacto de uma grave epidemia. Estaremos preparados para isso?

A Revista Brasileira de Epidemiologia organizou um conjunto de questões de interesse sobre a influenza aviária, que será divulgado neste e nos próximos números. Para discuti-los foram convidados pesquisadores e gestores envolvidos com a elaboração de estratégias nacional e regionais para enfrentar uma possível transmissão epidêmica do vírus influenza H5N1 no Brasil. A seguir são apresentados comentários pontuais e sucintos sobre alguns temas centrais da influenza aviária: 1) perspecti-

Although human infection by the A H5N1 avian influenza virus was first recorded in 1997 in China, its incidence has been increasing and there have been cases identified in many countries in the past few years, following the pathway of the epidemic in birds, although it has also been detected in other animal species.

Human infections by the H5N1 influenza virus were confirmed in Vietnam and Thailand in 2003 and 2004, and arrived in Cambodia, Thailand, China, Turkey, Iraq and Egypt in 2005 and 2006. From the first reports until April 6, 2006, there were 192 cases in humans with 109 deaths, almost all of them related to direct contact with infected birds (World Health Organization).

The high lethality of human cases (around 50%) causes major concerns about the real risk of a possible pandemic with severe infections, to which human susceptibility may be high and universal.

However, it is impossible to predict when the pandemic will happen, how severe it will be, or the exact identity of its virus. It can be said that, in addition to the vaccine and specific antiviral drugs, not yet available in the public health system, one of the best strategies to delay viral transmission is viral and epidemiological surveillance, that is, the early etiological detection of the first cases, blockade to transmission, and early intervention. The epidemiological surveillance system will be tested again, with the task of changing transmission pathways and the impact of a severe epidemic. Will we be ready for it?

The Revista Brasileira de Epidemiologia prepared a group of relevant questions about avian influenza, which will be published in this and in coming issues. We invited researchers and managers involved with the design of national and regional strategies to fight a possible epidemic transmission of the H5N1 influenza virus in Brazil to discuss these questions. Here follow some specific and brief comments on some core issues regarding avian influenza: 1) prospects for viral surveillance in

vas da vigilância virológica no Brasil; 2) as possíveis mutações do vírus H5N1 e sua adaptação na transmissão inter-humana; 3) aspectos clínicos da influenza aviária; 4) a eficácia da terapêutica antiviral em casos humanos e 5) a perspectiva da produção da vacina no Brasil.

1. O Brasil está preparado para detectar a entrada e realizar a vigilância virológica do vírus H5N1?

- Prof^a Dra. Terezinha Maria Paiva. Laboratório de Vírus Respiratórios/Virologia/Instituto Adolfo Lutz Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

O Brasil está apto a realizar a vigilância virológica do vírus da influenza, uma vez que atua nesta área junto à Rede Mundial de Vigilância, coordenada pela Organização Mundial de Saúde, desde a década de 50. O país possui três Laboratórios integrantes da Rede Mundial: Instituto Adolfo Lutz, Instituto Evandro Chagas e Fundação Oswaldo Cruz. Estes Laboratórios são capacitados na realização de metodologias clássicas e moleculares para detecção rápida e específica do vírus da influenza.

A vigilância virológica no Brasil foi implementada pela Rede Nacional de Vigilância da Influenza sob coordenação do Ministério da Saúde em função do risco de uma pandemia. Atualmente, cerca de 45 Unidades Sentinelas, distribuídas nos diferentes Estados da Federação, integram a Rede Nacional de Vigilância da Influenza. As Autoridades em Saúde Pública estão mobilizadas quanto ao agravo e já elaboraram o Plano Nacional de Contingência da Influenza, do qual participam todos os setores da sociedade.

2. Quais as mutações envolvidas na adaptação do vírus influenza aviária H5N1 em humanos?

- Prof^a Dra. Rita Catarina Medeiros Souza do Núcleo de Medicina Tropical/ Universidade Federal do Pará e do Laboratório de Vírus Respiratórios/Instituto Evandro Chagas/Ministério da Saúde.

Brazil; 2) possible mutations of the H5N1 virus and its adaptation to inter-human transmission; 3) clinical aspects of avian influenza; 4) the efficacy of antiviral therapy in human cases and 5) prospects for the production of the vaccine in Brazil.

1. Is Brazil ready to detect the arrival of the H5N1 virus and to conduct viral surveillance?

- Prof^a Dra. Terezinha Maria Paiva. Respiratory Virus/Virology Laboratory/Adolfo Lutz Institute São Paulo State Health Department.

Brazil is ready to carry out the viral surveillance of the influenza virus, because it has been working in this area along with the Global Surveillance Network, coordinated by the World Health Organization, since the 1950's. The country has three laboratories that are part of the Global Network: Instituto Adolfo Lutz, Instituto Evandro Chagas, and Fundação Oswaldo Cruz. These laboratories are capable of conducting classical and molecular methodologies for the rapid and specific detection of the influenza virus.

Viral surveillance in Brazil was implemented by the National Influenza Surveillance Network under the coordination of the Ministry of Health in face of the risk of a pandemic. Currently, 45 Sentinel Units, spread throughout different states of the Federation, comprise the National Influenza Surveillance Network. Public health authorities are mobilized and have already prepared the National Influenza Contingency Plan, with the participation of all sectors of the society.

