

PARECER RELATOR

O Relator declara ter incluído Informação Confidencial no corpo deste Parecer?

<input type="checkbox"/>	SIM
<input checked="" type="checkbox"/>	NÃO

• **Processo:** 01250.062702/2017-54

Data de Protocolo: 10/10/2016

Processo SEI nº: 2289697

Assunto: Solicitação de liberação comercial da vacina Ingelvac Provenza - Vacina vírus vivo modificado contra Influenza Suína.

Requerente: Boehringer Ingelheim do Brasil Química e Farmacêutica Ltda.

CQB: 0251/08

CNPJ: 60.831.658/0021-10

Extrato Prévio: 5832/2017, publicado no DOU em 8 de novembro de 2017.

I. Informações gerais

A infecção pelo Vírus da Influenza Suína A (VIS), sobretudo com o H1N1 e o H3N2, é uma das mais comuns entre as que afetam o sistema respiratório na suinocultura, além de serem consideradas zoonoses que podem também infectar os seres humanos.

O vírus da Influenza Suína pertence à família Orthomyxoviridae sendo um vírus com fita de RNA negativa (complementar ao do RNAm) e com genoma segmentado. O genoma viral consiste em oito segmentos de RNA denominados HA, NA, PB2, PB1, PA, NP, M e NS. Apresenta também a "Proteína Não Estrutural 1" (NS1) que permite ao vírus selvagem inibir a resposta imune inata mediada pelo IFN- γ , sendo, por isso, considerado um fator central na replicação viral e no bloqueio da resposta imune inata do hospedeiro.

Por meio da truncagem da proteína NS1, ocorre uma supressão desta e o sistema imune consegue desenvolver imunidade rápida e eficaz contra o vírus da vacina. A vacina é administrada em dose única de 1 mL por via intranasal, conferindo forte imunidade na entrada natural do vírus selvagem, tornando assim a vacina em grande parte resistente à interferência dos anticorpos maternos.

Isso permite aos veterinários e suinocultores vacinarem os animais em idade bem precoce, já no primeiro dia de vida, momento adequado para conferir uma proteção adequada. A vacina contém dois sorotipos de influenza A, o H1N1 e o H3N2, englobando os subtipos circulantes relevantes. As vacinas

vivas geralmente induzem resposta imune celular mais intensa, o que se traduz em proteção mais ampla contra infecções de alguma forma heterólogas.

A vacina será elaborada, submetida ao controle de qualidade e fabricada na Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. em Saint Joseph, estado de Missouri, nos Estados Unidos. O produto será importado em sua apresentação final e todas as etapas de fabricação ocorrerão nos Estados Unidos. A filial brasileira será responsável pelo recebimento, estocagem e comercialização da vacina.

II. Identificação do OGM

De acordo com a Resolução Normativa nº 2, de 27 de novembro de 2006, os organismos recombinantes encontram-se na Classe de Risco 1.

A vacina bivalente do Vírus de Influenza Suína NS1, vírus vivo modificado (MLV), possui um isolado de H1N1 NS1 (lote Nº 241-192) e um isolado de H3N2 NS1 (lote Nº 241-196). O Vírus da Semente-Mãe (MSV) para cada fração é um isolado de Vírus da Influenza Suína que foi atenuado por meio da truncagem da proteína NS1.

O agente biológico controlado é o Vírus da Semente-Mãe (MSV) de Influenza Suína H1N1 NS1 que é um recombinante criado em laboratório e contém:

- HA e NA de A/swine/Minnesota/37866/1999 (H1N1).
- PB2, PB1, PA, NP, M de A/Swine/Texas/4199-2/98 (H3N2).
- O gene NS1-126 modificado derivado de A/Swine/Texas/4199-2/98 (H3N2) que codifica uma proteína NS1 com porção carboxi truncada constituída pelos aminoácidos 1 ao 126 do NS1.

O agente biológico controlado é o Vírus da Semente-Mãe (MSV) de Influenza Suína H3N2 TX98 NS1 que é um recombinante criado em laboratório e contém:

- HA, NA, PB2, PB1, PA, NP e M de A/Swine/Texas/4199-2/98 (H3N2).
- O gene NS1-126 modificado derivado de A/Swine/Texas/4199-2/98 (H3N2) que codifica uma proteína NS1 com porção carboxi truncada constituída pelos aminoácidos 1 ao 126 do NS1.

