

# **Produção de vacinas contra influenza de derivados recombinantes naturais de vírus influenza aviário**

## **Uma Provisória do Risco para a Biossegurança**

29 de maio de 2003

### **Introdução**

Os casos de 1997 e 2003 de infecções humanas pelo H5N1 em Hong Kong e os casos de 2003 de infecções humanas pelo H7N7 nos Países Baixos foram causados por vírus influenza aviários altamente patogênicos. Geralmente é aceito que nossa exposição contínua aos vírus influenza circulantes nas espécies aviárias domésticas e selvagens, apresente uma ameaça pandêmica e atualmente existem ações em todo o mundo para desenvolver medidas profiláticas de emergência para a influenza pandêmica. Será necessário rapidamente desenvolver cepas vacinais seguras capazes de crescerem em ovos ou células de mamíferos tão breve como uma sinal de perigo pandêmico seja percebido e produzir vacina de acordo com a demanda epidemiológica. Esta avaliação de risco provisória é intencionada para fornecer diretrizes para os fabricantes de vacinas para a produção de lotes pilotos de vacina para uso experimental. Cada fabricante deve se preparar para avaliar o risco, levando em conta as práticas locais de trabalho, as medidas de controle de biossegurança locais e as medidas de controle ambiental locais. Os exemplos usados nesta avaliação de risco se relacionam a um projeto de desenvolvimento de vacina contra o H5N1, porém os argumentos são aplicáveis à produção de vacina de qualquer vírus com potencial pandêmico. À medida que mais informações se tornarem disponíveis, a avaliação do risco será atualizada e surgindo a necessidade para a produção de vacina em larga escala, será produzida uma avaliação de risco revisada.

O genoma do vírus influenza consiste de 8 segmentos. É provável que um recombinante natural de alto crescimento fornecerá a base para o desenvolvimento da vacina pandêmica. O recombinante natural conterá as proteínas hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) do novo vírus aviário ou humano e as 6 proteínas restantes derivadas de um vírus influenza humano como o A/PR/8/34 (H1N1). Se um vírus apatogênico adequado estiver disponível, os recombinantes naturais podem ser produzidos por tecnologia convencional. No evento de que nenhuma cepa apatogênica adequada esteja disponível, o vírus vacinal será um recombinante natural contendo a HA e um

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

vírus influenza altamente patogênico, onde o gene HA tenha sido modificado para remover o aminoácidos multi-básicos no peptídeo de conexão da HA. As modificações para a HA serão feitas para remover os determinantes conhecidos de alta patogenicidade. Os recombinantes naturais serão produzidos por genética reversa usando uma estratégia de 8 plasmídios ou 12 plasmídios.

### **Sistema de 8 plasmídios**

Oito plasmídios, cada codificando um dos genes do vírus influenza estarão sob a direção do sistema de expressão pol I - pol II.

### **Sistema de 12 plasmídios**

Oito plasmídios, cada codificando um dos genes do vírus influenza estarão sob a direção do sistema de expressão pol I. Quatro plasmídios expressarão as proteínas PB1, PB2, PA e NP.

### **Resgate do vírus**

O vírus será resgatado da transfecção plasmídica de uma linha de célula Vero aprovada para a produção de vacina humana. O vírus recombinante natural conterá seis segmentos do gene interno do vírus PR8 e a NA e segmento HA modificado de um vírus aviário. O vírus subsequente será crescido em ovos ou em células de mamíferos.

### **Teste de patogenicidade**

A patogenicidade viral será avaliada em galinhas e furões<sup>1</sup>.

### **Produção da vacina**

***Cada companhia descreverá com brevidade seu próprio processo de produção.***

### **Identificação do risco**

#### **Riscos associados com o vírus recipiente**

O vírus influenza recipiente será a cepa humana PR8. Este é um vírus que tem tido passagens extensivas em camundongos, furões e ovos de galinha. O resultado dessa história de passagem é quase completa inabilidade de replicação no homem e completa atenuação para o homem (Beare et al, 1975).

---

<sup>1</sup> Animal também chamado doninha.