2. Which are the mutations involved in the adaptation of the H5N1 avian influenza virus to humans?

- Prof^a Dra. Rita Catarina Medeiros Souza. Tropical Medicine Core / Federal University of the State of Pará and Respiratory Virus Laboratory / Evandro Chagas Institute / Ministry of Health.

The species barrier for the type A in-

A barreira de espécie para o vírus influenza de tipo A é estabelecida por vários genes virais, envolvendo não somente os genes codificadores das glicoproteínas de superfície viral, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), mas também genes internos como o da PB2 do complexo polimerase. O vírus influenza possui genoma RNA segmentado, o que favorece o acúmulo de mutações além da possibilidade de rearranjos dos diversos segmentos quando uma célula é co-infectada com dois ou mais vírus geneticamente distintos. Os vírus introduzidos na população humana durante as pandemias de 1957 e 1968, causadas respectivamente pelos vírus A (H2N2) e A (H3N2), foram resultado de um rearranjo entre segmentos do genoma de um vírus de origem aviária com aqueles de vírus que já circulavam há algum tempo na população humana. Os genes de origem aviária foram HA, NA e PB1, no caso do vírus H2N2, e HA e PB1, no caso do vírus H3N2, sugerindo que a manutenção de genes codificadores de proteínas internas de vírus humanos é necessária para a adaptação do novo vírus à espécie humana. Daí o grande receio da expansão da gripe aviária pelo vírus H5N1 no mundo, o que aumenta o risco de co-infecção com um vírus influenza de origem humana, seja no homem ou em outro hospedeiro, como o porco, o que favoreceria o surgimento de um vírus híbrido aviário/humano com risco potencial de maior adaptação e fixação na população humana. Porém, muito recentemente, foi demonstrado que o vírus A (H1N1), responsável pela gripe espanhola, era um vírus de origem exclusivamente aviária, que não sofreu rearranjo com vírus de outras origens, demonstrando o potencial de adaptação de um vírus aviário ao homem sem a necessidade da ocorrência do rearranjo genético com vírus humanos. Nesse caso, torna-se evidente a evolução genética com o acúmulo de mutações em sítios importantes de interação das proteínas virais com a célula hospedeira. O exemplo mais bem documentado é o da hemaglutinina viral.

influenza virus is established by many viral genes, involving not only the coded genes of the glycoproteins of the viral surface, hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA), but also internal genes like the PB2 of the polymerase complex. The influenza virus has a segmented RNA genome, which favors the accumulation of mutations, in addition to the possibility of rearrangements of the many segments when one cell is co-infected with two or more genetically different viruses. The viruses introduced in the human population during the 1957 and 1968 pandemics, caused respectively by viruses A (H2N2) and A (H3N2), were the result of a rearrangement between segments of the genome of a virus of avian origin with viruses that had already been circulating for some time in the human population. The genes of avian origin were HA, NA and PB1, in the case of virus H2N2, and HA and PB1, for virus H3N2, suggesting that the maintenance of internal protein-coding genes of human viruses is necessary for the adaptation of the new virus to the human species. Hence, the great fear of a global expansion of avian influenza by the H5N1 virus, increasing the risk of co-infection with an influenza virus of human origin, either in humans or in another hosts, like pigs, which would favor the emergence of hybrid avian/human virus with potential risk of better adaptation and fixation in the human population. Nevertheless, very recently, it has been demonstrated that virus A (H1N1), responsible for the Spanish influenza, was a virus of exclusively avian origin, which did not undergo a rearrangement with viruses from other origins, demonstrating the adaptation potential of an avian virus to humans without needing genetic rearrangement with a human virus. In this case, genetic evolution becomes clear with the accumulation of mutations in important sites of interaction of viral proteins with the host cell. The best-documented example is that of viral hemagglutinin.

In fact, the HA of the influenza virus is

De fato, a HA do vírus influenza é capaz de reconhecer de forma diferenciada seus receptores, os ácidos siálicos, existentes nos sítios de replicação viral de diversos hospedeiros. Os vírus influenza aviários possuem HA com alta afinidade pelos ácidos siálicos terminais de uma cadeia oligossacarídica, quando em ligação $\alpha 2,3$ com a galactose subjacente. Este tipo de ácido siálico é predominante em células epiteliais do intestino das aves selvagens, local de maior multiplicação viral nestes hospedeiros. Ao contrário, a HA dos vírus influenza adaptados ao homem fixam-se com maior afinidade aos ácidos siálicos ligados em $\alpha 2,6$ com a galactose, que são mais abundantes em células epiteliais não ciliadas presentes no trato respiratório humano. Essas predileções por receptor definem em parte a barreira de espécie, impedindo a livre passagem dos vírus de um hospedeiro a outro. Muito recentemente foi demonstrado que existe uma população de células epiteliais ciliadas na traquéia humana que expressam, em baixa densidade, os receptores para vírus aviário, justificando dezenas de casos humanos de influenza pelo vírus A (H5N1) ocorridos desde 1997, sem a ocorrência de mutação no gene codificador para a HA. Entretanto, quando estas alterações genéticas acontecem no âmbito do sítio de fixação da proteína ao receptor, é possível ocorrerem mudanças na especificidade da mesma. A HA do vírus aviário poderá então aumentar sua afinidade por ácidos siálicos do tipo 2,6, determinando um aprimoramento da multiplicação viral no trato respiratório humano, especialmente na traquéia e faringe, o que favoreceria a transmissão respiratória do vírus de pessoa a pessoa.

