

Tecnologia de Vacinas Virais

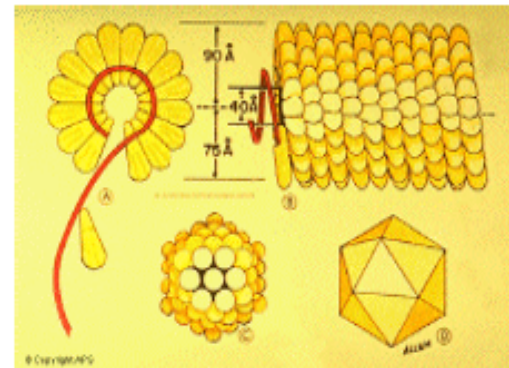
Vírus, Raiva, Influenza e Rotavírus

Características Gerais dos Vírus


- são agentes filtráveis
- **são parasitas intracelulares obrigatórios**
- são incapazes de produzir energia ou proteínas independentemente de uma célula hospedeira
- multiplicam dentro de células vivas usando a maquinaria de síntese das células

Características Gerais dos Vírus

- Tamanho pequeno e variável - 10 a 300 nm (ME)
- Material genético - DNA ou RNA (ss ou ds)
tamanho variável
- Capsídeo (protéico)
- Envelope (lipoprotéico)
- Vírus complexos



Características Gerais dos Vírus

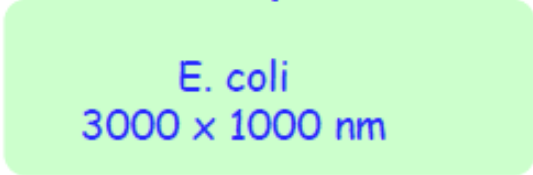


Vírus do Mosaico do tabaco
250x18 nm



Clamídia
1.000 nm

Bactérias:
1 a 3 μm



E. coli
3000 x 1000 nm



Poxvirus
300x200x100 nm

Cel. animais:
10 a 20 μm

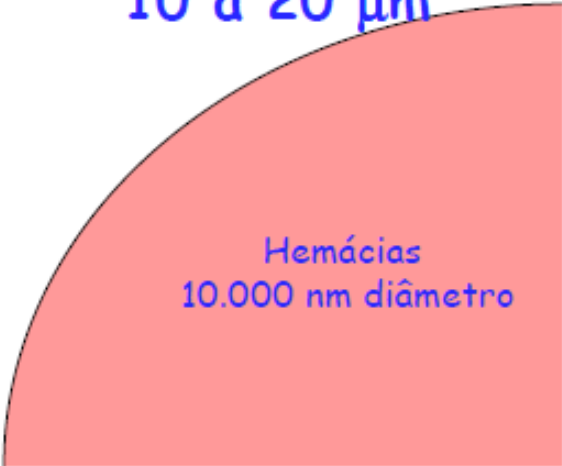


Poliovirus
30 nm



Adenovirus
90 nm

Vírus:
10 a 300 nm



Hemácias
10.000 nm diâmetro

Características Gerais dos Vírus

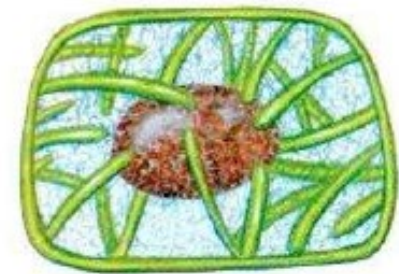
mosaico do fumo



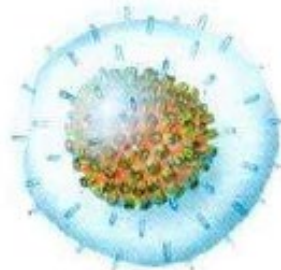
pólio



adenovírus



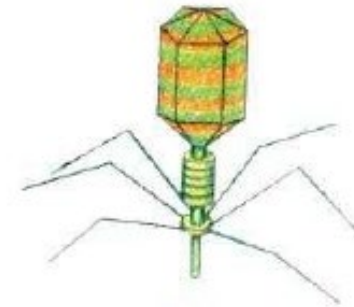
variola



herpes



gripe



bacteriófago

Características Gerais dos Vírus

Ácido Nucléico:

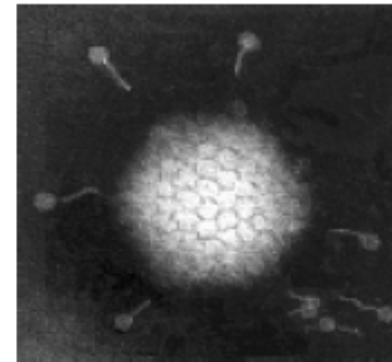
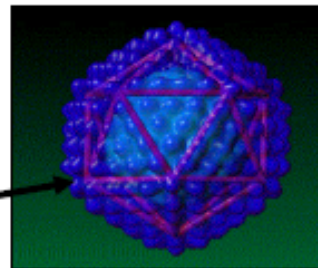
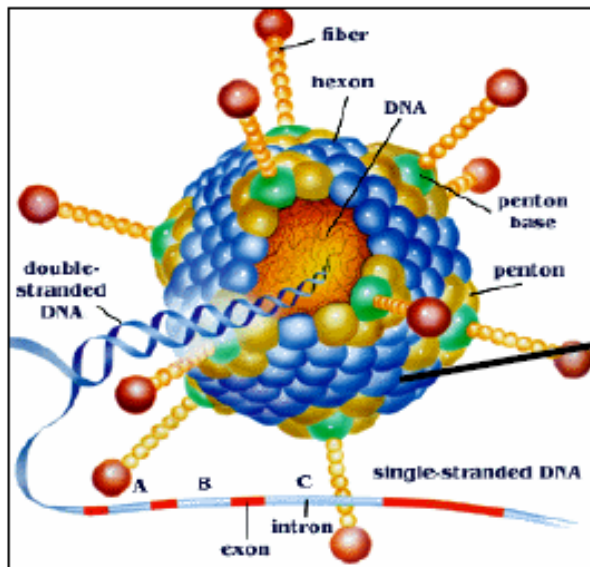
- DNA ou RNA
- ✓ Fita simples
- ✓ Fita dupla
- ✓ Dupla fita parcial (hepadnaviridae)

Capsídeo (protéico)

- Grupamento de proteínas virais (protômeros)
da a simetria
- ✓ Icosaédrica
- ✓ Helicoidal

Envelope (lipoprotéico)

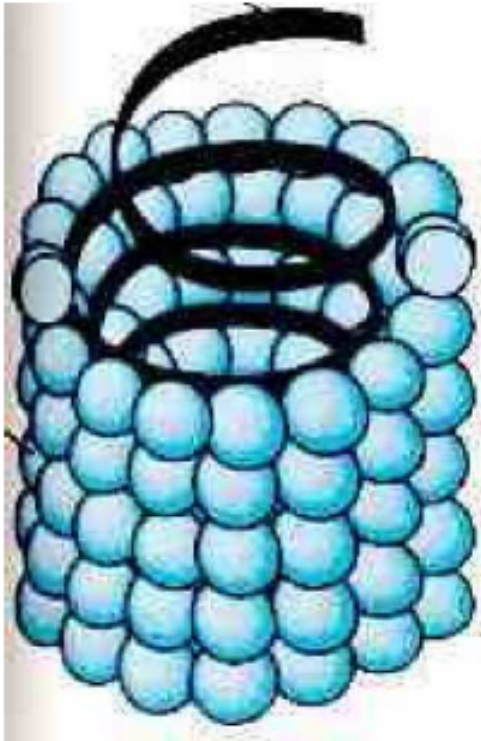
SIMETRIA ICOSAÉDRICA



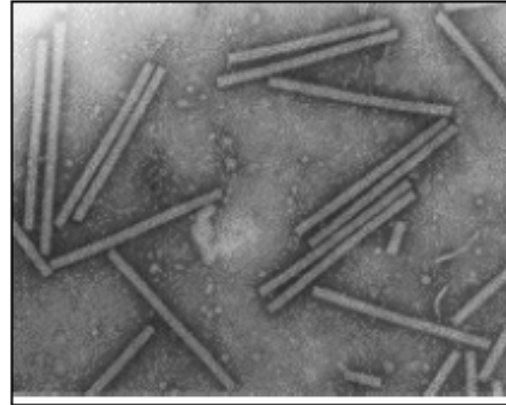
Micrografia eletrônica do Adenovírus 2 (NÃO ENVELOPADO)

