

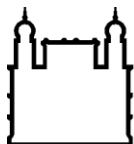
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

VIGILÂNCIA LABORATORIAL DOS POLIOVÍRUS RELACIONADOS À  
VACINA, CIRCULANTES NO BRASIL ENTRE 2008 E 2015, EM  
SUPORTE ÀS ATIVIDADES DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA  
POLIOMIELITE

KLÉCIA MARÍLIA SOARES DE MELO CASSEMIRO

Rio de Janeiro  
Julho de 2016



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

*KLÉCIA MARÍLIA SOARES DE MELO CASSEMIRO*

Vigilância Laboratorial dos Poliovírus Relacionados à Vacina, Circulantes no Brasil entre 2008 e 2015, em Suporte às Atividades de Erradicação Global da Poliomielite.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Edson Elias da Silva

**RIO DE JANEIRO**

Julho de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT/ FIOCRUZ - RJ

C344 Cassemiro, Klécia Marília Soares de Melo

Vigilância laboratorial dos poliovírus relacionados à vacina, circulantes no Brasil entre 2008 e 2015, em suporte às atividades de erradicação global da poliomielite / Klécia Marília Soares de Melo Cassemiro. – Rio de Janeiro, 2016.

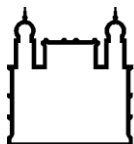
xx, 153 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 102-127

1. Poliovírus. 2. Poliomielite. 3. Vigilância laboratorial. 4. VOP. 5. VDPV. 6. VP1. 7. Recombinação gênica. I. Título.

CDD 616.835



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

***KLÉCIA MARÍLIA SOARES DE MELO CASSEMIRO***

**VIGILÂNCIA LABORATORIAL DOS POLIOVÍRUS RELACIONADOS À VACINA,  
CIRCULANTES NO BRASIL ENTRE 2008 E 2015, EM SUPORTE ÀS ATIVIDADES  
DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA POLIOMIELITE.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Edson Elias da Silva**

**Aprovada em: 28 / 07 / 2016**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Claudia Lamarca Vitral - Presidente** (Universidade Federal Fluminense)  
**Prof. Dr. Clarissa Damaso** (Universidade Federal do Rio de Janeiro)  
**Prof. Dr. Luciane Almeida Amado Leon** (Instituto Oswaldo Cruz)  
**Prof. Dr. Luciana Jesus da Costa** (Universidade Federal do Rio de Janeiro)  
**Prof. Dr. Marcelo Alves Pinto** (Instituto Oswaldo Cruz)

Rio de Janeiro, 28 de julho de 2016

Dedicado a Joselma e Germano, porque  
nesta vida recebi de vocês muito mais  
do que posso retribuir.  
E a Rafael, o dono do sorriso mais lindo  
que já existiu.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio financeiro.

À Fundação Oswaldo Cruz, que me acolheu e me ensinou o amor à ciência e ao método científico.

À Pós-graduação em Biologia Parasitária, pela excelência na qualidade de ensino.

Ao meu orientador, Dr. Edson Elias, pelos ensinamentos, confiança, incentivo e amizade.

A todos que fazem o Laboratório de Enterovírus, pelo suporte científico e emocional.

Aos colegas e amigos, os que trago da vida e os que fiz nestes anos de Doutorado, cada um com sua contribuição a esta jornada.

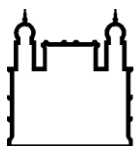
À família, sempre presente.

A Rafael, que me trouxe amor e me ensinou parceria.

Por fim, parafraseando Agostino de Hipona, agradeço Àquele que ainda não descobri ao certo, mas sei que inquieta meu espírito, instiga o coração e me leva à sempre buscar.

“Um cientista em seu laboratório não é somente um técnico: é também uma criança colocada diante de fenômenos naturais que a impressionam como um conto de fadas.”

Marie Curie



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### VIGILÂNCIA LABORATORIAL DOS POLIOVÍRUS RELACIONADOS À VACINA, CIRCULANTES NO BRASIL ENTRE 2008 E 2015, EM SUPORTE ÀS ATIVIDADES DE ERRADICAÇÃO GLOBAL DA POLIOMIELITE

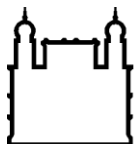
#### RESUMO

#### TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITARIA

**Klécia Marília Soares de Melo Cassemiro**

A poliomielite é uma doença viral de natureza infectocontagiosa, clinicamente caracterizada pelo desenvolvimento da paralisia flácida aguda (PFA). A Iniciativa Global para Erradicação da Poliomielite, lançada em 1988, tem como meta central a eliminação da pólio do mundo por meio da completa erradicação e contenção de todos os poliovírus (PV) selvagens e relacionados à vacina. A vigilância laboratorial é um componente fundamental dentro do programa de erradicação por fornecer, através do diagnóstico virológico, informações que possibilitam o monitoramento contínuo da circulação de PV globalmente, o que direciona estratégias e tomada de decisões. O objetivo principal deste trabalho é analisar a diversidade de PV de origem vacinal circulantes no Brasil entre 2008 e 2015, isolados no Laboratório de Enterovírus da Fundação Oswaldo Cruz por meio da vigilância laboratorial dos casos de PFA e vigilância ambiental. Para tanto, foi realizada uma análise descritiva dos isolados entre 2008 a 2015, considerando variáveis como procedência geográfica, período de isolamento e sorotipos virais. Entre 2008 e 2015, foram analisadas 3242 amostras de fezes provenientes de casos de PFA, das quais 2.5% foram positivas para PV. Todos os PV isolados foram classificados como “Sabin-like” e um isolado Sabin tipo 3 (LEV45507) foi identificado como recombinante natural intertípico Sabin 3/Sabin 2 na região do capsídeo. Quanto às 134 amostras de ambiente, 77.6% foram positivas para PV. Um isolado PVDV tipo 2 altamente mutado (8.6% de divergência em VP1) foi isolado a partir de amostra do ambiente (LEV44624). Os genomas completos dos vírus LEV45507 e LEV44624 foram sequenciados para caracterização molecular. LEV45507 apresentou um único sítio de recombinação, localizado na porção 3' do gene VP1. Dois determinantes de atenuação do genoma de Sabin 3 apresentaram reversão para o fenótipo de neurovirulência (nt 472 em 5' NC e nt 2493 em VP1), no entanto testes de caracterização fenotípica não identificaram alterações no perfil atenuado do vírus. Por sua vez, LEV44624 apresentou mutações em dois determinantes de atenuação de cepas Sabin 2 (nt 481 de 5' NC e aa 143 de VP1), além características fenotípicas que indicam reversão para o fenótipo neutrotrópico. Foram descritos diversos padrões de recombinação com outros *Enterovirus C* ao longo do genoma de LEV44624. Baseado no relógio molecular dos PV, o tempo de circulação deste vírus foi estimado em ~8.5 anos. Não foi identificada relação filogenética estreita entre LEV44624 e qualquer outro vírus (PV ou Enterovírus não-pólio) isolado no Brasil, indicando que se trata de um vírus importado. As sequências genômicas dos vírus LEV45507 e LEV44624 foram depositados no GenBank (KU763188 e KU372652, respectivamente). A vigilância laboratorial dos PV, executada de forma sistemática, é fundamental para diagnosticar vírus circulantes e identificar casos de importação.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### LABORATORIAL SURVEILLANCE OF VACCINE-RELATED POLIOVIRUS, CIRCULATING IN BRAZIL BETWEEN 2008 AND 2015, IN SUPPORT OF THE GLOBAL POLIO ERADICATION ACTIVITIES

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITARIA

**Klécia Marília Soares de Melo Cassemiro**

Poliomyelitis is a viral infectious disease, clinically characterized by the development of acute flaccid paralysis (AFP). The Global Polio Eradication Initiative, launched in 1988, aims primarily the elimination of polio worldwide through the complete eradication and containment of all wild and vaccine-related poliovirus. The laboratory surveillance is a key component within the eradication program, because it generates, through virological diagnosis, information that enables continuous monitoring of PV circulation globally, guiding strategies and decision-making. The main objective of this study is to analyze the diversity of vaccine-related PV circulating in Brazil between 2008 and 2015, isolated in the facilities of the Enterovirus Laboratory (EL) at Oswaldo Cruz Foundation by laboratory surveillance of AFP cases and environmental surveillance. Therefore, a descriptive analysis of isolates from 2008 to 2015 was carried out, considering variables such as geographic origin, period of isolation and viral serotypes. From 2008 to 2015, 3242 stool samples from AFP were examined, and 2.5% were positive for PV. All isolates were classified as Sabin-like and one Sabin type 3 (LEV45507) was identified as an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. Regarding the 134 environment samples, 77.6% were positive for PV, and one highly mutated PVDV2 (8.6% divergent in VP1) was isolated (LEV44624). The complete genomes of LEV44624 and LEV45507 were sequenced for molecular characterization. LEV45507 presented a single recombination site placed in the 3' end of VP1 gene. Two determinants of attenuation for Sabin 3 genome had reverted to wildtype (nt 472 in 5' UTR and nt 2493 in VP1) however the isolate retained the attenuated phenotype. LEV44624 presented mutations in two major determinants of attenuation for Sabin 2 strains (nt 481 5' UTR and aa 143 in VP1) and phenotypic characteristics show reversion to the neurotropic phenotype. Different recombination patterns with other *Enterovirus C* virus were found throughout the genome of LEV44624. Based on poliovirus molecular clock, its circulation time since the initial OPV dose was estimated to be ~8.5 years. No close phylogenetic relationship was described between this isolate and any polio or non-polio enteroviruses isolated in Brazil, indicating that this is an imported virus. The genome sequences of LEV44624 and LEV45507 were deposited in GenBank (KU763188 and KU372652, respectively). Laboratory surveillance of poliovirus, performed systematically, is essential for diagnosis of circulating poliovirus and identification of virus importation.

# ÍNDICE

<b>Índice de Figuras</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xv</b>
<b>Lista de Siglas e Abreviaturas</b>	<b>xvi</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Poliovírus</b>	<b>1</b>
1.1.1 Classificação	1
1.1.2 Propriedades químicas e físicas da partícula viral	2
1.1.3 Estrutura do vírion	2
1.1.4 Estrutura e organização do genoma viral	4
1.1.5 Ciclo replicativo	6
1.1.6 Mecanismos evolutivos	9
1.1.6.1 Mutação	9
1.1.6.2 Recombinação	9
<b>1.2 Aspectos clínicos da infecção por poliovírus</b>	<b>11</b>
1.2.1 Patogenia	11
1.2.2 Manifestações clínicas	12
1.2.3 Resposta imune	16
1.2.4 Tratamento	18
1.2.5 Síndrome pós-poliomielite	19
<b>1.3 Poliomielite: Situação Epidemiológica</b>	<b>20</b>
1.3.1 Histórico e Situação Epidemiológica Mundial	20
1.3.2 Poliomielite no Brasil	25
<b>1.4 A erradicação da poliomielite</b>	<b>29</b>
1.4.1 Iniciativa global para erradicação da poliomielite	30
1.4.2 Ações de vigilância	32
1.4.3 Diagnóstico laboratorial	36
1.4.3.1 Laboratório de Enterovírus (LEV)	38
<b>1.5 Vacinas</b>	<b>39</b>
1.5.1 Vacina Inativada contra a Poliomielite (VIP)	40
1.5.2 Vacina Oral contra a Poliomielite (VOP)	42
<b>1.6 Complicações relacionadas à vacinação</b>	<b>44</b>
1.6.1 Poliomielite parálitica associada à vacina (PPAV)	45
1.6.2 Poliovírus derivado vacinal (PVDV)	46
1.6.3 Interrupção da vacinação com VOP	48

1.7	Justificativa	49
2	Objetivos	51
2.1	Objetivo Geral	51
2.2	Objetivos Específicos	51
3	Material e Métodos	52
3.1	Amostras	52
3.2	Isolados virais selecionados para caracterização genômica e fenotípica	53
3.3	Cultivo de células RD	54
3.4	Inoculação e propagação de cepas de poliovírus	55
3.5	Quantificação viral por titulação	55
3.6	Reatividade com anticorpos policlonais sorotipo-específicos	56
3.7	Extração de RNA	56
3.8	Síntese de cDNA	56
3.9	Amplificação, sequenciamento e análise genômica	57
3.10	Eventos de recombinação	59
3.11	Estimativa do tempo de replicação dos isolados desde a dose vacinal	60
3.12	Análise filogenética	60
3.13	Perfil fenotípico dos isolados	61
3.13.1	Teste marcador RCT	61
3.13.2	Curva de crescimento	62
4	Resultados	63
4.1	Isolamento de poliovírus no Brasil entre 2008-2015	63
4.1.1	Vigilância laboratorial das paralisias flácidas agudas	63
4.1.2	Vigilância ambiental	67
4.2	Reatividade com anticorpos policlonais sorotipo-específicos	68
4.3	Amplificação e sequenciamento do genoma	69
4.4	Análise de eventos mutacionais	71
4.4.1	Mutações em sítios de neutralização antigênica	74
4.5	Recombinação	75
4.6	Estimativa do tempo de replicação desde a dose vacinal	80
4.7	Análise filogenética	81
4.8	Características fenotípicas	83
4.8.1	Marcador RCT	83
4.8.2	Curva de crescimento	84

<b>5</b>	<b>Discussão</b>	<b>86</b>
5.1	Vigilância laboratorial para poliovírus (2008-2015)	86
5.2	Vírus derivado vacinal tipo 2 - LEV 44624 (Artigo 1)	91
5.3	Vírus recombinante intertípico tipo 3/tipo 2 - LEV 45507 (Artigo 2)	94
<b>6</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>99</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões</b>	<b>100</b>
<b>8</b>	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>102</b>
<b>9</b>	<b>Apêndices e/ou Anexos</b>	<b>128</b>
9.1	Artigo 1	128
9.2	Artigo 2	147

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura da partícula dos poliovírus.	3
Figura 1.2. Estrutura genômica dos poliovírus.	5
Figura 1.3. Ciclo replicativo dos poliovírus.	6
Figura 1.4. Músculos comumente atingidos em casos de poliomielite.	14
Figura 1.5. Casos de poliomielite no mundo no ano de 2015.	25
Figura 1.6. Incidência de poliomielite, por 100.000 habitantes, e cobertura vacinal em menores de cinco anos, no Brasil, de 1968 a 2010.	28
Figura 1.7. Fluxograma de envio de fezes aos laboratórios de referência para pesquisa de enterovírus e liberação de resultados.	34
Figura 1.8. Fluxograma de investigação epidemiológica de PFA/poliomielite: conduta frente a casos suspeitos.	35
Figura 1.9. Fluxograma das etapas do diagnóstico laboratorial de PV.	37
Figura 1.10. Esquema representativo da atenuação das cepas Sabin.	43
Figura 1.11. Surtos de poliomielite relacionados a poliovírus circulantes derivados da vacina (cPVDV), 2000-2013.	47
Figura 4.1. Poliovírus isolados entre 2008 e 2015, distribuídos por estado, região e sorotipo.	65
Figura 4.2. Poliovírus isolados, por ano e mês de recebimento da amostra de fezes.	66
Figura 4.3. Amplificação da sequência completa dos genomas dos isolados LEV 44624 e LEV 45507, em dois fragmentos, por meio de reação em cadeia da polimerase.	69
Figura 4.4. Representação esquemática da organização do genoma dos	70

vírus LEV 44624 e LEV 45507, após sequenciamento nucleotídico.

- Figura 4.5. Mutações encontradas em sítios de neutralização antigênica dos isolados LEV 44624 e LEV 45507. 74
- Figura 4.6. Análise de recombinação do genoma do isolado LEV 44624 e outros membros da espécie *Enterovirus C*, através de plotagem de similaridade e “bootscan”, no programa Simplot. 76
- Figura 4.7. Análise de recombinação do genoma do isolado LEV 45507 e cepas Sabin tipo 1, tipo 2 e tipo 3, através de plotagem de similaridade e “bootscan” no programa Simplot. 79
- Figura 4.8. Análise filogenética das sequências de VP1 do isolado 44624 e outros PVDV tipo 2 isolados entre 1998 e 2015. 82
- Figura 4.9. Curva de replicação do isolado LEV 44624 em cultura de células RD, em comparação com Sabin 2 em diferentes temperaturas. 84

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. 'Vacina ideal' em comparação com as vacinas atualmente disponíveis contra poliomielite.	40
Tabela 3.1. Iniciadores utilizados para reações de PCR e sequenciamento	58
Tabela 4.1. Procedência geográfica das amostras de fezes enviadas ao LEV para vigilância laboratorial de casos de PFA, por ano e região do país (2008-2015)	63
Tabela 4.2. Poliovírus isolados a partir de amostras do ambiente coletadas entre 2008 a 2015 nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro.	67
Tabela 4.3. Análise da divergência nucleotídica e de aminoácidos entre o isolado LEV 44624 e Sabin 2 (GenBank AY184220)	71
Tabela 4.4. Análise da divergência nucleotídica e de aminoácidos entre o isolado LEV 45507 e as respectivas cepas de origem Sabin 3 (GenBank AY184221) e Sabin 2 (GenBank AY184220).	73
Tabela 4.5. Análise de recombinação do genoma do isolado LEV 44624 e outros membros da espécie <i>Enterovirus C</i> , no programa RDP4.	78
Tabela 4.6. Valores de Ks, Ka e Kt dos isolados LEV 44624 e LEV 45507, calculados a partir da divergência genética da cepa Sabin de referência para cada isolado.	80
Tabela 4.7. Teste de capacidade replicativa em diferentes temperaturas (marcador RCT) dos isolados LEV 44624 e LEV 45507.	83

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Adenina
aa	Aminoácido
aPVDV	Poliovírus derivado vacinal de origem ambígua
bVOP	Vacina oral contra a poliomielite bivalente
C	Citosina
CD8	“Cluster of Differentitation 8” (Grupo de diferenciação 8)
CD155	“Cluster of Differentitation 155” (Grupo de diferenciação 155)
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention” (Centros para Controle e Prevenção de Doenças)
cDNA	DNA complementar
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CGDT	Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CID	Código Internacional de Doenças
Cols.	Colaboradores
COVER	Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis
cPVDV	Poliovírus circulante derivado da vacina
cre	“Cis-acting replication element” (elemento de replicação de ação em cis)
CV	Coxsackievírus



DEVEP	Departamento de Vigilância Epidemiológica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Deoxinuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeos
ECP	Efeito citopático
EV	Enterovírus
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
G	Guanina
GPEI	“Global Polio Eradication Initiative” (Iniciativa Global para Erradicação da Poliomielite)
GT-poliomielite	Grupo de Trabalho para Erradicação da Poliomielite
h	Hora
H <sub>2</sub> O	Água
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICTV	“International Committee on Taxonomy of Virus” (Comitê Internacional para Taxonomia de Vírus)
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
iPVDV	Poliovírus derivado vacinal associado a imunodeficiência
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IRES	“Internal Ribosome Entry Site” (Sítio interno de ligação ao

	ribossomo)
kb	Kilobases
kd	Kilodalton
Lacen	Laboratório Central
LEV	Laboratório de Enterovírus
MAbs	“Monoclonal antibodies” (Anticorpos monoclonais)
MDA-5	“Melanoma Differentiation-Associated protein 5” (gene associado à diferenciação de melanoma 5)
MS	Ministério da Saúde
MOI	Multiplicidade de infecção
mVOP	Vacina oral contra a poliomielite monovalente
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NAg	“Neutralizing antigenic site” (Sítio de neutralização antigênica)
NISBC	“National Institute of Biological Standards and Control” (Instituto Nacional de Controle e Padrões Biológicos)
NK	“Natural killer cell” (célula assassina natural)
nM	Nanomolar
nt	Nucleotídeo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
ORF	“Open Reading Frame” (Sequência da região aberta de leitura)

pb	Pares de bases
PCR	“Polymerase chain reaction” (Reação em cadeia da polimerase)
PBS	Tampão fostato-salina
PFA	Paralisia flácida aguda
pH	Potencial hidrogeniônico
p.i.	Pós-infecção
PNI	Programa Nacional de Imunizações
PPAV	Poliomielite parálitica associada a vacina
PV	Poliovírus
PV+	Isolamento positivo para poliovírus
PVDV	Poliovírus derivado vacinal
Pvr	“Poliovírus Receptor” (Receptor de poliovírus)
RCT	“Replicative capacity at elevated temperatures” (Capacidade replicativa em temperaturas elevadas)
RD	Rhabdiosarcoma humano
RGLP	Rede Global de Laboratórios de Poliomielite
RIG-I	“Retinoic acid-inducible gene 1” (gene induzível por ácido retinóico I)
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
RNAse	Ribonuclease

Real-Time PCR	“Real-time polymerase chain reaction” (reação em cadeia da polimerase em tempo real)
RT-PCR	“Retrotranscription-polymerase chain reaction” (transcrição reversa associada a reação em cadeia da polimerase)
SBG	Síndrome de Guillain-Barré
SES	Secretaria Estadual de Saúde
SFB	Soro fetal bovino
SINAN	Sistema Nacional de Agravos de Notificação
SPP	Síndrome pós-poliomielite
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
T	Timina
TCID50	“Tissue culture infective dose 50%” (Dose infectante para 50% das culturas de células)
TLR	“Toll-like receptor” (receptor semelhante ao Toll)
tVOP	Vacina oral contra a poliomielite trivalente
U	Unidades
UNICEF	“United Nations Children's Emergency Fund” (Fundo das Nações Unidas para a Infância)
US EPA	“US Environmental Protection Agency” (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos)
US\$	Dólar americano
WPV	“Wild Poliovirus” (Poliovírus selvagem)
VIP	Vacina Inativada contra a poliomielite

VOP	Vacina oral contra a poliomielite
VP	“Virion protein” (Proteína viral)
VPg	“Virion protein, genome linked” (Proteína viral ligada ao genoma)
xG	Força gravitacional
μL	Microlitro
°C	Graus Celsius
2A <sup>pro</sup>	Proteína Protease 2A
3CD <sup>pro</sup>	Proteína Protease 3CD
3D <sup>pol</sup>	Proteína Polimerase 3D
3' NC	Região 3' não codificante
5' NC	Região 5' não codificante

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Poliovírus

### 1.1.1 Classificação

De acordo com a mais recente publicação do Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (da língua inglesa, “International Committee on Taxonomy of Viruses”, ICTV), os PV estão classificados dentro da ordem *Picornavirales*, família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*, espécie *Enterovirus C* (ICTV, 2015).

A família *Picornaviridae* é formada por vírus não envelopados de genoma constituído por uma fita simples de RNA de polaridade positiva (*Pico-pequeno, RNA-material genético*). O gênero *Enterovirus* atualmente está dividido em 12 espécies: *Enterovirus A, B, C, D, E, F, G, H, J, Rhinovirus A, B e C*, com base nas propriedades moleculares e evolutivas dos vírus (ICTV, 2015).

Os enterovírus que infectam humanos somam mais de 200 diferentes sorotipos, que pertencem às espécies *A, B, C e D*. As espécies *E e F* são formadas por vírus que infectam bovinos, a espécie *G* infecta porcos e, as espécies *H e J* símios (<http://www.picornaviridae.com>).

A espécie *Enterovirus C* é o protótipo do gênero Enterovírus. Dentro desta espécie estão classificados 23 (soro)tipos virais: poliovírus (PV)-1, PV-2, PV-3, coxsackievírus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, enterovírus (EV)-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117 e EV-C118.

Os PV existem como três sorotipos imunologicamente distintos (PV 1, PV 2 e PV 3). Previamente classificados como um grupo separado dentro do gênero, foram recentemente enquadrados dentro da espécie *Enterovirus C* por conta de sua proximidade genética (Stanway & Knowles, 2008).

Os diferentes tipos de PV podem ser distinguidos entre si através de reações de neutralização com soros imunes tipo-específicos, bem como pela sua diferente propensão para causar doença paralítica. Os PV, devido a sua importância médica e dentro dos avanços da Virologia no século XX, estão entre os mais bem estudados e caracterizados agentes de doenças humanas.

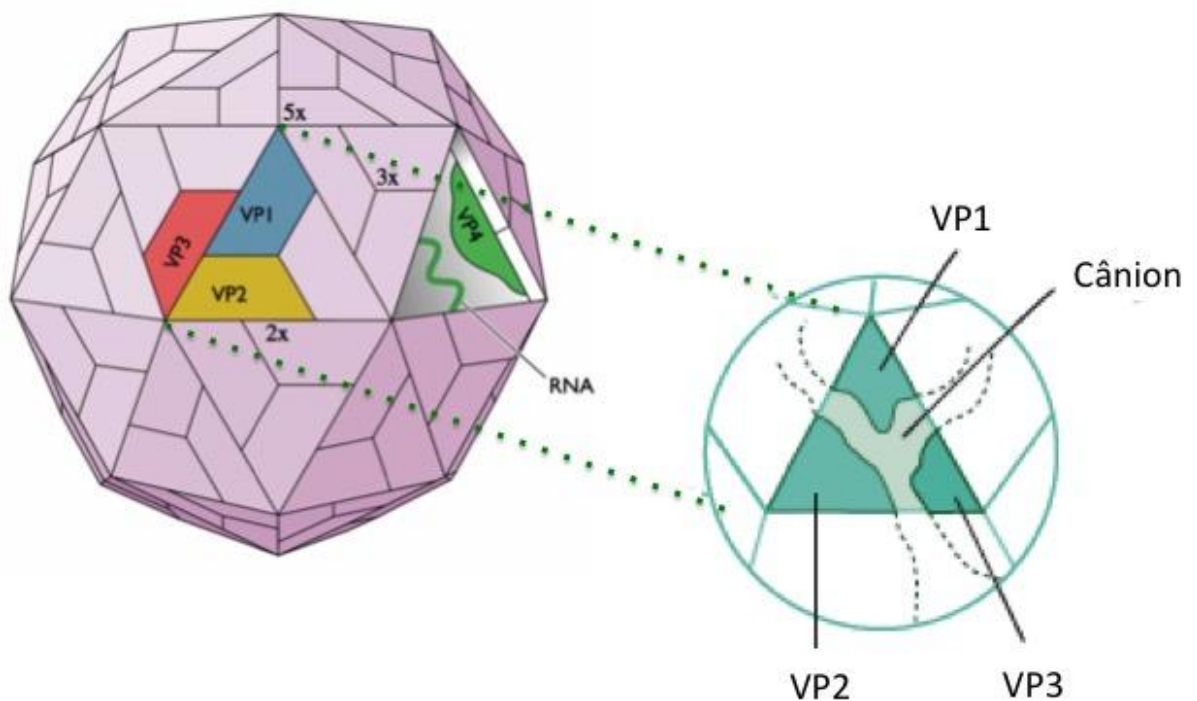
### **1.1.2 Propriedades químicas e físicas da partícula viral**

Os PV são vírions esféricos, com um diâmetro de aproximadamente 30 nm. As partículas virais são formadas por um capsídeo protéico de simetria icosaédrica, que envolve um genoma de RNA. Os vírus não apresentam envelope lipídico, portanto são resistentes a solventes orgânicos. O gênero *Enterovírus* é assim denominado pela sua capacidade de replicar no trato digestório dos vertebrados e, portanto, resistir a condições de acidez (pH 3 a 5, por uma a três horas) (Racaniello, 2007).