A razão para a seleção do PR8 é sua capacidade para crescimento alto e não apenas em células de mamíferos, porém também em ovos embrionados de galinha. Sempre desde o final da década de 60 o vírus PR8 vem sendo usado para produzir “recombinantes naturais de alto crescimento” em combinação com a cepa vacinal do influenza A prevalente e o uso desses recombinantes naturais como cepa vacinal tem aumentado a produção em várias vezes. Esses recombinantes naturais como cepas vacinais têm sido produzido por uma combinação de infecção mista de ovos com PR8 e a cepa vacinal e um sistema de seleção baseado no uso do anticorpo anti-PR8 e crescimento em alta diluição.

Não existem riscos para a saúde humana pelo vírus PR8.

### **Perigos de elevação do produto genético inserido**

Os produtos dos genes inseridos serão a HA e NA modificadas de um vírus H5N1. A HA terá sido modificada de forma que os aminoácidos multi-basais no peptídeo de conexão à HA serão reduzidos a um simples aminoácido básico. Essas proteínas influenza isoladamente não são inerentemente infecciosas ou prejudiciais.

### **Perigos de elevação da alteração dos traços patogênicos existentes**

A proteína HA do influenza inserida tem especificidade por receptores do ácido siálico nas moléculas de superfície celular. As HAs presentes nos vírus influenza A humanos preferencialmente se ligam aos receptores celulares contendo resíduos do ácido siálico vinculado ? 2, 6, enquanto que os vírus influenza aviários preferencialmente se ligam ao ácido siálico vinculado ? 2, 3 (Rogers e D’Souza, 1989). As células traqueais humanas têm principalmente resíduos ? 2, 6 (Nelson et al, 1993), conseqüentemente a aquisição de uma HA aviária por um vírus PR8 é esperada que minimize o potencial de ligação às células epiteliais respiratórias humanas. Embora a especificidade do receptor ? 2, 3 de vírus aviários reduzirá a eficácia dessa ligação. Pode não completamente prevenir a infecção no homem. Beare e Webster (1991) tiveram êxito na infecção de voluntários com uma variedade de vírus influenza aviários, embora a replicação tenha sido pobre. Entretanto Beare e Webster observaram que quantidades extremamente grandes de vírus avários (entre  $10^{6.8}$  e  $10^{9.2}$  doses infecciosas aos ovos) tenham sido necessárias para a replicação no homem e que não foi possível induzir a transmissão pessoa-a-pessoa. Em 1997, infecções humanas com um vírus H5N1 aviário também teve lugar em Hong Kong, embora a replicação desses casos tenha sido muito melhor, provavelmente devido à natureza virulenta do vírus. Em Hong Kong, as pessoas foram expostas a altos títulos de vírus H5N1 em fezes contaminadas, o que pode ter sido uma das razões para a transmissão dos pássaros ao homem. Entretanto, como nos estudos experimentais, houve pouca transmissão pessoa-a-pessoa ou nenhuma do vírus H5N1 em 1997. Isto também foi o caso com a ocorrência mais limitada

de infecção humana com o vírus aviário H9N2 em 1999. Conseqüentemente na conclusão, a presença de uma HA H5 na superfície do vírus recombinante natural PR8 x H5N1 é provavelmente a apresentação de ligação extremamente fraca nas células humanas com probabilidade muito baixa de infecção humana.