Esquema do Adenovírus 2

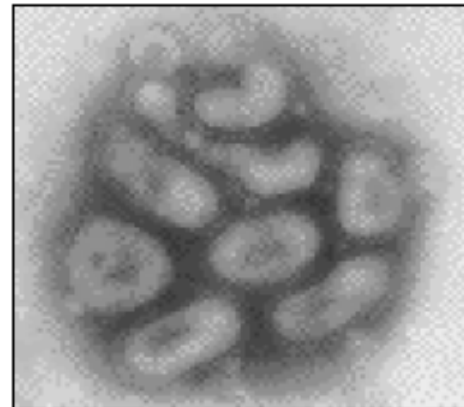
SIMETRIA HELICOIDAL



Esquema de vírus com capsídeo de simetria helicoidal

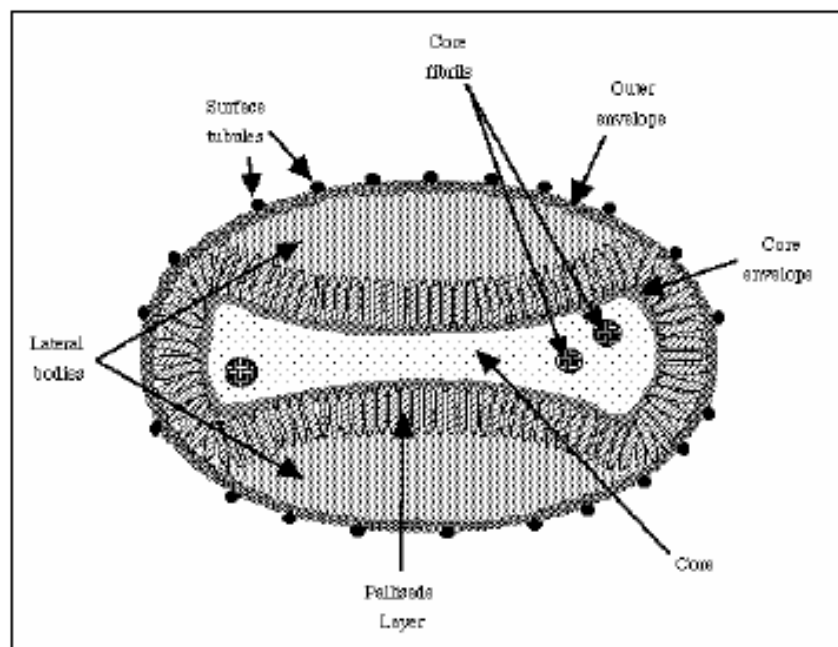


Micrografia eletrônica do vírus do mosaico do tabaco - **NÃO ENVELOPADO**

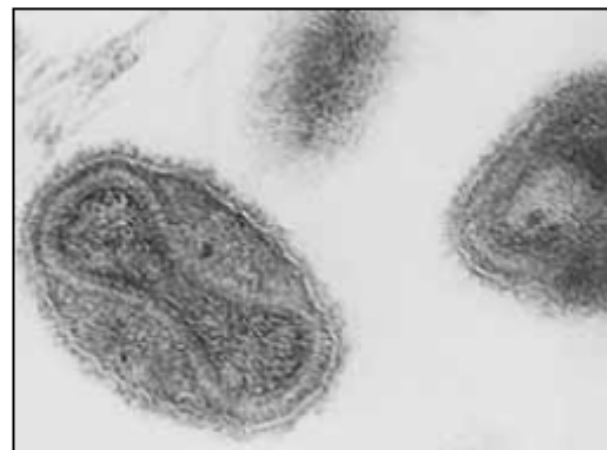


Micrografia eletrônica do vírus de influenza - **ENVELOPADO**

SIMETRIA COMPLEXA



Esquema do vírus da varíola



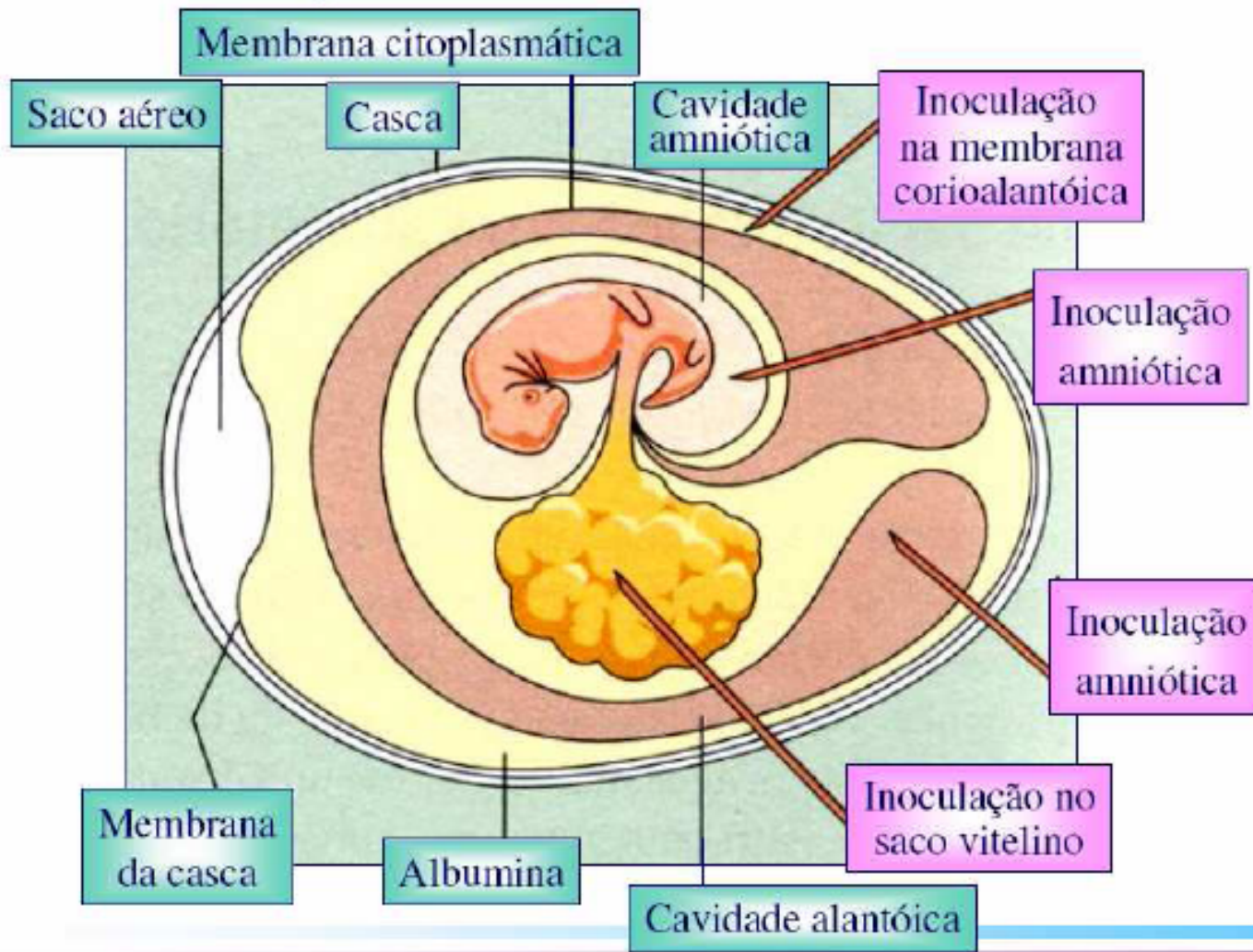
Micrografia eletrônica vírus da Varíola

CULTIVO DE VÍRUS ANIMAIS DE LABORATÓRIO



CULTIVO DE VÍRUS

OVOS EMBRIONADOS DE GALINHA



CULTIVO DE VÍRUS

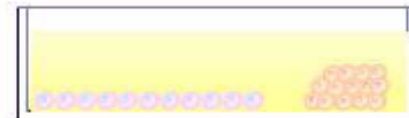
CULTURA DE CÉLULAS PRIMÁRIAS OU DE LINHAGEM



☆ Tratamento de tecidos
com enzima

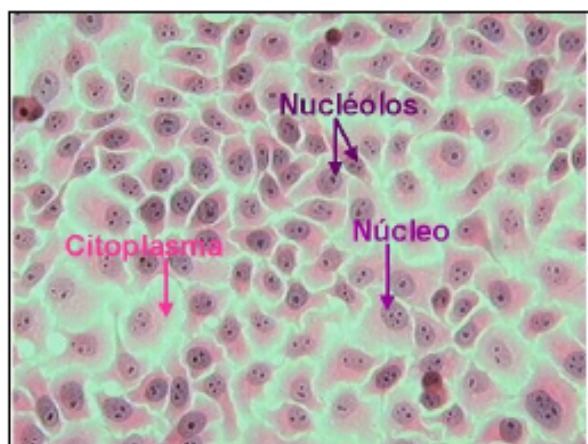


⌚ Suspensão de células
em meio de cultura



⌚ Formação de monocamadas
e células transformadas

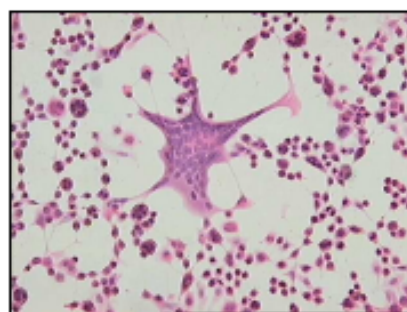
EFEITO CITOPÁTICO



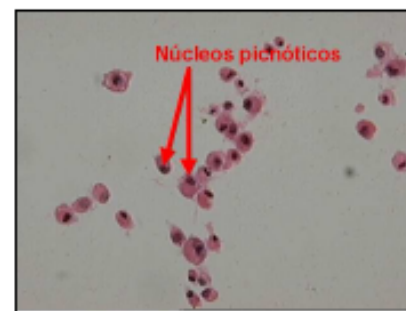
Cultivo de células de rim de macaco corado com HE



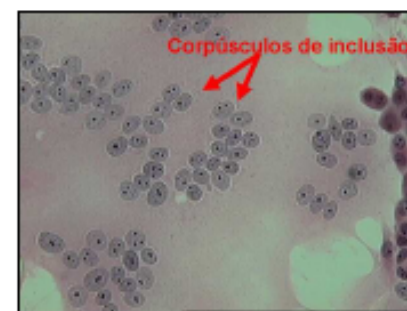
Cultivo de células de rim de macaco infectadas com vírus vaccinia corado com HE



Cultivo de células de rim de macaco infectadas com vírus Herpes simplex corado com HE



Cultivo de células de rim de macaco infectadas com poliovírus corado com HE



Cultivo de células de rim de macaco infectadas com vírus Sarampo corado com HE

TIPOS DE VACINAS VIRAIS

VACINAS INATIVADAS

- Tratamento por calor ou químico;
- Maior custo e com riscos de efeitos adversos;
- Imunidade menos duradoura - maior nº de doses.