A partícula viral apresenta uma densidade de 1.34 g/ml em cloreto de cério, e um coeficiente de sedimentação de aproximadamente 156 S. As partículas infecciosas são relativamente resistentes ao aquecimento quando estabilizadas por cátions de magnésio. Pela ausência de envoltório lipídico, os PV são resistentes a muitos detergentes e desinfetantes, incluindo sabão comum, detergentes não-iônicos, éter, clorofórmio, entre outros solventes lipídicos. O vírus pode permanecer estável a 4 °C por semanas e em temperatura ambiente, por alguns dias. A inativação da partícula viral acontece prontamente, no entanto, sob a ação de luz ultravioleta, altas temperaturas, formaldeído, clorina livre e condições de secagem da partícula viral (Abad *et al.*, 1997 apud Pallansch & Roos, 2007).

### **1.1.3 Estrutura do vírion**

O capsídeo dos PV tem simetria icosaédrica e é formado por 60 protômeros, a unidade básica estrutural, que contém uma cópia de cada uma das quatro proteínas estruturais: VP1, VP2, VP3 e VP4 (Figura 1.1). As proteínas VP1-VP3 formam a estrutura externa do capsídeo, e VP4 está localizada na parte interna da estrutura. VP1 é a principal proteína de superfície, desempenhando um papel importante na indução de anticorpos neutralizantes em todos os três sorotipos de PV (van der Marel *et al.*, 1983).



**Figura 1.1. Estrutura da partícula dos poliovírus.**

A partícula do PV possui aproximadamente 30 nm de diâmetro e compreende 60 cópias de cada uma das quatro proteínas - VP1, VP2, VP3 e VP4 - as quais estão dispostas com simetria icosaédrica para formar um capsídeo protéico que envolve um RNA fita simples de sentido positivo. O conjunto de quatro proteínas constitui um protômero. A superfície externa da partícula é composta por platôs (eixos de simetria 5x e 3x) e cânions, que formam a estrutura corrugada do vírus. Os sítios de ligação ao receptor estão localizados nos bolsões hidrofóbicos, no interior dos cânions.

Fonte: Adaptado de McDermott, 2001 e <[http://www.afd-ld.org/~fdp\\_viro/content.php?page=picorna](http://www.afd-ld.org/~fdp_viro/content.php?page=picorna)>.

A topografia da superfície viral mostra que essas partículas possuem uma superfície corrugada, dividida entre platôs proeminentes nos eixos de simetria 5x e 3x, que são circundados por depressões profundas chamadas de cânions (Figura 1.1). Nos cânions, que são regiões envolvidas com a ligação ao receptor, estão localizados os “bolsões hidrofóbicos”, os quais contém uma molécula de esfingosina.

A estrutura antigênica do PV foi extensivamente estudada através da caracterização com anticorpos monoclonais (MAbs) da classe IgG neutralizantes. Dessa forma, foram identificados quatro epítomos principais, chamados de sítios de neutralização antigênica 1 a 4 (NAg1 – NAg4), os quais estão localizados na superfície das proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3 (Minor, 1990).

Há diferenças nos sítios antigênicos entre os três tipos virais (Yakovenko *et al.*, 2006) e essas diferenças são as principais responsáveis pela identidade



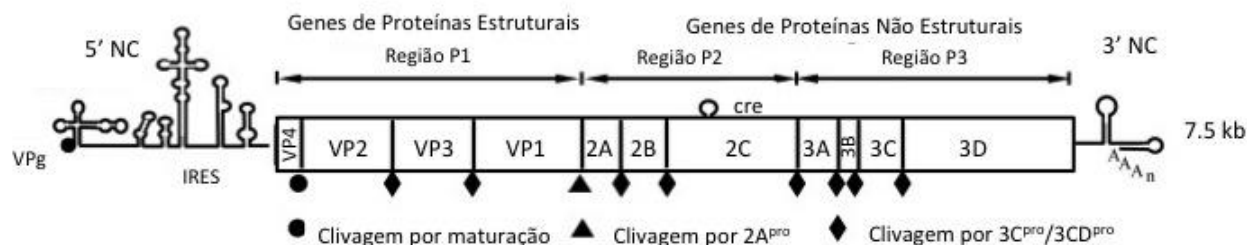
capsídica de cada um dos sorotipos de PV. Para os sorotipos 1 e 2, o NAg1 inclui os resíduos de aminoácidos 1091-1102; o NAg2 os resíduos 2164-2166, 2168-2170, 2270, 1221-1224 e 1226; o NAg3 os aminoácidos 3058-3060, 3071, e 3073; e o NAg4, os resíduos 2072 e 3076. Embora os NAg destes vírus tenham a mesma localização, eles diferem nas sequências de aminoácidos constituintes, decorrentes de cada genoma viral individualmente. Para o sorotipo 3, o NAg1 está localizado nos resíduos 1089 a 1100; o NAg2 nos aminoácidos 2164, 2166 a 2167, 2172, 1221-1224 e 1226; o NAg3 inclui os resíduos 3058-3060, 3071, 3073 e 1286-1290; e o NAg4 é formado pelos resíduos 2072, 3076-3077 e 3079 (Minor, 1990).

A ocorrência de apenas três tipos de PV (sorotipos 1, 2 e 3) se deve à existência de apenas estes três conjuntos de quatro sítios de neutralização antigênica na natureza. Eventos de recombinação são bastante raros na região do capsídeo (Martín *et al.*, 2002), o que diminui a possibilidade da emergência de novos tipos virais. Na resposta imune ao vírus, anticorpos capazes de neutralizar a infectividade viral são normalmente produzidos contra estes sítios antigênicos de neutralização e, dessa forma, anticorpos produzidos contra o sorotipo 1 não são capazes de neutralizar significativamente a infectividade dos sorotipos 2 ou 3.

#### **1.1.4 Estrutura e organização do genoma viral**

Os PV estão entre os vírus mais simples em termos de complexidade genética e tamanho (OMS, 2004). O genoma dos PV é constituído de uma molécula infecciosa de RNA de fita simples de polaridade positiva, que ao entrar no citoplasma celular, é diretamente traduzida por meio da maquinaria celular, dando origem a todas as proteínas estruturais e não estruturais do vírus.

O genoma dos PV tem aproximadamente 7500 bases e está representado na Figura 1.2. O RNA genômico contém um polipeptídeo covalentemente ligado à sua porção 5', chamado VPg (da língua inglesa "virion protein, genome linked", proteína viral ligada ao genoma), e não possui cap em sua estrutura, diferentemente dos RNAm de células eucarióticas (Agol, 1991). A região 5' não codificante (5'-NC) é longa (~750 nt) e altamente estruturada, possuindo regiões que controlam a replicação do genoma e sua tradução (Nicholson *et al.*, 1991). O sítio interno de ligação ao ribossomo – IRES tipo I, que direciona a tradução do RNAm em PV pela ligação ao ribossomo celular, está também localizado dentro da região 5' NC.



**Figura 1.2. Estrutura genômica dos poliovírus.**

O genoma dos PV é um RNA de fita simples e polaridade positiva, que possui aproximadamente 7.500 bases de comprimento. O genoma é flanqueado por extremidades 5' e 3' não codificantes (5' NC e 3' NC), e é covalentemente ligado a um polipeptídeo chamado VPg (proteína 3B) na porção 5'-NC. A longa região 5' NC possui um sítio interno de ligação ao ribossomo (IRES), essencial para a iniciação da tradução. O genoma possui uma ORF única de leitura, que ao ser traduzida dá origem a uma poliproteína que é clivada por proteases virais ( $2A^{pro}$ ,  $3C^{pro}$  e  $3CD^{pro}$ ) para dar origem às proteínas maduras. A clivagem VP4/VP2 está associada à maturação da partícula viral. A ORF dos PV pode ser dividida em três regiões: a região P1 codifica para as proteínas estruturais do capsídeo viral (VP4, VP2, VP3 e VP1), enquanto as regiões P2 e P3 codificam para proteínas envolvidas na maquinaria de replicação (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D). Algumas proteínas virais tem ação de protease. Em 2C, está localizado o elemento cre, um elemento de ação cis importante na replicação do genoma viral. O genoma do PV possui uma cauda poliA associada à porção 3' NC.

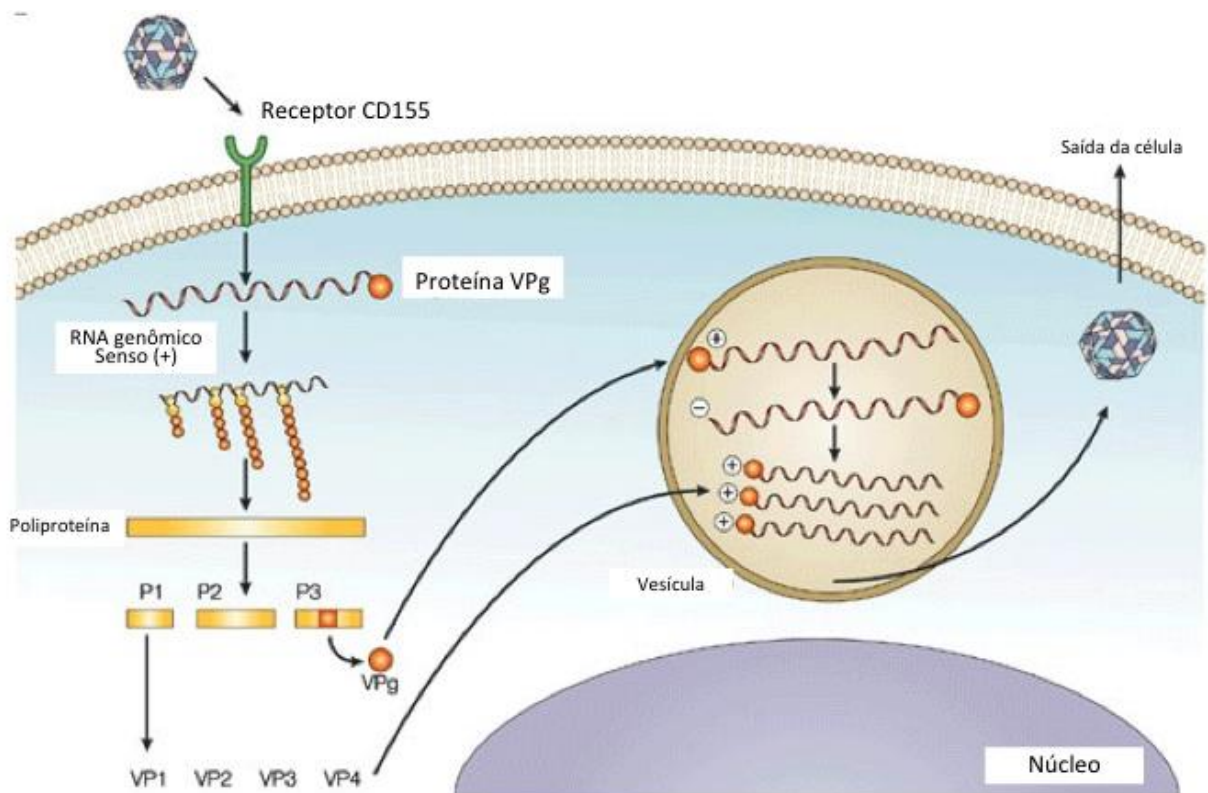
Fonte: Adaptado de Wang *et al.*, 2012.

O genoma de RNA dos PV possui apenas uma sequência de região aberta de leitura (ORF), que dá origem por tradução a uma única poliproteína que será processada por proteinases virais, para dar origem às proteínas virais individuais (Wimmer *et al.*, 1993). Por questões de nomenclatura, a poliproteína foi dividida em três regiões: P1, P2 e P3. A porção P1 codifica as proteínas estruturais (VP1-VP4), enquanto P2 e P3 codificam as proteínas envolvidas no processamento de proteínas ( $2A^{pro}$ ,  $3C^{pro}$ ,  $3CD^{pro}$ ), e na replicação do genoma (2B, 2C, 3AB,  $3B^{VPg}$ ,  $3CD^{pro}$ ,  $3D^{pro}$ ).

A região 3' não codificante (3' NC) dos PV é curta, possuindo cerca 65 nt, e está ligada a uma cauda poliA de tamanho variável, a qual é essencial para a infectividade do RNA viral. Essa região terminal do genoma está envolvida no controle da síntese da fita negativa de RNA viral, durante a replicação (Herold & Andino, 2001).

### 1.1.5 Ciclo replicativo

A replicação dos PV acontece inteiramente no citoplasma celular (Figura 1.3). Primeiramente, deve haver a ligação do vírus ao seu receptor, para permitir a entrada na célula. O receptor celular dos PV, CD155, ou Pvr, foi identificado em 1989 por Mendelsohn e colaboradores. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana tipo I, membro da superfamília das imunoglobulinas, que contém em sua estrutura uma sequência sinal N-terminal, três domínios imunoglobulina extracelulares (D1-D3), um domínio transmembrana e uma cauda citoplasmática (Mendelsohn *et al.*, 1989).



**Figura 1.3. Ciclo replicativo dos poliovírus.**

O ciclo replicativo dos PV numa célula infectada envolve a fixação ao receptor, internalização, descapsidação, tradução e replicação do RNA, encapsidação da partícula viral e saída da célula através de lise. O receptor de poliovírus (Pvr, CD155) é uma proteína de três domínios pertencente à superfamília das imunoglobulinas. O genoma dos PV, ao entrar na célula, funciona como um RNAm, que é imediatamente traduzido, dando origem a uma poliproteína que é clivada por proteases virais para produzir proteínas maduras que vão desempenhar papéis na replicação viral (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D) e encapsidação (VP1-4). A replicação viral ocorre em vesículas lipídicas no citoplasma celular, nas quais acontece a síntese de intermediários replicativos de RNA de sentido negativo, que darão origem a novas fitas de RNA de sentido positivo. O RNA genômico é ligado covalentemente à proteína VPg e encapsidado, dando origem às novas partículas de PV que são liberadas pela desintegração da célula hospedeira.

Fonte: Adaptado de Minor, 2004.

A função celular de CD155 envolve o estabelecimento de junções aderentes intercelulares entre as células epiteliais, sendo um gene especificamente expresso na linhagem primata (Maier *et al.*, 2007). Através de processamento alternativo de RNA, podem ser produzidos dois mRNAs que codificam para polipeptídeos de 392 e 417 aminoácidos, sendo que ambas as formas funcionam como receptores para PV (Racaniello, 1996).

Os PV se ligam ao receptor Pvr através do domínio imunoglobulina D1, que penetra na região dos cânions na superfície viral. Uma vez que acontece a ligação, a interação com Pvr provavelmente começa a desestabilizar a estrutura viral, enfraquecendo a afinidade da molécula de esfingosina, localizada dentro do bolsão hidrofóbico da região do cânion. À medida que a membrana da célula envolve a partícula viral, mais moléculas Pvr são recrutadas e se ligam ao capsídeo, liberando mais moléculas de esfingosina e levando à desestabilização completa do capsídeo (Racaniello, 1996).

Dessa forma, o capsídeo viral se dissocia através de modificações estruturais das proteínas, liberando o genoma de RNA no citoplasma.

A estrutura cap 5', importante para reconhecimento de RNAm pelos sistemas de tradução em células eucariotas, está ausente no genoma viral dos PV. A extremidade 5' do genoma está ligada covalentemente à proteína VPg, a qual é clivada quando da entrada do RNA viral no citoplasma celular, gerando um RNAm com terminação pUp (Hewlett *et al.*, 1976).

Para iniciar a tradução, é utilizada a estrutura específica IRES tipo I, presente na porção 5' não-codificante do genoma viral, que serve como sítio de ancoragem para os ribossomos celulares, e sinaliza a posição do códon de iniciação. O RNA viral funciona diretamente como RNAm, sendo traduzido na forma de uma única poliproteína, que será clivada em seus intermediários (P1, P2 e P3), e dará origem às proteínas virais maduras essenciais à replicação e produção de novas partículas virais.

Esta estratégia permite a síntese de vários produtos protéicos a partir de um único RNA viral. A poliproteína não é observada em células infectadas, porque começa a ser processada tão logo as sequências de proteases virais, 2A<sup>pro</sup>, 3C<sup>pro</sup> e 3CD<sup>pro</sup>, sejam traduzidas.

A replicação do genoma viral acontece inteiramente no citoplasma celular e é dependente da proteína viral 3D<sup>pol</sup>, uma RNA polimerase dependente de RNA, além de outras proteínas virais e celulares (Rueckert, 1996).

A infecção por PV leva a uma proliferação e rearranjo das membranas intracelulares das células infectadas. O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi são destruídos neste processo e dão origem a inúmeras vesículas de membrana dupla no citoplasma celular. É na superfície citoplasmática destas vesículas que acontece a replicação do RNA viral, direcionando a localização dos componentes necessários, garantindo uma maior eficiência ao processo (Racaniello, 2007).

Na célula infectada, a fita molde de polaridade positiva do genoma viral é amplificada em cerca de 50.000 novas cópias, por meio de um intermediário complementar, de polaridade negativa. A síntese da fita complementar é iniciada na extremidade 3' não codificante do genoma viral. A proteína VPg desempenha o papel de iniciador ("primer") para a proteína 3Dpol, quando após sofrer a modificação pós-traducional de uridilação, oferece uma hidroxila livre que pode ser estendida pela RNA polimerase dependente de RNA (Lyons *et al.*, 2001).

A partir de um mesmo molde de RNA, 5 a 8 fitas nascentes de polaridade complementar são transcritas simultaneamente pela polimerase viral 3D<sup>pol</sup>, formando o chamado intermediário replicativo (Rueckert, 1996; Racaniello, 2007). As fitas recém-sintetizadas servirão, então, de molde para a síntese de mais fitas. A replicação genômica em PV é assimétrica, sendo geradas cerca de 30-70 vezes mais fitas positivas que negativas.

No momento que o acúmulo de proteínas do capsídeo é suficientemente grande, inicia-se a encapsidação: o precursor P1 é clivado para dar origem aos protômeros imaturos, que formarão os pentâmeros pertencentes à estrutura do capsídeo, que quando recebe uma cópia da fita de RNA positiva recém-sintetizada, completa a formação do vírus infeccioso.

As partículas completas são liberadas pela desintegração da célula hospedeira (Watson *et al.*, 1987; Rueckert, 1996). Um ciclo replicativo inteiro leva em torno de 5 a 10 horas para os PV, dependendo de algumas variáveis como temperatura, pH, célula hospedeira, multiplicidade de infecção e da própria partícula viral (Moore & Morens, 1991).

### **1.1.6 Mecanismos evolutivos**

Os PV são considerados um dos vírus de mais rápida evolução que se tem notícia. Seu mecanismo evolutivo baseia-se numa combinação de: 1) mutações pontuais consequentes de erros induzidos pela ausência de atividade revisora da RNA polimerase viral e, 2) recombinação (homóloga ou não-homóloga). Em todos os casos, há seleção/enriquecimento das variantes com melhor “fitness” (Agol, 2006; Agol, 2010).

Dessa forma, linhagens genéticas distintas são geradas rapidamente durante uma infecção aguda por PV em um hospedeiro (Kinnunen *et al.*, 1991), bem como existem relatos do surgimento de linhagens divergentes durante a replicação prolongada em hospedeiros imunodeficientes (Cherkasova *et al.*, 2002; Odoom *et al.*, 2008).

#### **1.1.6.1 Mutação**

Os PV possuem uma elevada taxa de mutações, estimada na ordem de  $10^{-4}$  erros/nt/ciclo replicativo do genoma viral. Isso acontece em decorrência da baixa fidelidade da RNA polimerase viral (proteína 3D<sup>pol</sup>) e da ausência de mecanismos de reparo (Ward *et al.*, 1988).

Conseqüentemente, mutações se acumulam nos genomas dos PV e variantes com propriedades vantajosas são rápida e constantemente selecionadas e enriquecidas (Savolainen-Kopra *et al.*, 2009). Quando se analisam as frequências de erro da RNA polimerase 3D<sup>pol</sup> nas diferentes regiões do genoma viral, não se encontram diferenças significativas (Ward *et al.*, 1992). No entanto, parece claro que a região que codifica para as proteínas do capsídeo possui uma maior taxa total de fixação de mutações ( $\sim 10^{-2}$  substituições/nt/ano) que as demais partes do genoma, sendo portanto esta região aparentemente menos estável geneticamente (Jorba *et al.*, 2008; Savolainen-Kopra & Blomqvist, 2010).

#### **1.1.6.2 Recombinação**

O mecanismo de recombinação entre RNAs virais foi primeiramente identificado em PV (Hirst, 1962; Ledinko, 1963) e hoje já é um fenômeno de ocorrência bastante conhecida no gênero *Enterovírus*, bem como em diversos outros

vírus de RNA (Lukashev *et al.*, 2003; Oprisan *et al.*, 2002; Santti *et al.*, 1999; Kirkegaard *et al.*, 1986).

Parte da heterogeneidade genômica dos vírus de RNA se deve aos rearranjos genéticos (recombinação ou transferência de genes). Existem dois modelos principais (não-exclusivos) que explicam a recombinação de RNA: 1) Mecanismo homólogo, ou replicativo, o qual propõe que ocorra uma troca de fita molde durante a síntese da fita negativa na replicação do RNA viral (Kirkegaard *et al.*, 1986) e, 2) Mecanismo não-homólogo, ou não-replicativo, que envolve clivagem e junção de fragmentos de RNA independentemente do evento replicativo (Gmyl *et al.*, 1999).

Eventos de recombinação intratípica ocorrendo na natureza tem sido descritos entre os sorotipos 1, 2 e 3 de PV do tipo selvagem (Dahourou *et al.*, 2002; Furione *et al.*, 1993), entre cepas de PV selvagens e vacinais (Dahourou *et al.*, 2002; Georgescu *et al.*, 1995; Guillot *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003), bem como entre cepas de PV e outros vírus membros da espécie *Enterovírus C* (Brown *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2007; Rousset *et al.*, 2003).

Dessa forma, a recombinação é um fenômeno recorrente em PV e a literatura indica que o parceiro de transferência de genes pode ser qualquer vírus com um genoma suficientemente semelhante (Savolainen-Kopra *et al.*, 2009).

Romanova e cols. (1986), ao analisarem a estrutura primária das regiões genômicas chamadas junções de recombinação, ou sítios de “crossover”, de recombinantes intertípicos de PV, demonstraram que a distribuição destas regiões não é aleatória ao longo do genoma. Tais sítios estariam localizados em regiões genômicas com potencial para formarem estruturas secundárias de RNA, indicando a existência de sítios preferencias para recombinação e de mecanismos de seleção contra recombinantes que apresentem baixa viabilidade (Tolskaya *et al.*, 1987).

A análise de um grande número de recombinantes intertípicos de PV mostrou que a recombinação está relacionada com propriedades específicas das sequências de RNA parentais, o que inclui domínios com elevado conteúdo de U-A, em regiões próximas aos sítios de “crossover” (King, 1988). Além disso, experimentos realizados por Duggal & Wimmer (1999) indicam que a temperatura influencia fortemente os loci em que ocorrem recombinação entre duas cadeias de RNA.

As regiões não codificantes e a porção não estrutural do genoma são descritos como as regiões do genoma onde mais frequentemente acontecem eventos de recombinação em enterovírus, em especial nos nucleotídeos que

codificam para as proteínas 2A, 2B, 2C e 3D (Savolainen-Kopra *et al.*, 2009). Além disso, raros eventos de recombinação na região do capsídeo, tanto na proteína VP1 (Blomqvist *et al.*, 2003; Dedepsidis *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2002; Casseiro *et al.*, 2016), quanto na proteína VP2 (Kyriakopoulou *et al.*, 2006), têm sido relatados.

Apenas eventos de recombinação entre PV e outros membros da espécie *Enterovírus C* têm sido descritos como ocorrendo naturalmente. No entanto, vários tipos de cruzamentos experimentais têm demonstrado a viabilidade da ocorrência de recombinações inter-espécies, como por exemplo entre as espécies *Enterovírus B* e *C* (Bolanaki *et al.*, 2007; Johnson & Semler, 1988; Lu & Wimmer, 1996; Rieder *et al.*, 2003).

Lukashev e cols. (2003) propuseram que as espécies de enterovírus consistem de um conjunto finito de genes de capsídeo, responsáveis pela ocorrência dos diferentes sorotipos virais e um “continuum” de genes para proteínas não estruturais, que parecem evoluir de uma maneira aparentemente independente.

## **1.2 Aspectos clínicos da infecção por poliovírus**

### **1.2.1 Patogenia**

Os seres humanos são os únicos hospedeiros naturais dos PV. A entrada do poliovírus no organismo se dá por via oral, através do contato direto com fezes de pessoas infectadas (via fecal-oral), por meio de secreções orofaríngeas de indivíduos infectados com o vírus (via respiratória) ou de forma indireta através de água e alimentos contaminados com fezes de doentes ou portadores (Dowdle & Birmingham, 1997; Kew *et al.*, 2005).

O vírus, quando introduzido por via oral, penetra no organismo pela mucosa orofaríngea ou intestinal, atingindo, respectivamente, as amígdalas ou as placas de Peyer, dando início à multiplicação primária (Nomoto & Arita, 2002).

O vírus pode ser detectado nas secreções da orofaringe e nas fezes geralmente antes mesmo do início dos sintomas. A presença do vírus na orofaringe normalmente acontece por uma semana após a infecção (p.i.), ao passo em que, nas fezes a excreção de partículas virais acontece por um período bem mais prolongado, que pode se estender por até 6 semanas p.i. (CDC, 2015).



O vírus segue o curso da infecção, invadindo os tecidos linfóides cervicais e mesentéricos e, em seguida, entra na circulação sanguínea, causando uma viremia primária transitória (Bodian & Horstmann, 1965). A maioria das infecções por PV (cerca de 90%) termina neste ponto, gerando uma doença mínima de sintomas inespecíficos, como dor de garganta, febre e mal-estar, com geração de anticorpos protetores sorotipo-específicos, que protegerão o indivíduo pela vida toda (Diamant & Kok, 1991).

A continuidade da replicação em sítios não-neurais (tecido adiposo, sistema retículo-endotelial e músculos) para além desse primeiro estágio, seria o fator responsável pela geração da chamada viremia secundária e pela maior probabilidade da entrada do vírus no sistema nervoso central (Bodian, 1955; Ren & Racaniello, 1992; Wenner & Kamitsuka, 1957). Em 1-2% dos indivíduos infectados, o vírus é capaz de invadir o sistema nervoso central e replicar em neurônios motores dentro da medula espinhal, tronco cerebral ou córtex motor. A replicação do PV nos neurônios motores do corno anterior da medula e no tronco cerebral resulta na destruição destas células e é o fator responsável pelas manifestações de paralisia muscular típicas da poliomielite (Atlas, 1997).

Dois vias de entrada do PV no sistema nervoso central têm sido propostas e são amplamente sustentadas pela literatura: 1) o vírus entra no sistema nervoso central pela via hematogênica, como consequência das viremias ou, 2) o vírus entra por via neural (nervo periférico e/ou craniano), sendo então transportado diretamente para o sistema nervoso central por transporte axonal. É importante ressaltar que as duas teorias não são mutuamente excludentes e possivelmente ambos os eventos devem ocorrer (Racaniello, 2006).

### **1.2.2 Manifestações clínicas**

O espectro clínico da infecção por PV é bastante amplo, envolvendo desde infecções inaparentes ou assintomáticas, que representam a maioria dos casos, até quadros de paralisia grave, que podem levar à morte. De acordo com Sutter *et al.* (2013), o curso clínico da infecção por PV pode ser assim dividido:

**1. Infecção inaparente:** Cerca de 72% de todas as infecções por pólio em crianças são assintomáticas. Mesmo as pessoas infectadas que não apresentam

quaisquer sintomas são capazes de disseminar o vírus nas fezes e assim transmití-lo a outras pessoas.