A proteína HA do vírus influenza deve ser dividida em HA1 e HA2 pelas proteases da célula hospedeira para uma infecção produtiva. A patogenicidade dos vírus influenza A H5 e H7 para aves domésticas é amplamente determinada pela presença de aminoácidos multi-básicos no peptídeo de conexão a HA. As HAs dos vírus altamente patogênicos podem efetivamente se dividir por proteases, que são expressas na maioria dos organismos de pássaros e homem. Entretanto, as HAs dos vírus não patogênicos contêm um resíduo único básico no peptídeo de conexão que pode apenas ser dividido por tripsina tipo proteases que estão restritas a certos tipos de célula, p.. ex. células epiteliais que revestem o trato respiratório humano e o intestino dos pássaros. Conseqüentemente a HA divisível determina a especificidade do tecido e é o principal determinante da patogenicidade. Têm se obtido evidências diretas de que a divisão da HA e a especificidade do receptor HA tem um efeito sobre o tropismo tissular de um vírus H7N1 aviário, A/Fowl Plague/Rostock/34 em embriões de galinha, camundongos e furões esteve diretamente relacionada à posse de aminoácidos multi-base. Estudos realizados na OMS em Tóquio (M Tashiro, dados não publicados), têm demonstrado que a remoção dos aminoácidos básicos alterou as infecções pelo H5N1 de uma infecção sistêmica fatal para uma infecção localizada não patogênica em galinhas, camundongos e furões. Hatta et al (2001) tem também demonstrado por engenharia genética reversa que a alta divisibilidade do HA H5N1 devido à presença de aminoácidos multi-bases foi uma exigência essencial para uma infecção letal em camundongo. De certo, não é possível examinar a patogenicidade da infecção pelo vírus influenza no homem, porém um exame de vírus H5N1 por Gao et al (1999) tem fornecido evidências de que a patogenicidade em camundongos é semelhante em humanos. A ocorrência de falência múltipla de órgãos após infecções pelo H5N1 é sugestiva de um tropismo tissular não usual, porém nenhuma evidência para a replicação viral for a do pulmão tem sido encontrada (To et al, 2001). Conseqüentemente as evidências disponíveis sugerem que a virulência dos vírus H5N1 de 1997 para o homem esteve relacionada à presença de aminoácidos multi-básicos. Conseqüentemente é considerado aconselhável remover os aminoácidos básicos da HA do vírus H5N1 de 2003 a fim de reduzir o potencial para lesão ao homem. Este procedimento também aumentará a segurança dos recombinantes naturais para as espécies aviárias (ver posteriormente sob avaliação do risco ambiental).

A escolha da cepa PR8 para a recombinação natural é também por causa de sua atenuação comprovada para o homem. As informações publicadas indicam que um recombinante natural PR8 com um genótipo 6:2 (6 segmentos do PR8, HA e NA de um vírus influenza humano do tipo selvagem é avirulento no homem (Florent, 1980; Beare e Hull, 1971; Beare et al, 1975; Oxford et al, 1978). De

fato Florent et al (1977) e os estudos realizados pela OMS em Tóquio (M Tashiro, dados não publicados) têm mostrado que o grau de atenuação aumenta à medida que os recombinantes naturais incluem mais genes PR8. Neste projeto, os recombinantes naturais derivaram do vírus H5N1 de 2003 conterão seis dos oito genes virais do PR8 que é o máximo alcançável dentro do alvo científico do trabalho. Espera-se conseqüentemente que um recombinante natural carregando 6 genes internos do vírus PR8 e a NA e a HA modificada do vírus H5N1 também serão atenuados para o homem.

Todas as evidências acima sobre a replicação viral no homem é baseada em recombinantes naturais com HAs derivadas de vírus influenza humanos, que preferencialmente se ligam à células receptoras abundantes no epitélio respiratório humano (2, 6 vinculado a resíduos do ácido siálico). Os recombinantes naturais criados neste projeto contêm uma HA do H5 aviário que tem uma preferência pelo 2, 3 vinculada a resíduos, de forma que se tem pouca expectativa de que os recombinantes naturais H5N1 serão capazes de se ligar e replicar em células humanas. Embora esteja claro na experiência de Hong Kong de 1997 que os vírus influenza H5N1, os quais exibem a especificidade ao ácido siálico a 2, 3 puderam se replicar em humanos, deve se observar que a patogenicidade do vírus influenza não depende unicamente da HA, porém é uma peculiaridade poligênica e o vírus H5N1 de 1997 tinha genes PB2 e NS1 não usuais que influenciaram a patogenicidade. As alterações no gene PB2 dos vírus H5N1 de 1997 foram suficientes para atenuá-los em camundongos (Hatta et al, 2001) e as alterações na proteína NS1 tornou esses vírus resistentes aos efeitos de interferons e outras citocinas produzidas como parte de uma resposta imunológica natural (Seo et al., 2002). As alterações do NS1 conferiram um fenótipo altamente virulento que permitiu a replicação para continuar incontrolado in vivo. Neste caso mesmo um vírus com pouca afinidade para seu receptor foi capaz de se replicar (embora não se transmitir). Em contraste, os vírus com a constelação genética interna PR8 são claramente sensíveis às restrições imunológicas naturais que prevenirão o estabelecimento de infecção por um vírus aviário em humanos. Isto pode bem explicar o por que nos surtos de influenza aviário antes de 1997, nenhuma evidência de transmissão de pássaros ao homem vem sendo observada e também o porque durante muitos anos de manejo laboratorial de altos títulos de vírus aviário (um dos quais [A/FPV/Dobson] sabe-se conter um gene que se adapta para replicação em células de mamífero), nenhum trabalhador tem aparentemente sido afetado por esses vírus (Almond, 1977).