II. Descrição do OGM e Proteínas Expressas

O plasmídeo pHW2000 foi utilizado para clonar cada um dos oito segmentos de cDNA genômico viral e sua posterior transfecção (A DNA transfection system for generation of influenza A vírus from eight plasmids. Hoffmann et al. PNAS 2000;97:6108-6113) na criação do Vírus da Semente-Mãe (MSV) de Influenza Suína H1N1 NS1 recombinante. A bactéria *Escherichia coli* é utilizada para transformar e amplificar os plasmídeos pHW2000.

O MSV de Influenza Suína H1N1 NS1 e H3N2 TX98 NS1 possuem uma truncagem geneticamente introduzida do gene NS1 que atua de forma a atenuar o fenótipo virulento selvagem.

O Agente Biológico Usado como Vetor Suporte é derivado do vírus da Influenza Suína A, no qual pertence à família Orthomyxoviridae e é um vírus com fita de RNA negativa e com genoma segmentado. O genoma viral consiste em oito segmentos de RNA denominados HA, NA, PB2, PB1, PA, NP, M e NS. Os segmentos de RNA codificam os seguintes itens:

- HA codifica hemaglutinina.
- NA codifica neuraminidase.
- NP codifica nucleoproteína.
- M codifica duas proteínas matrizes (a M1 e a M2) por meio do uso de diversas fases abertas de leitura (ORFs) no mesmo segmento de RNA.
- NS codifica duas proteínas não estruturais distintas (NS1 e NEP) por meio do uso de diversas fases abertas de leitura (ORFs) no mesmo segmento de RNA.
- PA codifica uma RNA-polimerase.
- PB1 codifica uma RNA-polimerase e a proteína PB1-F2 por meio do uso de diversas fases abertas de leitura (ORFs) no mesmo segmento de RNA.
- PB2 codifica uma RNA-polimerase.

III. Aspectos relacionados à Saúde Humana e dos Animais

A referida vacina é indicada para a vacinação de suínos de um dia de idade, não sendo recomendada a aplicação em animais enfermos.

Como ocorre com outros vírus de Influenza de mamíferos, o tropismo tissular esperado dos vírus de Influenza Suína H1N1 NS1 e H3N2 NS1 é pelos tecidos pulmonares e do trato respiratório superior. A truncagem da proteína NS1 não deve alterar o tropismo tissular e, na verdade, ocasiona uma menor capacidade de replicação nos tecidos do pulmão e do trato respiratório superior.

A exposição humana aos vírus da vacina poderia ocorrer durante a fabricação, distribuição e/ou administração do produto experimental ou registrado. Em geral, as precauções comuns adotadas na produção e na manipulação de todo produto biológico previnem a exposição humana aos microrganismos da vacina. Os procedimentos específicos para a proteção da segurança humana são adotados nas instalações de produção da vacina aprovada pelo USDA na Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc. (BIV). Também, poderia haver exposição humana no manejo dos suínos vacinados. Tal evento é improvável, pois é limitada a excreção dos animais vacinados para os animais não vacinados. Dada a menor virulência do vírus vacinal no animal hospedeiro, também é menor a capacidade de cruzar a barreira de espécie para seres humanos.

Quanto à possibilidade de propagação e dispersão em animais:

Foram apresentados resultados de um estudo de propagação e dispersão em suínos de 1 dia com o vírus da semente-mãe (MSV) de Influenza Suína H1N1 NS1 (Estudo BIV 2012201— Estudo de Segurança em Laboratório para Análise da Propagação e Dispersão da Vacina de Influenza Suína, H1N1 e H3N2, Vírus Vivo Modificado). Nesse estudo foi administrado 1 mL ($6,60 \log_{10}$ FAID₅₀/dose de H1N1) a suínos de um a dois dias de vida (FAID = Dose Infecciosa 50% determinada por teste de imunofluorescência). A vacina revelou-se clinicamente segura nos suínos inoculados, foi excretada, por no máximo, 7 dias nas secreções nasais dos suínos vacinados e foi observado que se propaga apenas minimamente nos suínos inoculados. Tanto as fêmeas dos leitões vacinados, quanto os grupos não-vacinados não eliminaram vírus nas secreções nasais. Em última análise, a vacina revelou-se clinicamente segura no estudo, já que não houve relato de nenhum efeito adverso.