VACINAS ATENUADAS

- Passagens consecutivas *in vitro* do tipo selvagem (cél, ovos, biol. molecular, outros organismos);
- Custo menor;
- Resposta imune humoral e celular, duradoura;
- Possível reversão genética;
- Não recomendado para imunodeprimidos;
- Maior labilidade (transporte e armazenamento) - liofiliz.

VACINAS DE SUBUNIDADES

TIPOS DE VACINAS VIRAIS

VACINAS INATIVADAS

VACINAS ATENUADAS

VACINAS DE SUBUNIDADES Ex: Peptídeos, VLPs

- Frações purificadas do patógeno;
- Proteínas (toxinas destoxificadas quimicamente);
- Polissacarídeos (cápsula de *Neisseria meningitides*);
- Sem riscos de patogenicidade;
- Custo mais elevado;
- Resposta imune humoral.

VACINAS DE DNA - Inoculação com DNA contendo genes virais contra os quais se deseja imunidade.

1796

2008

Conhecimentos & Tecnologia

- Novas vacinas;
- Maior eficiência (qualidade da vacina, esquemas de vacinação);
- Maior produção → < custo por dose, campanhas de vacinação;
- Maior segurança;
 - Novas tecnologias → ex. raiva, hepatite B;
 - BPF (GMP), biossegurança → preocupação c/ o vacinado, produtor, meio ambiente, etc.

VACINAS ATUAIS

Vacina/ agente	Substrato utilizado	Tipo de vacina
Raiva	Animais (1) Cultura de tecidos	Inativada Inativada
Febre amarela	Ovos embrionados	Viva, atenuada
Poliomielite Oral	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Inativada	Cultura de tecidos	Inativada
Sarampo (2)	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Caxumba (2)	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Rubéola (2)	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Hepatite B	Plasma humano (1) Levedura	Subunidades Recombinante
Varicela	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Influenza	Ovos embrionados	Inativada
Hepatite A	Cultura de tecidos	Inativada

(1) NÃO MAIS EM USO

(2) ASSOCIADAS

VACINAS EM DESENVOLVIMENTO

Agente	Substrato utilizado	Tipo de vacina
Citomegalia	Cultura de tecidos	Viva, atenuada, subunidades
Dengue	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Rotavírus	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Parainfluenza 3	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Encefalite japonesa	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Hepatite A	Cultura de tecidos	Viva, atenuada
Febre amarela	Cultura de tecidos	Viva, atenuada

PRODUÇÃO DE VACINAS

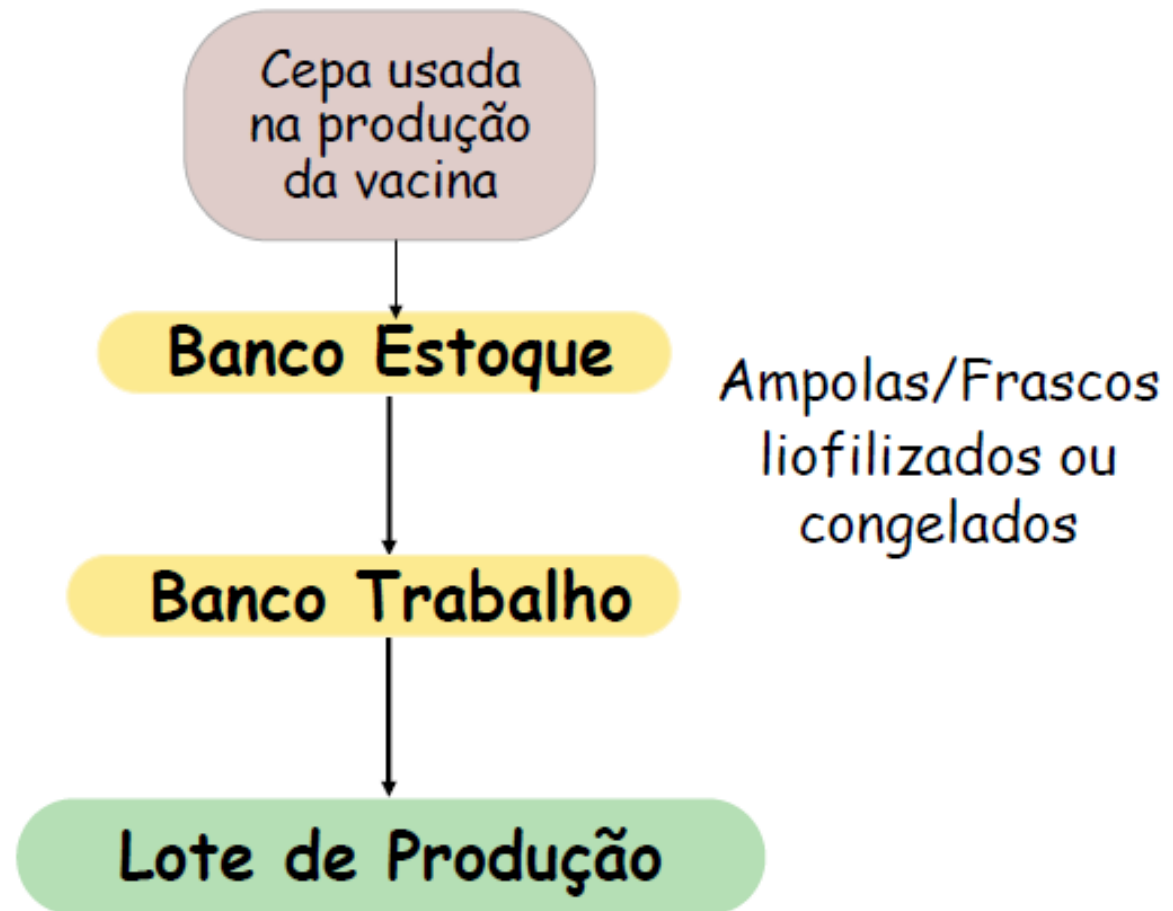
PRODUÇÃO → BPF (GMP)

- BPF = Boas Práticas de Fabricação;
- Normas escritas (procedimentos/equipamentos);
- Cada lote é registrado (documentos);
- Áreas de produção:

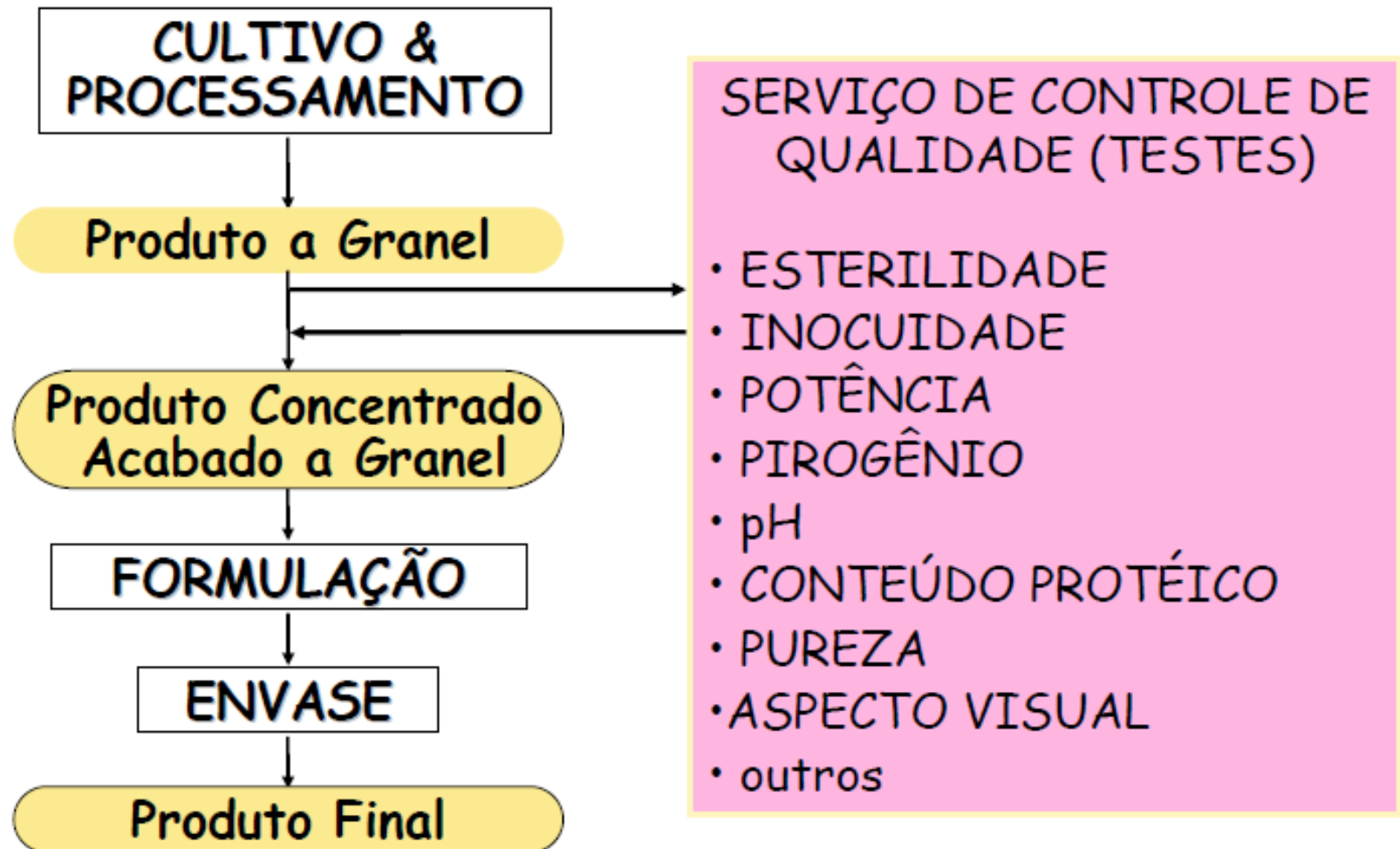
Isolamento (ar), uniformização, circulação de materiais e funcionários, biossegurança, etc.