Os aminoácidos em posições 226 e 228 são classicamente envolvidos nessa especificidade de interação da HA ao seu receptor. A presença de uma leucina ou isoleucina ou valina em posição 226, além de serina em posição 228, encontradas em vírus humanos, determina maior afinidade da glicoproteína aos ácidos siálicos do tipo 2,6, enquanto que glutamina e glicina em posições 226 e 228, respectivamente,

capable of differently recognizing its receptors, the sialic acids that exist in the viral replication sites of many hosts. The HA of avian influenza viruses has high affinity with the terminal sialic acids of the oligosaccharide chain, when linked to $\alpha 2,3$ with the underlying galactose. This type of sialic acid is predominant in the epithelial cells of the intestine of wild birds, the site where viruses multiply the most in these hosts. In contrast, the HA of the influenza viruses adapted to humans fixate with greater affinity to the sialic acids bound in $\alpha 2,6$ with galactose, which are most abundant in the non-ciliated epithelial cells present in the human respiratory tract. These receptor preferences partly define the species barrier, preventing the free passage of the virus from one host to the other. Very recently it has been shown that there is a population of ciliated epithelial cells in the human trachea that express, at density, the receptors for the avian virus, justifying dozens of human influenza cases by virus A (H5N1) that occurred since 1997, without a mutation in the coding gene for the HA. However, when these genetic changes happen at the level of the fixation protein site to the receptor, there may occur changes in its specificity. The HA of the avian virus will then be able to increase its affinity for type 2.6 sialic acids, thus determining an improvement in viral multiplication in the human respiratory tract, especially in the trachea and pharynx, which would favor airborne transmission of the virus from one person to another.

The amino acids in positions 226 and 228 have been classically involved in this interaction specificity between the HA and its receptor. The presence of a leucine or isoleucine or valine in position 226, in addition to serine in position 228, found in the human virus, determines the greater affinity of the glycoprotein to type 2.6 sialic acids, while glutamine and glycine in positions 226 and 228, respectively, provide greater specificity to type 2.3 sialic acids. These are the last amino acids found so far

conferem maior especificidade aos ácidos siálicos do tipo 2,3. São estes últimos os aminoácidos encontrados na H5 dos vírus isolados tanto de aves como de humanos até o momento, revelando assim a manutenção da afinidade da proteína aos receptores 2,3. Entretanto, já foi demonstrado que substituições em outras posições de aminoácidos que compõem o sítio de fixação ao receptor, por exemplo 193, 227 e 156, podem interferir na afinidade da hemaglutinina ao ácido siálico, constituindo assim um primeiro passo para a mudança de especificidade da proteína viral. Como estas mutações são aleatórias, é impossível prever como e quando ocorrerão. Porém, com a rápida expansão geográfica do vírus H5N1 e sua contínua evolução genética, supõe-se que tais mutações surgirão, determinando risco potencial de fixação do vírus na população humana.

3. Quais os aspectos clínicos que diferenciam um quadro de influenza sazonal humana e a infecção pelo vírus H5N1?

- Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva. Departamento de Clínica Médica/Faculdade de Ciências Médicas/Unicamp.

Os casos humanos de influenza H5N1 são indistinguíveis dos casos humanos da influenza anual, por H1N1 ou H3N2, salvo, talvez, pela maior gravidade e letalidade desta última, em torno de 50%.

Cabe lembrar, no entanto, que a experiência clínica com casos humanos de influenza H5N1 é reduzida e, possivelmente por viés de notificação e diagnóstico, os casos identificados tendem a ser os mais graves.

A maior letalidade deve-se à maior frequência de pneumonia viral, sendo que os óbitos ocorreram por insuficiência respiratória. A aparente maior gravidade pode ser explicada pela tendência do vírus a determinar viremia.

Dos 18 pacientes de 1997, 11 evoluíram para pneumonia e seis morreram de insuficiência respiratória. A evolução desses

in the H5 of viruses isolated both in birds and in humans, thus revealing the maintenance of the affinity of the protein for receptors 2,3. However, it has already been demonstrated that replacements in other amino acid positions that comprise of the fixation site to the receptor, for example 193, 227 and 156, may interfere in the affinity of hemagglutinin to sialic acid, which is the first step for the change in the specificity of the viral protein. As these mutations are random, it is impossible to predict how or when they will happen. However, with the rapid geographical expansion of the H5N1 virus and its continuing genetic evolution, these mutations are expected to happen, thus determining a potential risk of fixation of the virus in the human population.

3. Which clinical aspects differentiate the seasonal human influenza from infection by the H5N1 virus?

- Prof. Dr. Luiz Jacintho da Silva. Internal Medicine Department/ University of Campinas Medical School

The cases of human influenza by H5N1 are impossible to differentiate from the cases of annual human influenza by H1N1 or H3N2, except, maybe, by the higher severity and lethality of the latter, around 50%.

We should remember, however, that the clinical experience with cases of human influenza by H5N1 is small and, possibly due to the bias of reporting and diagnosis, the cases identified tend to be the most severe.