Um segundo estudo foi realizado em espécies não alvo a saber: furão, galinha e ratos (V 2013266 - Estudo de Laboratório para Avaliação da Segurança da Vacina Bivalente de Influenza Suína a Vírus Vivo Modificado). Neste estudo foi administrada cerca de uma quinta parte da dose-alvo ($4,4 \log_{10}$ FAID₅₀/dose de H1N1) em 50 µl em ratos (n=7) e cerca de uma quinta parte da dose-alvo ($5,0 \log_{10}$ FAID₅₀/dose de H1N1) em 200 µl em galinhas (n=8) e furões (n=8). A vacina revelou-se segura em todas as espécies sem indicação de uso que foram avaliadas nesse estudo. A maioria das amostras de secreções coletadas nesse estudo apresentou resultado negativo para o vírus vacinal, com exceção de uma galinha com uma amostra com resultado positivo e todos os furões com no mínimo uma amostra com resultado positivo no dia seis. Depois do dia seis, todos os furões apresentaram secreções com resultado negativo do dia sete até o término do estudo.

Somando-se os dois estudos, há clara demonstração que é insignificante o risco de excreção do vírus vacinal dos animais vacinados para os animais não expostos em quantidades suficientes para permitir a replicação e posterior excreção. Aliado aos protocolos de biossegurança a serem adotados quando do uso da vacina, é insignificante o potencial de escape do vírus vacinal das instalações e de propagação para uma população não tratada previamente.

Quanto à possibilidade de reversão do fenótipo:

Ambas as sementes-mãe de VIP NS1 H1N1 e VIP NS1 H3N2 foram analisadas em retropassagens e estudos de reversão à virulência.

Resumidamente, suínos (de um dia a três semanas de vida, dependendo da passagem) foram inicialmente inoculados pela via intratraqueal com os vírus MSV com título de $6,04 \log_{10}$ DICT₅₀/mL no caso do isolado H1N1 NS1 e $7,52 \log_{10}$ DICT₅₀/mL no caso do isolado H3N2 NS1 (DICT = doses infectantes de cultura de tecidos 50% por dose). Os animais foram observados para verificar a ocorrência de sinais clínicos quatro horas pós-inoculação e depois diariamente durante cinco dias. Cinco dias pós-inoculação, os suínos foram necropsiados. Foram coletados os fluidos do lavado bronco alveolar e os

fluidos do lavado das vias aéreas superiores. Foram analisadas as amostras para detectar a presença de VIP por meio de isolamento do vírus. Foi feito um pool com as amostras positivas, utilizado para inoculação no próximo grupo de suínos por via intratraqueal. Esse processo foi repetido por cinco passagens. Na quinta passagem, os animais foram observados durante 21 dias e então necropsiados.

No estudo da semente-mãe de VIP NS1 H1N1, foi inoculado um total de 24 suínos durante as 5 passagens. Desses 24 suínos, quatro apresentaram tosse e onze, aumento na frequência respiratória nos dias pós-inoculação. Nenhum dos suínos apresentou febre e não foi observado aumento de lesões pulmonares após a quinta passagem do vírus.

No estudo da semente-mãe de VIP NS1 H3N2, foi inoculado um total de 45 suínos durante as 5 passagens. Desses 45 suínos, três apresentaram tosse; quatorze, aumento da frequência respiratória; e um, depressão nos dias pós-inoculação. Nenhum dos suínos apresentou febre e não foi observado aumento de lesões pulmonares após a quinta passagem do vírus.

Os estudos de reversão à virulência das sementes-mãe de H1N1 NS1 e H3N2 NS1 foram aceitos pelo USDA em cumprimento às exigências de estabilidade e segurança da semente-mãe, no dia 6 de junho de 2012 e no dia 7 de junho de 2012, respectivamente. Embora tenham ocorrido algumas alterações genéticas que posteriormente levaram à truncagem da região NS1, nenhuma delas ocasionou a restauração de um gene NS1 funcional ou aumento da virulência. Estes dados fornecem evidência científica do baixo risco nos animais com indicação de uso.

IV. Aspectos Ambientais

Pela própria característica do OGM (vírus vivo modificado), a possibilidade de produção de esporos é inexistente.

A maior ou incomum sobrevivência das cepas da vacina no meio ambiente poderiam aumentar a possibilidade de propagação ambiental e exposição e colonização em animais que não são as espécies alvos e em seres humanos. Porém, a sobrevivência das cepas da vacina deve ser semelhante à do microrganismo parental. O Influenza é um vírus de RNA envelopado. Em geral, os vírus envelopados apresentam baixa sobrevivência no ambiente e são facilmente inativados pela maioria dos desinfetantes e pela exposição à luz ultravioleta. Além disso, a truncagem do segmento do gene NS1 não confere vantagem seletiva no ambiente. A capacidade da Influenza Suína H1N1 ou H3N2 NS1 para sobreviver no meio ambiente não é maior do que a do vírus da Influenza Suína selvagem presente no ambiente.