⇒ Garantia do Produto

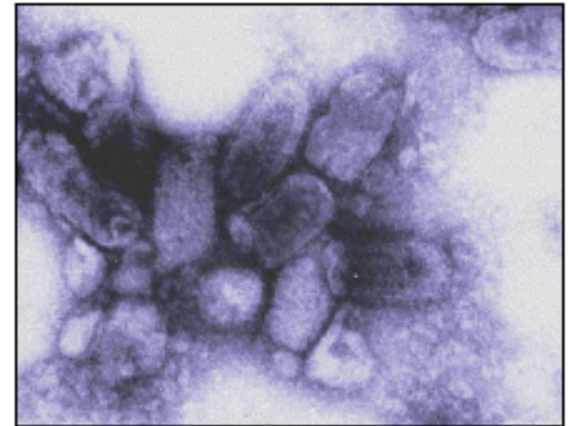
VACINAS VIRAIS- PRODUÇÃO



CONTROLE de QUALIDADE



VACINA CONTRA RAIVA EM CÉLULAS VERO



Rhabdovirus

DEFINIÇÃO E AGENTE ETIOLÓGICO

Definição

Doença infecciosa causada por um vírus que atinge o sistema nervoso central → encefalite viral aguda

Vírus rábico

RNA de fita simples, não segmentado, polaridade negativa

Forma: projétil ou bastonete de 75 x 180 nm

Ordem: *Mononegavirales* Família: *Rhabdoviridae*

Gênero: *Lyssavirus*

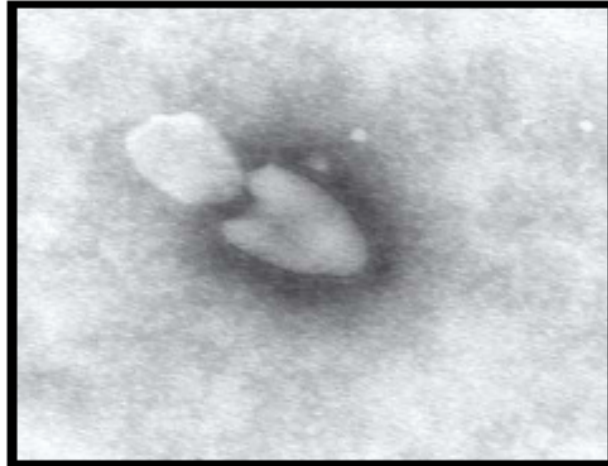
Composição: nucleocapsídeo helicoidal

envelope protéico

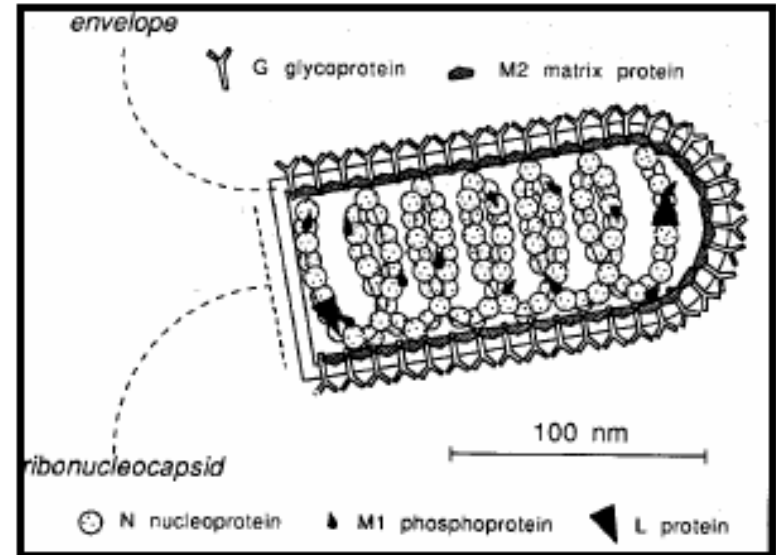
projeções em forma de espículas (10 nm comp.)

DEFINIÇÃO E AGENTE ETIOLÓGICO

Vírus rábico



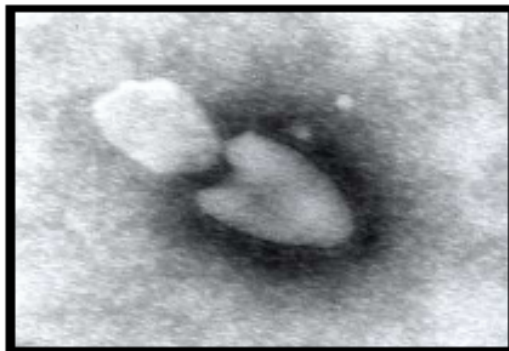
aumento de 156 000 x



Composição: nucleocapsídeo helicoidal
envelope protéico
projeções em forma de espículas (10 nm comp)

RAIVA

- Zoonose de grande importância, com prevalência mundial. Grande número de mamíferos são reservatórios e transmissores;
- Encefalite viral aguda fatal (100% em indivíduos não vacinados);
- Raiva animal 40.000 a 60.000 casos/ano e raiva humana - 35000 e 50000 mortes/ano (diminuição ?);
- 10.000.000 de pessoas/ano recebem tratamento;
- Brasil - predomínio da raiva urbana - cão. Silvestre - morcegos;
- Município São Paulo - raiva controlada - últimos casos de raiva humana 1981.



Vírus Rábico PV (156.000 x)
ME: I Butantan

Período de incubação: ~20 a 60 dias, podendo chegar até anos

- Sintomas iniciais envolvendo sistema respiratório e gastrointestinal
- Infecção aguda - formas paralítica ou furiosa (hiperatividade) com paralisia espástica
- Coma e morte

RAIVA

Vírus inativado

1ª Vacina Fuenzalida & Palácios modificada, preparada em **animais**:
• Camundongos recém nascidos

2ª Vacina preparada em **cultura de células primárias**:
• Diplóides humanas (HDCV)
• Cultura de células de embrião de galinha, purificada (PCEV)

3ª Vacina purificada preparada em **cultura de células diplóides ou heteroplóides**:
• Células WI-38, MRC-5
• BHK-21 - animais
• VERO (PVCV) - rim de macaco Verde Africano *Cercopithecus aethiops*)

TRANSMISSÃO

Vias

- saliva com vírus rábico, pele ou mucosa
- mordedura, arranhadura e lambedura da pele ou mucosa
- outras formas (mais raras)
 - cavernas com morcegos
 - laboratório
 - transplante de córnea ou outros órgãos

Período

- cães e gatos = 2- 4 dias antes dos sintomas (morte até 5 dias após o aparecimento dos sintomas)
- outros animais → não há comprovação do período

Período de incubação no homem

Média de 20- 60 dias

Australian bat lyssavirus = 7 dias a 6 anos

CONTROLE

Vacinação dos animais

- cães e gatos - anual - 1ª vacinação 4 meses de idade
- bovinos e eqüinos - semestral
1ª vacinação 3 meses de idade (D_0 e D_{30})