Its greater lethality is due to the higher frequency of viral pneumonia, and deaths occurred due to respiratory failure. The apparent greater severity can be explained by the trend of the virus in determining viremia.

Of the 18 patients of 1997, 11 evolved to pneumonia and six died from respiratory failure. The development of these cases, as usual with influenza, is fast, within

casos, como costuma ocorrer na influenza, é rápida, de apenas alguns dias. O tempo de incubação também é curto, de dois a oito dias. O tempo do início dos sintomas ao óbito variou de quatro a 30 dias. Encefalite foi uma complicação encontrada.

À semelhança de outras influências aviárias, a conjuntivite foi uma manifestação vista, porém não freqüente, nos primeiros 18 casos vistos em Hong Kong em 1997. Manifestações gastrintestinais, particularmente diarreia, não comuns na influenza, foram freqüentes nesses casos. A ocorrência de conjuntivite e manifestações gastrintestinais se explica pelo fato de a hemaglutinina dos vírus de influenza aviária se ligar ao ácido siálico com receptores alfa 2-3 da superfície das células do hospedeiro. Esses receptores são encontrados nas células respiratórias e digestivas das aves, e em humanos são encontrados nas células da mucosa ocular e digestiva, com menor freqüência na mucosa do trato respiratório, onde os receptores do ácido siálico são alfa 2-6, para os quais os vírus da influenza humana (H1, H2, e H3) estão adaptados.

O manejo clínico desses pacientes não deve diferir do usual na influenza, apenas impondo um maior cuidado dada a maior letalidade em humanos verificada até então. O uso de antivirais, é recomendado até demonstração em contrário.

4. Que eficácia podem ter os antivirais na infecção pelo vírus influenza H5N1?

- Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco. Departamento de Clínica Médica/Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Minas Gerais.

A discussão sobre eficácia e efetividade dos medicamentos antivirais disponíveis para o tratamento de possível epidemia de infecção pelo H5N1 aviário é complexa e os dados atuais são escassos e contraditórios.

Há, atualmente, quatro medicamentos de duas diferentes classes disponíveis para o tratamento da infecção pelo vírus da influenza.

Inibidores da neuraminidase. Há dois

only a few days. The incubation period is also short, from two to eight days. The time from the onset of symptoms to death has ranged from four to 30 days. Encephalitis was one of the complications found.

Like other avian influenzas, conjunctivitis was also found, although not frequent, in the first 18 cases seen in Hong Kong in 1997. Gastrointestinal symptoms, particularly diarrhea, uncommon in influenza, were frequent in these cases. The occurrence of conjunctivitis and gastrointestinal symptoms are explained by the fact that the hemagglutinin of avian influenza viruses binds to sialic acid with alpha 2-3 receptors on the surface of the cells of the host. These receptors are found in the respiratory and digestive cells of birds, and in humans they are found in the cells of the ocular and digestive mucosa, being less frequent on the mucosa of the respiratory tract, where the receptors of sialic acid are alpha 2-6, to which human influenza viruses (H1, H2, and H3) are adapted.

The clinical management of these patients should not differ from the usual management of influenza, only with greater care due to the higher lethality found so far in humans. The use of antivirals is recommended until proven otherwise.

4. How effective can antiviral drugs be for infection by the H5N1 influenza virus?

- Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco. Internal Medicine Department/Medical School/Federal University of the State of Minas Gerais.

The discussion on the efficacy and effectiveness of the antiviral drugs available for the treatment of a possible epidemic of avian infection by H5N1 is complex and current data are scarce and contradictory.

There are, today, four drugs of two different classes available for the treatment of infection by the influenza virus.

Neuraminidase Inhibitors. There are two drugs in this class that have been ap-

medicamentos desta classe aprovados para utilização a partir de um ano de idade: oseltamivir em comprimidos de 75 mg (Tamiflu®1999) e zanamivir em blisters para inalação com 5 mg (Relenza®1999), que reduzem a gravidade e a duração dos sintomas da influenza sazonal, tipos A e B. Estes medicamentos atuam sobre uma das duas principais estruturas de superfície do vírus da influenza, a proteína neuraminidase, que é praticamente a mesma em todas as cepas comuns da influenza. Para ter eficácia devem ser administrados dentro de, no máximo, 48 horas do início dos sintomas. O oseltamivir é administrado oralmente e o zanamivir é disponível em pó para auto-administração inalatória, através de um aparelho plástico.

Inibidores M2. Há também dois medicamentos nesta classe, disponíveis há mais tempo: amantadina (Symetrel®1966) e rimantadina (Flumadine®1993) para o tratamento e quimioprofilaxia da influenza tipo A, para adultos e crianças com um ano ou mais.

Eficácia

Oseltamivir e zanamivir

Apesar dos poucos dados clínicos disponíveis, é possível que o H5N1 seja suscetível aos inibidores de neuraminidase. Na utilização habitual para infecção por vírus A da Influenza, a resistência tem sido rara, embora possa se desenvolver em uso extensivo no caso de uma pandemia. A maioria das cepas do H5N1 testadas mostrou-se suscetível a estes medicamentos, mas a efetividade destes como tratamento para a infecção é ainda desconhecida. Metanálise publicada recentemente (Jefferson T et al, 2006) demonstrou que o Oseltamivir na dose diária de 150 mg foi eficaz na prevenção de complicações pulmonares dos casos de influenza (OR 0,32, 0,18–0,57).