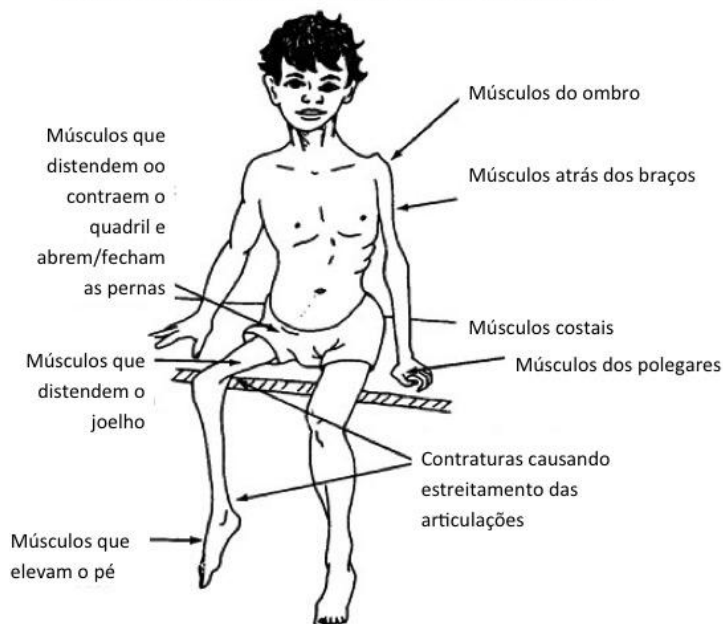
2. **Poliomielite abortiva ou doença menor:** Em torno de 24% das infecções por PV se manifestam como uma doença menor, não específica, que não apresenta evidência clínica ou laboratorial de invasão ao sistema nervoso central. Os sintomas desta forma clínica envolvem febre de baixo grau, cefaleia, náuseas, mal-estar, dor de garganta e vômitos, com remissão completa em menos de uma semana.

3. **Meningite asséptica não-paralítica:** Além dos sintomas presentes na doença menor, o indivíduo desenvolve rigidez no pescoço, costas e/ou pernas, com presença de espasmos musculares, sintomas consequentes da inflamação das meninges. Acomete cerca de 1-5% dos indivíduos infectados por PV. Tipicamente, os sintomas perduram por 2 a 10 dias após o período prodrômico, aos quais se segue completa remissão dos sintomas.

4. **PFA, poliomyelite ou doença maior:** Menos de 1% de todas as infecções por PV resultam em paralisia (Ferreira & Sousa, 2002). Os sintomas de paralisia geralmente começam 1 a 18 dias após o período prodrômico e progridem por mais 2 a 3 dias. A queixa predominante consiste em paralisia flácida assimétrica sem perda sensorial, decorrente da lesão dos neurônios motores inferiores. Todavia, pode-se verificar também a ocorrência de descoordenação secundária, comprometimento de nervos cranianos e até mesmo a invasão do tronco cerebral. A paralisia pode regredir nos primeiros dias, podendo resultar em recuperação completa, paralisia tecidual ou levar à morte. Na maioria dos casos, a função muscular retorna em algum grau. Sinais de fraqueza ou paralisia, que permanecem após 12 meses do início dos sintomas, geralmente configuram um quadro permanente.

Os músculos comumente acometidos em quadros de poliomyelite e que formam o quadro clínico tipicamente conhecido como pólio estão descritos na Figura 1.4.

### Músculos comumente atingidos em casos de pólio



**Figura 1.4. Músculos comumente atingidos em casos de poliomielite.**

Fonte: Adaptado de Werner, 1987.

A poliomielite parálitica se classifica em três tipos, dependendo do nível de comprometimento do sistema nervoso central (CDC, 2015):

- Pólio espinal: forma clínica mais comum, responsável por 79% dos casos. Acontece como resultado da invasão viral nos neurônios motores do corno anterior da medula, que são responsáveis pelo movimento dos músculos do tronco, membros e músculos intercostais. A infecção pode levar as células neuronais à morte, causando paralisia nos músculos inervados (Karp, 2005). A extensão da paralisia depende da região da medula afetada, podendo ser cervical, torácica ou lombar. Frequentemente, a paralisia se manifesta de forma assimétrica, no entanto, quaisquer músculos do corpo podem ser afetados, de forma individual (por exemplo, uma perna) ou em combinação (ambas as pernas).

- Pólio bulbar: Responsável por 2% de todos os casos de paralisia. É caracterizada pela infecção dos nervos cranianos, levando à fraqueza dos músculos por eles inervados, produzindo sintomas de encefalite e levando a dificuldades para respirar, falar e engolir, podendo inclusive levar à sufocação (Silverstein *et al.*, 2001).

- Pólio bulboespinal: forma clínica que combina as formas paralíticas espinal e bulbar, responsável por 19% de todos os casos de paralisia. Nestes casos, o vírus infecta a parte superior da medula cervical (vértebras C3 até C5), levando à paralisia do diafragma, afetando a respiração. Pacientes com este quadro necessitam de suporte ventilatório. Os chamados pulmões de aço, ou ventiladores de pressão negativa, foram utilizados em larga escala em centros de tratamento respiratório para casos de pólio.

A taxa de mortalidade dos casos de pólio paralítica, em crianças, varia em torno de 2%–5%. Quando o agravo acomete adultos, esta taxa se eleva para até 15%–30%, dependendo da idade do indivíduo. Nos casos de envolvimento bulbar, a taxa de mortalidade pode alcançar percentuais de até 25%–75% dos casos (CDC, 2015).

São fatores de risco para o desenvolvimento de sintomas paralíticos a deficiência imunitária, gravidez, remoção das amígdalas, injeções intramusculares, excesso de exercício físico e presença de lesões prévias (GPEI, 2016c).

É importante notar que, dentro do espectro clínico da poliomielite, existem outras doenças que podem causar um quadro clínico assemelhado, especialmente no que se refere ao desenvolvimento de sintomas de PFA (Sutter *et al.*, 2013). As doenças que mais frequentemente fazem diagnóstico diferencial com a poliomielite são: Síndrome de Guillain-Barré (SGB), neurite traumática (pós-injeção), mielite transversa, meningites, meningoencefalites e outras enterovirose (Echovírus tipo 71 e Coxsackievírus) (da Silva *et al.*, 2005).

Por fim, sabe-se que a infecção por PV em pessoas imunocompetentes se manifesta de forma aguda, com duração limitada da replicação viral, que varia de alguns dias a 3 meses (Gelfand *et al.*, 1957). No entanto, em casos associados à imunodeficiência, PV podem replicar-se por períodos consideravelmente mais longos (Dowdle & Birmingham, 1997), e já foram relatados casos de isolamento contínuo de PV a partir de amostras de um mesmo paciente por vários anos (de Silva *et al.*, 2012; Dunn *et al.*, 2015; Pavlov *et al.*, 2006). Pelas dificuldades associadas à identificação e ao seguimento desses indivíduos, sabe-se pouco acerca do mecanismo envolvido na excreção de PV por longos períodos, e ainda é preciso determinar se, por exemplo, existem mudanças nos títulos de excreção ao longo do tempo, quais as modificações na estrutura antigênica e na neurovirulência do vírus após muitos anos de evolução em um único indivíduo e, qual a eficácia das

vacinas atuais na interrupção da transmissão e prevenção de paralisia causadas por estes vírus (Dunn *et al.*, 2015).

### **1.2.3 Resposta imune**

A resposta imune do hospedeiro contra o PV é diversa e complexa (Dotzauer & Kraemer, 2012). Como uma grande parte das infecções se apresenta de forma assintomática, pode-se assumir que o sistema imune inato é capaz de bloquear, em certo grau, a replicação viral. Estruturas específicas de RNA viral de cadeia dupla (intermediários replicativos) são reconhecidas como padrões moleculares associados a patógenos quando presentes no citoplasma celular, por meio dos receptores celulares do tipo Toll 3 (TLR3), que estão associados a vesículas intracelulares, e dos sensores celulares gene induzível por ácido retinóico I (RIG-I) e gene associado à diferenciação de melanoma 5 (MDA-5) (Malathi *et al.*, 2007). Este reconhecimento leva à síntese de citocinas com forte atividade antiviral, como o interferon tipo I (IFN-I) (Oshiumi *et al.*, 2011).

Um outro mecanismo de imunidade inata que combate as infecções virais é a ação das células assassinas naturais, as células NK (da língua inglesa, “Natural Killer cells”) (Dotzauer & Kraemer, 2012). Estas células reconhecem e destroem as células infectadas por meio da degranulação e liberação de enzimas, as quais ativam os mecanismos de apoptose celular (Hamerman *et al.*, 2005).

De um modo geral, a resposta imune adaptativa é induzida 3 a 5 dias após o início da infecção por assistência das citocinas produzidas durante a resposta imune inata. A resposta de células T CD8 + atinge o seu pico de 7 a 10 dias após a infecção e permanece por 3 a 4 semanas (Dotzauer & Kraemer, 2012).

Os anticorpos produzidos pela resposta das células B são praticamente indetectáveis na fase aguda/sintomática da doença, mas se elevam em 2 a 4 semanas após a infecção. A infecção por PV induz a produção de imunoglobulina A (IgA, secretora e no soro), imunoglobulina M (IgM) e imunoglobulina G (IgG), e estes anticorpos são críticos para evitar reinfecções (Dotzauer & Kraemer, 2012).

Anticorpos IgM neutralizantes anti-PV aparecem 3 dias após a infecção, atingem o seu título máximo após 9 dias e desaparecem no curso de 4 semanas. A resposta de IgG anti-PV é iniciada 3 a 4 dias após a infecção e atinge seu ápice em 3 a 4 semanas. Estes anticorpos IgG persistem por anos, provavelmente por toda a

vida do indivíduo. Os anticorpos IgA de mucosa anti-PV são detectados em amostras da faringe e fezes cerca de uma semana após a infecção, enquanto a IgA no soro aparece três semanas após a exposição. Ambas as respostas de IgA atingem seus níveis máximos em aproximadamente 4 semanas após a infecção (Nathanson *et al.*, 2008; Ogra *et al.*, 1968 apud Dotzauer & Kraemer, 2012).

A imunidade de mucosa, conferida pela IgA, oferece proteção contra infecções secundárias e parece desempenhar um papel importante na prevenção da propagação do PV. Dentre as vacinas disponíveis para PV, a vacina inativada para poliomielite (VIP) é menos eficaz do que a vacina oral para poliomielite (VOP) em estimular a imunidade entérica e prevenir a infecção intestinal por PV (Bakker *et al.*, 2011). Ambas as vacinas, no entanto, induzem níveis semelhantes de anticorpos circulantes (Dotzauer & Kraemer, 2012).

Os anticorpos anti-PV são importantes para controlar a replicação viral no tecido infectado e sua propagação para outros órgãos através da viremia. A terminação da viremia acontece em sequência imediata à detecção de anticorpos neutralizantes no organismo. Visto que mesmo baixos níveis de anticorpos anti-PV circulantes, incluindo imunoglobulinas adquiridas passivamente, são capazes de prevenir a doença paralítica, há indicações que a infecção do sistema nervoso central requer ou é, pelo menos, suportada pela viremia e, portanto, de forma significativa depende da velocidade e da força da resposta de anticorpos (Ogra *et al.*, 1971 apud Dotzauer & Kraemer, 2012).

A importância dos anticorpos se manifesta ainda no tempo que o indivíduo permanece excretando vírus nas fezes. Pessoas que apresentam imunodeficiências relacionadas a anticorpos, como hipogamaglobulinemia, estão associadas à excreção persistente de vírus por longos períodos (MacLennan *et al.*, 2004), o que não é descrito em indivíduos que apresentam imunodeficiências associadas às células T (Moss *et al.*, 2003; Asturias *et al.*, 2006).

A neutralização da infecção por PV é mediada pela ligação de anticorpos sorotipo-específicos aos sítios antigênicos NAg, estruturas conformacionais, descontínuas e complexas presentes nas proteínas estruturais da superfície da partícula viral (Minor *et al.*, 1986), como descrito na sessão 1.1.3 deste trabalho. A produção de anticorpos neutralizantes pode ser induzida mesmo durante o curso assintomático da doença (imunização oculta). De modo a evadir esta defesa, o PV apresenta três sorotipos antigenicamente distintos, que não geram anticorpos

neutralizantes cruzados, o que permite que o PV infecte o mesmo indivíduo várias vezes por meio de um sorotipo diferente, mesmo que este indivíduo apresente títulos elevados de anticorpos neutralizantes contra o primeiro sorotipo (Dotzauer & Kraemer, 2012).

Normalmente, a eliminação dos vírus e das células infectadas ocorre duas semanas após a infecção, permanecendo no organismo os anticorpos e as células B e T de memória (Dotzauer & Kraemer, 2012).

#### **1.2.4 Tratamento**

Não existem, até o momento, tratamento específico para a infecção por poliovírus, ou mesmo cura para indivíduos acometidos pela poliomielite. O foco do tratamento está em aumentar o conforto dos pacientes, acelerando a recuperação e prevenindo complicações. Os tratamentos de suporte incluem: repouso, analgésicos, dieta nutritiva, ventiladores portáteis para ajudar a respiração e prática de exercícios de forma moderada (terapia física) para prevenir deformidades e perda da função muscular (Clínica Mayo, 2014).

Atualmente, existem abordagens terapêuticas em diferentes fases de desenvolvimento e foco em diversos alvos, incluindo o capsídeo viral, as proteases 2A<sup>pro</sup> e 3C<sup>pro</sup>, bem como a RNA polimerase 3D<sup>pol</sup>.

Segundo Collett e cols. (2008), existe viabilidade tecnológica para o desenvolvimento de tais drogas, bem como grande probabilidade de sucesso clínico, o que foi estabelecido por mais de três décadas de desenvolvimento de drogas para combate aos rinovírus e enterovírus não-pólio, que são relacionados aos PV. Existem compostos já conhecidos que apresentaram atividade anti-PV *in vitro*, que representam excelentes pontos de partida para o desenvolvimento de drogas para PV. Por exemplo, o autor descreve a molécula V-037, que age no capsídeo viral inibindo a entrada do vírus na célula por interferir com a ligação ao receptor. Esta molécula demonstrou importante atividade *in vitro* contra a cepa Sabin tipo 1, embora seja menos ativa contra o PV selvagem e as cepas Sabin tipos 2 e 3 (Collett, 2008).

Outros estudos demonstram que moléculas de RNA de interferência (RNAi) podem ser utilizadas para inibir a replicação do vírus em células infectadas. A atividade pós-transcricional da maquinaria de RNAi direciona para a degradação as

moléculas de RNA presentes no citoplasma que apresentem determinada sequência específica (Saleh *et al.*, 2004). Com o uso de moléculas de RNAi que especificamente reconheçam as sequências de RNA do PV, seria possível conseguir função antiviral segura e altamente específica. Diversos trabalhos vem buscando melhor compreensão e controle deste mecanismo (Gitlin & Andino, 2003; Randall *et al.*, 2003; Waterhouse *et al.*, 2001)

### **1.2.5 Síndrome pós-poliomielite**

Também conhecida como atrofia muscular progressiva pós-poliomielite, a síndrome pós-poliomielite (SPP) foi primeiramente descrita por Charcot, em 1875. A SPP é um transtorno neurológico que pode acontecer numa fase mais tardia da vida, em pessoas acometidas pelo PV durante a infância. Os sintomas usualmente se manifestam cerca de 15 anos ou mais após a infecção pelo PV (São Paulo, 2006; Oliveira & Quadros, 2008).

O agravo é caracterizado principalmente por nova fraqueza e dor nos músculos e articulações, resultando em uma diminuição da capacidade funcional e/ou surgimento de novas incapacidades. Menos comumente, a síndrome inclui dificuldades respiratórias e de deglutição, atrofias musculares e intolerância ao frio, entre outros sintomas (Oliveira & Quadros, 2008).

A teoria mais aceita para a causa da SPP é a de que o agravo se desenvolve sem a presença/atividade do poliovírus, como consequência do uso excessivo dos neurônios motores ao longo dos anos (Orsini *et al.*, 2010).

Durante a infecção, o poliovírus pode danificar até 95% dos neurônios motores do corno anterior da medula, destruindo completamente pelo menos 50% deles. Por consequência, os músculos desta área de atuação perdem sua inervação, o que leva à paralisia e atrofia. Nestes casos, os neurônios remanescentes procuram compensar o dano gerado, enviando ramificações para ativar esses músculos-órfãos, recuperando parcial ou totalmente a função neuromuscular. Dessa forma, um neurônio é capaz de estabelecer 5-10 vezes mais conexões, inervando um número muito maior de fibras neuro-musculares do que normalmente faria. Este fator levaria a uma sobrecarga neuronal e, após anos de estabilidade, a célula nervosa começaria a se degenerar, dando origem ao novo quadro sintomatológico (São Paulo, 2006).



Os fatores de risco da SPP não são completamente compreendidos. No entanto, estudos apontam para alguns fatores de risco para desenvolvimento de SSP, normalmente relacionados à gravidade da infecção inicial por PV: 1) Idade inicial da infecção (casos de infecção tardia apresentam maior risco para o aparecimento de novos sintomas neurológicos); 2) Casos que envolveram hospitalização; 3) Pacientes que fizeram uso de suporte ventilatório; 4) Envolvimento paralítico em mais de um membro; 5) Fraqueza intensa na época da pólio aguda; 6) Aumento recente de peso; e 7) Dor muscular associada com exercício (Halstead & Rossi, 1985; Trojan, 1994).

### **1.3 Poliomielite: Situação Epidemiológica**

#### ***1.3.1 Histórico e Situação Epidemiológica Mundial***

O termo poliomielite tem origem grecolatina ('pólios' = cinzento, 'mielos' = medula e 'ite' = inflamação). Trata-se de uma doença de etiologia viral de caráter altamente infeccioso, causada por um dos três tipos antigênicos de poliovírus (PV) - tipos 1, 2 e 3.

A poliomielite existe provavelmente desde a antiguidade. O documento histórico mais antigo associado ao agravo é uma estela funerária (Estela Funerária de Ruma), datada de aproximadamente 1400 a.C., que traz a representação de um indivíduo com manifestações clínicas típicas de pólio, com paralisia flácida assimétrica, membro inferior atrofiado e o pé flexionado para baixo (Minor, 2014).

Apesar deste achado histórico, até o fim do século XIX existem poucas descrições médicas acerca da poliomielite. O primeiro registro médico que claramente descreve a doença foi escrito em 1837, e trata-se de uma narrativa biográfica escrita em inglês por John Gibson Lockhart, intitulada "Memoirs of the life of Sir Walter Scott, Bart", na qual o autor descreve o evento de paralisia aguda que resultou em deficiência motora que acometeu Walter Scott em 1772, quando o mesmo tinha dois anos de idade (Lockhart, 1837 apud Modlin, 1995).

Em 1789, o médico britânico Michael Underwood fez a primeira descrição clínica da pólio, a qual chamou de "debilidade dos membros inferiores", na segunda edição do livro "A Treatise on the Disease of Children". O autor descreveu que as crianças mais jovens (1-5 anos) eram preferencialmente acometidas pela patologia,

e buscou relacionar sua etiologia ao mau funcionamento do intestino e à dentição (Underwood, 1918 apud Modlin, 1995).

O ortopedista alemão Jacob von Heine publicou, em 1840, uma investigação sistemática da poliomielite, correlacionando-a às alterações do neurônio motor inferior do corno anterior da medula, descrevendo os quadros clínicos da doença e desenvolvendo a teoria de que esta poderia ser contagiosa (Heine, 1840 apud Pearce, 2005). Por sua vez, o pediatra sueco Karl Oskar Medin, em 1887, fez a descrição do caráter epidemiológico e das diferentes formas clínicas da doença, ao observar uma epidemia de 44 casos de paralisia infantil nos arredores de Estocolmo (Medin, 1891 apud Williams, 2013).

O consenso é que, inicialmente, a doença existia de forma esporádica na população. Isso mudou no final do século XIX até meados da década de 1960, quando os padrões de qualidade de vida e higiene da sociedade começaram a se elevar e emergiram epidemias avassaladoras nos países ocidentais (Minor, 2014).

Em 1894 foi registrada a primeira epidemia significativa de paralisia infantil, na cidade de Vermont nos Estados Unidos, com registro de 132 casos acometendo principalmente crianças e relato de 12 óbitos (Caverly, 1924). Ao mesmo tempo, pequenos surtos e epidemias se espalhavam por toda a Europa e Américas. Por exemplo, em 1905 foram registrados cerca de 1000 casos na Suécia, e em 1907, foram 1200 casos em Nova Iorque.

A pólio começou a ser encarada como um real problema de saúde pública mundial, na medida em que a doença desafiava a comunidade médica e científica da época ao não se enquadrar no modelo higienista então vigente, que associava sujeira e pobreza à doença (Campos *et al.*, 2003).

O médico Ivar Wickman, aluno de Oskar Medin, após testemunhar uma grande epidemia com registro de 1301 casos na Suécia em 1905, contribuiu com importantes descobertas como o caráter sazonal da infecção, que apresentava maiores picos no final do verão e início do outono, a ocorrência de grande número de casos assintomáticos e abortivos de doença não paralítica e sua relevância para a propagação da infecção pelo contato direto pessoa a pessoa (Wickman, 1911 apud Eggers, 1999).

Ivar Wickman ainda propôs que a doença fosse chamada de Moléstia de Heine-Medin em homenagem aos avanços destes pesquisadores. Como destacam Maynard e Headley (2000), ao longo dos anos a poliomielite recebeu diversas outras

denominações como paralisia infantil, mielite dos cornos anteriores, paralisia da manhã e pólio.

No final de 1908, os médicos austríacos Karl Landsteiner e Erwin Popper propuseram a etiologia viral da doença, através de experimentos em macacos do velho mundo (*Cynocephalus hamadryas* e *Macaca mulatta*), por meio de inoculação por via intraperitoneal de uma suspensão de medula espinhal proveniente de um menino de 9 anos de idade, que tinha sucumbido à poliomielite grave após quatro dias de doença (Landsteiner & Popper, 1909 apud Eggers, 1999). O material inoculado, que era bacteriologicamente estéril, produziu resultados negativos quando injetado em coelhos, porquinhos da índia e camundongos. Os dois macacos, no entanto, exibiram lesões na medula espinhal, ponte e tronco cerebral, que eram indistinguíveis daquelas observadas em casos de poliomielite em humanos. O macaco rhesus, inclusive, desenvolveu paralisia flácida completa em ambas as pernas (Landsteiner & Popper, 1909 apud Eggers, 1999).

Em 1916, foi registrada uma grande epidemia de pólio nos Estados Unidos. O surto começou com duas crianças pertencentes à comunidade italiana do Brooklyn, em Nova Iorque, que foram acometidas no começo de maio. No fim do mesmo mês, 24 casos já haviam sido reportados no Brooklyn, dos quais 14 estavam localizados nas imediações dos casos iniciais. Até o final do mês de junho, o bairro já contava com 646 casos e, após duas semanas, já havia 150 crianças acometidas em outros cinco bairros da cidade (Lavinder, 1918 apud Wyatt, 2011).

As medidas de saúde pública aplicadas normalmente para conter epidemias, como o isolamento e a quarentena, não obtinham sucesso. A epidemia se espalhou rapidamente para outros estados, como Nova Jersey, Connecticut e Pensilvânia, perdendo força em dezembro. Somente em Nova Iorque, houve 8.900 casos de paralisia, com 2.448 mortes. Acredita-se que essa epidemia tenha atingido 23.000 casos, com 5.000 mortes espalhadas por diversas localidades, como Nova Inglaterra, Delaware, Maryland, Distrito de Columbia, Vermont e Canadá (Wyatt, 2011).

A situação era alarmante e havia muito pânico entre a população, bem como entre a mídia da época, especialmente acerca dos modos de transmissão e prevenção da doença.

“Muitos inspetores ... se posicionaram na estação de estrada de ferro, balsas e atracagens de barco ao longo do rio Delaware ... para barrar todas as crianças com menos de 16 anos de idade que tentaram atravessar para [Pensilvânia] sem certificados de saúde.”

-Los Angeles Times, 9 de agosto de 1916.

“Incapaz de encontrar um médico, ele colocou o rapaz em um automóvel e dirigiu para a Smith Infirmary, mas a criança morreu no caminho e os médicos do hospital não iriam receber o corpo... Ele dirigiu por Staten Island com o corpo do menino, por horas, à procura de alguém que iria recebê-lo”.

-New York Times, 26 de julho de 1916.

A partir desse momento, a preocupação mundial acelerou o avanço das pesquisas na área. Estudos pioneiros envolvendo PV foram essenciais para o desenvolvimento da Virologia Moderna, como:

- identificação de diferenças antigênicas entre cepas de PV, levando ao conhecimento da existência dos diferentes tipos virais, hoje conhecidos como sorotipos 1, 2 e 3 (Burnet & MacNamara, 1931),

- cultivo de PV em células do sistema nervoso de embrião humano (Sabin & Otistsk, 1936),

- adaptação da cepa Lansing em camundongos (Armstrong, 1939),

- isolamento da cepa Mahoney a partir de fezes de três crianças saudáveis, por Francis e Mack, em 1941.

- primeira propagação de um vírus em cultivo de células (Enders *et al.*, 1949), possibilitando estudos de replicação viral (esta conquista rendeu aos seus autores o prêmio Nobel em 1954);

- desenvolvimento do ensaio de placa, essencial para quantificação da infectividade viral (Dulbecco, 1952),

- primeira identificação da síntese da poliproteína precursora a partir da qual as proteínas virais seriam derivadas por clivagem proteolítica (Summers & Maizel, 1968),

- primeiro clone infeccioso de DNA de um vírus animal de RNA (Racaniello & Baltimore, 1981), e

- primeira estrutura tridimensional de partícula viral, determinada por cristalografia de raio-X (Hogle *et al.*, 1985), entre diversos outros achados.