**O recombinante natural H5N1 x PR8 criado neste projeto não conterá a constelação genética considerada necessária para a patogenicidade em galinhas, camundongos e furões.**

Os recombinantes derivados de PR8 vêm sendo usados rotineiramente para a produção de vacinas inativadas contra o influenza nos últimos 30 anos. Este trabalho envolve a produção de muitos milhares de litros de fluido alantóide de

ovos infectados, que criará aerossóis substanciais de vírus recombinante naturalmente dentro das plantas de fabricação. A maioria dos recombinantes naturais foram feitos a partir de cepas humanas do tipo selvagem que não tinham ainda se circulação ampla. Conseqüentemente, embora o pessoal da fabricação estivesse suscetível à infecção pelo vírus do tipo selvagem, não têm ocorrido casos anedóticos ou documentados de doença humana relacionada ao trabalho, resultante da exposição aos recombinantes naturais. Isto é mais um testemunho para a atenuação dos recombinantes naturais PR8.

A estabilidade genética dos vírus recombinantes naturais é um importante ponto considerando que os vírus aviários H5 e H7 do tipo selvagens não patogênicos são a fonte de vírus altamente patogênicos. Os estudos de um recombinante natural H5N3 não patogênico entre A/Goose/Hong Kong/437/99 e PR8 não têm mostrado evidências de reversão à virulência (galinhas, camundongos e furões) após 10 passagens em ovos in eggs (R Webster, dados não publicados).

**Os vírus H5N1 recombinantes naturais serão avaliados e considerados negativos para a patogenicidade no teste estatutório de patogenicidade intravenosa em galinhas (índice PIV de 1,2 ou menos) e em furões (sintomas clínicos e de replicação viral consistentes com aqueles induzidos pelo vírus atenuado parente [p. ex.: PR8] e distintos da infecção pelo vírus aviário H5N1). Os testes para a segurança em camundongos podem também ser realizados. Os vírus recombinantes naturais podem então ser distribuídos aos fabricantes de vacina.**

Os furões têm sido extensivamente usados como um bom indicador de virulência do vírus influenza para o homem (revisado por Smith e Sweet, 1988). Tipicamente, os vírus influenza humanos causam letargia, corrimento nasal e ocasionalmente febre e a replicação viral é limitada ao sistema respiratório. O vírus PR8 tem sido avaliado em furões e causa poucos ou nenhum sintoma e a replicação viral é limitada ao trato respiratório superior. Entretanto o vírus H5N1 de 1997 em Hong Kong replicou por todo o corpo, causou febre, perda de peso e ocasionalmente morte (Zitzow et al, 2002). Assim, nos termos de prognosticar uma infecção humana altamente patogênica ou uma infecção que seja atenuada para o homem, o furão é o melhor modelo disponível.