As cepas da vacina poderiam ter potencial de se espalhar no meio ambiente se excretados via secreções ou nos excrementos dos suínos vacinados. Entretanto, a evidência experimental indica que as cepas da vacina não são excretadas em quantidades que possibilitariam a propagação efetiva no meio ambiente. A presença do segmento do gene NS1-126 não representaria uma vantagem seletiva ao

ambiente, a capacidade de a Influenza Suína H1N1 ou H3N2 sobreviver no meio ambiente não seria superior à do vírus da Influenza Suína selvagem já presente. Além disso, é uma prática comum entre os suinocultores fazer a desinfecção completa das instalações dos suínos nos grupos alojados. Esses fatores minimizariam a propagação das cepas da vacina no ambiente por meio de fatores físicos ou químicos.

Os antígenos da vacina poderiam resultar em efeitos ecológicos adversos significativos se infectassem e se revelassem altamente patogênicos para as espécies sem indicação de uso, causando-lhes morbidade e mortalidade. Por sua vez, o número limitado de hospedeiros, a baixa capacidade de sobrevivência no meio ambiente e a susceptibilidade ao interferon do hospedeiro não indicam que o uso dessa vacina poderá causar danos ao meio ambiente.

Se as cepas da vacina fossem transmitidas e colonizassem espécies de invertebrados, elas poderiam causar doença nessas populações ou possivelmente poderiam fornecer um meio para a sua propagação mais ampla no ambiente, desempenhando os invertebrados o papel de vetores. Para responder a esta questão, no artigo "Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna*." Applied Environmental Microbiology, Dezembro 2013; 79(23):7249-55, os autores pesquisaram a capacidade do invertebrado *Daphnia magna* acumular os vírus em água enriquecida com vírus da Influenza aviária. Como conclusão, os autores sugerem que o invertebrado *Daphnia* inativa o vírus em um curto intervalo de tempo pós-ingestão e reduz a concentração do vírus na água. Desta forma, o potencial de transmissão para invertebrados é baixo. Não há evidência para concluir que as consequências das cepas com NS1 truncado apresentam maior probabilidade de transmissão aos invertebrados. Os MSV de Influenza Suína H1N1 NS1 e H3N2 NS1 são atenuados na espécie alvo (suínos) e a incorporação do NS1-126 truncado deve conferir o mesmo nível de atenuação nos animais sem indicação de uso. Em resumo, a capacidade do MSV Influenza Suína H1N1 NS1 ou H3N2 NS1 sobreviver no meio ambiente não seria maior do que a do vírus selvagem.


V. Conclusão


Tendo em vista o apresentado pela proponente, sou favorável à solicitação da empresa para liberação comercial da vacina Ingelvac Provenza - Vacina vírus vivo modificado contra Influenza Suína apresentado nesta proposta. A análise deste parecerista considerou documentos aportados na Secretaria Executiva da CTNBio pela requerente; estudos e publicações científicas independentes da requerente.

VI. Bibliografia

1. BIAH studies #2013200, 2013232, and 2014001 publicado no endereço: <http://productdata.aphis.usda.gov>.

2. Genzow M, Goodell C, Kaiser TJ, Johnson W, Eichmeyer M. Live attenuated influenza virus vaccine reduces virus shedding of newborn piglets in the presence of maternal antibody. *Influenza Other Respir Viruses*. 2017;00:1–7. doi:10.1111/irv.12531.
3. Alvarez J, Sarradell J, Kerkaert B, et al. Association of the presence of influenza A virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in sow farms with post-weaning mortality. *Prev Vet Med*. 2015;121:240-245.
4. Vincent AL, Ma W, Lager KM, et al. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine*. 2007;25:7999–8009.
5. Janke BH. Influenza A virus infections in swine: Pathogenesis and diagnosis. *Vet Pathol*. 2014;51:410–426.
6. Hoffmann et. al. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *PNAS* 2000;97:6108-6113.
7. Meixel et al. Accumulation and inactivation of avian influenza virus by the filter-feeding invertebrate *Daphnia magna*. " *Applied Environmental Microbiology*, Dez 2013; 79(23):7249-55


Dr. Hugo Bruno Correa Molinari
Membro da CTNBio


Dr. Wellington Lutz de Araújo
Membro da CTNBio