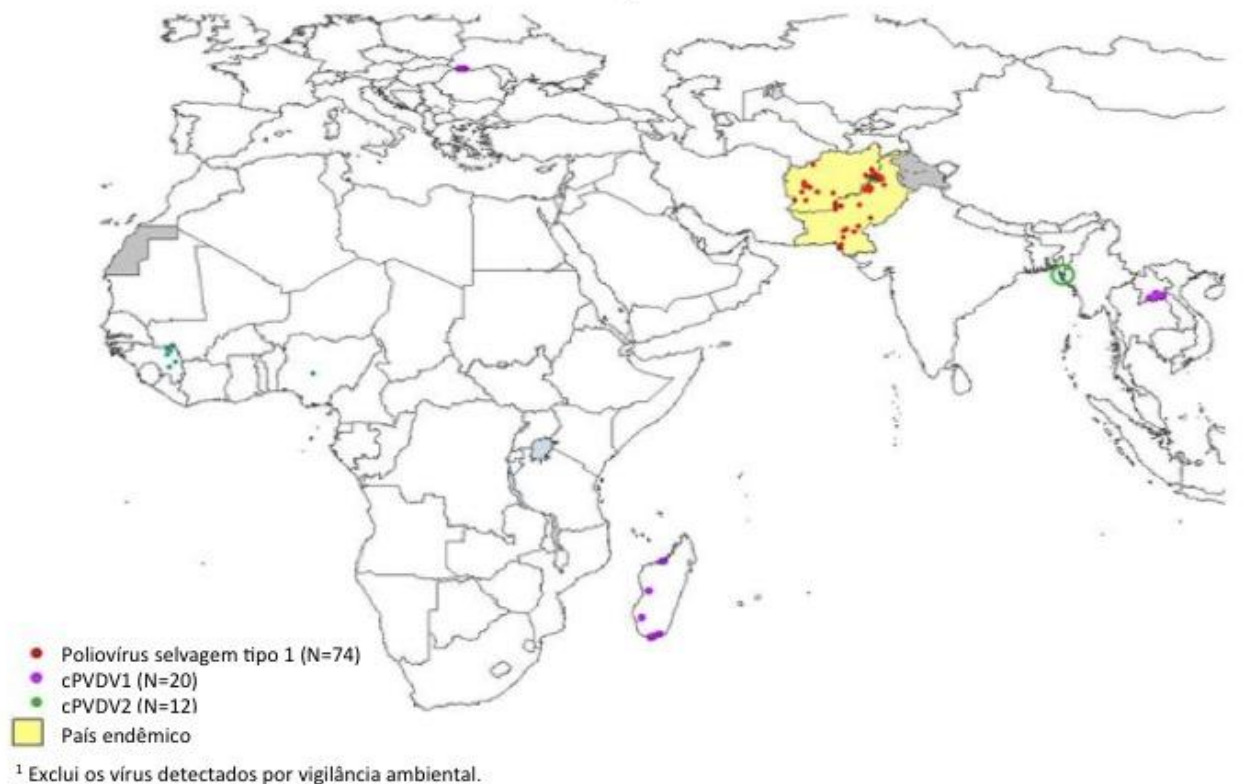
Principalmente, a propagação do PV em cultivo celular, e a descoberta da ação citopatogênica do vírus sobre células cultivadas *in vitro* (Enders, Weller & Robins, 1949), permitiram o andamento das pesquisas de Jonas Salk, que culminaram com o licenciamento da vacina injetável de vírus inativado, VIP, em 1955, e de Albert Sabin, que anunciou o desenvolvimento da vacina oral de vírus atenuado, VOP, em 1961. Esta última rapidamente se tornou a vacina de escolha da maioria dos programas nacionais de imunização ao redor do mundo.

A partir da implementação, no início da década de 60, das duas vacinas, em especial com o uso de VOP em campanhas de vacinação em massa, o número de casos de poliomielite foi reduzido drasticamente e a cadeia de transmissão foi interrompida com sucesso em muitos países (Nathanson & Kew, 2010).

Com o lançamento da Iniciativa Global de Erradicação da Poliomielite (da língua inglesa, “Global Polio Eradication Initiative”, GPEI), em 1988, pela Organização Mundial de Saúde (OMS), e implementação sistemática de ações de vigilância e vacinação, o número dos casos de pólio no mundo diminuiu drasticamente, de 350.000 casos reportados em mais de 125 diferentes países em 1988, para apenas 74 casos reportados em 2015 (Figura 1.5). Hoje, quando o mundo já se vê às portas de alcançar a eliminação global da pólio, restam apenas dois países considerados endêmicos, Afeganistão e Paquistão (GPEI, 2016a).

## Poliovírus Selvagem e Casos de cPVDV<sup>1</sup>, 2015

01 Janeiro – 31 Dezembro



### Figura 1.5. Casos de poliomielite no mundo no ano de 2015.

Os países considerados endêmicos estão destacados em amarelo. Casos relacionados aos vírus selvagens estão representados por pontos vermelhos, e casos relacionados a vírus derivados vacinais tipo 1 e tipo 2 estão representados por pontos rosa e verde, respectivamente. Esta representação não inclui os vírus detectados por vigilância ambiental.

Fonte: GPEI, 2016a.

### 1.3.2 Poliomielite no Brasil

De acordo com Lima Filho e cols. (1993 apud Schatzmayr *et al.*, 2002), existem referências a casos esporádicos de quadro clínico semelhante ao da poliomielite ocorrendo no Brasil no final do século XIX. No entanto, maiores descrições acerca dos casos de pólio no país aconteceram apenas no início de 1911, feitas quase que simultaneamente pelos médicos Luiz Hoppe, na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e Oswaldo Oliveira no Hospital Misericórdia, no Rio de Janeiro (Scorzelli, 1966 apud Schatzmayr *et al.*, 2002; Durante & Dal Poz, 2014).

Em 1911, o médico Fernandes Figueira, diretor da Policlínica das Crianças Pobres da Santa Casa de Misericórdia e pediatra responsável pelo Pavilhão Bourneville (enfermaria infantil) do Hospício Nacional de Alienados, ao se debruçar sobre 39 casos no Rio de Janeiro entre os anos de 1909 e 1911, descreveu o primeiro surto de poliomielite no país (Figueira, 1911 apud Campos, 2009).

Pouco anos depois, Francisco de Salles Gomes Jr. descreveu outro surto de pólio com 17 casos e dois óbitos que ocorreu em 1917 na cidade de Villa Americana, estado de São Paulo. A recorrência das nascentes epidemias foi destacada pelo próprio Gomes Jr., quando falou que “dos casos esporádicos, estamos caminhando para a generalização da moléstia” (Gomes Jr., 1919 apud Campos, 2009). Nesta mesma publicação, o autor teorizou que o surto de Villa Americana poderia ser decorrente da importação do vírus de Nova Iorque, por meio de algum indivíduo infectado durante a grande epidemia em 1916, que veio ao Brasil. Essa teoria está baseada no fato de Villa Americana ter sido fundada por americanos sulistas que buscaram refúgio no Brasil após a Guerra Civil norte-americana.

Nas décadas seguintes, novos surtos foram registrados em diversas cidades brasileiras: Porto Alegre (1935); Santos (1937); São Paulo e Rio de Janeiro (1939); Belém (1943); Florianópolis (1943-47); Recife (1946) e Porto Alegre (1945) (Campos *et al.*, 2009).

A partir da década de 1950, ocorreu um processo de interiorização, com o surgimento de diversos surtos em cidades do interior e, em 1953, a cidade do Rio de Janeiro vivenciou a maior epidemia de pólio documentada até então, com 746 casos notificados, com uma taxa de incidência de 21,5 casos por 100 mil habitantes (Scorzelli, 1966 apud Schatzmayr *et al.*, 2002; Brasil, 1988; Risi Jr., 1984).

As políticas públicas de controle da doença no Brasil tiveram início a partir do desenvolvimento das vacinas contra pólio, durante os anos 1950. Num primeiro momento, em 1955, houve a introdução da vacina inativada (VIP), mas a imunização feita pelas Secretarias Estaduais e Municipais (principalmente em São Paulo e Rio de Janeiro), tinha amplitude reduzida. À época, alguns jornais anunciavam a intensificação da imunização contra a poliomielite com a vacina Salk (*O Estado de São Paulo*, 10.12.1960 apud Campos *et al.*, 2003; Sartori & França, 2016).

Em 1960, por meio de um convênio entre a Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e o Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, foi estruturado um

laboratório no campus de Manguinhos para desenvolver estudos sobre enterovirose no Brasil. Pesquisadores importantes para a pesquisa virológica no país foram envolvidos no projeto, como Joaquim Travassos da Rosa e Hermann Schatzmayr. Os trabalhos desenvolvidos neste laboratório trouxeram importantes avanços, como o trabalho de formulação final da vacina atenuada oral trivalente (tVOP) a partir dos concentrados importados, utilizando-se a sacarose como estabilizador do produto. Este foi um trabalho pioneiro no Brasil, que possibilitou que a tVOP fosse titulada e distribuída para todo país, para atender às campanhas estaduais de vacinação (Schatzmayr *et al.*, 2002).

Foi em 1961 que o Ministério da Saúde (MS) adotou oficialmente a tVOP para uso nas campanhas de vacinação em massa da população infantil, que se iniciaram em julho daquele ano nas cidades de Santo André, São Bernardo e São Caetano, no estado de São Paulo, e no Rio de Janeiro, por meio de um projeto-piloto no Instituto Fernandes Figueira e uma campanha de vacinação em massa na cidade de Petrópolis. Havia um forte apoio da mídia, que conclamava a população a apoiar cada vez mais a campanha de vacinação (revisado por Campos *et al.*, 2003; Nascimento, 2011).

De acordo com Nascimento (2011), aconteceu paulatinamente um aumento no número de capitais brasileiras realizando campanhas de vacinação para pólio, com vacinas distribuídas pelo Ministério da Saúde. No entanto, não havia continuidade nas iniciativas, principalmente por deficiência no suprimento e distribuição das vacinas.

Em decorrência dos repetidos surtos em várias cidades brasileiras, o Ministério da Saúde instituiu em 1971 o Plano Nacional de Controle da Poliomielite, a primeira tentativa de controle da pólio de abrangência nacional, coordenada por João Baptista Risi Jr. (Risi Jr., 2000 apud Nascimento, 2011). As atividades foram iniciadas com um projeto piloto no estado do Espírito Santo, com objetivo de estudar a resposta sorológica à vacina e introduzir a metodologia de campanhas estaduais realizadas em um só dia. Em 1972 e 1973, houve a ampliação do plano para 14 estados brasileiros (Brasil, 1993).

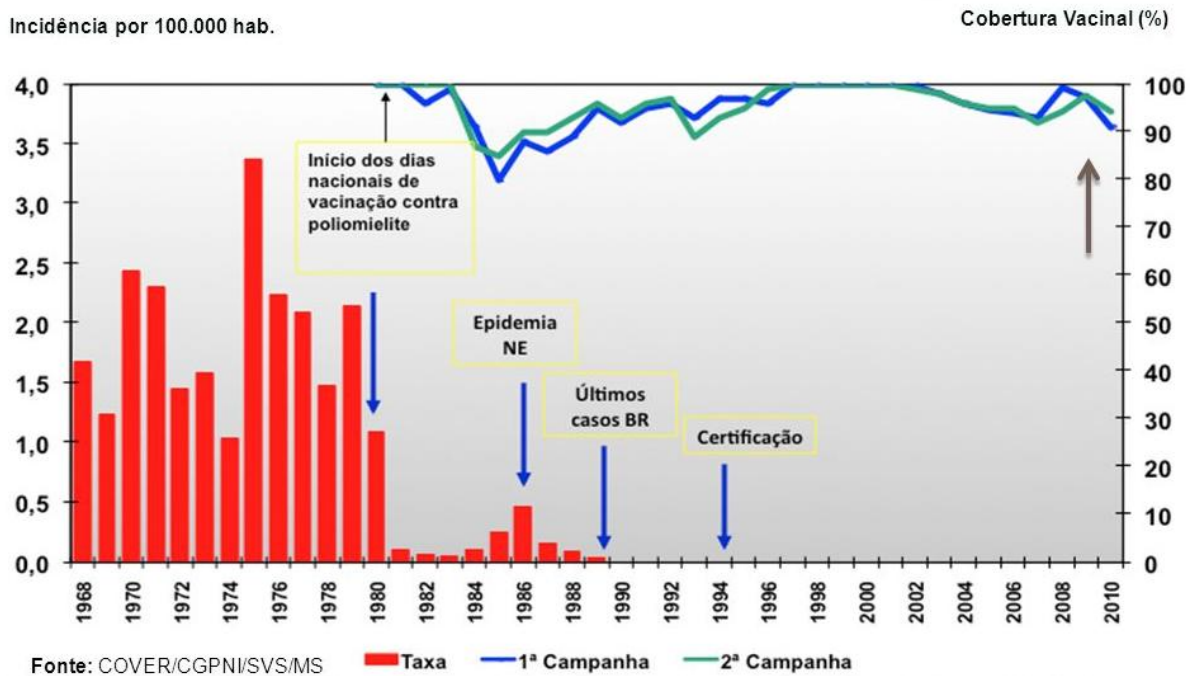
O Programa Nacional de Imunizações (PNI) foi implementado em 1973, por determinação do MS, inserindo amplamente a VOP na estratégia de imunização das crianças brasileiras. Iniciou-se, em 1980, a 1ª Campanha Nacional de Vacinação contra a Poliomielite, com a meta de vacinar todas as crianças menores de 5 anos



em um só dia. Instituíram-se, assim, os “Dias Nacionais de Imunização contra a Poliomielite”, uma estratégia sistemática de vacinação em massa, com abrangência nacional e ênfase em crianças de 0-5 anos, realizada em duas etapas anuais, normalmente em junho e agosto. Na primeira campanha, foi utilizada a vacina monovalente atenuada do poliovírus tipo 1 e, nas campanhas seguintes, as vacinas orais trivalentes (Brasil, 2015).

Segundo Risi Jr. (1984), a partir da implementação desta estratégia, aconteceu uma queda significativa na incidência da doença no país (Figura 1.6).

### Incidência de Poliomielite e Cobertura Vacinal com a VOP, em Campanhas, Brasil, 1968 - 2010 – Impacto



**Figura 1.6. Incidência de poliomielite, por 100.000 habitantes, e cobertura vacinal em menores de cinco anos, no Brasil, de 1968 a 2010.**

As duas campanhas nacionais de vacinação, realizadas desde 1980, com uso em massa da vacinal oral em crianças menores que cinco anos, duas vezes a cada ano, estão representadas pelas linhas laranja e verde. A incidência anual está representada em barras brancas.

Fonte: Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis (COVER)/Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações (CGPNI)/Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS)/Ministério da Saúde (MS).

Inicialmente, entre os anos de 1980 e 1983, o país alcançou taxas de cobertura vacinal próximas a 100% em crianças de 0 a 5 anos, com extrema

redução de casos da doença. Um relaxamento nos níveis de cobertura entre 1984 e 1987 foi o provável responsável pela elevação no número de casos nos anos de 1984 (142 casos), 1985 (329 casos), 1986 (612 casos), 1987 (196 casos) e 1988 (106 casos). Estes casos estavam concentrados sobretudo na região Nordeste, e foram associados principalmente ao PV tipo 3 (Brasil, 2002).

Em 1985, o Brasil se comprometeu com a proposta do Comitê Executivo da OPAS para alcançar a erradicação da circulação autóctone dos poliovírus selvagens nas Américas. A partir deste momento, todos os casos de paralisia flácida aguda (PFA) passaram a ser investigados de forma sistemática, o que resultou em um aumento do número de notificações de casos suspeitos anualmente, em paralelo com uma diminuição do número de casos confirmados (Brasil, 2003).

Em 1986, foi criado o Grupo de Trabalho para a Erradicação da Poliomielite (GT-poliomielite), objetivando alcançar uma maior eficiência dentro do programa de vacinação, com acompanhamento da evolução epidemiológica da doença, o que favorecia um planejamento mais efetivo das medidas de controle (Durante & Dal Poz, 2014).

O último caso de poliomielite no Brasil ocorreu na Paraíba em março de 1989, causado pelo sorotipo selvagem 1. Nas Américas, o último caso registrado foi em 1991, no Peru. Em 1994, as Américas receberam da Comissão Internacional para a Certificação da Erradicação, o certificado de interrupção da transmissão autóctone do poliovírus selvagem no continente.

#### **1.4 A erradicação da poliomielite**

O termo erradicação global é definido como

"a ausência mundial de um agente de doença específica na natureza, como resultado dos esforços deliberadas de controle que podem ser descontinuados quando o agente não mais apresentar risco significativo a partir de fontes extrínsecas" (Cochi & Dowdle, 2011).

Em 1997, a Conferência Dahlem para Erradicação de Doenças estabeleceu três critérios fundamentais a serem cumpridos para que uma doença seja considerada erradicável: 1. Os seres humanos devem ser críticos para manutenção da circulação do organismo; 2. Devem estar disponíveis ferramentas de diagnóstico

sensíveis e específicas para o agravo; e 3. Uma intervenção eficaz para interromper a cadeia de transmissão homem-a-homem deve estar disponível (por exemplo, vacinas). Além disso, muitos especialistas estabeleceram um quarto critério: Demonstração da interrupção da transmissão por um período prolongado numa grande área geográfica (Cochi *et al.*, 2002).

A varíola foi a primeira doença infecciosa a ser declarada erradicada, em 1980, como consequência de campanhas de imunização globais, lideradas pela OMS (OMS, 1982). Com o sucesso da eliminação da varíola com base na vacinação, a OMS lançou em 1974 o Programa Ampliado de Imunização, buscando expandir a cobertura vacinal no mundo para seis diferentes doenças: pólio, sarampo, tuberculose, coqueluche, difteria e tétano (Kew *et al.*, 1993).

A poliomielite se tornou um candidato à erradicação mundial ao cumprir os requisitos da Conferência Dahlem para Erradicação de Doenças: 1) O receptor celular específico dos PV (PVR ou CD155) é naturalmente expresso apenas em células de humanos e símios. Uma vez que o tamanho das populações de primatas susceptíveis é muito pequeno para manter a transmissão sustentada da doença, os seres humanos são os únicos hospedeiros essenciais para a cadeia de transmissão do PV; 2) A vigilância de casos de PFA e testes virológicos de fezes são formas confiáveis para detectar casos de pólio em populações; 3) A interrupção da cadeia de transmissão na população humana pode erradicar o vírus; e existem duas vacinas efetivas na prevenção da infecção em indivíduos e na redução da circulação do PV nas populações, a vacina oral para poliovírus (VOP) e a vacina inativada para poliovírus (VIP); 4) A eliminação da poliomielite no hemisfério ocidental serviu como prova de princípio de que a erradicação global seria possível (Garon *et al.*, 2015).

#### **1.4.1 Iniciativa global para erradicação da poliomielite**

A Iniciativa Global para Erradicação da Poliomielite (GPEI) foi lançada em 1988, durante a 41ª Assembleia Mundial da Saúde em Genebra (Resolução WHA41.28 da OMS), visando a eliminação da doença no mundo até o ano 2000 e tendo como base de ação o Programa Ampliado de Vacinação (OMS, 1988).

Devido às suas proporções e impacto direto na saúde pública, o esforço global para erradicar a pólio se tornou a maior parceria público-privada da história. Instituições como os governos nacionais, a OMS, Rotary Internacional, Centros de

Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (da língua inglesa, "Centers for Disease Control and Prevention", CDC), Fundação Bill & Melinda Gates e o Fundo das Nações Unidas para as Crianças (da língua inglesa, "United Nations Children's Fund", UNICEF) se envolveram diretamente na Iniciativa (UNICEF, 2016).

Em 1989, um Plano de Ação foi lançado pela OMS detalhando a estrutura da Rede Global de Laboratórios de Poliomielite (RGLP), que atuaria no suporte à erradicação da pólio. A rede laboratorial estaria presente nas seis regiões de atuação da OMS no globo (Américas, África, Europa, Pacífico Ocidental, Leste do Mediterrâneo e Sudeste Asiático), em diferentes níveis hierárquicos com funções determinadas (laboratórios nacionais, laboratórios de referência regional e laboratórios especializados globais).

Foi também distribuído o Manual para Investigação Laboratorial de Poliomielite (da língua inglesa, "Manual for the Virological Investigation of Poliomyelitis", WHO/EPI.CDS/POLIO/90.1), no intuito de padronizar os métodos laboratoriais em toda a rede global (OMS, 1990). Versões revisadas do manual foram distribuídas em 1997 (WHO/EPI/GEN/97.01) e em 2001 (apenas distribuída em versão eletrônica). A versão atual, intitulada Manual do Laboratório de Pólio (da língua inglesa, "Polio Laboratory Manual"), foi publicada em 2004 (OMS, 2004).

Durante a década de 1990, muitos progressos foram alcançados: o número de casos em todo o mundo caiu em mais de 99%, a poliomielite foi declarada eliminada das Américas em 1994 e o último caso de pólio causado pelo poliovírus selvagem (PVS) tipo 2 foi notificado na Índia em 1999 (CDC, 2001a). Em acréscimo, o estabelecimento de um sistema efetivo de vigilância epidemiológica e laboratorial foi essencial para o sucesso do programa, com monitoramento de regiões endêmicas e certificação de regiões livres de pólio (CDC, 1994). Como analisado por Garon e cols. (2015), o sucesso dessa iniciativa estava alicerçado nos pilares de fortalecimento da alta cobertura de imunização de rotina, atividades continuadas de vacinação suplementar, vigilância extensiva para rastreamento de vírus e foco em áreas que ainda permaneciam em transmissão continuada.

A meta de erradicação da pólio do mundo até o ano 2000 não foi alcançada e uma nova meta foi proposta para 2005. A Iniciativa de Erradicação enfrentou grandes entraves, especialmente problemas sociais e políticos nos países ainda endêmicos. Por outro lado, avanços técnicos foram levados a bom termo, como a disponibilização das vacinas monovalentes mVOP1 e mVOP3 e mais tarde a versão

bivalente (tipos 1 e 3), formulações que demonstraram um grande aumento na imunogenicidade, por eliminação da interferência do componente tipo 2 (Sutter et al., 2010).

O PV selvagem tipo 3 foi isolado pela última vez em 11 de novembro de 2012. Em 2013, foi lançado o mais recente Plano Estratégico para a Erradicação da Poliomielite (2013-2018), com a meta da eliminação da poliomielite do mundo até o ano 2018 (OMS, 2013a).

#### **1.4.2 Ações de vigilância**

Para alcançar a eliminação da poliomielite do mundo, é necessária a atuação de um sistema de vigilância ativo e sensível. As estratégias básicas da vigilância epidemiológica da poliomielite envolvem: 1) manutenção de taxas de cobertura vacinal altas e homogêneas; 2) realização de dias nacionais de vacinação, com foco em todas as crianças com menos de 5 anos; 3) investigação epidemiológica e laboratorial de todos os casos de PFA na população; e, 4) campanhas de imunização para interromper cadeias finais de transmissão.

A eficiência da erradicação global da poliomielite depende da vigilância efetiva de poliovírus nos casos clínicos de PFA. Todos os casos em menores de 15 anos ou em indivíduos maiores de 15 anos que apresentem hipótese diagnóstica de poliomielite devem ser imediatamente detectados, investigados e analisados em laboratórios pertencentes à rede global de laboratórios da OMS (Hovi, 2006). Esta ação tem como objetivo a realização de um diagnóstico rápido e preciso dos casos de poliomielite (sejam estes importados ou autóctones) e o estabelecimento de medidas de controle para impedir a disseminação do agente viral na população (da Silva *et al.*, 2005).

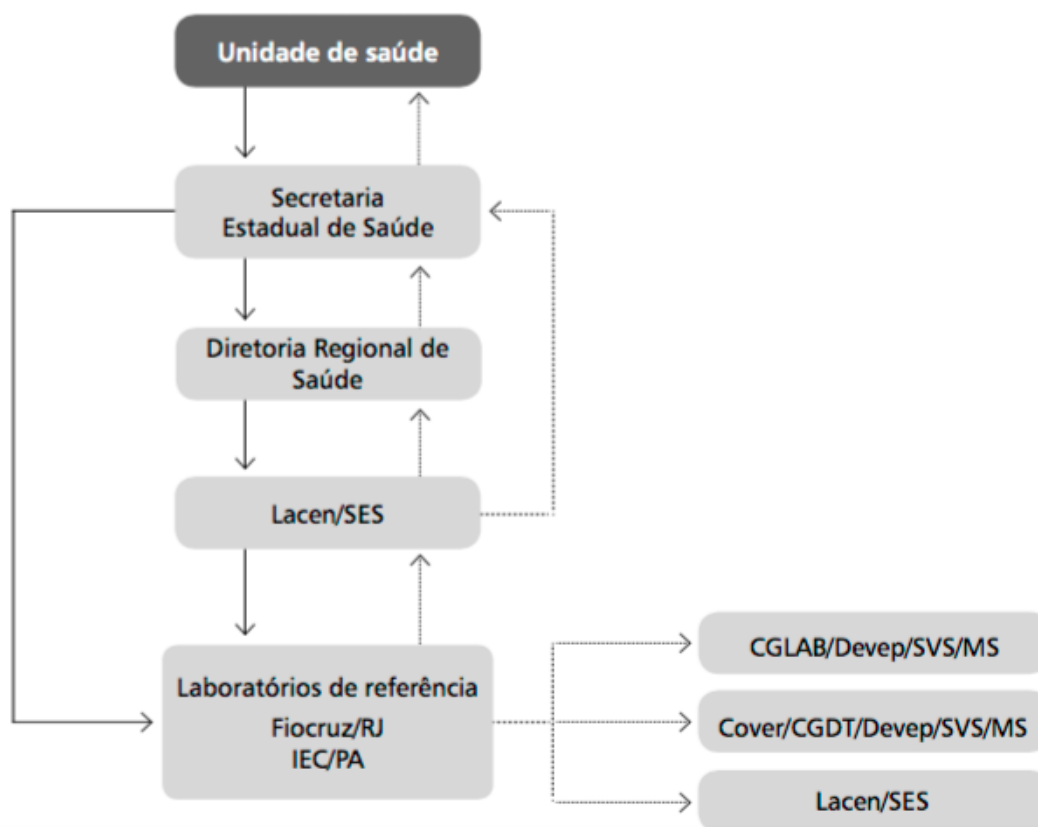
Dentro do escopo da vigilância epidemiológica, é identificado como **caso suspeito** de poliomielite todo caso de deficiência motora flácida de início súbito em menores de quinze anos, independente da hipótese diagnóstica de poliomielite, bem como todo caso de paralisia flácida de início súbito em indivíduos de qualquer idade, com histórico de viagem, nos últimos 30 dias, para países onde ainda circula o PVS.

Casos suspeitos de poliomielite são de **notificação compulsória** em todo território nacional (Portaria MS Nº 104, de 25 de janeiro de 2011) e demandam notificação imediata pelo profissional ou serviço de saúde, com coleta de dados

clínicos e epidemiológicos e registro no Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN), sob a classificação CID 10-A80.

O sistema de vigilância está baseado na identificação de todo e qualquer caso de PFA na população por parte do nível local de assistência em saúde, que deve imediatamente notificar as Secretarias de Saúde (níveis Municipal e Estadual) e proceder com o registro do caso no SINAN, por meio do preenchimento e envio da Ficha de Investigação de Paralisia Flácida Aguda/Poliomielite. Além disso, todo caso suspeito de poliomielite paralítica associada a vacina (PPAV) e/ou poliovírus derivado vacinal (PVDV) deve ser notificado no Sistema de Informação de Eventos Adversos Pós-Vacinação, por intermédio da Ficha de Investigação/Notificação de Evento Adverso Pós-vacinação (Brasil, 2014).

O fluxograma de envio de fezes aos laboratórios de referência para pesquisa de enterovírus e liberação de resultados está descrito na Figura 1.7.



**Figura 1.7. Fluxograma de envio de fezes aos laboratórios de referência para pesquisa de enterovírus e liberação de resultados.**

O fluxo de envio de amostras está representado pelas setas em preto. As unidades de saúde são primariamente responsáveis pela identificação, notificação e coleta de amostras de fezes em até 14 dias do início dos sintomas. A amostra de fezes segue para a esfera estadual [Secretaria Estadual de Saúde (SES), Diretoria Regional e Laboratório Central (Lacen)], a partir da qual é encaminhada para os Laboratório de Referência. No Brasil, o Laboratório de Enterovírus (LEV) da Fiocruz RJ atua como o Laboratório Nacional de Referência e o Instituto Evandro Chagas no Pará atende a região Norte e parte da região Nordeste como Laboratório Regional de Referência. Após o diagnóstico, o fluxo de informação segue o caminho apontado pela seta pontilhada de volta às unidades notificadoras e em direção aos órgãos de planejamento e gestão [Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB), Departamento de Vigilância Epidemiológica (DEVEP), Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS), Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis (CGDT) e Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis (COVER)].