### **Riscos potenciais da seqüência ser transferida a microrganismos relacionados**

Os vírus influenza facilmente trocam os genes pelo processo de recombinação natural. Assim existe uma possibilidade teórica de que as recombinações naturais secundárias poderão ocorrer no recombinante H5N1 x PR8 recentemente criado e naturalmente ocorrerem vírus influenza animais ou humanos. Embora seja considerado que o recombinante natural H5N1 x PR8 não será infeccioso e atenuado para o homem, um recombinante secundário com um vírus influenza humano, pode ser infeccioso para o homem e possui

uma ameaça epidêmica. Geralmente considera-se tecnicamente difícil produzir recombinantes in vitro e apenas poucos laboratórios no mundo têm sucesso com essa técnica. Além disso, a chance de produção de recombinantes naturais entre os vírus aviários e mamíferos é extremamente pequena, como foi demonstrado por uma falta de sucesso na produção de vacina recombinante H5N1 em 1997 (Reino Unido, vírus suínos e aviários; Austrália e EUA, vírus aviários e PR8). Quando essas dificuldades são consideradas, juntas com o provável evento de que as medidas de contenção laboratorial permitiria um vírus H5N1 x PR8 de infectar o homem e produzir um recombinante natural, o risco desse evento é baixo. Deve também ser considerado que os criadores de aves domésticas e porcos são continuamente expostos aos vírus influenza animais e tem ocorrido poucos casos documentados de infecção humana com um recombinante natural entre um vírus aviário e o vírus influenza humano. O risco desses recombinantes naturais para as espécies animais serão consideradas na seção sobre a avaliação do risco ambiental.

### **Possibilidade de dano a saúde humana**

Por probabilidade de uma especificidade do receptor aviário, a atenuação do PR8 e perda dos aminoácidos multi-básicos no peptídeo de conexão a HA, espera-se que o recombinante natural H5N1 x PR8 não será capaz de infectar o homem ou causar dano à saúde humana. Como descrito acima, existe uma possibilidade remota de recombinação natural com vírus humanos normais e esses recombinantes pode ser competentes quanto à replicação no homem, embora as barreiras do receptor aviário ainda atuariam para restringir a infecção. Em uma situação extrema esse recombinante se tornaria bem adaptado à infecção humana e causaria atividade epidêmica ao redor do mundo.

Entretanto a probabilidade desse evento é pouca.

### **Determinação de um nível provisório de contenção**

O vírus parental PR8 é um agente biológico do grupo 2 de perigo e a HA do vírus H5N1 será submetido à engenharia genética de forma que o vírus resgatado não será patogênico. O nível provisório de contenção será Biossegurança nível 2+ (BSN2 com controles adicionais no local, ou seja, BSN2+).

### **Natureza do trabalho e revisão das medidas de controle para salvaguardar a saúde humana**

***Cada laboratório deve revisar suas próprias medidas de controle à luz do futuro e a natureza das instalações laboratoriais, entretanto os itens seguintes podem ser usados como guia:***

- ? De modo ideal um laboratório BSN2+ deve ser mantido em uma pressão negativa em relação à atmosfera e todas as manipulações virais fora de containers selados devem ser feitas dentro de uma cabine de segurança microbiológica. Entretanto isto pode não ser possível em um ambiente de fabricação e medidas alternativas de controle podem ser necessárias:
  - o Uso de sistemas adequados de barreira
  - o Onde manipulações virais em uma bancada aberta são inevitáveis, o pessoal deve ser protegido pelo uso de respiratórios de face altamente poderosos, equipados com filtros HEPA.
  - o Considerações devem ser dadas à profilaxia antiviral para o pessoal na área de produção e àqueles em áreas adjacentes..
- ? O banho não é necessário, considerando que roupas protetoras e procedimentos de lavagem das mãos são normalmente considerados adequados para proteger a saúde humana e o ambiente para este nível de perigo.
- ? Não deve existir necessidade de inativar o efluente da bacia de mãos e pias, porque qualquer efluente líquido de pias deve ter sido desinfectado por procedimentos validados e existe pouco risco de efluentes de lavagem das mãos apresentarem um perigo ao ambiente.