Recolhimento de cães e gatos abandonados

Vacinação humana

Esquemas de pré- exposição: dias 0, 7 e 28

pós exposição: dias 0, 3, 7, 14 e 28

Vacina + soro: casos mais graves

VACINAS DE USO HUMANO

Vacinas para humanos aprovadas e utilizadas atualmente

Em países desenvolvidos

vacinas em cultura de células e purificadas

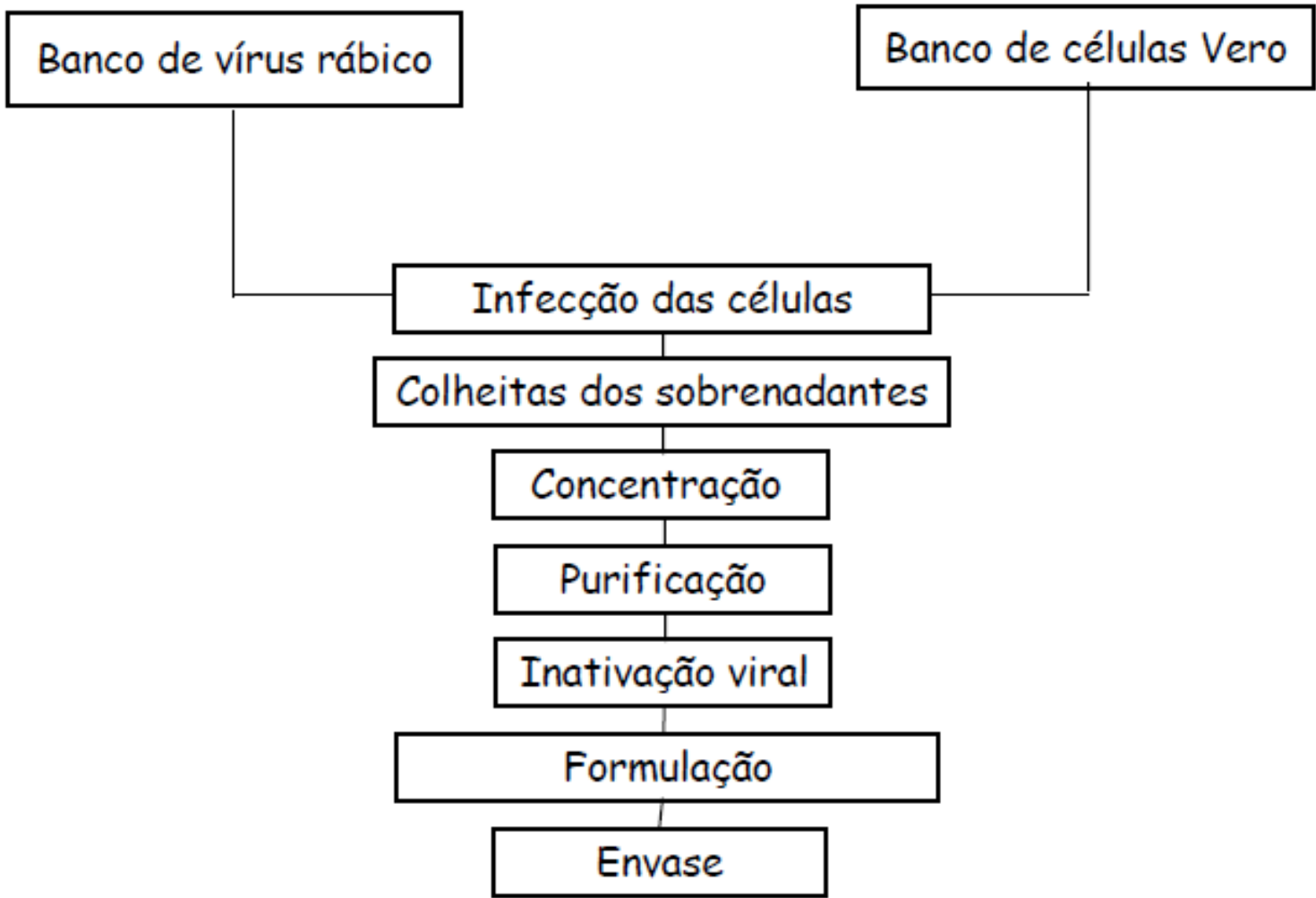
Em países sub-desenvolvidos

Vacinas de tecido nervoso de lactentes ou animais adultos

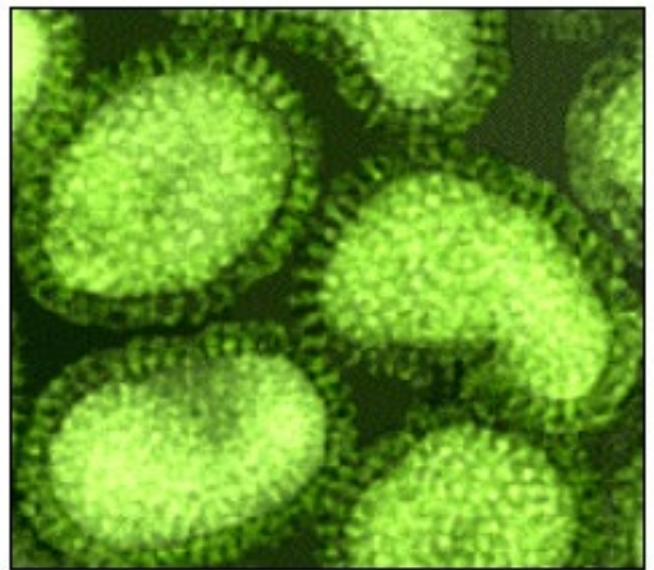
Brasil

Vacina em cultura de células VERO (Instituto Butantan)

VACINA CONTRA RAIVA EM CÉLULAS VERO INSTITUTO BUTANTAN



VACINA CONTRA INFLUENZA



VÍRUS DA INFLUENZA

Família - *Orthomyxoviridae*

Gênero *Influenzavirus A* (Influenza Aviária)

Mais importante, dividido em subtipos, baseado na variedade das glicoproteínas de superfície: Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA).

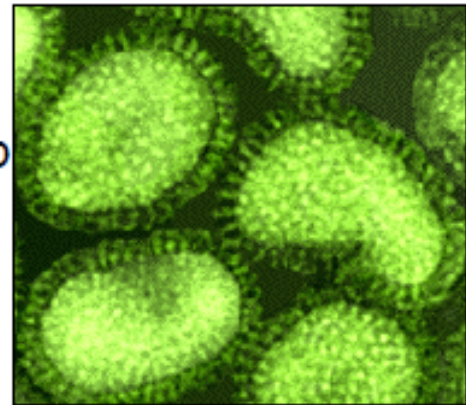
Infectam homem, aves, suínos, equinos, mamíferos marinhos

Gênero *Influenzavirus B* - homem (surtos localizados)

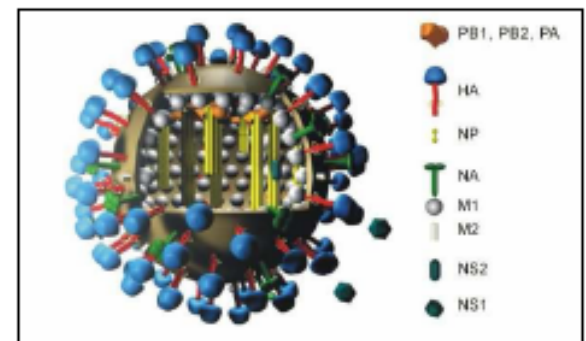
Gênero *Influenzavirus C* - sem importância clínica

Pleomórficos, envelopados, simetria helicoidal
RNA^{ss-}, segmentado

A e B → 8 segmentos, C → 7 segmentos (H-)
Mutações durante a replicação → Variações antigênicas