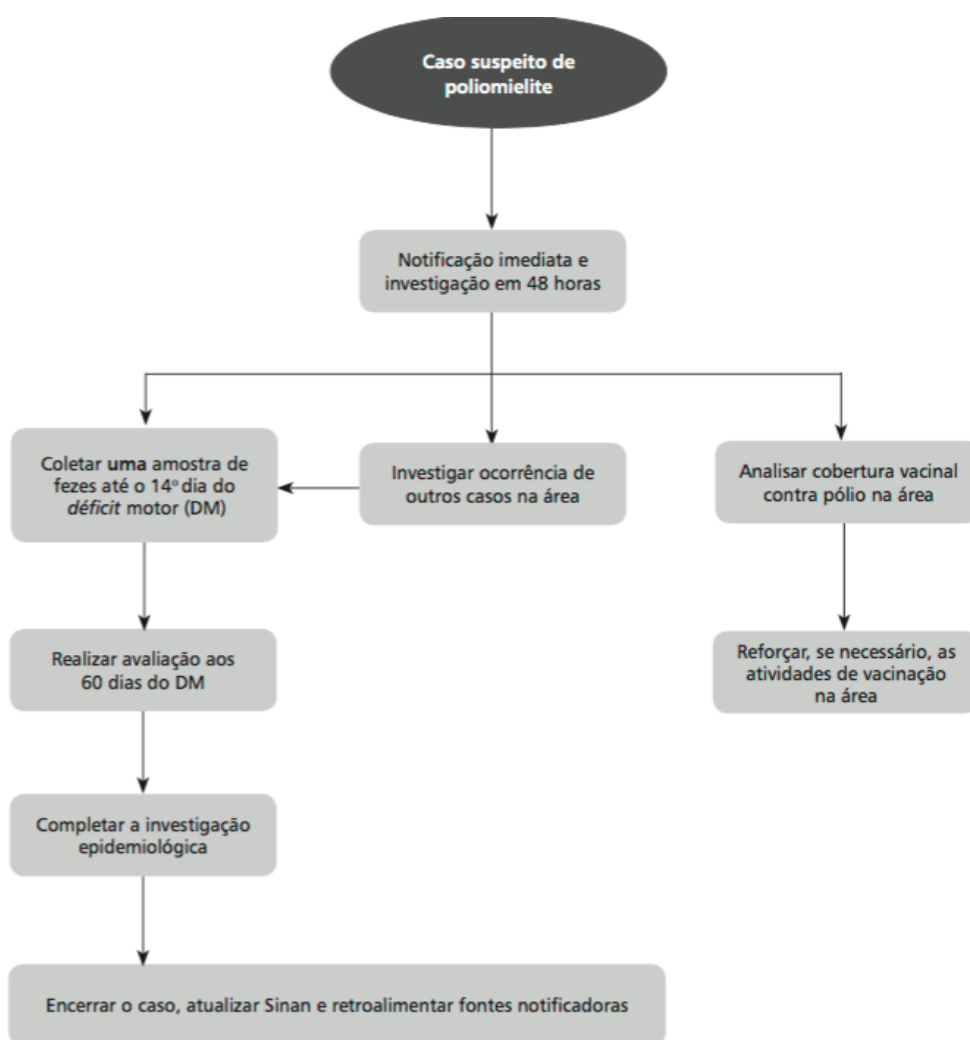
Fonte: Brasil, 2009.

Após conhecimento do caso, deve-se proceder com a investigação do caso suspeito em até 48 horas, com coleta de pelo menos uma amostra de fezes nos primeiros quatorze dias da deficiência motora, para a pesquisa de PV. A celeridade neste processo busca favorecer a tomada de decisão quanto ao desencadeamento das medidas de controle indicadas em cada situação (Brasil, 2014).

Em paralelo, deve-se proceder com investigação da ocorrência de outros casos na mesma área e verificação dos níveis de cobertura vacinal na região. O

sistema de vigilância deve ainda realizar nova avaliação neurológica no paciente após 60 dias do início do déficit motor, com complementação da investigação epidemiológica e adequado encerramento do caso através de registro completo de dados no SINAN e retroalimentação das fontes notificadoras (Brasil, 2014; São Paulo, 2007).

A Figura 1.8 descreve o roteiro de investigação dos casos de PFA no Brasil, de acordo com o Guia de Vigilância em Saúde publicado em 2014 (Brasil, 2014).



**Figura 1.8. Fluxograma de investigação epidemiológica de PFA/polio mielite: conduta frente a casos suspeitos.**

Fonte: Brasil, 2014.

A OMS preconiza, internacionalmente, a avaliação de quatro indicadores para análise da sensibilidade da Vigilância Epidemiológica: 1) A notificação de pelo



menos 1 caso de PFA para cada 100.000 habitantes menores de 15 anos; 2) A investigação de todo caso notificado em até 48 horas, independentemente do diagnóstico final; 3) A coleta adequada de fezes em pelo menos 80% dos casos (pelo menos uma amostra de fezes coletada dentro de 14 dias do início do déficit motor); e, 4) A notificação semanal (positiva ou negativa) por parte de pelo menos 80% de todas as fontes notificadoras (OMS, 2004).

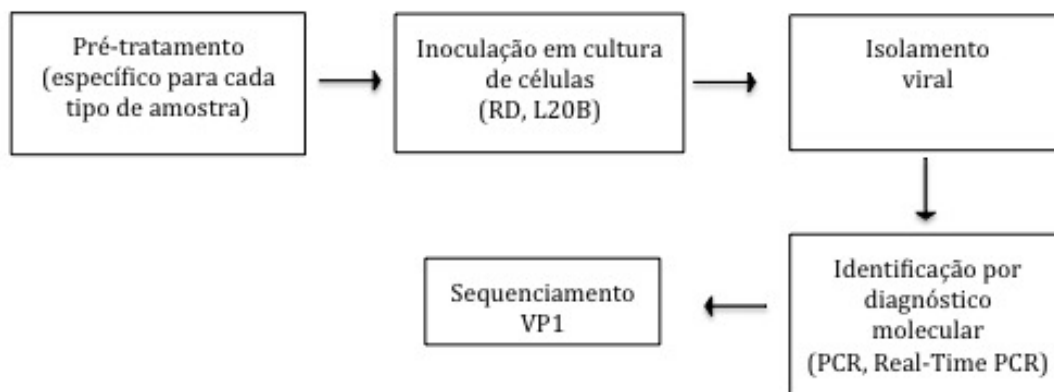
Como apenas 1% dos indivíduos infectados por PV desenvolvem sintomas paralíticos (Hovi *et al.*, 2012), a circulação silenciosa do vírus mantida em quadros assintomáticos numa população é preocupante, especialmente para países que já erradicaram o vírus e não registram casos há longo tempo. Com isto em mente, a OMS vem incluindo desde 2010, dentro do Plano Estratégico da Iniciativa de Erradicação Global da Pólio, ações de vigilância ambiental dos PV como uma ferramenta suplementar à vigilância de casos de PFA (OMS, 2010). Essa investigação possibilita o monitoramento da circulação de poliovírus selvagens e/ou vírus relacionados à vacina em amostras ambientais supostamente contaminadas por fezes humanas, mesmo na ausência de casos de PFA (Hovi, 2006; Hovi *et al.*, 2012).

A vigilância ambiental de poliovírus é altamente sensível à presença de PV circulantes na comunidade (Shulman *et al.*, 2000). Ela baseia-se no fato de que indivíduos infectados por poliovírus, sintomáticos ou não, excretam grandes quantidades de partículas virais nas fezes por várias semanas (OMS, 2003). A quantidade de vírus excretada nas fezes por uma pessoa infectada é variável, podendo chegar, num dia, a até  $10^7$  partículas virais por grama de fezes (Hovi *et al.*, 2012). Dessa forma, é avaliado o risco potencial de infecção a partir do meio ambiente e de alimentos (Jaykus, 1997), bem como a eficiência das campanhas de imunização para eliminação do tipo selvagem, especialmente durante os últimos estágios para a erradicação da poliomielite (Deshpande *et al.*, 2003).

### **1.4.3 Diagnóstico laboratorial**

O diagnóstico laboratorial dos PV é realizado de forma padronizada em todo o mundo pelos laboratórios pertencentes à RGLP, os quais são continuamente monitorados e avaliados quanto ao cumprimento dos indicadores de qualidade (GPEI, 2016b).

Na Figura 1.9 estão representadas as principais etapas envolvidas no diagnóstico laboratorial dos PV.



**Figura 1.9. Fluxograma das etapas do diagnóstico laboratorial de PV.**

Após o pré-tratamento adequado para cada tipo de amostra, acontece a inoculação em cultura de células (RD e L20B), as quais são monitoradas para o surgimento de efeito citopático. Caso aconteça isolamento viral em cultura de células, dá-se início ao diagnóstico molecular para identificação do agente. São utilizadas as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (“Real-Time” PCR) para identificação e diferenciação intratípica dos vírus, além de determinação de origem (selvagem ou vacinal). Os PV identificados são encaminhados para sequenciamento do gene VP1, para análise de sequência nucleotídica.

Fonte: Adaptado de Brasil, 2014.

O pré-tratamento de amostras fecais envolve a clarificação por clorofórmio, para remoção de contaminantes como bactérias, fungos e lipídios potencialmente citotóxicos (OMS, 2004). Para as amostras provenientes do ambiente (por exemplo, águas de esgoto) é frequentemente utilizado o método de concentração por floculação orgânica, seguido de clarificação com clorofórmio, como descrito por Sattar e Westwood (1977) e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US EPA, 2003). Em ambos os casos, o tratamento com clorofórmio dissocia os agregados de vírus mas preserva a viabilidade das partículas.

O Guia de Vigilância Epidemiológica 2014 (Brasil, 2014) e o Manual para Laboratórios de Pólio da OMS (OMS, 2004) descrevem as seguintes etapas para o diagnóstico laboratorial de PV a partir de amostras provenientes de casos de PFA:

1. O isolamento do vírus em cultura de células, realizado a partir de amostra de fezes do caso ou de seus contatos, para confirmação diagnóstica. A amostra de fezes constitui o material mais adequado para o isolamento de PV. Os melhores resultados de isolamento são alcançados com amostras fecais coletadas na fase

aguda da doença, ou seja, até o 14<sup>o</sup> dia do início da deficiência motora. As linhagens de células utilizadas para o isolamento viral são a RD (células de rabdiosarcoma humano) e L20B (linhagem transgênica de células de camundongo que expressa o receptor de PV CD155 em sua superfície).

2. A identificação do agente viral isolado, que pode ser realizada por meio de testes sorológicos (ensaios de soroneutralização com o uso de soros imunes sorotipo específicos), ou métodos moleculares (transcrição reversa associada a reação em cadeia da polimerase). Os métodos moleculares são preconizados pela OMS por permitirem identificar precisamente vírus pertencentes ao gênero *Enterovirus*, além da identificação do sorotipo do poliovírus isolado (diferenciação intratípica) e sua origem, se vacinal ou selvagem. Mais recentemente, a OMS recomenda que o diagnóstico molecular seja realizado através da técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real.

3. O sequenciamento nucleotídico do gene que codifica a principal proteína do capsídeo viral (VP1), que permite analisar a divergência do gene VP1 do isolado em relação à cepa de referência. Caso a sequência não tenha relação com a cepa vacinal, o vírus é classificado como poliovírus selvagem.

Estas mesmas técnicas são utilizadas para o isolamento de PV selvagem e vacinal a partir de amostras do ambiente, após pré-tratamento específico (Brasil, 2014).

#### **1.4.3.1 Laboratório de Enterovírus (LEV)**

Desde 1980, o LEV da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) atua como Laboratório Central para Enteroviroses, por determinação do MS e posteriormente da OPAS (Schatzmayr *et al.*, 2002). Dentro da RGLP, o LEV está classificado como Laboratório de Referência Regional para a região das Américas, desempenhando papel de monitoramento de casos importados e da circulação de cepas vacinais, especialmente o surgimento e circulação de PVDV (OMS, 2004).

Foi no LEV que foram caracterizados tanto o último PVS isolado de um paciente no Brasil (PVS tipo 1), em 1989, quanto o derradeiro vírus selvagem isolado de um paciente na região das Américas (PVS tipo 1), proveniente do Peru, em 1991 (CDC, 1997; Kew *et al.*, 1995). Hoje, o LEV é responsável pelo recebimento e investigação de amostras de PFA provenientes de grande parte da

região Nordeste e das regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. As amostras coletadas na região Norte e nos estados do Maranhão e Piauí são primariamente analisadas pelo Instituto Evandro Chagas (IEC), que atua para estas localidades como Laboratório de Referência Regional para Poliomielite. O IEC, por sua vez, envia ao LEV todos os PV isolados, para diferenciação intratípica e sequenciamento.

## **1.5 Vacinas**

Existem duas vacinas que protejam eficazmente contra a poliomielite, disponíveis há mais de 60 anos e usadas ainda hoje. A vacina inativada contra poliovírus (VIP) foi desenvolvida em 1955 por Jonas Salk e é formada por três cepas virais do tipo selvagem, neurovirulentas, inativadas com formalina (Mahoney, MEF-1 e Saukett) (Salk, 1953). Na década de 1960, Albert Sabin introduziu a segunda vacina contra a poliomielite: a vacina oral contra poliovírus (VOP), uma formulação trivalente de três estirpes virais atenuadas (Sabin 1, 2 e 3) (Sabin, 1955; Sabin, 1960).

O uso das vacinas VIP e, especialmente VOP, reduziu drasticamente a incidência da poliomielite desde a sua introdução. Um resumo das características principais de cada vacina, bem como uma comparação com a chamada 'vacina ideal', estão apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1. ‘Vacina ideal’ em comparação com as vacinas atualmente disponíveis contra poliomielite.

Fonte: Adaptado de Bandyopadhyay *et al.*, 2015.

<b>‘Vacina ideal’ x vacinas atualmente disponíveis contra poliomielite</b>			
<b>Característica</b>	<b>Vacina ideal</b>	<b>VOP</b>	<b>VIP</b>
<b>Rota de administração</b>	Não injetável	oral	Injeção intra-muscular
<b>Estabilidade térmica</b>	Estável ao aquecimento e congelamento	Sensível ao aquecimento	Sensível ao aquecimento e congelamento
<b>Imunogenicidade humoral</b>	Boa	Boa	Boa
<b>Imunogenicidade intestinal</b>	Boa	Boa	Baixa
<b>Custo</b>	<US\$ 0.10/dose	~ US\$ 0.15/dose (preço UNICEF US\$ 0.10–0.20)	~ US\$ 1/dose
<b>Segurança de produção</b>	Risco difundido e baixo	Risco difundido e baixo	Apenas em alguns países, risco de reintrodução de PVS <sup>1</sup> a partir de instalações de produção
<b>Segurança</b>	Sem risco	PPAV <sup>2</sup> , PVDV <sup>3</sup>	Sem risco
<b>Esquema vacinal/duração de proteção</b>	1 dose	Múltiplas doses	Pelo menos uma dose em esquemas combinados, de quatro a cinco doses em esquemas apenas com IPV
<b>Método de administração</b>	Imunização de rotina e atividades suplementares de vacinação	Imunização de rotina e atividades suplementares de vacinação	Imunização de rotina e atividades suplementares de vacinação em pequena escala
<b>Descarte de resíduos</b>	Sem risco	Sem risco	Perfuro-cortantes
<b>Espaço de estoque refrigerado</b>	Pequeno	Pequeno	Pequeno (<5-7% do volume total)

<sup>1</sup> PVS – poliovírus selvagem; <sup>2</sup> PPAV – poliomielite associada a vacina; <sup>3</sup> PVDV – poliovírus derivado vacinal;

### 1.5.1 Vacina Inativada contra a Poliomielite (VIP)

A VIP foi inicialmente produzida através de inativação da partícula viral infecciosa, usando um tratamento prolongado com formalina para eliminar a infecciosidade, mas sem destruir a antigenicidade da partícula viral. As primeiras preparações da vacina Salk foram produzidas por inativação de fluido de cultura de tecidos, não purificado. Atualmente, a VIP é produzida por purificação e

concentração de PV inativados (Minor, 2004). Desde seu desenvolvimento, a vacina inativada é reconhecida como uma das vacinas mais seguras para uso em seres humanos, visto que nenhum evento adverso grave ou questões de segurança foram associados ao seu uso (OMS, 2014a).

A formulação atual de VIP é responsável por uma taxa de soroconversão muito próxima a 100%, com presença de altos títulos de anticorpos para os três sorotipos de PV após um esquema vacinal de três doses, sendo a última dose administrada aos 6 meses de idade ou mais velho (Estivariz *et al.*, 2013). A VIP mostra um efeito semelhante a VOP na indução de imunidade faríngea, mas tem um efeito limitado na indução da imunidade intestinal primária, quando administrada sozinha. Dessa forma, a VIP é semelhante à VOP na redução da eliminação de partículas virais pela orofaringe, mas é inferior à VOP na redução da eliminação de partículas virais nas fezes, quando utilizada em imunização primária de indivíduos que não tenham sido expostos anteriormente à VOP (Vidor & Stanley, 2013).

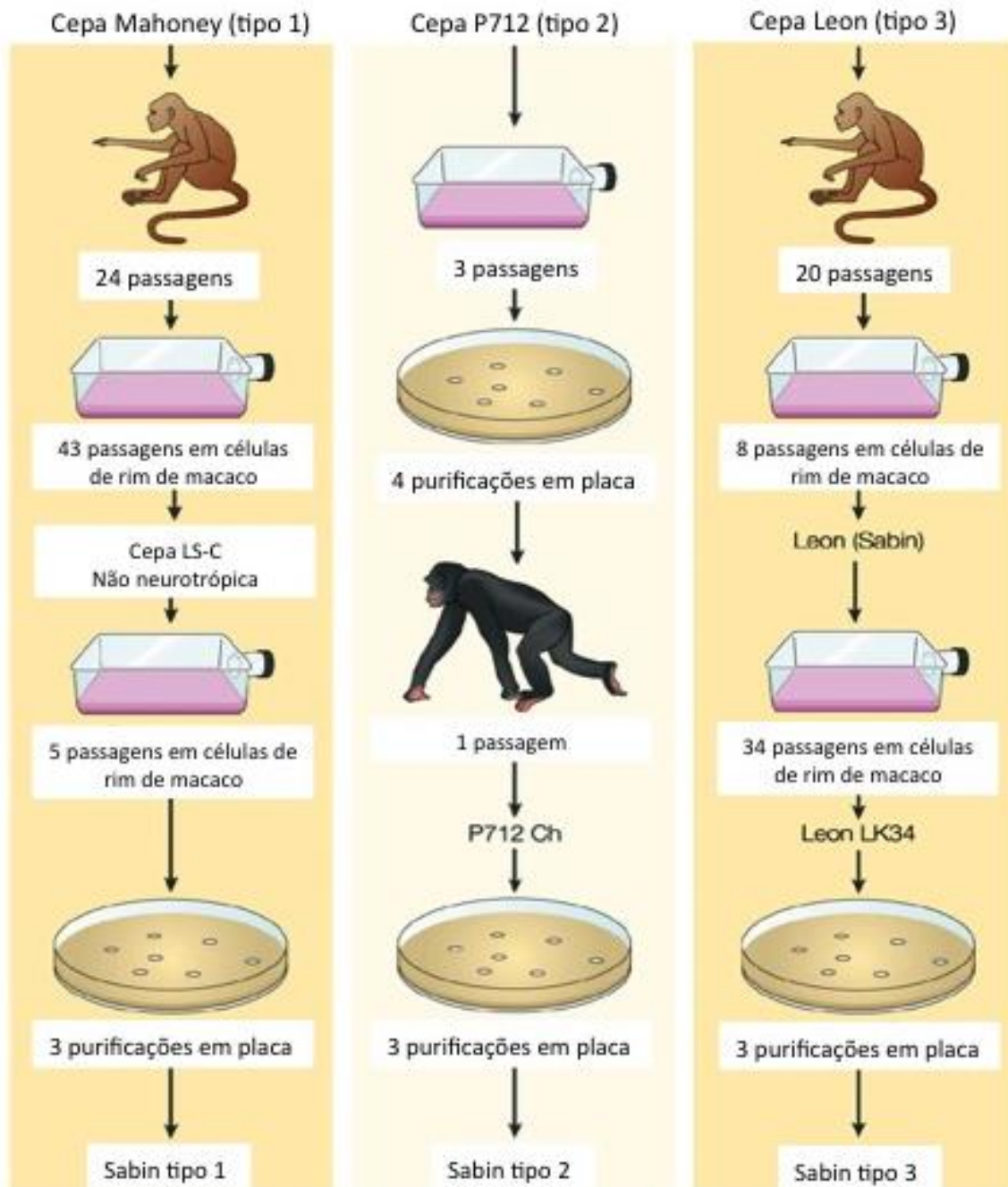
No entanto, apesar de deficiências na indução de imunidade intestinal em imunizações primárias, estudos demonstram que a VIP é eficaz na redução tanto do tempo quanto da quantidade de partículas virais eliminadas nas fezes (Hird & Grassly, 2012; Laassri *et al.*, 2005). Esse fato é um importante indicador de que a VIP é capaz de reduzir a transmissão viral, mesmo em locais onde a propagação fecal-oral ainda seja o modo predominante de transmissão (Bandyopadhyay *et al.*, 2015).

O uso da VIP foi responsável pelo fim da cadeia de transmissão de PV na Suécia e Holanda, países onde a principal forma de transmissão é a rota oral-oral (Bandyopadhyay *et al.*, 2015). Israel, por sua vez, após anos de uso exclusivo de VIP (2005-2013), reportou a detecção de PVS tipo 1 em amostras ambientais por um período de quase um ano (fevereiro de 2013 a março de 2014), sem relatos de casos de pólio sintomática (Anis *et al.*, 2013; Kopel *et al.*, 2014). Este fato despertou a atenção da comunidade científica para a possibilidade de importação de vírus e transmissão silenciosa em países que fazem uso exclusivo de VIP (Bandyopadhyay *et al.*, 2015).

### **1.5.2 Vacina Oral contra a Poliomielite (VOP)**

A VOP, desenvolvida pelo Dr. Albert Sabin, foi licenciada no início da década de 1960 e é formada por cepas de PV atenuados por sucessivas passagens em cultivo celular (Sabin, 1960).

A vacina foi desenvolvida empiricamente a partir de cepas circulantes que foram adaptadas às condições de laboratório. Para tanto, os vírus foram sucessivamente cultivados usando condições sub-ótimas de cultivo e diferentes células hospedeiras, resultando em linhagens descendentes com menor virulência em macacos (Figura 1.10). Análises do genoma viral das cepas vacinais evidenciaram que o processo de atenuação aconteceu devido a um pequeno número de mutações ao longo do genoma das cepas de PVS (Minor, 1993). As cepas produzidas, chamadas Sabin 1, 2 e 3, foram avaliadas quanto à virulência por vias intracraniana, intraespinal e subcutânea (Minor, 2004), e deram origem à vacina oral trivalente atenuada.



**Figura 1.10. Esquema representativo da atenuação das cepas Sabin.**

A vacina Sabin foi desenvolvida a partir de estirpes circulantes de PV (Mahoney - PV 1, P712 - PV 2 e Leon - PV 3) que foram adaptadas às condições de laboratório. A produção das cepas vacinais foi empírica através do cultivo de vírus em condições sub-ótimas, uso de diferentes células hospedeiras e teste de virulência em macacos utilizando diferentes vias de infecção (intracraniana, intra-espinal e subcutânea). A estabilidade das cepas foi avaliada por reinoculação em animais "naïve". A vacina oral trivalente contra a poliomielite (tOPV) é uma mistura dos três sorotipos de poliovírus atenuados, Sabin 1, 2 e 3.

Fonte: Adaptado de Minor, 2004.



Hoje, várias apresentações de VOP estão disponíveis, incluindo a vacina trivalente (tVOP) contendo os tipos 1, 2 e 3; bivalente (bVOP), contendo os tipos 1 e 3; e monovalentes (mVOP) para os tipos 1, 2 e 3.

Desde a sua criação em 1988, a GPEI baseou sua estratégia de vacinação no uso de VOP (principalmente tVOP), especialmente devido ao seu baixo custo, facilidade de administração, indução de forte imunidade de mucosa e potencial para amplificar o alcance da vacinação pela imunização indireta de contatos secundários (imunidade de rebanho) (Sutter *et al.*, 2004).

Após a administração de VOP em indivíduos susceptíveis, as cepas vacinais, à semelhança dos vírus selvagens, estabelecem infecção e replicam na orofaringe e no intestino durante 4-6 semanas, permitindo que o indivíduo desenvolva uma potente imunidade humoral e de mucosa (Minor, 2009).

A tVOP apresenta taxas de soroconversão de 100% contra todos os três sorotipos virais, quando usada em países desenvolvidos. Países em desenvolvimento geralmente apresentam taxas muito mais baixas de anticorpos detectáveis após a vacinação com três doses de tVOP, especialmente para os tipos 1 e 3, o que sugere que o componente vacinal VOP2, bem como os vírus entéricos onipresentes em países em desenvolvimento, interferem com a geração de respostas imunológicas para os tipos 1 e 3 (Orenstein & Garon, 2016).

A baixa imunogenicidade em países em desenvolvimento pode ser superada por doses adicionais (às vezes mais de 10) de VOP, que levam a níveis de imunidade da população que gerem os limiares de imunidade de rebanho necessários para interromper a transmissão de PV. Além disso, a VOP é sensível ao calor e deve ser transportada em uma cadeia de frio intacta (Shrivastav *et al.*, 2012), o que torna mais difícil a vacinação em áreas rurais e de difícil acesso, exatamente onde os últimos reservatórios de PVS permanecem.

## **1.6 Complicações relacionadas à vacinação**

As sequências que codificam a principal proteína do capsídeo, VP1 (cerca de 900 nt), são rotineiramente utilizadas para a vigilância epidemiológica de PV, pela Rede Global de Laboratórios para Poliomielite (Burns *et al.*, 2014).

Com base em análise de suas sequências, os PV são divididos em duas categorias: (1) PVS, definidos como os poliovírus com nenhuma evidência genética de derivação a partir de qualquer estirpe de vacina e demonstrada capacidade de transmissão contínua pessoa a pessoa e, (2) PV relacionadas a vacina.

Para efeitos de vigilância, os PV relacionados a vacina são ainda divididos em duas categorias: (1) isolados “Sabin-like” (SL), que apresentam uma limitada divergência de suas cepas parentais vacinais e são onipresentes, sempre que a vacina oral é utilizada e, (2) isolados derivados vacinais, ou PVDV, que apresentam níveis mais elevados de divergência genética a partir de suas cepas VOP parentais.

### **1.6.1 Poliomielite paralítica associada à vacina (PPAV)**

A PPAV é classificada como um evento adverso após exposição a VOP (Alexander *et al.*, 2004; Sutter *et al.*, 2013), de ocorrência esporádica e rara, ocorrendo em taxas igualmente baixas na maioria dos países que utilizam a VOP (Kew *et al.*, 2005; Sutter *et al.*, 2013).