Um código de prática para o trabalho deve ser preparado, com as características chaves abaixo:

- ? Procedimentos para prevenir exposição do recombinante natural H5N1 aos vírus influenza animais e humanos. O pessoal deve ter recebido uma vacina convencional contra o influenza para limitar a suscetibilidade à infecção pelos vírus humanos normais. Se lotes pilotos de vacina H5 estiverem disponíveis, o pessoal deve recebê-los. Deve existir uma Política de Saúde Ocupacional para a profilaxia antiviral ou para tratamento pós-exposição acidental ao vírus recombinante natural H5N1.
- ? Revisão de todas as práticas de trabalho para minimizar a criação de aerossóis do vírus vacinal.
- ? Procedimentos para a descontaminação segura de rejeitos e equipamento.
- ? Procedimentos de emergência (p. ex.: derramamentos) documentados.
- ? Programa de treinamento documentado do pessoal.

## **Perigos ambientais e quais medidas adicionais de controle necessárias**

Os vírus influenza são capazes de infectarem naturalmente uma variedade de espécies animais (pássaros, porcos, cavalos, o homem, mamíferos aquáticos, furões), embora existam restrições por parte do hospedeiro que limitam o leque de hospedeiros para certos subtipos de vírus. Considerando que o recombinante natural H5N1 terá uma especificidade pelo receptor aviário, os pássaros seriam as espécies teoricamente mais suscetíveis. Qual seria a contribuição dos genes internos PR8 para replicação e virulência em pássaros? Brown et al (2001) demonstrou que a adaptação de um vírus influenza H3N2 para virulência aumentada em camundongos, poderia resultar em uma variedade de mutações em genes virais diferentes. Três mutações do H3N2 foram comuns com o vírus H5N1 de Hong Kong e uma (PA -556) foi compartilhada com o vírus PR8. Assim poderia ser argüido que a aquisição dos genes PR8 pode indicar risco aumentado para animais. Entretanto Hatta et al (2002) tem demonstrado recentemente pelo uso de genética reversa, que a aquisição de apenas um gene PR8 por um vírus influenza aviário anula a replicação viral em patos. Baseado neste trabalho, um vírus aviário com seis genes internos do vírus PR8 não seria esperado se replicar em pássaros. De fato as evidências experimentais têm demonstrado que o vírus PR8 é atenuado em não apenas o homem (já discutido), mas também as galinhas (Subbarao et al 2003). Além disso, um recombinação natural entre o PR (genes internos) e o vírus H5N1 de Hong Kong (NA e HA com aminoácido básico único) foi apenas capaz de se replicar em galinhas e não foi letal. Estudos similares têm sido realizados com o vírus H5N1 de Hong Kong de 2003 no WHO CC Memphis (R Webster, dados não publicados), onde o recombinante PR8 não replicou ou causou sinais de doença em galinhas. A remoção dos aminoácidos multi-básicos dos recombinantes H5 x PR8 em ambos os estudos indubitavelmente desempenhou um papel na redução do risco para as galinhas.

É concebível que os porcos sejam suscetíveis à infecção pelo recombinante natural H5N1, considerando que os vírus com especificidade a receptor aviário são conhecidos como replicadores nesta espécie. É também possível que essas espécies seriam suscetíveis a recombinações naturais secundários entre o vírus recombinante natural H5N1 e vírus suíno. De fato existe evidência que recombinações naturais triplices entre os vírus influenza aviários, suínos e humanos podem circular em porcos nos EUA (Webby et al, 2000).

***Cada laboratório avalia o risco de infecção aviária ou suína baseado na probabilidade de espécies aviárias ou suínas na vizinhança e controles de laboratório em uso.***

O código de laboratório para este trabalho previne que o trabalho seja realizado com outros vírus influenza animais no momento do trabalho de recombinação,

de forma que o risco de eventos de recombinação adicional dentro do laboratório seja eliminado.

É também sabido que os camundongos podem ser experimentalmente infectados por alguns vírus influenza e a cepa do PR8 é conhecida como letal para camundongos. Não se conhece se o recombinante H5N1 será capaz de replicar em camundongos, porém etapas devem ser seguidas para prevenir a exposição de camundongos selvagens e fuga dos camundongos do laboratório.

***Cada laboratório comenta as medidas de controle de roedores no local***

Conseqüentemente, em resumo, não existem medidas adicionais necessárias para proteção ambiental.