Amantadina e rimantadina

Já se sabe que algumas cepas de H5N1 aviária são completamente resistentes.

proved for use after one year of age: oseltamivir in 75 mg capsules (Tamiflu® 1999) and zanamivir in blisters for inhalation with 5 mg (Relenza®1999), which reduce the severity and duration of the symptoms of seasonal influenza, types A and B. These drugs work on one of the two main surface structures of the influenza virus, the protein neuraminidase, which is practically the same in all usual strains of influenza. For efficacy, they should be taken within no more than 48 hours after the onset of symptoms. Oseltamivir is administered orally and zanamivir is available in powder for self-administration with a plastic inhaler.

M2 inhibitors. There are also two drugs in this class, which have been available longer: amantadine (Symetrel®1966) and rimantadine (Flumadine®1993) for the treatment and chemoprophylaxis of type A influenza, for adults and children over one year of age.

Efficacy

Oseltamivir and zanamivir

Despite the scarce clinical data available, H5N1 may be susceptible to neuraminidase. Resistance has been rare in the regular utilization for virus A Influenza infection, although it may develop with the extensive use in a pandemic. Most H5N1 strains tested proved to be susceptible to these drugs, but their effectiveness for the treatment of the infection is still unknown. A meta-analysis published recently (Jefferson T et al, 2006) showed that a daily dose of 150 mg of Oseltamivir was efficacious in the prevention of pulmonary complications in cases of influenza (OR 0.32, 0.18–0.57).

Amantadine and rimantadine

Some strains of avian H5N1 are known to be completely resistant. However, depending on the type of virus emerging in the case of mutations for the human infection, these inhibitors may be effective.

In the meta-analysis mentioned above,

Entretanto, dependendo do tipo de vírus que emergirá no caso de mutações para infecção humana, estes inibidores poderão ser eficazes.

Na metanálise acima citada, quando utilizados para prevenir a influenza A, a eficácia situou-se em torno de 60% para os antivirais disponíveis. Não foram encontradas evidências de eficácia destes medicamentos na infecção humana pelo H5N1 aviário.

Por outro lado, há relatos de não eficácia do oseltamivir em pacientes infectados pelo H5N1 aviário tratados no Centro de Doenças Tropicais de Hanói.

Limitações do uso dos inibidores de neuraminidase

As principais dificuldades estão relacionadas à capacidade limitada de produção e ao preço muito elevado, tornando-os inacessíveis para muitos países. Também será necessário diagnóstico precoce, pois a atuação destes medicamentos se dá nas primeiras 48 horas de infecção. Some-se a isto o fato de que pessoas com afecções crônicas têm risco aumentado de complicações quando infectadas pelos vírus da influenza e, além disso, várias patologias, incluindo bacteremias de progressão rápida podem ter sintomatologia inicial semelhante à influenza, o que pode dificultar a decisão terapêutica.

Deve ainda ser levado em conta o fato que reações adversas, apesar de relativamente pouco frequentes, podem ser graves, havendo ainda o risco de aumentar a resistência viral se estes medicamentos forem utilizados indiscriminadamente.

Precauções

Recomenda-se que a amantadina e a rimantadina não sejam utilizadas para o tratamento da influenza sazonal; do mesmo modo, por sua baixa efetividade, esta recomendação também se estende aos inibidores de neuraminidase. Sua utilização deve ficar reservada para o caso de

the efficacy of the anti-viral drugs available was approximately 60% when they were used to prevent influenza A. No evidence was found on the efficacy of these drugs in human infection by the avian H5N1.

On the other hand, there are reports on the lack of efficacy of oseltamivir in patients infected by avian H5N1 treated at the Tropical Diseases Center of Hanoi.

Limitations to the use of neuraminidase inhibitors

The major drawbacks are related to the limited production capacity and the very high price, making these drugs unaffordable to many countries. Early diagnosis is also necessary, because these drugs act in the first 48 hours of infection. This adds to the fact that individuals with chronic conditions have a higher risk of complications when infected by influenza viruses and, moreover, several diseases, including fast progressing bacteremia may present with initial symptoms similar to influenza, which may make therapeutic decisions difficult.

It should be also taken into account that although adverse events are relatively rare, they may be severe, with a risk of increasing viral resistance to these drugs if utilized indiscriminately.

Precautions

Amantadine and rimantadine should not be used to treat seasonal influenza; likewise, due to their low efficacy, this recommendation is also extensive to neuraminidase inhibitors. Their utilization should be restricted to severe epidemic or pandemic, along with other public health measures.

Other precautions

Amantadine: may cause mydriasis, and therefore is not indicated in non-controlled glaucoma.

Zanamivir: there is risk of severe ad-

epidemia grave ou pandemia, junto com outras medidas de saúde pública.

Outras precauções

Amantadina: pode causar midríase, sendo, portanto, contra-indicada em glaucoma não controlado.

Zanamivir: há risco de eventos adversos graves como broncoespasmo, o que contraindica o seu uso em pessoas com asma. Há também relatos de edema facial e de orofaringe.

Oseltamivir: têm sido relatados náusea e vômitos, que diminuem de intensidade quando ele é tomado junto com alimentos.