O risco de desenvolvimento de PPAV é de aproximadamente 1 caso a cada 2.5 milhões de doses de vacina (Dowdle *et al.*, 2003). Indivíduos que apresentam imunodeficiências (especialmente imunodeficiência primária), administração de injeções intramusculares antes da administração de VOP, bem como indivíduos que recebem a primeira dose de VOP estão em maior risco de desenvolver PPAV (Estívariz *et al.*, 2011; Más Lago *et al.*, 2008; Nkowane *et al.*, 1987; Schonberger *et al.*, 1976; Shahmahmoodi *et al.*, 2010, Strebel *et al.*, 1995). Estes indivíduos, quando expostos a vacinação com VOP, podem apresentar infecções duradouras pelo vírus vacinal (> 6 meses) e permanecer excretando vírus por períodos substancialmente mais longos que os indivíduos imunologicamente normais (Burns *et al.*, 2014).

Durante este período, quando da replicação no intestino do indivíduo vacinado, as cepas Sabin sofrem eventos naturais de mutação, que podem levar à geração de variantes geneticamente mais estáveis, que por vezes reverterem para cepas mais neurotrópicas, que podem entrar no sistema nervoso central e causar paralisia clinicamente indistinguível da poliomielite causada pelo PVS.

A maioria dos casos de PPAV ocorre em indivíduos receptores de VOP, ou em seus contatos diretos; apenas uma pequena fração dos casos de PPAV é

descrito como adquirido na comunidade e há muito pouca evidência de circulação do vírus vacinal a partir de casos de PPAV.

Devido a diferenças de transmissibilidade e atenuação entre os tipos virais que constituem a vacina, o sorotipo 3 é o mais associado ao desenvolvimento de casos de PPAV no indivíduo receptor da vacina, o sorotipo 2 é mais frequentemente relacionado ao desenvolvimento de PPAV em indivíduos imunodeficientes e em casos de PPAV em contactantes e, o sorotipo 1, é o mais raramente associado a casos de PPAV (Sutter *et al.*, 2013).

### **1.6.2 Poliovírus derivado vacinal (PVDV)**

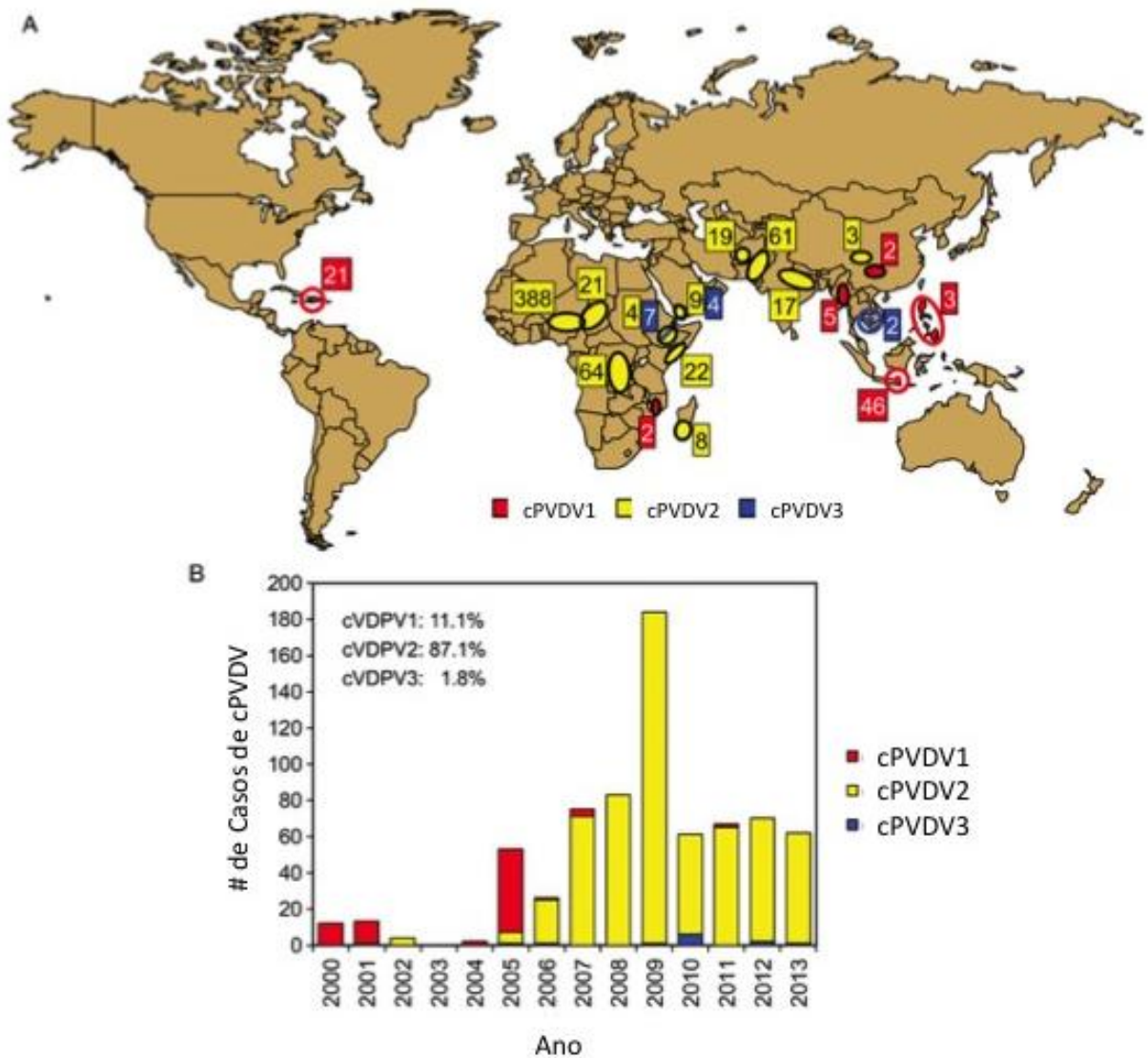
O PVDV é um poliovírus que têm propriedades genéticas atípicas, indicativas de replicação ou circulação prolongada. A definição de um PVDV está baseada no nível de divergência genética encontrado no gene VP1, com base no relógio molecular dos PV, que marca uma taxa global de evolução de aproximadamente 1% de substituições nucleotídicas que são acrescentadas ao genoma, por ano de circulação (Burns *et al.*, 2014).

Para os sorotipos 1 e 3, vírus que apresentam mais que 1% de divergência genética são classificados como PVDV, o que indicaria que este vírus esteve replicando em uma ou mais pessoas durante pelo menos um ano após a administração de uma dose de VOP. Para o sorotipo 2, o valor do nível de divergência genética em VP1 foi reduzido para 0,6% para aumentar a sensibilidade para detecção precoce de surtos causados pelo sorotipo 2 (CDC, 2012).

Os PVDVs são classificados como (1) PVDVs circulantes (cPVDVs), quando há evidência de transmissão pessoa a pessoa na comunidade; (2) PVDVs associados à imunodeficiência (iPVDVs), que são isolados a partir de pessoas com imunodeficiências primárias que apresentam infecções prolongadas por PV; e, (3) PVDVs ambíguos (aPVDVs), que são isolados a partir de pessoas sem imunodeficiência conhecida ou isolados do ambiente, sem fonte determinada (CDC, 2012).

As três categorias de PVDVs diferem em sua importância para a saúde pública. Os cPVDVs representam uma ameaça tão grande para a comunidade quanto os PVS, por terem revertido o fenótipo de atenuação e recuperado as propriedades biológicas do vírus selvagem, com o potencial para restabelecer

endemicidade em áreas de baixa cobertura vacinal (Burns *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2003). Desde os anos 2000, os cPVDV vêm sendo associados à geração de várias epidemias em comunidades que apresentam baixa cobertura vacinal (Figura 1.11).



**Figura 1.11. Surtos de poliomielite relacionados a poliovírus circulantes derivados da vacina (cPVDV), 2000-2013.**

Em A está descrita a localização geográfica dos surtos de cPVDV, por sorotipo. Em B, o número de casos associados a cPVDV, entre 2000-2013, distribuídos por ano e por sorotipo, além da distribuição percentual das infecções por cada sorotipo, calculada sobre o número total de casos de cPVDV no período.

Fonte: Adaptado de Burns *et al.*, 2014.

Por sua vez, indivíduos imunodeficientes infectados com iPVDVs podem permanecer excretando vírus por vários anos, sem sinais aparentes de paralisia (MacLennan *et al.*, 2004; DeVries *et al.*, 2011). Estes indivíduos estão em risco de desenvolver a poliomielite parálitica (Kew *et al.*, 1998) e podem infectar outros indivíduos, disseminando o vírus (Alexander *et al.*, 2009).

No caso dos aPVDVs, alguns destes vírus são na verdade cVDPVs para os quais ainda não foi identificada a fonte e/ou casos de infecção pelo vírus, ao passo que outros, como vírus altamente divergentes encontrados no ambiente em países desenvolvidos, são provavelmente iPVDVs.

### **1.6.3 Interrupção da vacinação com VOP**

Apesar de suas inúmeras vantagens e do seu papel essencial na redução dos casos de poliomielite no mundo, o uso de VOP está associado à geração dos casos de PPAV e emergência de cepas PVDV, principalmente por conta da instabilidade genética de suas cepas constituintes.

Nas fases finais de eliminação do PV e, especialmente após a erradicação do PV selvagem, as cepas vacinais originadas da vacina oral seriam a única fonte de PV no mundo. A interrupção do uso de VOP é, portanto, essencial para alcançar a completa erradicação do PV.

Em novembro de 2012, o Grupo Consultor Estratégico de Especialistas em Imunização (da língua inglesa, “Strategic Advisory Group of Experts on Immunization”, SAGE) recomendou que todos os países que, à época, utilizassem exclusivamente VOP, fizessem a introdução de pelo menos uma dose de VIP no esquema primário de vacinação (OMS, 2013b). Em acréscimo, em virtude da erradicação do PVS tipo 2 desde 1999 e do elevado número de casos de PPAV e PVDV associados ao tipo 2 vacinal, a GPEI está estruturando a retirada gradual das cepas atenuadas de VOP, começando por Sabin tipo 2 (VOP2).

Ainda em 2012, o Brasil começou a implantar a substituição do uso de VOP por VIP, por meio de um esquema combinado de vacinação. Inicialmente, foi adotado um esquema que utilizava duas doses de VIP, aos 2 meses e 4 meses de idade, seguidas de duas doses de VOP trivalente, aos seis meses e quinze meses de vida. O esquema de vacinação que entra em vigência em 2016 envolve a administração das três primeiras doses (aos dois, quatro e seis meses) com VIP,

seguidas de um reforço com VOP aos 15 meses, quatro anos e anualmente durante a campanha nacional, para crianças de um a quatro anos (Brasil, 2015).

Essa ação trará impactos diretos no risco e epidemiologia da PPAV (Platt *et al.*, 2014). A experiência dos países que substituíram VOP por VIP no calendário de imunização primária demonstra que os casos de PPAV são eliminados após a troca (Bonnet & Dutta, 2008). Além disso, estudos em países que adotaram um programa de imunização sequencial, em que crianças receberam doses múltiplas de VIP seguidas de doses múltiplas de VOP, também demonstraram que os casos de PPAV foram eliminados (Wattigney *et al.*, 2001).

## 1.7 Justificativa

Desde seu licenciamento, na década de 60, a VOP vem desempenhando um papel essencial na redução no número de casos da doença e na interrupção da cadeia de transmissão do vírus selvagem em todo o mundo. Em 2016, até 24 de maio, apenas 16 casos de poliomielite, todos relacionados ao sorotipo 1 selvagem, foram reconhecidos pela OMS, distribuídos entre Afeganistão e Paquistão (<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring.aspx>).

Na fase final de erradicação, os vírus de origem vacinal serão as únicas fontes de PV no mundo livre de pólio selvagem. Por sua instabilidade genética associada à capacidade de reversão e desencadeamento de epidemias paralíticas, esses vírus têm importante impacto no Programa de Erradicação Global e o uso de VOP deve ser interrompido para viabilizar a completa eliminação do patógeno.

Nesse período transicional, no qual muitos países ainda fazem administração de VOP (incluindo o Brasil), é importante manter altos níveis de cobertura vacinal, bem como um sistema de vigilância epidemiológica, laboratorial e ambiental de excelência para monitoramento da circulação viral, tanto de PVS quanto os relacionados à vacina.

O monitoramento da circulação de PV deve ser realizado através das ações de uma vigilância laboratorial rápida e eficaz. Recentemente, o monitoramento ambiental vem sendo fortemente encorajado pela OMS. Um panorama completo dos vírus isolados é essencial, tanto para direcionar efetivamente as ações de vigilância,

quanto para que possa ser feito um detalhado registro histórico da eliminação do vírus no mundo.

Nestas fases finais de erradicação da pólio, é importante que as nações estejam atentas para o risco de importações de casos de países onde ainda há circulação endêmica do poliovírus selvagem (Nigéria e Paquistão). Ao mesmo tempo, a preocupação acerca da emergência de surtos relacionados a PVDV em áreas com coberturas vacinais baixas e/ou heterogêneas ressalta a necessidade de monitoramento da circulação de PV.

A identificação e caracterização de isolados PVDV despertam particular interesse devido às implicações que o isolamento destes vírus traz para as estratégias atuais e futuras de erradicação global da pólio. Os PVDV são indistinguíveis dos PV selvagens em sua capacidade de causar doença paralítica em humanos e no potencial para estabelecer circulação sustentada na população.

Em acréscimo, este estudo possibilitou a descrição de cepas de PV com características biológicas de interesse para a comunidade científica, envolvendo a descrição de eventos atípicos de recombinação que podem fornecer um maior entendimento acerca dos mecanismos evolutivos dos PV.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar a diversidade de poliovírus de origem vacinal circulantes no Brasil, entre 2008 e 2015, isolados no Laboratório de Enterovírus da Fundação Oswaldo Cruz, e caracterizar molecular e fenotipicamente os isolados com importância para as fases finais da erradicação dos poliovírus.

### **2.2 Objetivos Específicos**

1) Identificar a procedência geográfica, a faixa etária dos casos com isolamento positivo, o período do ano no qual a amostra de fezes foi coletada, e o sorotipo dos PV isolados no Brasil a partir de casos de PFA, entre 2008 e 2015;

2) Identificar a procedência geográfica e o sorotipo dos PV isolados no Brasil a partir de amostras do ambiente, entre 2008 e 2015.

3) Caracterizar o genoma dos poliovírus relacionados à vacina com impacto para o Programa de Erradicação da Poliomielite, com relação à presença de mutações em regiões determinantes de atenuação e sítios de neutralização antigênica, identificação de eventos de recombinação, determinação do tempo de evolução dos isolados e análise filogenética;

4) Caracterizar fenotipicamente estes PV isolados, para identificação de marcadores relacionados à neurovirulência.



### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Amostras**

Em suporte ao Programa de Erradicação Global da Poliomielite, o LEV no Rio de Janeiro (Laboratório de Referência Nacional para Enterovirose frente ao MS e Laboratório de Referência Regional nas Américas para a OMS) realiza diagnóstico laboratorial nas amostras de fezes obtidas a partir dos casos de PFA encaminhadas pela Vigilância Epidemiológica dos Estados, de acordo com o fluxograma de envio de fezes aos laboratórios de referência descrito na Figura 1.7.

Serão analisadas neste trabalho os dados relacionados ao total de amostras de fezes (3242 amostras) recebidas pelo LEV entre os anos de 2008 a 2015, para fins de vigilância laboratorial de casos de PFA que ocorreram no Brasil. Estas amostras foram provenientes de todas as regiões do país, visto que o LEV recebe diretamente as amostras de fezes das regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e parte da região Nordeste e, por meio do IEC, no Pará, recebe as amostras com isolamento positivo para PV provenientes da região Norte, Maranhão e Piauí.

Serão ainda analisadas neste trabalho os dados relacionados às 134 amostras coletadas no ambiente para pesquisa de poliovírus, que foram recebidas no LEV entre 2008 e 2015. A maior parte destas amostras (103/134) foram enviadas pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) nos anos 2012 e 2015. No Brasil, apenas o estado de São Paulo, por meio da CETESB, desempenha atividades sistemáticas de vigilância ambiental de PV, com coletas quinzenais de amostras em diversas localidades que representam áreas de risco para a entrada de PV no país (principalmente portos e aeroportos internacionais). Os tipos de amostras coletadas envolvem, por exemplo, água de esgoto, entradas de estações de tratamento, poços e água do mar) (Barbosa, 2016). A CETESB realiza o pré-tratamento destas amostras e o isolamento dos vírus em cultura de células, enviando ao LEV os PV isolados para diferenciação intratípica e sequenciamento.

As demais 31 amostras de ambiente foram coletadas na cidade do Rio de Janeiro, no período de dezembro de 2011 a dezembro de 2012, como parte de um projeto de monitoramento da presença de PV em amostras de águas residuais recolhidas em uma estação de tratamento de águas residuais no município (Estação

de Tratamento de Águas Residuais Alegria), como descrito por Pereira e cols. (2016).

O LEV realizou o diagnóstico laboratorial de acordo com o algoritmo descrito na Figura 1.9, tanto nos casos de amostras de fezes provenientes de casos de PFA quanto amostras do ambiente.

Para as amostras de fezes, estão organizadas no banco de dados do LEV as informações acerca da data de coleta, procedência geográfica, data de envio e recebimento das amostras, dados provenientes das fichas epidemiológicas como a idade dos pacientes, resultado do isolamento viral, diferenciação intratípica e sequenciamento. Quanto as amostras coletadas do ambiente, o LEV dispõe das informações de data e local de coleta das amostras, data de recebimento das amostras, resultado do isolamento viral, diferenciação intratípica e sequenciamento.

Dessa forma, o LEV é depositário de um grande acervo de informações consolidadas acerca da circulação de PV no Brasil. Neste trabalho, foram avaliados descritivamente os registros de amostras recebidas e analisadas pelo LEV para pesquisa de PV durante a série histórica '2008 a 2015'. Compuseram a população do estudo os registros acerca de todas as amostras coletadas no Brasil neste período e relacionadas no banco de dados do laboratório pelas palavras-chave "PFA" (amostras de fezes de casos de PFA) e/ou "Ambiental" (amostras coletadas no ambiente).

As informações obtidas foram utilizadas para construir e analisar planilhas de dados no programa Excel (Microsoft Excel para Mac 2011, versão 14.6.3).

Esta pesquisa foi realizada com fontes de dados secundários individuais do LEV da FIOCRUZ, não envolvendo pacientes diretamente. Serão divulgados apenas dados agrupados.

### **3.2 Isolados virais selecionados para caracterização genômica e fenotípica**

Por meio da análise dos registros de PV relacionados à vacina isolados no Brasil entre 2008 e 2015, destacaram-se dois vírus:

- Um poliovírus derivado vacinal tipo 2 (PVDV 2), altamente divergente, isolado a partir de amostra coletada no ambiente (registro LEV 44624). A amostra de

água do mar foi coletada pela equipe da CETESB no Porto de São Sebastião, em São Paulo, em janeiro de 2014.

- Um vírus “Sabin-like” tipo 3, que apresentou um evento de recombinação intertípica (Sabin 3/Sabin 2) na região do capsídeo (registro LEV 45507). O vírus foi isolado a partir de amostra de fezes de um paciente com sintomas de PFA, coletada em janeiro de 2015 no estado de São Paulo.

Como discutido na Justificativa deste trabalho (Seção 1.7), o isolamento de um vírus PVDV é um evento de grande relevância dentro do escopo do Programa de Erradicação. Por sua vez, o isolamento de um vírus naturalmente recombinante na região do capsídeo é um evento raramente relatado na literatura científica e sua descrição pode trazer esclarecimentos sobre os mecanismos de evolução da espécie *Enterovírus C*.

Por estes motivos, tais isolados foram selecionados para caracterização molecular do genoma e análise de propriedades fenotípicas.

### **3.3 Cultivo de células RD**

Células RD (“National Institute of Biological Standards and Control”, NIBSC 081003), provenientes de rhabdomiosarcoma humano, foram fornecidas pelo CDC, e semeadas em meio de crescimento Eagle-Earle acrescido de soro fetal bovino (SFB) a 10% termicamente inativado (Life-Technologies), Penicilina-Streptamicina a 1% (Gibco) e aminoácidos não-essenciais a 1% (Gibco), utilizando frascos T75 (Corning). Cerca de um  $2,5 \times 10^6$  células por frasco foram mantidas em incubadora a 36 °C, sem controle de CO<sub>2</sub>, para expansão celular.

Quando as células estavam próximas à confluência (2-3 dias), foi realizada a substituição do meio de crescimento pelo meio de manutenção Eagle-Earle acrescido de SFB termicamente inativado a 1%, Penicilina-Streptamicina a 1% e aminoácidos não essenciais a 1%.

As células foram sub-cultivadas a cada 7 dias, aproximadamente. Para tanto, as células foram lavadas brevemente, por duas vezes, com tampão fóstico salina (PBS) livre de cálcio e magnésio, pH 7.4, tripsinizadas pela ação de solução Tripsina a 0.25% em PBS (Gibco) a 36 °C e ressuspensas em meio de crescimento. As

células foram contadas em câmara de Neubauer, semeadas em frascos T75 (Falcon) e mantidas a 36 °C até o próximo sub-cultivo.

### **3.4 Inoculação e propagação de cepas de poliovírus**

As cepas de referência (controles) Sabin 1 (NISBC 01/528), Sabin 2 (NISBC 01/530) e Sabin 3 (NISBC 01/532), fornecidas pelo CDC, bem como os vírus LEV 44624 e LEV 45507 foram inoculados em células RD a fim de obter aumento do título viral.

As cepas virais estavam estocadas a -80 °C em criotubos. O inóculo viral (~50 µL) foi realizado em frascos T75 (Corning), contendo uma camada confluyente e saudável de células RD em 25 ml de meio de manutenção, sendo utilizado um frasco para cada cepa viral. Os frascos inoculados foram mantidos em incubadora a 36 °C, sem controle de CO<sub>2</sub>, por 24-48 horas. Quando 75-100% das células apresentaram efeito citopático 3+ ou 4+, o frasco foi retirado da incubadora e submetido a três ciclos de congelamento/descongelamento, para promover a ruptura de todas as células.

O lisado celular foi centrifugado para clarificação por 20 minutos a 1500 xG em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi aliqotado e estocado a -80 °C em criotubos.

### **3.5 Quantificação viral por titulação**

As partículas infecciosas a partir dos estoques virais foram quantificadas através de ensaios de titulação. As diluições em série (base 10), para cada cepa viral foram preparadas e inoculadas em culturas de células RD, em duplicata, em placas de 96 poços previamente semeadas com ~2000 células/poço. As células foram incubadas em estufas a 36 °C, sem controle de CO<sub>2</sub> e observadas por até 5 dias. O número de poços com células infectadas foi determinado para cada diluição do vírus por identificação da presença de efeito citopático.

O título viral foi calculado pela fórmula de Karber e expresso como o valor de TCID<sub>50</sub> (da língua inglesa, “50% Tissue Culture Infectious Dose”), ou seja, o valor de

diluição de vírus capaz de infectar 50% das culturas de células (Reed & Muench, 1938).

### **3.6 Reatividade com anticorpos policlonais sorotipo-específicos**

A fim de determinar as características antigênicas dos isolados LEV 44624 e LEV 45507, um teste de soroneutralização em microplaca de 96 poços foi realizado de acordo com as recomendações da OMS (OMS, 2004), utilizando anticorpos policlonais sorotipo-específicos (anti-PV1, -PV2 e -PV3) e células RD.

O soro policlonal sorotipo-específico foi titulado na base 2 (diluição 1:2 a 1:2048) em meio de Eagle-Earle. Em placas de poliestireno de 96 poços, as diferentes diluições de anticorpos foram incubadas a 37 °C durante uma hora com 100 TCID<sub>50</sub> de cada cepa viral testada: cepas de referência Sabin 1, Sabin 2 e Sabin 3 (controles) e cepas-teste LEV 44624 e LEV 45507. Um total de 100 µL de uma suspensão de células RD contendo  $\sim 2 \times 10^5$  células/mL em meio Eagle-Earle, suplementado com SFB a 2%, foi adicionado a cada poço e a placa foi novamente incubada a 36.5 °C, sem controle de CO<sub>2</sub>, durante 7 dias, sendo examinadas diariamente para o aparecimento de efeito citopático. O perfil antigênico (sorotipo) de cada vírus foi identificado por meio do soro imune capaz de neutralizar completamente a infectividade da partícula viral (ausência de efeito citopático). Os testes foram realizados em triplicata.

### **3.7 Extração de RNA**

O material genético dos vírus LEV 44624 e LEV 45507 foi extraído a partir do sobrenadante de lisado celular, previamente estocado a -80 °C, utilizando o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante.

### **3.8 Síntese de cDNA**

Para síntese da fita de DNA complementar (cDNA), uma reação de 21 µL (volume final) foi preparada como segue. Aproximadamente 5 ng de RNA total foram

suspendidos em 10 µL de H<sub>2</sub>O livre de DNase/RNase, aos quais foram acrescentados 2 picomoles de iniciador específico (5'-TCGATAAGC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCCGAATT-3') e 1 µL de dNTP a 10 mM (Life Technologies). A mistura foi incubada a 65 °C por 5 minutos e rapidamente resfriada em banho de gelo. Em seguida, ao tubo foram acrescentados 4 µl de tampão de primeira-fita 5x concentrado, 2 µl de DTT a 0.1M, 20 U de inibidor de RNase RNAsin (Promega), sendo a mistura incubada a 42 °C por 2 minutos. Por fim, foram adicionadas 200 U da enzima transcriptase reversa SuperScript II (Life Technologies), sendo a reação incubada a 42 °C por 50 minutos e a enzima inativada com 15 minutos a 70 °C. A fita de RNA do duplex RNA-DNA foi eliminada por meio da ação seletiva da RNase H (1 µL, 2 U), em incubação a 37 °C por 20 minutos. O cDNA produzido foi estocado a -20 °C.

### **3.9 Amplificação, sequenciamento e análise genômica**

Os genomas completos dos vírus LEV 44624 e LEV 45507 foram amplificados através de duas reações de amplificação em cadeia da polimerase (da língua inglesa, “Polymerase Chain Reaction”, PCR) de longa distância, utilizando o kit “Expand Long Template PCR System” (Roche). Os dois conjuntos de iniciadores utilizados na PCR, 001F\_Hind - Q8 e Y7 - S2\_7439R, têm suas sequências nucleotídicas descritas na Tabela 3.1. Tais iniciadores foram utilizados para amplificar dois fragmentos gênicos que se sobrepõe, o primeiro de 3.57 kb (Fragmento 1), que corresponde a porção inicial do genoma dos PV e, o segundo, de 5.28 kb (Fragmento 2), correspondente a porção mais terminal do genoma. A reação de PCR foi preparada com 10 ng de cDNA, 300 nM de iniciador senso, 300 nM de iniciador anti-senso, 350 µM dNTP's, 5 µL tampão de PCR contendo MgCl<sub>2</sub>, 0.75 µl de mix enzimático “Expand Long Template” e água livre de DNase/RNase, para um volume final de 50 µl.