**Designação do nível de contenção**

BSN2+

## **Referências**

Almond, JW. (1977) A single gene determines the host range of influenza virus. *Nature* 270: 617-618.

Beare, AS and Hall, TS. (1971). Recombinant influenza A viruses as live vaccines for man. *Lancet*, 1271-1273.

Beare, AS, Schild, GC and Craig, JW. (1973). Trials in man with live recombinants made from A/PR/8/34 (H0N1) and wild H3N2 influenza viruses. *Lancet*, 729-732.

Beare, AS, and Webster, RG. (1991). Replication of avian influenza viruses in humans. *Arch. Virol.* 119: 37-42.

Brown, EG, Liu, M, Changkit, L, Baird, S and Nesrallah, M. (2001). Patterns of mutation in the genome of influenza A virus on adaptation to increased virulence in the mouse lung: identification of functional themes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 6883-6888.

Feldmann, A, Schäfer, MKH, Garten, W and Klenk, HD. (2000). Targeted infection of endothelial cells by avian influenza virus A/FPV/Rostock/34 (H7N1) in chicken embryos. *J. Virol.* 74: 8018-8027

Florent, G. (1980). Gene constellation of live influenza A vaccines. *Arch. Virol* 64: 171-173.

Florent, G, Lobmann, M, Beare, AS and Zygraich, N. (1997). RNA's of influenza virus recombinants derived from parents of known virulence for man. *Arch. Virol.* 54: 19-28.

Gao, P, Watanabe, S, Ito, T, Goto, H, Wells, K, McGregor, M, Cooley A, J and Kawaoka, Y. (1999). Biological heterogeneity, including systemic replication in mice, of H5N1 influenza A virus isolates from humans in Hong Kong. *J. Virol.* 73: 3184-3189.

Hatta, M, Gao, P, Halfmann, P and Kawaoka, Y. (2001). Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* 293: 1840-1842.

Hatta, M, Halfmann, P, Wells, K and Kawaoka, Y. (2002). Human influenza A viral genes responsible for the restriction of its replication in duck intestine. *Virology* 295: 250-255.

Nelson, J, Couceiro, JNSS, Paulson, JC and Baum, LG. (1993). Influenza virus strains selectively recognise sialoligosaccharides on human respiratory

epithelium: the role of the host cell in selection of haemagglutinin receptor specificity. *Virus Res.* 29: 155-165.

Oxford, JS, McGeoch, DJ, Schild, GC and Beare, AS. (1978). Analysis of virion RNA segments and polypeptides of influenza A virus recombinants of defined virulence. *Nature* 273: 778-779.

Rogers, GN and D'Souza, BL. (1989). Receptor binding properties of human and animal HI influenza virus isolates. *Virology* 173: 317-322.

Seo, S H. (2002). Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nature Medicine.* 9: 950-954.

Smith, H and Sweet, C. (1988). Lessons for human influenza from pathogenicity studies in ferrets. *Rev. Infect Dis.* 10: 56-72.

Subbarao K, Chen, H, Swayne, D, mingay, L, Fodor, E, Xu, X, Lu, X, Ka, J, Cox, N, Matsuoka, Y. (2003). Evaluation of a genetically modified reassortant H5N1 influenza A virus vaccine candidate generated by plasmid-based reverse genetics. *Virology.* 305: 192-200.

To, K, Chan, PKS, Chan, K, Lee, W, Lam, W, Wong, K, Tang, NLS, Tsand, DNA, Sung, RYT, Buckley, TA, Tam, JS and Cheng, AF. (2001). Pathology of fatal human infection associated with avian influenza A H5N1 virus. *J. Med. Virol* 63: 242-246.

Webby, RJ, Swenson, SL, Krauss, SL, Gerrish, PJ, Goyal, SM and Webster, RG. (2000). Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *J. Virol.* 74: 8243-8251.

Zitzow, LA, Rowe, T, Morken, T, Shieh, W, Zaki, S and Katz, JM. (2002). Pathogenesis of avian influenza A (H5N1) viruses in ferrets. *J. Virol* 76: 4420-4429

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)