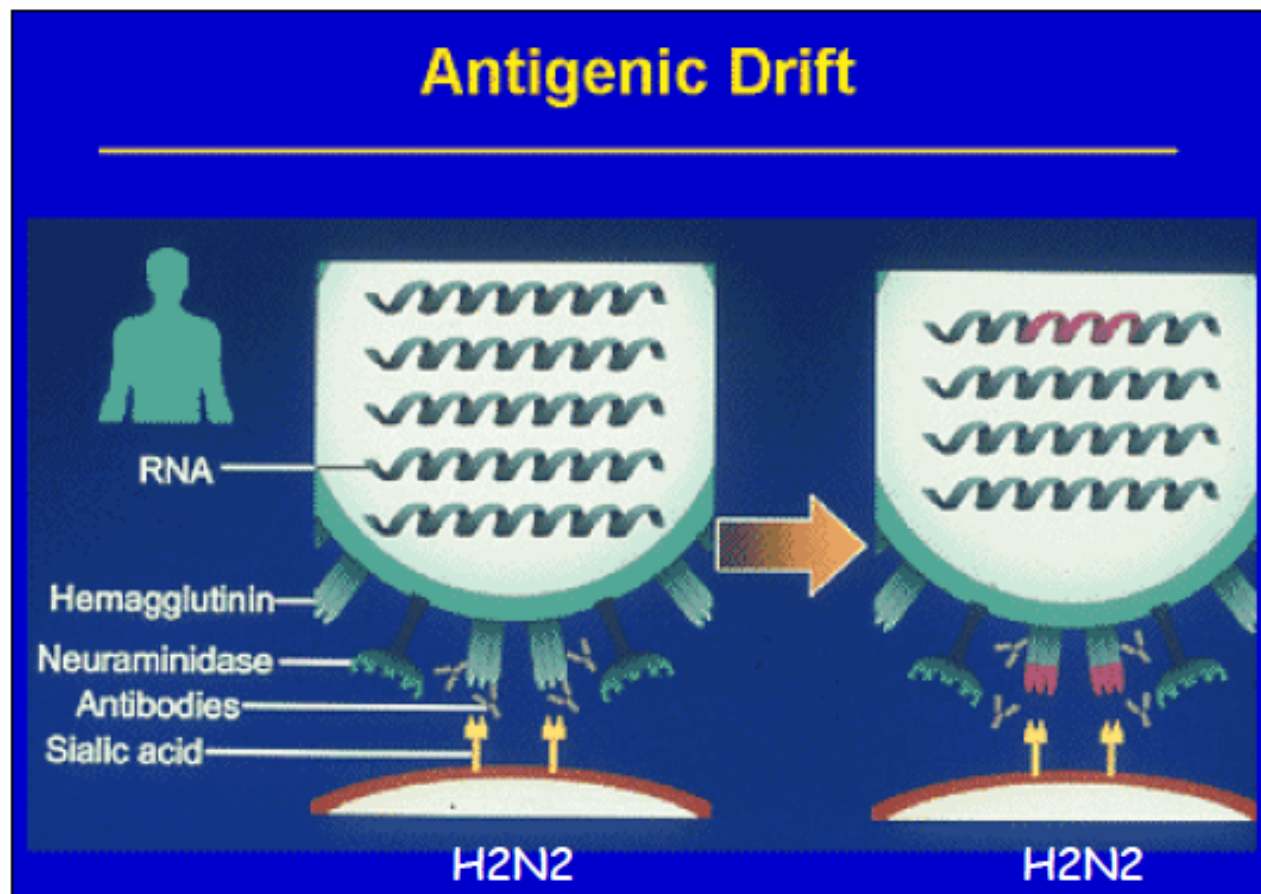


Microscopia eletrônica



VÍRUS DA INFLUENZA

VARIAÇÕES ANTIGÊNICAS MENORES

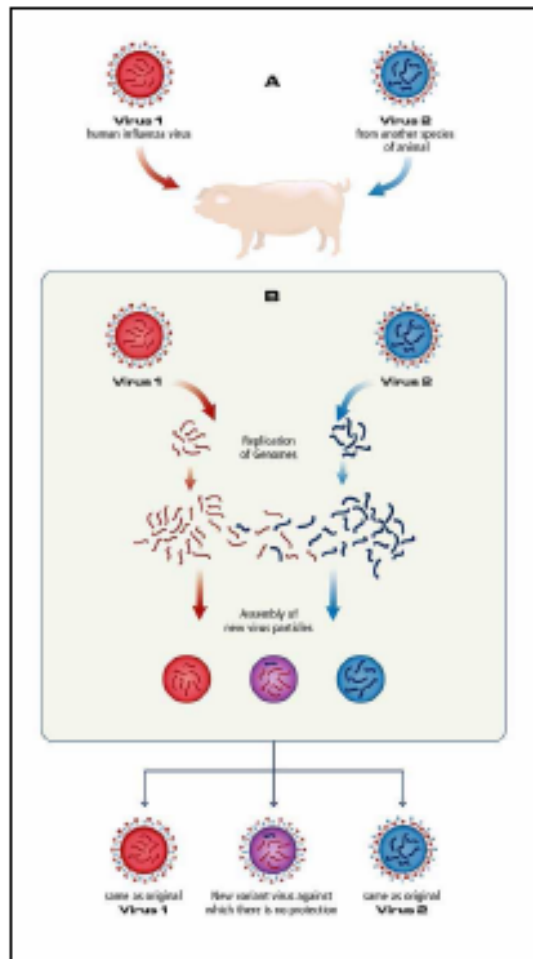


Pequenas variações nas proteínas = diferentes cepas circulantes a cada ano

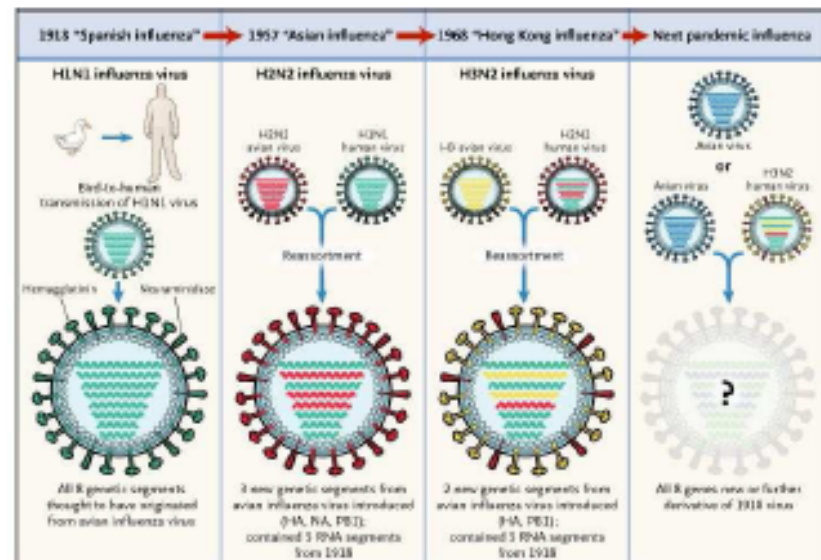
VÍRUS DA INFLUENZA

VARIAÇÕES ANTIGÊNICAS MAIORES

"SHIFT"

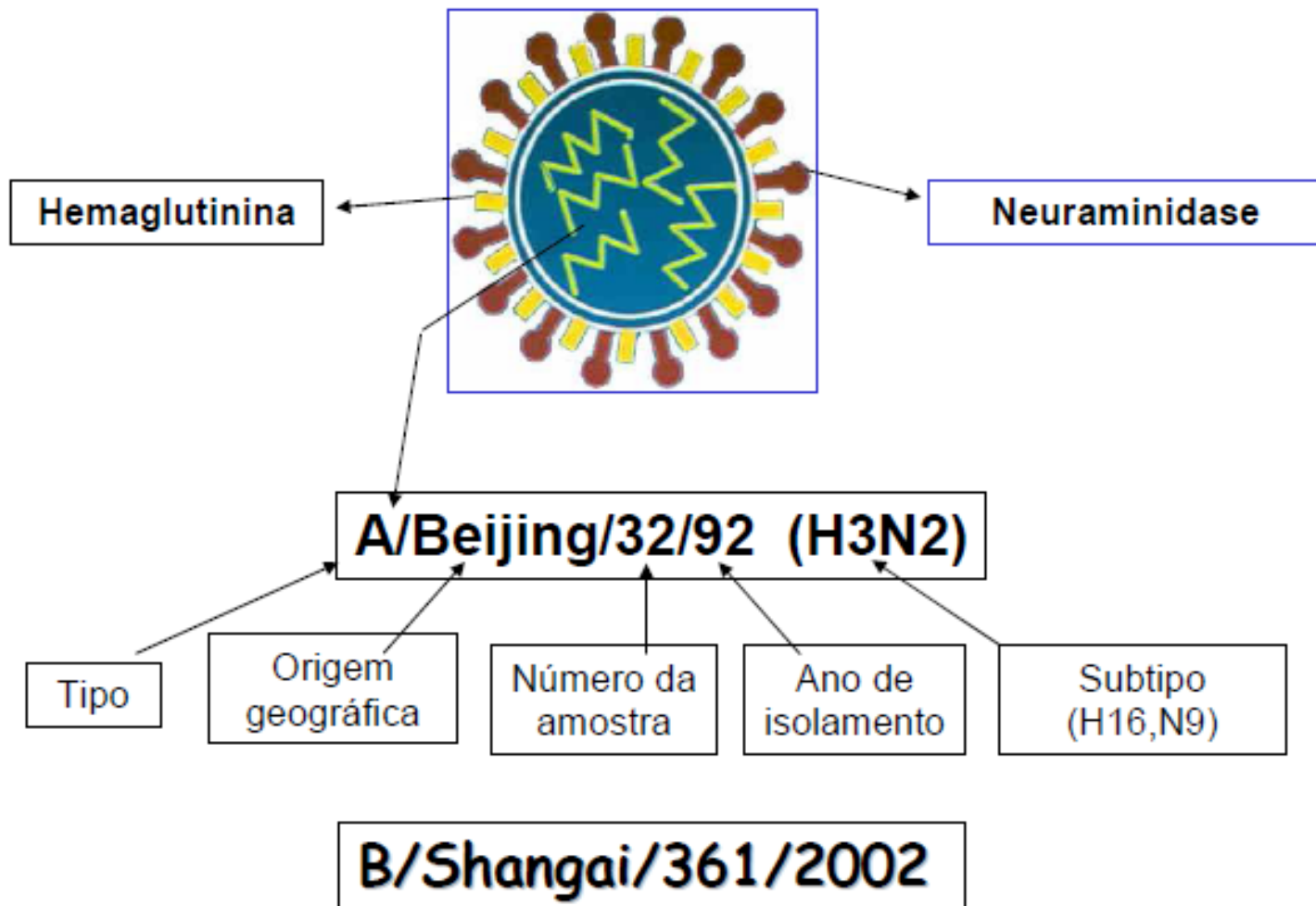


PANDEMIAS



VÍRUS DA INFLUENZA

NOMENCLATURA



INFLUENZA OU GRIPE

Distribuição global

Transmissão

- via aerossol (tosse, espirro)
- Espirro 5000 gotículas
- Um espirro pode transmitir a gripe a 167 km/h (5 m /0,1 seg)
- 24 h antes a 7 dias após o início dos sintomas

Período de Incubação

- 1 a 5 dias (vírus estabelecido)