**Tabela 3.1. Iniciadores utilizados para reações de PCR e sequenciamento.**

<b>Iniciador</b>	<b>Sequência</b>	<b>Orientação</b>
001F_Hind	5'-TCGATGTGCGACTAATACGACTCACTATAGGTTA AAACAGCTCTGGGG-3'	Senso
F2	5'-CTCCGGCCCCTGAATGCGGCTA-3'	Senso
R1	5'-ATTGTCACCATAAGCAGCC-3'	Anti-senso
F3	5'-AGCCTATGGCGGGTCCACCATCAA-3'	Senso
R2	5'- TGGTGATCGTTGAATTGCCAG-3'	Anti-senso
F4	5'-ACAGTGCACGTACAGTGCAATGCTTTCAAG-3'	Senso
R3	5'-TTTTTCGCCTGGATTTCGATTCTCGTACTT-3'	Anti-senso
F5	5'-TGAACACTCCAGGGAGTAACCA-3'	Senso
R4	5'-GGTATCGCACACGGAGACTGGT-3'	Anti-senso
F6	5'-GATAGTTTTACAGAAGGTGGCT-3'	Senso
Y7*	5'-GGGTTTGTGTCAGCCTGTAATGA-3	Senso
R5	5'-CATTGCAAGCTGACACAAA-3'	Anti-senso
F7	5'- CTGTTCAACTGAGACACGCAAAGTGAATTT-3'	Senso
R6	5'-GGACGTCTGCCACGTATAGTCATTCCATTT-3'	Anti-senso
F8	5'-GGCTACAAAATTTGCAATTACCAC-3'	Senso
Q8*	5'-AAGAGGTCTCTRTTCCACAT-3'	Anti-senso
F9	5'-TCATCACTTGTGATCATTACTA-3'	Senso
R8	5'-GCAAGCACTGTGGTAGTGTCT-3'	Anti-senso
F10	5'-ATTGCTAGAGCAATAGCCGAGA-3'	Senso
R9	5'-GGAGGCAGTGAGTATGTGGAGC-3'	Anti-senso
F11	5'-TGATCAGATCACTACAATGATTGTTAATGA-3'	Senso
F12	5'-AGATCAGGCAGGAACTAATCTT-3'	Senso
R11	5'-GCCTGATATCTCTGAACTTCTC-3'	Anti-senso
F13	5'-CTCAGGACAGACTTTGAAGAAGCAATAT-3'	Senso
R12	5'-ATGTCTCTCTTTTTCTTTCCCATTGCTAC-3'	Anti-senso
S2 F14	5'-CCCACCACCTGTACAAAAACAA-3'	Senso
R13	5'-TAATCATTGAGTTAAAAATTGA-3'	Anti-senso
7439R_Sal	5'-TCGATAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT CCCCGAATT-3'	Anti-senso
AP	5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'	Anti-senso
UAP	5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTAC-3'	Senso

\* Rico-Hesse *et al.*, 1987

Os parâmetros de ciclagem para o fragmento 1 foram: 94 °C por 2 min, 10 ciclos de 94 °C por 15 s, 50 °C por 30 s e 68 °C por 3 min e 30 s, seguidos por 25 ciclos de 94 °C por 15 s, 58 °C por 30 s e 68 °C por 3 min e 30 s, com uma extensão final a 68 °C por 10 min. Para o fragmento 2, os mesmos parâmetros foram utilizados, exceto por um tempo de extensão de 4 min 30 s.

Os fragmentos de PCR, após amplificação, foram purificados utilizando o kit “QIAquick Gel Extraction” (Qiagen). As reações de sequenciamento foram preparadas em placas de 96 poços, com o kit “BigDye terminator chemistry” versão 3.1 (Applied Biosystems), utilizando os iniciadores descritos na Tabela 3.1. Para cada reação, foram adicionados 1x “Terminator Ready Reaction Mix”, 50 ng do

produto de PCR purificado, 3.2 pmol do iniciador e água deionizada para completar o volume de 20 µl. Os parâmetros de ciclagem foram 96 °C por 1 min, 25 ciclos de 96 °C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min. Para purificar das reações de sequenciamento nas placas de 96 poços, foi realizada precipitação com 5 µL de EDTA a 125 mM e 60 µL of etanol a 100%, em cada poço. A placa foi incubada, sob o abrigo da luz, por 15 min à temperatura ambiente. A eletroforese e análise de dados das amostras foram realizadas no sequenciador ABI PRISM Analyzer 310.

O sequenciamento foi bi-direcional, e cada posição nucleotídica foi sequenciada pelo menos uma vez para cada fita. Para cada iniciador, foi obtida uma leitura de aproximadamente 400-600 pb("contig"). Para obtenção da sequência genômica completa de cada vírus, foi realizada a montagem dos "contigs" no programa DNA Dragon (<http://www.dna-dragon.com/index.php>). As sequências da porção 3' do genoma foram determinadas com o uso do kit "3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends", conforme recomendações do fabricante, utilizando os iniciadores AP e UAP, descritos na Tabela 3.1 (Life Technologies, USA).

As sequências genômicas foram alinhadas com as sequências das respectivas cepas Sabin de referência, utilizando ClustalW, disponível no programa MEGA versão 6.0 (Tamura, 2013). Foram analisadas especialmente mutações presentes em regiões determinantes de atenuação e em sítios de neutralização antigênica.

### **3.10 Eventos de recombinação**

Os isolados foram avaliados através dos programas Simplot v3.5.1 (Lole *et al.*, 1999) e RDP4 (Martin *et al.*, 2005), específicos para rastreamento de eventos de recombinação.

As sequências genômicas dos isolados foram comparadas quanto a percentagem de similaridade com outros vírus pertencentes à espécie C dos Enterovírus. Para as análises utilizando Simplot, foi utilizada uma janela de 200 nt, e "steps" de 20 nt. No programa RDP4, foram utilizadas as configurações padrão dos métodos GENECOV (Padidam *et al.*, 1999), BootScan (Martin *et al.*, 2005), Quimera (Posada & Crandall, 2001), MaxChi (Maynard, 1992), SiScan (Gibbs *et al.*, 2000),



3Seq (Boni *et al.*, 2007) e RDP (Martin *et al.*, 2000). Como critérios de seleção para análise estatística, um evento de recombinação putativo foi encaminhado para posterior análise somente quando foi consistentemente identificado por, pelo menos, três dos sete algoritmos descritos (Liu *et al.*, 2010).

Como critério de corte, foi estabelecido um p-valor de 0,05. Os menores valores de p estão associados a uma maior probabilidade de ocorrência de recombinação, enquanto valores mais elevados de p indicam a probabilidade de evolução convergente das sequências.

### **3.11 Estimativa do tempo de replicação dos isolados desde a dose vacinal**

O intervalo de tempo entre a data da administração de VOP e o isolamento das cepas LEV 44624 e LEV 45507 foi estimado a partir da divergência de nucleotídeos entre a sequência da região P1/capsídeo dos vírus, com relação à respectiva estirpe Sabin de referência. As demais regiões do genoma não foram incluídas na análise para evitar interferências de possíveis eventos de recombinação. A região recombinante do capsídeo do vírus LEV 45507 também não foi incluída na análise. Valores estimados de taxas de substituições sinônimas (Ks) e não-sinônimas (Ka) foram obtidos através de uma versão modificada do modelo de evolução de códons proposto por Goldman & Yang (1994), como disponível no programa MBEToolbox (Cai *et al.*, 2005). O número total de substituições por sítio (Kt) foi estimado utilizando o modelo de evolução nucleotídica T92 proposto por Tamura (Tamura, 1992), implementado em MBEToolbox.

### **3.12 Análise filogenética**

Para a análise da divergência e evolução do vírus LEV 44624, foi realizada uma análise filogenética com base nas sequências completas do gene VP1, utilizando o programa Mega, versão 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). A sequência do gene VP1 de LEV 44624 (903 nt) foi alinhada com as sequências da cepa referência Sabin 2 (GenBank AY184220), e com as sequências de diversos vírus tipo 2 altamente divergentes (PVDV tipo 2), identificadas entre 1998-2015, na China (GenBank KJ419273-KJ419277, AY948201, HM107832-HM107835), Egito

(GenBank AF448782 e AF448783)], Madagascar (GenBank HF913426-HF913428, AM084223, AM084225), Nigéria (GenBank JX274980, JX275085, JX274985, JX275162 , JX275380, DQ890388), Israel (GenBank AJ288062, AM040035-39, AM056049-50, AM158275-6, AM292219-21), Eslováquia (GenBank JX913541-JX913553, JX913635- 913647) e Estônia (GenBank KC784367-KC784371).

A história evolutiva dos isolados foi inferida pelo método da máxima verossimilhança, utilizando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2 parâmetros (Nei & Kumar, 2000), com mil réplicas de “bootstrap”, conforme indicado pelo programa Mega versão 6.0, para cada conjunto de dados. Todas as posições nucleotídicas contendo lacunas e dados em falta (“gaps”) foram excluídas das análises.

### **3.13 Perfil fenotípico dos isolados**

#### **3.13.1 Teste marcador RCT**

A capacidade replicativa em diferentes temperaturas (da língua inglesa **Replicative Capacities at Different Temperatures, RCT**) dos isolados LEV 44624 e LEV 45507, em comparação com a cepa Sabin de referência, foi avaliada em monocamadas de células RD, em placas de 6 poços, por meio de um teste RCT.

Aproximadamente  $6,5 \times 10^5$  células foram semeadas por poço e depois da adsorção, 200 µL de estoque de vírus foram inoculados em cada poço. As placas foram incubadas, separadamente, a 36.5 °C ou 40 °C, sem controle de CO<sub>2</sub>, durante a adsorção do vírus, por uma hora. As células foram então lavadas e 3 ml de meio de manutenção Eagle-Earle (SFB a 2%) foram adicionados por poço e as placas foram novamente incubadas a 36.5 °C ou 40 °C, sem controle de CO<sub>2</sub>, separadamente. Após 8, 24 e 48 h, as células foram coletadas e a TCID<sub>50</sub> foi calculada em placas de 96 poços, para cada condição testada. Quando uma cepa apresentou mais que 2 logaritmos de redução do título viral, entre as duas temperaturas, sua replicação foi considerada sensível à temperatura (Nakano *et al.*, 1978; Böttiger, 1968). A fim de minimizar o erro experimental, o ensaio foi realizado três vezes.

### **3.13.2 Curva de crescimento**

Para o isolado LEV 44624, que apresentou características replicativas muito divergentes da cepa Sabin de referência, foi realizada uma avaliação do perfil de replicação ao longo do tempo, por meio de uma curva de replicação. A cepa Sabin 2 foi utilizada como controle dos experimentos.

Os experimentos de curva de replicação foram realizados em células RD a 36.5 e 40 °C, com uma multiplicidade de infecção (MOI) 10, conforme determinado por titulação dos estoques de vírus em células RD. Resumidamente, para cada vírus foram preparadas quatorze placas de 96 poços a fim de que sete diferentes tempos de incubação possam ser avaliados, nas duas diferentes temperaturas. Em cada placa, foram preparados poços com 100 µL de células RD ( $\sim 2 \times 10^5$  células / mL). Após adsorção das células às placas, os vírus foram inoculados, em triplicata, em cada placa. As placas foram agitadas durante 2 h a 36.5 °C e, em seguida, as células foram cuidadosamente lavadas duas vezes cada uma com 300 µL de meio Eagle-Earle, para remover vírus não-adsorvidos. Em seguida, 100 µL de meio Eagle-Earle foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas, separadamente, a 36.5 ou 40 °C por 0, 2, 4, 6, 8, 10, e 12h p.i. Por fim, as células foram lisadas com consecutivos ciclos de congelamento-descongelamento e os títulos virais nos sobrenadantes do lisado foram determinados pelo ensaio de TCID<sub>50</sub>, em células RD a 36.5 °C, sem controle de CO<sub>2</sub>, para cada uma condições. A titulação foi repetida três vezes para cada uma das horas pós-infecção.

A taxa de replicação e o rendimento final em cultura foram analisados através de curvas de replicação (título viral x tempo), em diferentes temperaturas (36.5 °C e 40 °C).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento de poliovírus no Brasil entre 2008-2015

#### 4.1.1 Vigilância laboratorial das paralisias flácidas agudas

Durante os anos de 2008 a 2015, o LEV recebeu um total de 3242 amostras de fezes para fins de vigilância laboratorial de casos de PFA que ocorreram no Brasil, resultando em cerca de 405 amostras (em média) encaminhadas ao LEV para Vigilância Epidemiológica de PFA, a cada ano.

Desse total, 1215 amostras (37,47%) provieram da Região Sudeste, 1165 (35,93%) da Região Nordeste, 499 (15,39%) da Região Sul, 356 (10,98%) da Região Centro-Oeste, 6 (0,18%) da Região Norte e uma amostra (0,03%) não possuía descrição de procedência.

Na Tabela 4.1, está descrito o número de amostras recebidas no LEV, por ano e por região. Quanto ao número absoluto de amostras, os estados da Região Norte (Acre, Amazonas, Pará, Roraima, Rondônia, Tocantins e Amapá), além de Maranhão e Piauí, devem ser considerados separadamente, uma vez que, para estes estados, o IEC funciona como Laboratório Regional de Referência para Poliomielite.

**Tabela 4.1. Procedência geográfica das amostras de fezes enviadas ao LEV para vigilância laboratorial de casos de PFA, por ano e região do país (2008-2015).**

	<i>Norte</i>	<i>Nordeste</i>	<i>Centro-Oeste</i>	<i>Sudeste</i>	<i>Sul</i>	<i>Desconhecido</i>	<i>Brasil</i>
<b>2008</b>	2	162	47	182	59	-	452
<b>2009</b>	-	144	46	167	56	-	413
<b>2010</b>	-	134	63	162	71	-	430
<b>2011</b>	-	137	47	172	56	-	412
<b>2012</b>	1	149	47	163	67	1	428
<b>2013</b>	-	123	41	117	60	-	341
<b>2014</b>	-	155	35	109	60	-	359
<b>2015</b>	3	161	30	143	70	-	407
<b>Total</b>	6	1165	356	1215	499	1	3242

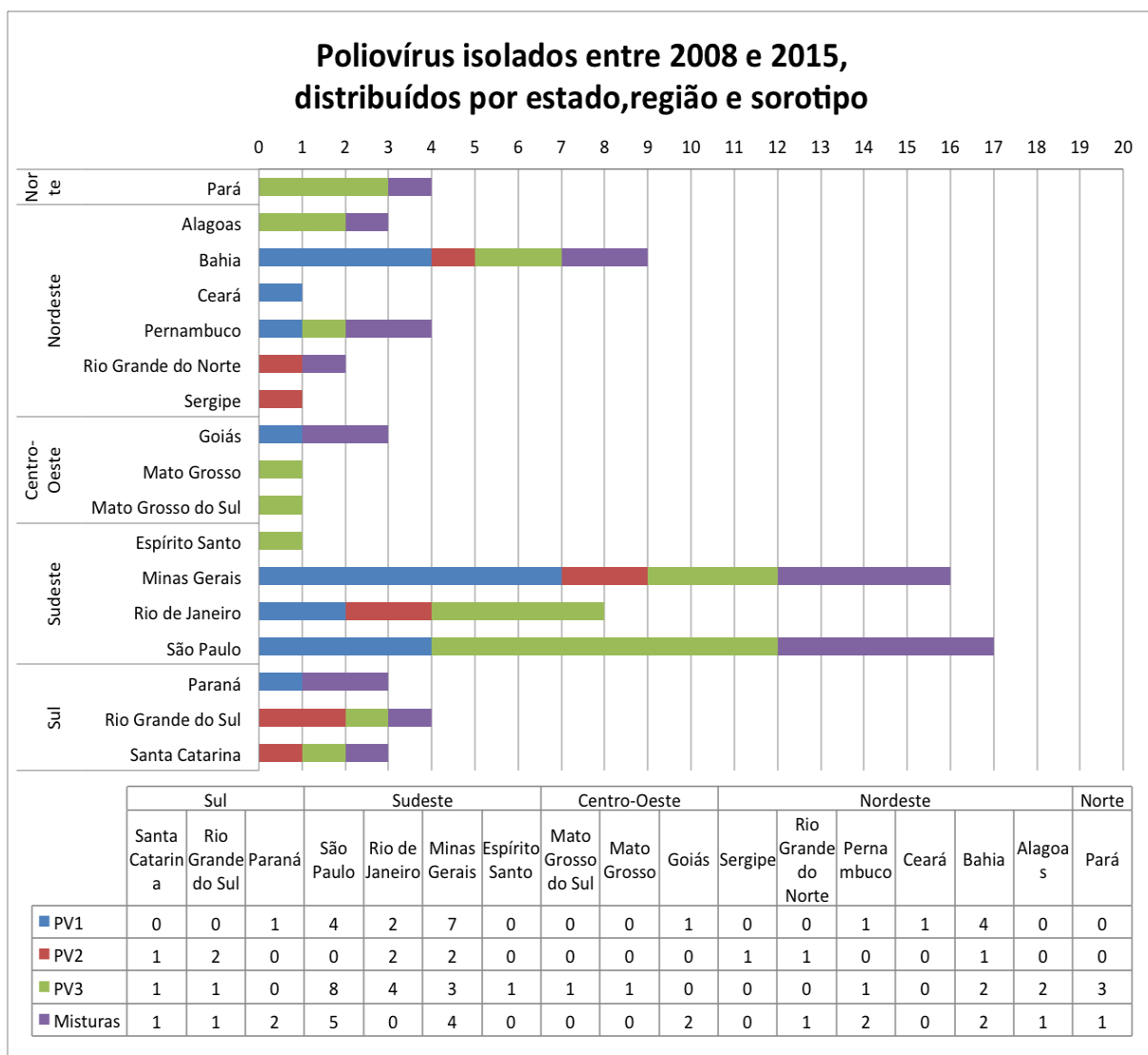
As seis amostras enviadas pelo IEC, da Região Norte, foram provenientes do estado do Pará. Todos os estados da Região Nordeste (com exceção de Maranhão e Piauí), bem como os estados das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e o Distrito Federal, enviaram amostras ao LEV durante o período de 2008 a 2015.

Com relação à idade dos pacientes, 1411 (44%) das amostras recebidas foram coletadas a partir de casos de PFA de pacientes com 0 a 5 anos, 1655 (51%) de pacientes com 6 até 15 anos, 74 (2%) amostras de pacientes maiores de 15 anos e 102 (3%) das amostras não possuíam a descrição da idade do paciente.

Quanto ao isolamento viral, 81/3242 amostras (2,5%) apresentaram isolamento positivo para poliovírus [PV(+)]. Dentre as amostras positivas, 38 (46.91%) foram coletadas em indivíduos do sexo feminino e 43 (53.09%) foram coletadas em indivíduos do sexo masculino, com uma razão entre os sexos de aproximadamente 1:1.1.

Das 81 amostras PV(+), 59 foram identificadas como um único sorotipo de PV (PV1 = 21, PV2 = 10 e PV3 = 28) e 22 foram identificadas como uma mistura de sorotipos [PV (1+2) = 7, PV (1+3)=5, PV (2+3) = 5 e PV (1+2+3) = 5].

Na Figura 4.1 está descrita a procedência geográfica dos PV isolados, bem como a discriminação dos sorotipos identificados no país, por região e unidade federativa. As regiões Nordeste e Sudeste se destacam pelo maior número absoluto de PV isolados a partir de amostras enviadas (20 e 44 isolados, respectivamente), embora em número relativos, as regiões Sul e Sudeste sejam responsáveis pelo maior número de PV isolados, com relação ao número total de amostras enviadas por região (0.02% e 0.034% de isolamento PV+ a partir do total de amostras, respectivamente).



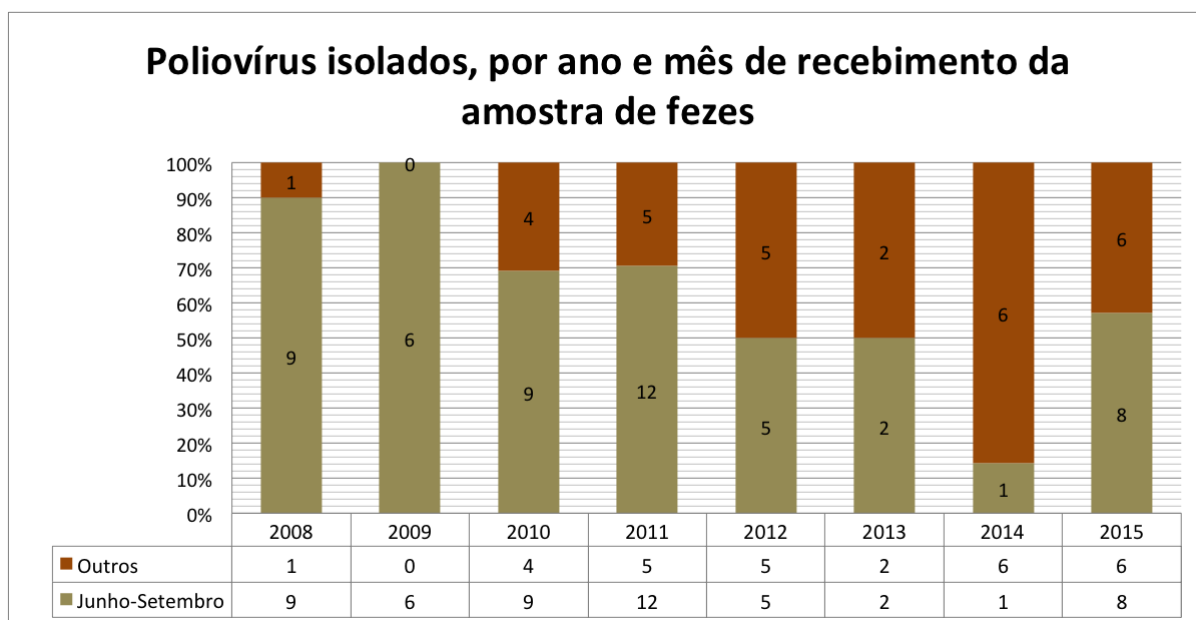
**Figura 4.1. Poliovírus isolados entre 2008 e 2015 no LEV, distribuídos por estado, região e sorotipo.**

Através da análise da sequência do gene VP1, todos os 81 isolados foram classificados como vírus “Sabin-like” (SL), não sendo identificado nenhum vírus selvagem ou derivado vacinal a partir de casos de PFA no Brasil, entre 2008 e 2015.

Um isolado “Sabin-like” foi classificado como vírus recombinante (LEV 45507). O vírus foi isolado a partir de amostra de fezes de um menino de 8 meses, enviada pela Vigilância Epidemiológica de São Paulo para diagnóstico de PFA. Não há relatos sobre a situação imunológica deste indivíduo, e os mesmo não apresentou sequelas associadas a este evento.

O sítio de recombinação do vírus LEV 45507 foi identificado na porção 3' do gene VP1, com um padrão de recombinação intertípico Sabin tipo 3/Sabin tipo 2. Nenhum outro evento de recombinação foi identificado no gene VP1 dos demais isolados.

Para verificar as implicações que a mudança no esquema vacinal, executada a partir de 2012, exerceu sobre o número de PV relacionados à vacina isolados no Brasil, foram analisados o número total de PV isolados a cada ano, a partir de amostras provenientes de casos de PFA (Figura 4.2). Na mesma figura, foi analisado o período do ano em que aconteceu o recebimento das amostras com isolamento positivo de PV, para verificar a percentagem de vírus SL isolados, que estão diretamente relacionados com a realização das Campanhas Nacionais de Vacinação, em junho e agosto. Foram considerados como relacionados ao período de vacinação em massa os meses de junho e agosto, bem como os seus meses imediatamente subsequentes, julho e setembro. Os demais meses foram agrupados na categoria Outros (não diretamente relacionados às Campanhas de Vacinação).



**Figura 4.2. Poliovírus isolados, por ano e mês de recebimento da amostra de fezes.**

Na figura, vê-se uma redução no isolamento de PV relacionados a vacina nos anos 2013 e 2014, o que poderia, *a priori*, ser considerado uma consequência da

mudança do esquema vacinal. No entanto, em 2015 aconteceu uma elevação no número de isolados e, dessa forma, não foi possível estabelecer uma relação direta entre a troca do esquema vacinal e a redução no isolamento de PV no Brasil, a partir de casos de PFA, nos três primeiros anos de uso do esquema combinado de vacinação.

Com relação à idade dos pacientes, 75 isolados (92.6%) foram obtidos a partir de amostras de pacientes entre 0 e 5 anos de idade; dois vírus (2.47%) foram isolados a partir de amostras de pacientes de 6 a 15 anos incompletos, e 4 isolados (4.93%) foram procedentes de amostras de pacientes sem idade discriminada no banco de dados.

#### 4.1.2 Vigilância ambiental

Durante o período analisado (2008-2015), o LEV analisou 134 amostras provenientes do ambiente, coletadas entre 2012 e 2015. Um total de 31 amostras foram coletadas no estado do Rio de Janeiro, como descrito por Pereira *et al.* (2016). As demais 103 amostras foram coletadas em São Paulo e enviadas ao LEV pela CETESB. Para estas amostras, foi realizado o isolamento do vírus no próprio estado de origem e apenas amostras positivas para PV foram enviados ao LEV para diferenciação intratípica e sequenciamento.

Os resultados da identificação dos PV isolados do ambiente estão descritos na Tabela 4.2, analisados por amostragem anual, resultados da diferenciação intratípica e do sequenciamento viral.

**Tabela 4.2. Poliovírus isolados a partir de amostras do ambiente coletadas entre 2008 a 2015 nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro.**

Ano	# de amostras	PV1 #Isolados/Tipo	PV2 #Isolados/Tipo	PV3 #Isolados/Tipo	Misturas #Isolados/Tipo
2012	45	10/SL	5/SL	2/SL	5 SL
2013	20	7/SL	2/SL	4/SL	7 SL
2014	62	13/SL 1/WPV	13/SL 1PVDV	20/SL	7 SL
2015	7	2/SL	-	4/SL	1 SL
<b>Total</b>	134	33	21	30	20

# - número; PV- poliovírus; SL – “Sabin-like”; WPV – PV selvagem; PVDV – PV derivado vacinal



Das 134 amostras analisadas, 104 (77.6%) foram positivas para 1 ou mais sorotipos de PV. Até o final de 2013, foram identificados apenas cepas SL em todas as amostras testadas do ambiente. No ano de 2014, dentre os isolados PV1, foi identificado um PVS tipo 1 (LEV 44620), isolado a partir de amostra de ambiente coletada no Aeroporto de Viracopos, no estado de São Paulo. O vírus foi encaminhado pelo LEV ao CDC, nos Estados Unidos e a análise da sequência nucleotídica do gene VP1 mostrou que o isolado apresentava uma identidade nucleotídica de 99.6% com um vírus PV1 selvagem isolado na Guiné Equatorial em 2014. O PVS tipo 1 (PV 44620) não foi estudado em detalhe no presente trabalho.

Ainda em 2014, foi identificado um PVDV tipo 2 (LEV 44624), isolado a partir de uma amostra coletada no Porto de São Sebastião, em São Paulo. O vírus apresentou 8.6% (78/903 nt) de divergência nucleotídica no gene VP1, com relação a cepa de referência Sabin 2 (GenBank AY184220).

#### **4.2 Reatividade com anticorpos policlonais sorotipo-específicos**

Para os vírus LEV 44624 (PVDV tipo 2) e LEV 45507 (SL tipo 3, recombinante S3/S2), foi realizada a caracterização genotípica e fenotípica, com base na importância do seu isolamento dentro da Estratégia de Erradicação e do interesse científico acerca das particularidades dos isolados.

A fim de determinar as suas características antigênicas, foi realizado um teste de microneutralização de acordo com as recomendações da OMS (OMS, 2004), utilizando células RD e anticorpos policlonais sorotipo-específicos PV tipo 1, PV tipo 2 e PV tipo 3.