Uso na gravidez: Nenhum ensaio clínico foi realizado com qualquer destes medicamentos durante a gravidez.

Em síntese

Em avaliação laboratorial, o vírus H5N1 é aparentemente suscetível à ação dos inibidores da neuraminidase. Entretanto, não é possível prever sua real efetividade nem o risco de surgimento de resistência com o uso em larga escala no caso de uma pandemia. Há relatos de não eficácia entre pacientes tratados no Vietnã, mas nestes casos não é possível excluir completamente a possibilidade de o oseltamivir ter sido administrado tardiamente. Por outro lado, já se sabe que algumas cepas de H5N1 aviária são resistentes a inibidores M2, embora não seja possível descartar a possibilidade de sua eficácia, se e quando esta cepa mudar para se adaptar melhor ao ser humano.

Não há estudo realizado com a associação destes medicamentos.

No caso de uma pandemia por variante do vírus H5N1 aviário e da dificuldade de se ter vacina eficaz disponível em tempo hábil, é possível que a utilização judiciosa e precoce de medicamentos antivirais possa proteger contra a infecção e diminuir as complicações em pacientes com doença aguda. Há muitas dúvidas quanto

verse events such as bronchospasm, which contraindicates its use in individuals with asthma. There have also been reports of facial and oropharynx edema.

Oseltamivir: nausea and vomiting—that are less intense when taken along with food—have been reported.

Use during pregnancy: No clinical trials have been carried out with any of these drugs during pregnancy.

In brief

The H5N1 virus is apparently susceptible to neuraminidase inhibitors in laboratory assessments. However, it is not possible to anticipate its efficacy or risk of resistance with large-scale use in the case of a pandemic. There are reports of non-efficacy in patients treated in Vietnam, although it is not possible to completely exclude the possibility of oseltamivir having been administered late in these cases. On the other hand, some strains of avian H5N1 are known to be resistant to M2 inhibitors, although it is not possible to rule out its efficacy, if and when these strains change to better adapt to man.

There are no studies on the association of these drugs.

In the case of a pandemic by an avian H5N1 virus variant and without an effective vaccine duly available, the cautious and early utilization of antiviral drugs may protect against infection and decrease complications in patients with acute disease. There are many questions as to the effectiveness, safety, possibility of emergence of resistance and on the manner of establishing monitoring mechanisms, and guaranteeing sufficient production of drugs and world access. The current WHO recommendation is to expedite efforts to develop an effective vaccine, and that countries organize to face a possible epidemic. Oseltamivir should be given early to treat respiratory infections suggestive of H5N1 in patients directly involved in bird breeding or care, in which the presence of the virus has already been proven.

à efetividade, segurança, possibilidade de aparecimento de resistência e sobre a maneira de estabelecer mecanismos de monitorização, assegurar produção suficiente de medicamentos e acesso mundial. A recomendação atual da OMS é que sejam agilizados os esforços para desenvolvimento de vacina eficaz e que os países se organizem para enfrentar a possível epidemia. Recomenda-se ainda que oseltamivir seja administrado precocemente para o tratamento de infecções respiratórias sugestivas de H5N1 em pacientes diretamente envolvidos com o trato ou criação de aves, onde já tenha sido comprovada a presença deste vírus.

5. Qual a perspectiva de preparação de uma vacina contra o vírus H5N1 no Brasil?

- Prof. Dr. Isaias Raw. Instituto Butantã/Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Alguns meses atrás, a Organização Panamericana de Saúde convocou uma reunião de produtores internacionais da vacina contra influenza e de alguns países. A agenda era a possível transferência de tecnologia dos produtores para instituições nacionais. A resposta era óbvia: a transferência, na qual os produtores não tinham interesse, era uma fantasia. Quem não tinha uma fábrica construída e montada, com equipamentos encomendados e importados (como uma ultracentrífuga preparativa industrial), não teria possibilidade de produzir vacina em menos de seis anos, quando a pandemia ou não ocorreu ou teria passado!

A única Instituição que estava na fase final de implantação da sua fábrica era o Butantã. A construção de cerca de 12.000 m² (incluído o piso técnico), apesar dos problemas usuais da licitação pública, estará pronta antes de Junho de 2006. Os equipamentos, adquiridos com recursos do Ministério da Saúde, já foram entregues e estão prontos para ser instalados e validados até outubro próximo. Os técnicos principais foram treinados e os demais

5. What are the prospects for preparing a vaccine for the H5N1 virus in Brazil?

- Prof. Dr. Isaias Raw. Butantã Institute / São Paulo State Health Department.

Some months ago, the Pan-American Health Organization (PAHO) called a meeting with some countries and international manufacturers of influenza vaccine. The agenda was the possible transfer of technology from manufacturers to national institutions. The answer was obvious: the transfer, in which manufacturers had no interest, was make-believe. Whoever did not own a plant built and set up with ordered and imported equipment (such as an industrial preparative ultracentrifuge), would not be able to manufacture vaccines in less than six years, when the pandemic would have either not happened or ended!

The only Institution in a final phase of implementing a plant was Butantã. The building of approximately 12,000 m² (including technical floor), despite the usual public bidding problems, will be ready before June 2006. The equipment, purchased with funds from the Ministry of Health, has been delivered and is ready to be installed and validated until next October. The most important technicians have been trained and the remaining employees are being hired by the State.