Controle - Prevenção

- Vacinação anual

Tratamento - Paliativo

- Descansar, ingestão de muito líquido, antitérmico e analgésico, evitar o uso de ácido acetilsalicílico (aspirina, AAS), principalmente para menores de 16 anos
- Infecções bacterianas secundárias (otites, sinusite ou bronquites) - antibióticos
- Antivirais: não substitui a vacina, reduz sintomas e contágios, alto custo, efeitos colaterais - Amantadina, Rimantadina, Zanamivir e Oseltamivir



INFLUENZA - EPIDEMIOLOGIA

- Epidemias anuais, vírus circula, geralmente, com início no final do outono e no decorrer de todos os meses de inverno
 - **Hemisfério Norte** - outubro e março
 - **Hemisfério Sul** - maio a setembro
 - **Clima tropical** - circulação basal no decorrer de todo o ano com pico durante os meses chuvosos
- **Brasil**
 - Norte meses mais chuvosos (janeiro e fevereiro)
 - Demais localidades (junho a setembro)
- **600 milhões de infectados no mundo**
- **3 a 5 milhões de casos graves**
- **250 a 500 mil mortes**



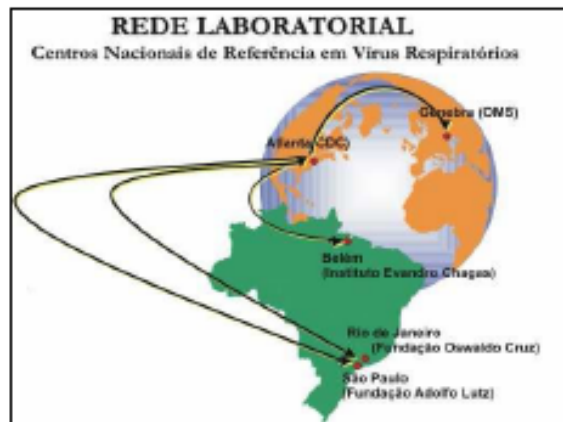
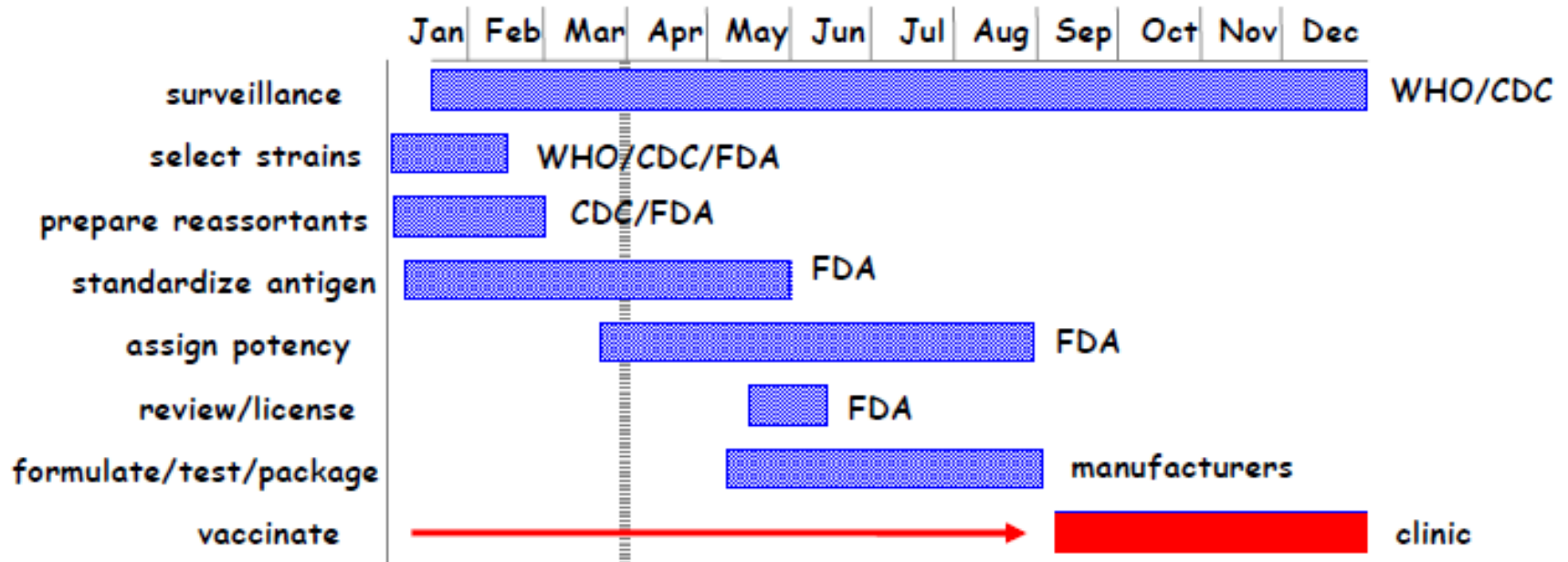
VACINA CONTRA INFLUENZA

- Prevenção e redução da propagação da doença
- Uma dose anual, grande número de pessoas, imunidade em 2 semanas
- Vacina trivalente, 15 mcg/dose de cada HA, (H1N1, H3N2 e B)
- Diminuição da gravidade e dos sintomas da doença com redução de morbidade e mortalidade
- Efetividade de 70 a 90%. Em idosos e portadores de doenças crônicas, induz proteção satisfatória contra complicações, hospitalizações e óbitos
- Redução de custos para o Sistema de Saúde
- Poucos efeitos colaterais
- Poucas contra indicações



INFLUENZA

REDE DE VIGILÂNCIA - OMS



- Amostras clínicas de diferentes continentes - análises específicas
- Seleção e distribuição das cepas
- Composição da vacina com vírus mais prevalentes nas amostras
- 112 centros e 83 países

TIPOS DE VACINA CONTRA INFLUENZA

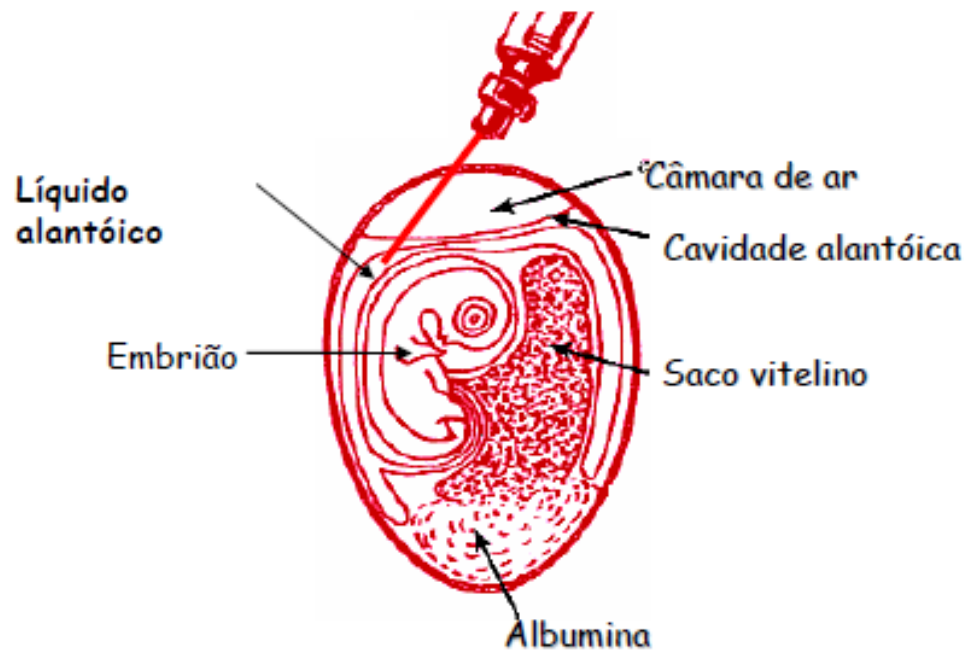
▪ Vacina inativada

- vírus inteiro inativado com formaldeído;
- vacina de vírus fracionados - vírus purificado rompido com detergentes para solubilização do envelope viral, seguido de inativação química (formaldeído) vacinas de subunidades;
- vacinas de subunidades.