Technology has been totally transferred from Sanofi-Aventis, as part of the purchase of bulk vaccine strains, from 2000 to 2006. The formulated and bottled vaccines purchased by the Butantã Foundation, are being delivered to the Ministry for US\$ 1.60, half of the international cost, leading to savings of US\$150 million, with an investment of only 10 million in the plant!

In order to define vaccines for influenza, circulating strains are monitored every year, and after serotyping by domestic reference laboratories they are sent to the Center for Disease Control and Prevention, CDC, and other international labora-

funcionários estão sendo contratados pelo Estado.

A tecnologia está totalmente transferida da Sanofi-Aventis, embutida na aquisição das cepas de vacinas a granel, de 2000 a 2006. A vacina adquirida pela Fundação Butantã, formulada e envasada, vem sendo entregue ao Ministério por US\$ 1,60, metade do custo internacional, o que resultou numa economia de 150 milhões de dólares, contra um investimento na fábrica de apenas 10 milhões!

As vacinas contra influenza são definidas através de um acompanhamento das cepas circulantes a cada ano, que depois de sorotipadas pelos laboratórios de referência nacionais são enviadas ao Center for Disease Control and Prevention, CDC e outros laboratórios internacionais para seqüência completa do seus RNAs, o que permite analisar a evolução anual dos vírus no Hemisfério Norte e Sul e encomendar, via Organização Mundial da Saúde, OMS, os lotes sementes e reativos para sua dosagem, que são fornecidos aos produtores. Portanto, as vacinas são internacionalmente definidas e uniformes.

A produção da vacina H5N1 também é feita com a cepa padrão, definida pela OMS e alterada, só caso necessário, durante a evolução de uma possível pandemia. Esta cepa é reconstruída a partir do vírus aviário e atenuada pela substituição de dois aminoácidos.

A produção planejada pelo Butantã usa, como a maior parte dos produtores, ovos fecundados. Na vacina de cada ano é utilizado um ovo para produzir uma vacina tripla. Como a vacina, no momento, é oferecida gratuitamente para os maiores de 60 anos, população de risco, e ao corpo médico-sanitário exposto ao vírus, a demanda nacional é da ordem de 20 milhões de doses. O Brasil é o maior produtor mundial de aves, e a utilização de cerca de 30 milhões de ovos galados, em novembro, não afeta a disponibilidade para o mercado nacional e exportador, nem o preço.

A idéia inicial de que o cultivo do vírus H5N1 não poderia ser feita em ovos, pois

tries for complete RNA sequencing. This allows analyzing the annual development of the virus in the North and South Hemispheres and to order, through WHO, the seed batches and reagents for dosing, which are, in turn, supplied to manufacturers. In this fashion, vaccines are internationally defined and uniform.

The production of H5N1 vaccine is also performed with the standard strain, defined by the WHO and changed, only if necessary, during the development of a possible pandemic. This strain is reconstructed from the avian virus and it is attenuated by the replacement of two amino acids.

The production planned by Butantã uses, as is the case of most manufacturers, fertilized eggs. Every year, an egg is used to obtain a triple vaccine. Given the vaccine is currently offered free of charge for individuals over 60 years, the population at risk, and to the medical-sanitary staff exposed to the virus, the national demand has reached about 20 million doses. Brazil is the world's largest bird raiser, and using about 30 million fertilized eggs in November does not affect the supply to the domestic, neither exporter market or the price.

The initial idea that the culture of the H5N1 virus could not be done in eggs because it would kill the embryo, has been proven to be wrong with the strain produced by the WHO. Some multinational companies had bioreactors available for animal cells, but this is not a solution for Brazil. Brazil does not have experience in vaccine production using animal cell culture for human use, in order to manufacture vaccines for influenza (Butantã has a scale production, and is expanding the production of vaccines for rabies in Vero cells and erythropoietin CHO in cells with in-house technology. Other viral vaccines are not produced in the country). Culture media have to be imported (or at least their quality certified components) and at a much higher cost than eggs. If manufacturers chose an influenza vaccine pro-

mataria os embriões, mostrou-se, com a cepa produzida para a OMS, equivocada. Algumas empresas multinacionais tinham disponíveis grandes biorreatores para células animais, mas esta não é a solução para o Brasil. O Brasil não tem experiência na produção da vacinas para uso humano, em cultivo em células animais, para produzir a vacina contra influenza (o Butantã está produzindo em escala, ampliando a produção de vacinas contra a raiva em células Vero e eritropoetina em células CHO com tecnologia própria. Outras vacinas virais não são ainda produzidas no país). Os meios de cultura devem ser importados (ou pelo menos seus componentes com qualidade certificada) e a custo muito maior do que os ovos. Se os produtores optarem por vacina de influenza produzidos em células, o suprimento de componentes do meio de cultura não estaria garantido.

O Butantã optou por não esperar a planta de influenza, que já foi alterada para atender as exigências da OMS para produzir a vacina da pandemia. Num tempo recorde, com um investimento pequeno, mas fundamental, da Secretaria de Vigilância a Saúde, reconstruímos um laboratório experimental para iniciar a produção da vacina H5N1. Este laboratório deve iniciar a produção de lotes experimentais até junho próximo.

Inovações brasileiras na composição da vacina

O Butantã já estava preocupado com a redução da quantidade de antígeno para a vacina anual da influenza, visando reduzir o seu custo, o que permitiria incluir, todos os anos, as crianças de 1-2 anos. Na reunião da OPAS, citada acima, apresentamos os primeiros resultados do uso de adjuvantes, que incluem o tradicional hidróxido de alumínio e um monofosforil-lipídio A (MPLA), produzido por método original. Tanto o hidróxido de alumínio, como apenas 0,2 microgramas de MPLA, permitem utilizar apenas um quarto da dose. O uso de hidróxido de alumínio já foi

duced in cells, the supply of components of culture media could not be guaranteed.

Butantã decided not to wait for the influenza plant, which was already modified to meet WHO requirements for manufacturing a vaccine for a pandemic. In record time, with small, but fundamental investments from the Health Surveillance Department, we have rebuilt an experimental laboratory to start producing H5N1 vaccine. This lab will probably begin the production of experimental batches before next June.

Brazilian innovations in the composition of the vaccine

Butantã was already concerned with the reduction in the amount of antigen for the annual influenza vaccine, in order to reduce its cost. This would allow including 1-2 year-old children every year. During the PAHO meetings, mentioned above, we presented the first results of using adjuvant, which include the traditional aluminum hydroxide and a monophosphoryl-lipid A (MPLA), produced by an original method. Both aluminum hydroxide and only 02 micrograms of MPLA allow using only one fourth dose. Aluminum hydroxide has already been tried in 60 volunteers, showing that it is possible to use one fourth of the dose of influenza A vaccine. New trials are being programmed in lab animals and volunteers, using a vaccine to be administered next April to all the elderly, and the vaccination will be repeated as soon as we have a H5N1 vaccine.

The meaning of these studies is paramount. Every year we will be able to reduce the dose by a factor of four, with a comparable reduction in immunization costs. It is fundamental to equate public and free vaccination, which will always be expanded, according to costs. The influenza vaccine costs roughly US\$43 million a year, a figure that can be reduced to about 15 million. For comparison, the remaining vaccines manufactured by Butantã (DTP, hepatitis B, rabies, BCG), and which re-

ensaiado em 60 voluntários, demonstrando ser possível usar um quarto da dose da vacina contra influenza A. Novos ensaios estão sendo programados em animais de laboratório e voluntários, usando-se a vacina a ser administrada em abril próximo para todos os idosos e repetindo-se a vacinação tão logo tenhamos vacina H5N1.

A implicação destas pesquisas é muito importante. A cada ano poderemos reduzir a dose de um fator de quatro, com comparável redução do custo da vacinação. É fundamental equacionar a vacinação pública e gratuita, que estará sempre sendo ampliada, conforme o custo. A vacina de influenza custa cada ano cerca de 43 milhões de dólares, o que poderia ser reduzido para cerca de 15 milhões. Para comparação, as demais vacinas produzidas pelo Butantã (DTP, hepatite B, raiva, BCG), e que representam 83% das vacinas realmente produzidas no País, custam ao Ministério o equivalente a 14,3 milhões de dólares. A vacina recombinante contra hepatite B é entregue ao Ministério por menos de R\$ 0,80! A vacina *monovalente* contra rotavirus importada custou 55 milhões de dólares e em 2007-8 será substituída pela vacina pentavalente do Butantã a um custo significativamente menor.

Outra implicação é que a fábrica de vacina contra influenza do Butantã, que foi dimensionada para produzir 20 milhões de doses anuais, poderia produzir, cada semestre, 60 milhões de doses da vacina. Se a vacina H5N1 crescer na mesma proporção, teremos 180 milhões de doses. Testes realizados na Europa demonstraram que esta vacina é menos imunogênica, exigindo até 4 doses por pessoa. Se os adjuvantes funcionarem como o esperado, bastaria uma dose de 15 microgramas e teríamos a capacidade de produzir 60 milhões de doses por semestre. Nenhum país planeja vacinar toda a população e a meta no Hemisfério Norte é dispor de vacina para cerca de um décimo da população, que seria usada para bloquear a transmissão, se houver, de um paciente para os que entraram em contacto com ele e para o pessoal de saúde.

present 83% of vaccines actually produced in the Country, cost the equivalent to US\$14.3 million to the Ministry. The recombinant vaccine against hepatitis B is delivered to the Ministry for less than R\$ 0.80! The imported monovalent rotavirus vaccine costs US\$55 million and in 2007-8 it will be replaced by the Butantã pentavalent vaccine at a significantly lower cost.

Another implication is that Butantã's influenza vaccine plant, planned to yield 20 million annual doses, can produce 60 million vaccine doses per semester. If the H5N1 vaccine grows at the same rate, we will have 180 million doses. Tests performed in Europe have shown that this vaccine is less immunogenic, demanding up to 4 doses per individual. If the adjuvant works as expected, a 15-microgram dose will suffice, and we will have the capacity to produce 60 million doses per semester. No country has planned to vaccinate the entire population. The target of the Northern Hemisphere is to make the vaccine available for about one tenth of the population, in order to interrupt transmission, if it is the case, from one patient to those who have contact with him/her, and for healthcare staff.