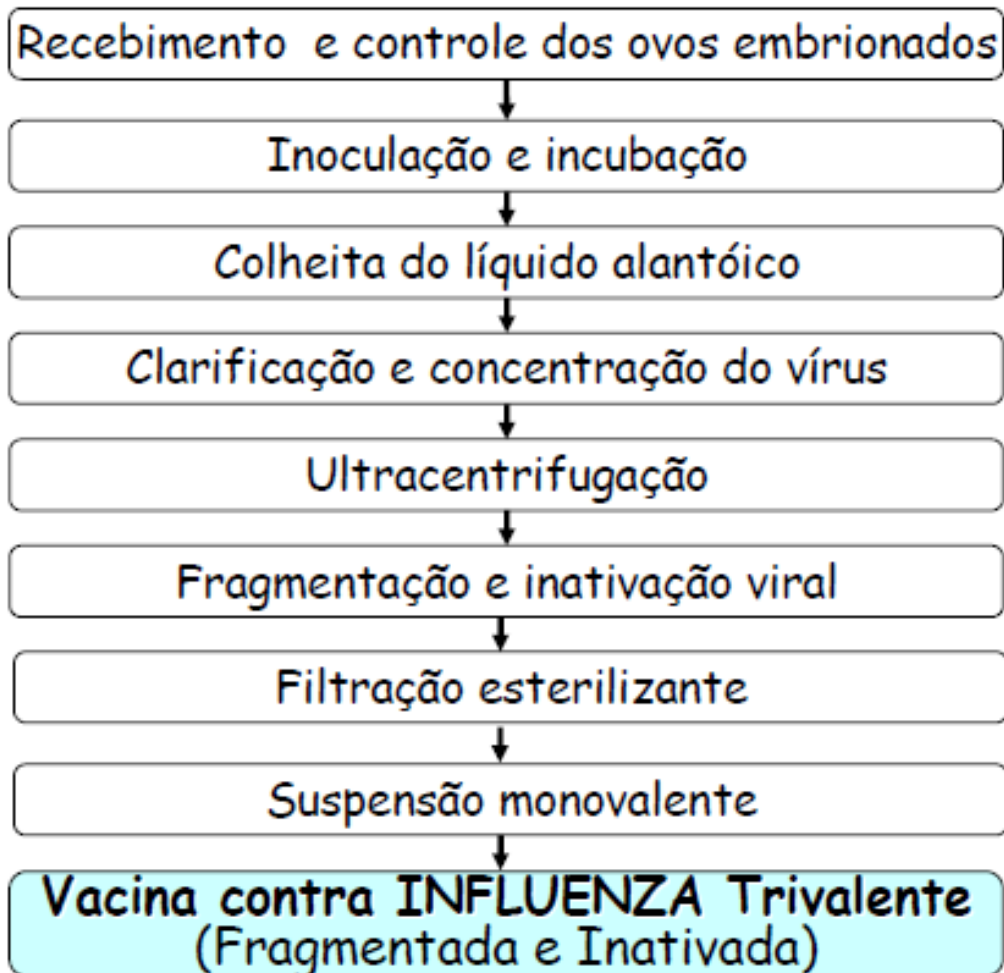
▪ Vacina de vírus vivo atenuado

- para administração intranasal

VACINA CONTRA INFLUENZA INOCULAÇÃO EM OVO EMBRIONADO DE GALINHA



PRODUÇÃO DE VACINA CONTRA INFLUENZA

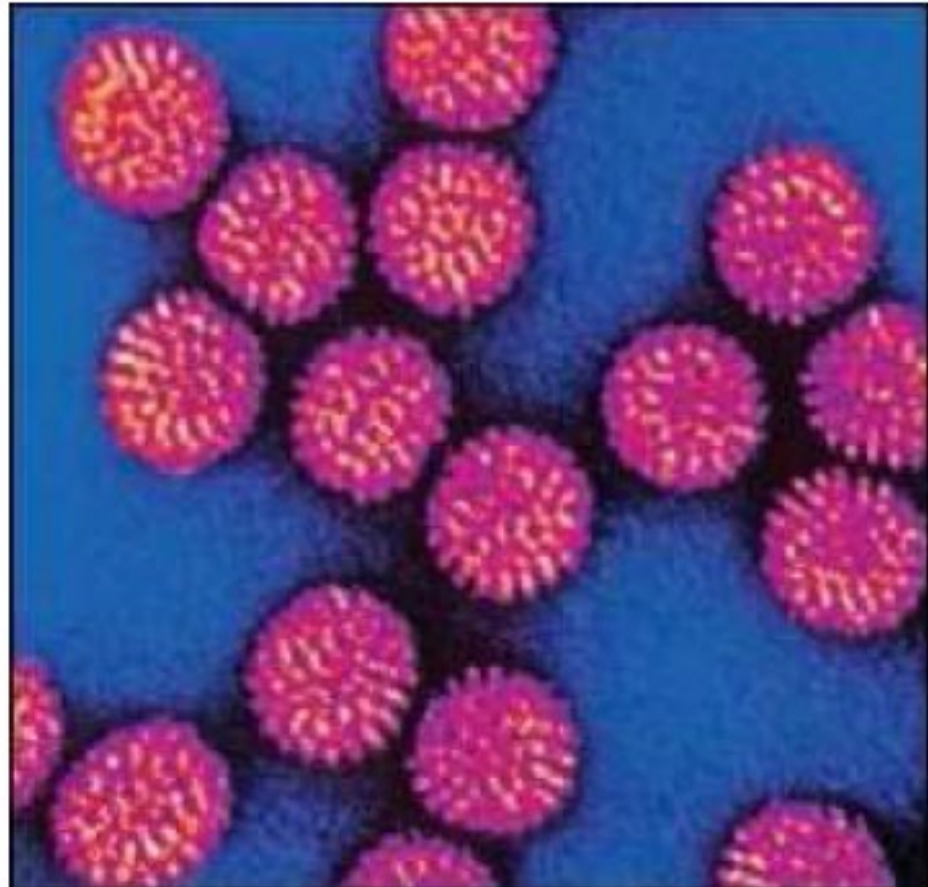


VACINA CONTRA ROTAVÍRUS

Rotavírus

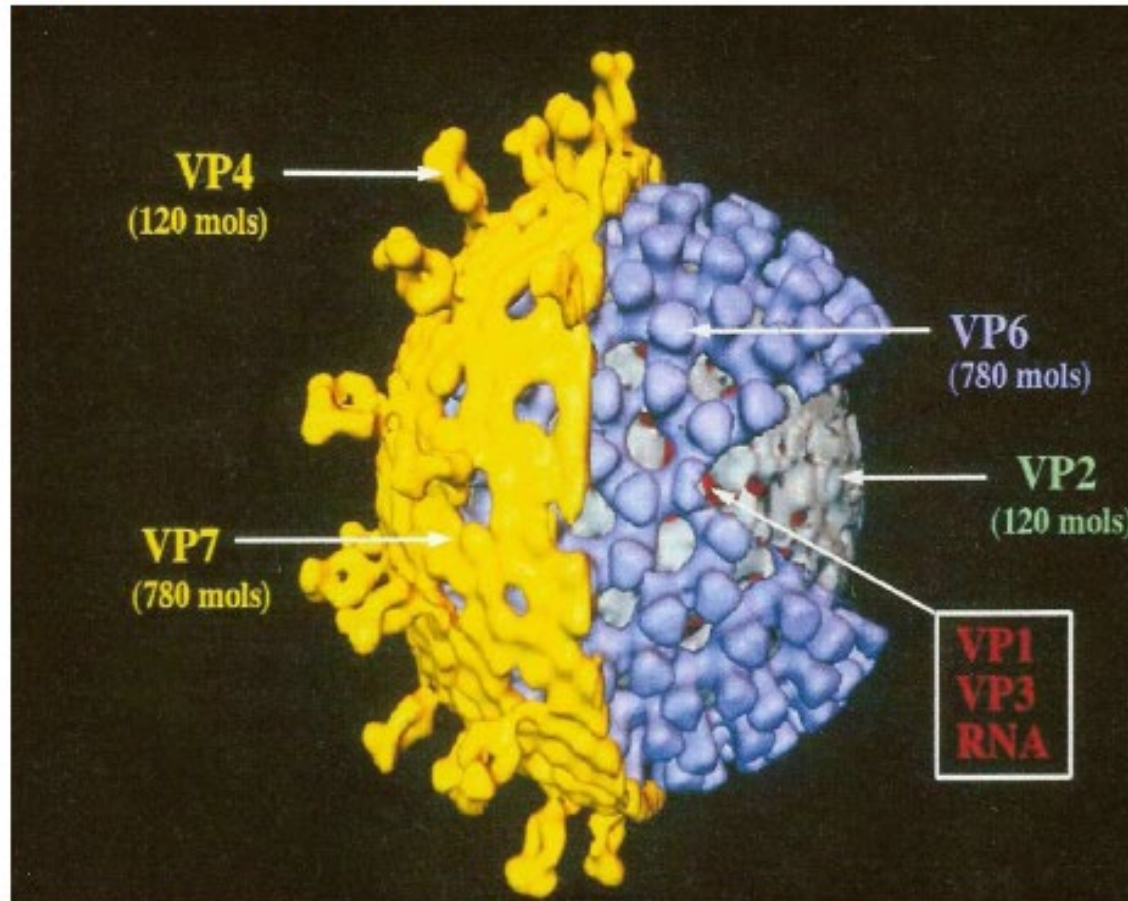
Família *Reoviridae*

(Gastroenterite)



ROTAVÍRUS

ESTRUTURA DO ROTAVÍRUS



RNA de fita dupla

7 proteínas estruturais (VP1 a VP7)

6 proteínas não estruturais (NSP1-NSP6)

ROTAVÍRUS

- Pela proteína G - 14 sorotipos/genotipos
 - Importância epidemiológica -
 - G1 a G4 mundial
 - G9 - Índia, Austrália e **Brasil**
 - G8 - África
 - G5 - América do Sul
- Pela Proteína P 14 sorotipos e 23 genótipos
 - Importância epidemiológica
 - Genótipos P[8] e P[4] - 90% das diarreias do mundo com exceção da África (P[6]).

VACINA CONTRA ROTAVÍRUS

INSTITUTO BUTANTAN

VACINA CONTRA ROTAVÍRUS PENTAVALENTE

Parceria com o NIH (cepa UK)
"bovine-human reassortant rotavírus vaccine"
Sorotipos G1, G2, G3 e G4

+

Sorotipo G9 presente no Brasil

OBRIGADO

Prof. Marco Antonio Stephano
stephano@usp.br