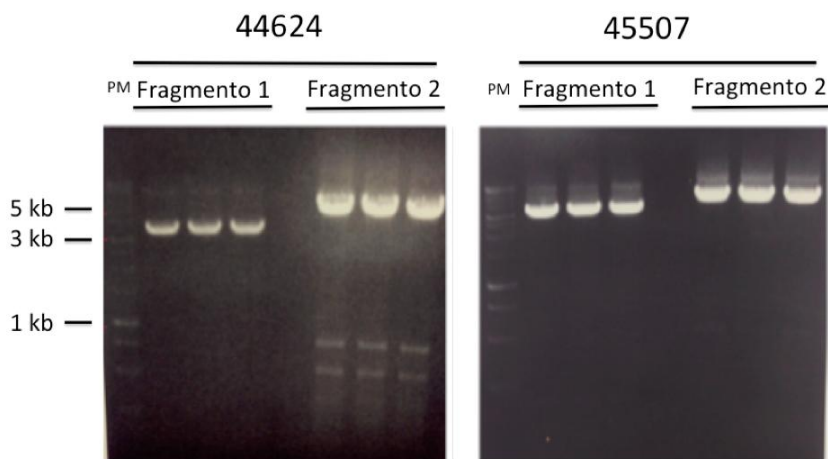
No ensaio de microneutralização do isolado LEV 44624, o vírus foi completamente neutralizado pelo soro imune específico para PV tipo 2. Não foi observada reação cruzada com soro imune para PV tipo 1 ou PV tipo 3.

Por sua vez, o isolado 45507 foi completamente neutralizado pelo soro para PV tipo 3, enquanto os soros policlonais específicos para PV tipo 1 e PV tipo 2 não foram capazes de neutralizar a infectividade do isolado.

### 4.3 Amplificação e sequenciamento do genoma

Para viabilizar o sequenciamento completo do genoma dos vírus, o título viral foi aumentado por uma passagem em célula RD. Os vírus LEV 44624 e LEV 45507 foram cultivados por 16 h a 36.5 °C. As células foram lisadas por ciclos sucessivos de congelamento/descongelamento, o RNA viral foi extraído e o cDNA sintetizado utilizando o iniciador específico 7439R\_polidT.

Os genomas completos dos vírus (~7.4kb) foram amplificados através de duas reações de PCR, que resultaram em dois produtos de PCR: o fragmento 1 amplificado com os iniciadores 1F e Q8, que corresponde aos primeiros 3.57 kb do genoma viral, e o fragmento 2, amplificado com os iniciadores Y7 e 7439R\_polidT, que corresponde aos 5.28 kb da porção terminal do genoma. Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose a 1% e visualizados com brometo de etídio em luz UV (Figura 4.3).

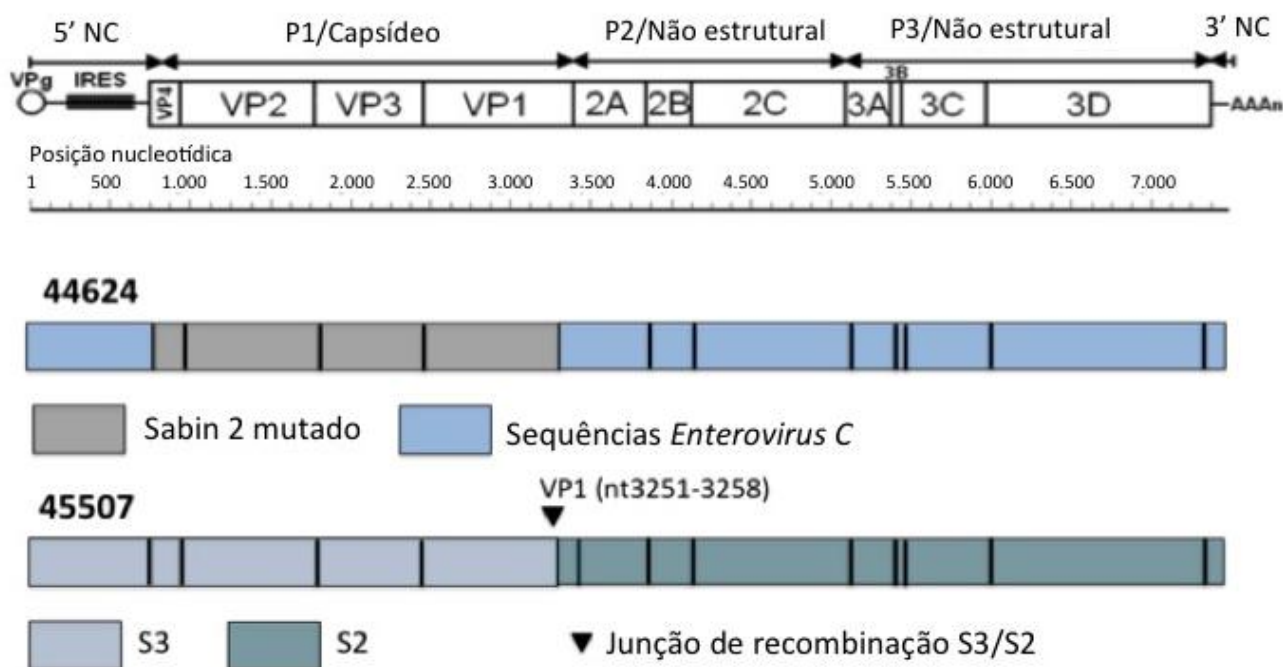


**Figura 4.3. Amplificação da sequência completa dos genomas dos isolados LEV 44624 e LEV 45507, em dois fragmentos, por meio de reação em cadeia da polimerase.**

O produto de PCR no fragmento 1 corresponde aos primeiros 3.57kb do genoma viral, enquanto o produto do Fragmento 2 corresponde aos 5.28kb da porção terminal do genoma. Para possibilitar o sequenciamento completo do genoma, há uma região de sobreposição entre os dois fragmentos. PM – peso molecular 1 kb DNA Plus (Promega).

As sequências genômicas foram obtidas através da análise dos blocos de sequência (“contigs”), provenientes do sequenciamento com os diversos iniciadores. As sequências de nucleotídeos e de aminoácidos foram alinhadas com a respectiva cepa Sabin de referência para cada isolado, bem como com as sequências de

outros vírus da espécie *Enterovirus C*, utilizando a ferramenta ClustalW, disponível no pacote Mega v6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Na Figura 4.4, é possível visualizar a representação esquemática da organização estrutural dos genomas estudados.



**Figura 4.4. Representação esquemática da organização do genoma dos vírus LEV 44624 e LEV 45507, após sequenciamento nucleotídico.**

O genoma do vírus LEV 44624 possui a região do capsídeo altamente mutada, apresentando homologia com a sequência de Sabin 2, enquanto as demais porções do genoma parecem ser fruto de recombinação com outros vírus da espécie *Enterovirus C*. O vírus LEV 45507 apresenta poucas mutações (“Sabin-like”), com presença de um evento de recombinação na porção 3’ terminal do gene VP1, com junção de recombinação localizada entre os nucleotídeos 3251 e 3258 e padrão de recombinação Sabin 3/Sabin 2. S2 – Sabin 2; S3 – Sabin 3; 5’ NC – 5’ não codificante; 3’ NC – 3’ não codificante

O genoma completo do isolado LEV 44624 contém 7439 nucleotídeos, com uma ORF única que codifica uma poliproteína de 2207 aminoácidos. O genoma completo do vírus diverge em 8.74% da sequência de Sabin 2. Em 44624, a região P1 (capsídeo viral), embora altamente mutada, é colinear com a região P1 de Sabin 2 (GenBank AY184220), porém as regiões 5'-NC, P2, P3 e 3' NC contém sequências adquiridas através de recombinação com outros membros da espécie *Enterovirus C*.

O genoma do vírus LEV 45507 é caracterizado como Sabin 3 na região P1. O seu genoma possui 7431 nucleotídeos, com a ORF única codificando para 2207

aminoácidos. Um evento único de recombinação foi identificado no genoma viral. A junção de recombinação está localizada entre os nucleotídeos 3251 e 3258 do genoma. Eventos de recombinação, embora comum em PV, dificilmente ocorrem na região do capsídeo. O vírus 45507 é classificado como um vírus recombinante natural intertípico Sabin3/Sabin2.

#### 4.4 Análise de eventos mutacionais

A análise das mutações encontradas no genoma do vírus LEV 44624 está apresentada na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3. Análise da divergência nucleotídica e de aminoácidos entre o isolado LEV 44624 e Sabin 2 (GenBank AY184220).**

Região do genoma	Nucleotídeos			Aminoácidos			Mutações relevantes
	Tamanho	NSN	% ID	Tamanho	NSA	% ID	
5'-NC	747	128	82.86	NA	NA	NA	Região hipervariável A481G
Região P1	2637	192	92.72	879	14	98.41	
VP4	207	13	93.71	69	0	100	
VP2	813	46	94.34	271	2	99.26	Thr45Ser; Lys152Arg
VP3	714	52	92.71	238	3	98.74	Ser73Asn; Thr75Ala
VP1	903	81	91.36	301	9	99	Ile143Thr; Thr291Ala
Região P2	1725	153	91.13	575	15	97.39	
2A	447	36	91.94	149	4	97.31	
2B	291	57	80.41	97	4	95.88	
2C	987	60	93.92	329	7	97.87	Elemento "cre"
Região P3	2259	175	92.25	753	14	98.14	
3A	261	47	81.99	87	4	95.40	
3B	66	11	83.33	22	1	95.45	
3C	366	45	87.70	122	2	98.36	
3D	1557	72	95.37	519	7	98.66	
3'-UTR	71	2	97.18	NA	NA	NA	
Genoma	7439	650	91.26	2207	43	98.05	

NSN – número de substituições nucleotídicas. NSA – número de substituições em aminoácidos. NA - não se aplica.

Embora a região 5'-NC dos vírus LEV 44624 e Sabin 2 tenham o mesmo tamanho (747 nt), elas divergem uma da outra, especialmente na região hipervariável, que compreende aproximadamente os últimos 100 nt que precedem o códon de iniciação. Nesta região, é possível notar um grande número de substituições de nucleotídeos, inserções e deleções.

O nucleotídeo 481, na região 5'-NC, é reconhecido como um dos principais determinantes do fenótipo atenuado de Sabin 2. Em LEV 44624, a posição 481 apresenta uma mutação de A (presente nas cepas Sabin tipo 2) para G (encontrado nas cepas PVS tipo 2).

A região P1/capsídeo de LEV 44624 contém um total de 188 substituições nucleotídicas, sendo que 14 delas foram responsáveis por mutações em aminoácidos. O padrão mutacional na região do capsídeo do vírus LEV 44624 é caracterizado por uma maior quantidade de substituições sinônimas (92,02%), em comparação às mutações não-sinônimas (7,98%).

Apenas mutações sinônimas foram encontrados em VP4. Em VP2, existem duas mutações não-sinônimas: Thr45Ser e Lys152Arg. A serina na posição 45 é encontrada em cepas selvagens de PV tipo 2: vírus MEF-1 (GenBank AY238473), uma cepa laboratorial de referência, e Lansing (GenBank M12197), uma cepa associada com a doença paralisante fatal em camundongos após a inoculação intracerebral (Couderc *et al.*, 1989; Dragunsky *et al.*, 2004; La Monica *et al.*, 1986).

Em VP3 são encontradas três mutações não-sinônimas (Ser73Asn; Thr75Ala; Ile103Val). Na região codificante de VP1, existem 9 substituições nucleotídicas, duas das quais resultaram em substituições em aminoácidos (Ile143Thr; Thr291Ala).

Quanto às mutações dentro da região não-estrutural do genoma, o elemento CRE (“cis-acting replication element”), localizado nos nt 4443-4503, no gene codificante para a proteína 2C, apresenta um total de nove substituições, em comparação com a sequência de referência Sabin 2. O sítio ativo do elemento CRE de cepas Sabin, “motif” AAACA, apresentou uma substituição em seu terceiro nucleotídeo, sendo a sequência AAGCA encontrada no genoma do isolado LEV 44624.

O número de identificação da sequência completa do genoma de LEV 44624, depositada no banco de dados GenBank, é KU372652.

Por sua vez, a análise das mutações encontradas no genoma do vírus LEV 45507 está apresentada na Tabela 4.4.

**Tabela 4.4. Análise da divergência nucleotídica e de aminoácidos entre o isolado LEV 45507 e as respectivas cepas de origem Sabin 3 (GenBank AY184221) e Sabin 2 (GenBank AY184220).**

As mutações que resultaram na reversão para as sequências de poliovírus selvagem tipo 3 Leon/37 (GenBank K01392) e poliovírus tipo 2 Lansing (GenBank M12197) estão indicados. Mutações encontradas nos três determinantes de atenuação presentes nos genomas da cepa Sabin 3 estão sublinhados.

Origem da sequência	Região	Número do nt	Substituição nt	Número do aa.	Substituição aa.	Reversão para sequência selvagem
Sabin 3	5'-NC	121	U → C			
		190	C → U			
		<u>472</u>	<u>U → C</u>			Sim
	VP2	1035	C → U	29	A → V	
		1158	U → C	70	M → T	
		1455	C → A	169	P → Q	
	VP3	1852	C → U			
		1991	G → A	76	D → N	
		2001	A → G	80	Q → R	
		<u>2033</u>	<u>U → A</u>	<u>91</u>	<u>F → I</u>	
		2188	C → U			
		2266	G → A			
	VP1	2479	U → G			
		<u>2493</u>	<u>C → U</u>	<u>6</u>	<u>T → I</u>	Sim
2509		G → A				
2749		C → U				
Sabin 2	2A	3531	C → A			Sim
	2C	4533	U → C			
	3A	5265	A → U			
	3B	5391	A → C			Sim
	3C	5676	C → U			Sim
	3D	5925	U → C			

O sequenciamento do genoma de LEV 45507 revelou que há apenas um sítio de recombinação, localizado na porção 3' do gene VP1, na posição 3251-3258 nt do genoma de Sabin 3. Enquanto a porção 5' do gene VP1 de LEV 45507 apresenta 99,5% de identidade com Sabin 3 (GenBank AY184221), os últimos 118 nt do gene VP1 possuem 100% de identidade com a estirpe Sabin 2 (GenBank AY184220), o que caracteriza o vírus como um recombinante intertípico natural na região do capsídeo, com padrão de recombinação Sabin 3/Sabin 2.

Um total de 22 substituições nucleotídicas foram encontradas no genoma do vírus da 45507, levando em consideração a sequência Sabin de origem de cada porção do genoma. Destas mutações, sete resultaram em substituição de aminoácidos, todas localizadas antes do sítio de recombinação, na porção do genoma correspondente a Sabin 3 (GenBank AY184221).

Foram encontradas mutações em dois dos principais determinantes do fenótipo atenuado de Sabin 3, o nt 472 no domínio V de 5'-NC (L472C) e o nt 2493 em VP1 (C2493L). A mutação C2493L levou à substituição do aminoácido 6 de VP1 (Thr6Ile), que é um resíduo encontrado no precursor neurovirulento de Sabin 3, a estirpe P3/ Leon/EUA/1937.

O isolado 45507 também apresentou uma transversão U2034A, localizada na região de VP3, a qual levou a uma substituição de aminoácido Phe91Ile, um outro aminoácido envolvido com a determinação da atenuação das cepas Sabin tipo 3. No entanto, neste caso não houve reversão para o aminoácido encontrado na cepa selvagem P3/ Leon/EUA/1937 (Serina).

Embora 6 mutações tenham sido encontradas em nucleotídeos na porção do genoma doada por Sabin 2, nenhuma delas resultou em mutações na sequência de aminoácidos do vírus.

O número de identificação da sequência completa do genoma de LEV 45507, depositada no banco de dados GenBank, é KU763188.

#### 4.4.1 Mutações em sítios de neutralização antigênica

Cada um dos três sorotipos de PV possui um conjunto específico de quatro sítios de neutralização antigênica (NAg 1, NAg2, NAg3a e NAg3b), que caracterizam a superfície antigênica de cada sorotipo viral, estando envolvidos com mecanismos de ligação ao receptor e determinação da identidade viral.

As mutações encontradas em sítios de neutralização antigênica nos isolados LEV 44624 e LEV 45507 estão representadas na Figura 4.5, em comparação com as sequências de referência Sabin 2 (AY184220) e Sabin 3 (AY184221).

	VP2			VP3			VP1		
	NAg3b	NAg2	NAg2	NAg3a	NAg3a	NAg3b	NAg1	NAg2	NAg3a
Sabin 2	71 WRK	163 DTNATNPARN	268 PRT	54 PLNLTSQR	70 VELSD	75 TAHSD	86 AIIIEVDNDAPTKRASRLFS	220 STE*GD	286 KDGLT
44624	...	.....	...	.....	...N.	A....	.....	...*..	....A
45507	.G.	.NAV.S.K.E	.KF	...E.TK	.T...	S.NLS	.....EQ..T..QK..A	NDQI..	.....
Sabin 3	.G.	.NAV.S.K.E	.KF	...E.TK	.T...	S.DLS	.....EQ..T..QK..A	NDQI..	RNN.D

**Figura 4.5. Mutações encontradas em sítios de neutralização antigênica dos isolados LEV 44624 e LEV 45507.**

As sequências dos NAg de Sabin 2 e Sabin 3 estão representadas nas extremidades superior e inferior do alinhamento. Aminoácidos não mutados estão representados por um ponto e aminoácidos mutados estão assinalados com a letra correspondente ao novo resíduo.

No vírus LEV 44624, foram identificadas três mutações em sequências que pertencem aos sítios de neutralização antigênica de Sabin tipo 2: Em VP3, Ser73Asn (N<sub>Ag</sub> 3a) e Thr75Ala (N<sub>Ag</sub> 3b), e em VP1, a substituição Thr291Ala (N<sub>Ag</sub>3a). Em LEV 45507, em decorrência do evento de recombinação, a região do N<sub>Ag</sub> 3a em VP1 (aa 286-290) foi completamente substituída por aminoácidos Sabin 2-específicos. Efetivamente, este evento de recombinação resultou na substituição de seis resíduos de aminoácido no capsídeo de Sabin 3, que foram doados pela sequência de Sabin 2: VP1-279, VP1-286, VP1-287, VP1-288, VP1-290 e VP1-293.

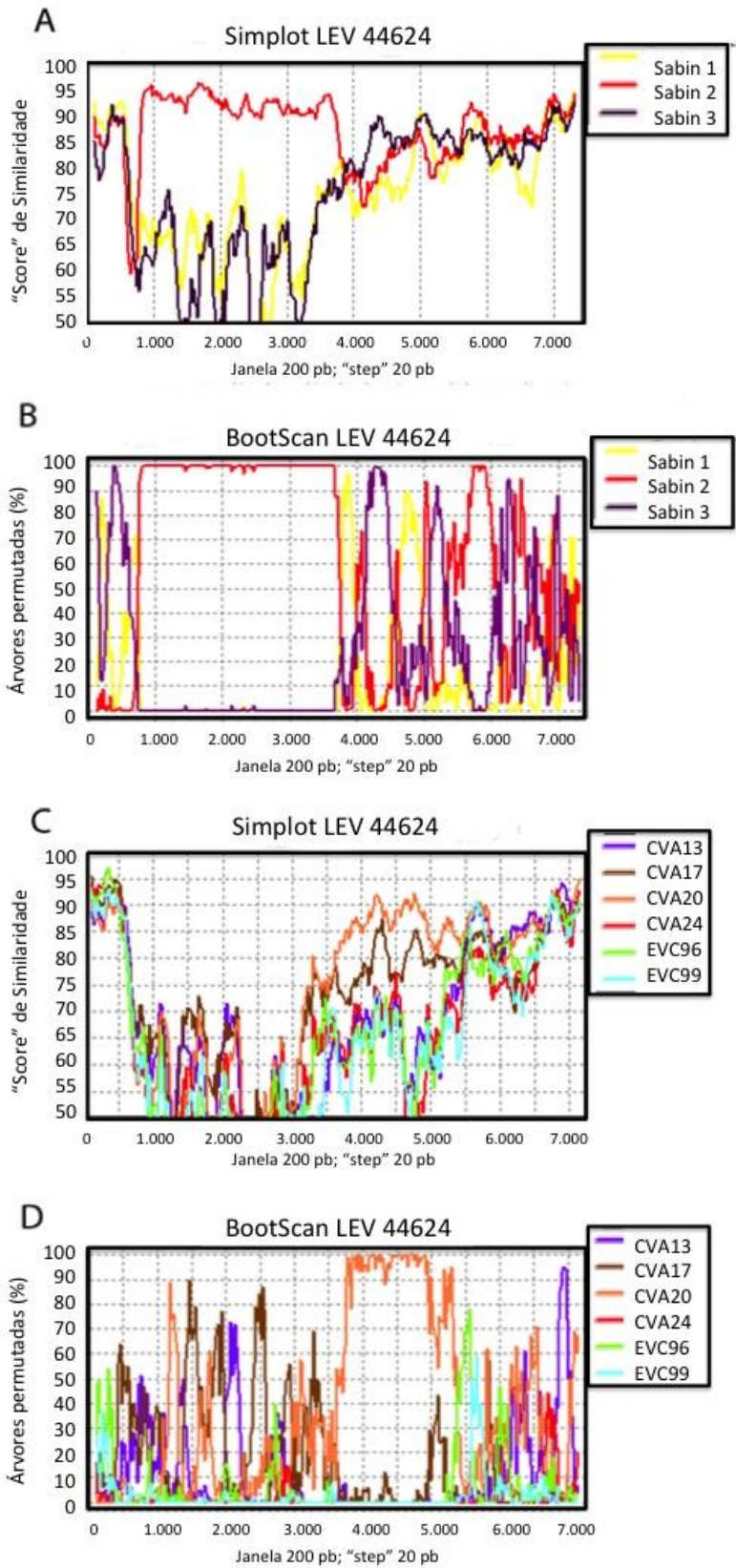
#### 4.5 Recombinação

Para análise dos genomas dos vírus LEV 44624 e LEV 45507 em busca de junções de recombinação putativas, foram utilizando os algoritmos disponíveis nos programas Simplot versão 3.5.1 e RDP4.

Utilizando Simplot v.3.5.1 para analisar o genoma de LEV 44624, foram realizadas a plotagem de similaridade e “Bootscan”, analisando a sequência do vírus frente à sequência de outros membros da espécie *Enterovirus C*: cepas de referência Sabin 1 (GenBank AY184219), Sabin 2 (AY184220), Sabin 3 (AY184221), CVA1 (AF499635), CVA11 (AF499636), CVA13 (AF465511), CVA17 (AF499639), CVA19 (AF499641), CVA20 (AF499642), CVA21 (AF465515 e D00538), CVA24 (EF026081), Enterovírus C96 (HQ415759), Enterovírus C99 (KJ857508), Enterovírus 104 (JX982259) e Enterovírus C109 (GQ865517).

Na Figura 4.6, apenas as sequências que apresentaram maior similaridade com LEV 44624 estão representadas.





**Figura 4.6. Análise de recombinação do genoma do isolado LEV 44624 e outros membros da espécie *Enterovirus C*, através de plotagem de similaridade e “bootscan”, no programa Simplot.**

Em A e B são analisados, respectivamente, a similaridade e o percentual de árvores permutadas entre LEV44624 e cepas Sabin 1, 2 e 3. Em C e D, são analisados, respectivamente, a similaridade e o percentual de árvores permutadas entre LEV44624 e cepas coxsackie (CV) A13, CV A17, CV A20, CV A24, enterovírus (EV) C 96 e EV C99. Embora seja bastante evidente a relação de LEV 44624 com algumas sequências (por exemplo, Sabin 2 e CVA 20), através desta análise não é possível determinar os pontos de quebra no genoma (junções de recombinação) ou mesmo identificar todas as cepas parentais do vírus LEV 44624.

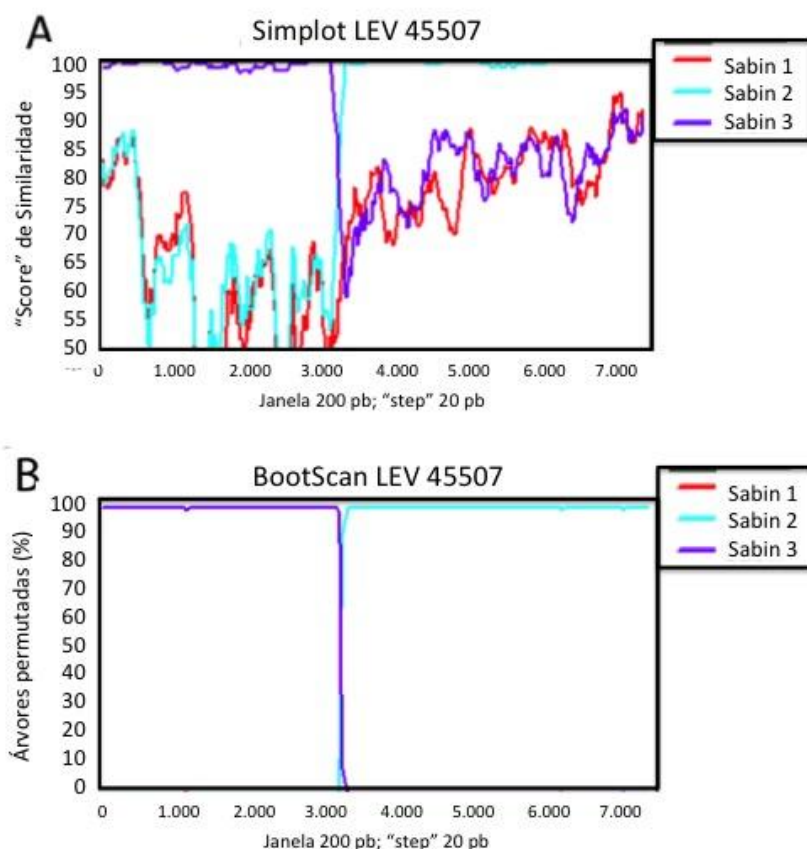
Nenhum evento de recombinação foi encontrado na região P1/capsídeo de LEV 44624. A colinearidade da sequência do vírus LEV 44624 com Sabin 2, na região do capsídeo, fica bastante evidente. Vê-se que as demais porções do genoma provavelmente foram herdadas de outros vírus da espécie *Enterovirus C*, embora não seja possível determinar com precisão quais foram as sequências doadoras.

Para tentar precisar quais foram as sequências doadoras com significância estatística, foi utilizado o programa RDP4. Utilizando o mesmo conjunto de sequências de referência de vírus *Enterovirus C*, fomos capazes de descrever cinco eventos de recombinação putativos, com significância estatística ( $p$  valor < 0,05) (Tabela 4.5), sendo as sequências de referência Sabin 2 (GenBank AY184220), Sabin 3 (AY184221), CVA11 (AF499636), CVA13 (AF465511), CVA20 (AF499642) e CVA24 (EF026081) apresentadas como linhagens parentais putativas.

Tabela 4.5. Análise de recombinação do genoma do isolado LEV 44624 e outros membros da espécie *Enterovirus C*, no programa RDP4.

Vírus	Evento	Pontos de Quebra (nt)		Cepas Parentais		Genes	P-value médio						
		Início	Fim	Maior	Menor		RDP	GENECON	Bootscan	MaxChi	Chimaera	SIScan	3Seq
44624	1	96	509	Sabin 3	CVA24	5'-NC	$1.187 \times 10^{-9}$	$1.059 \times 10^{-3}$	$1.732 \times 10^{-11}$	$2.155 \times 10^{-2}$	$4.668 \times 10^{-2}$	$6.092 \times 10^{-7}$	$4579 \times 10^{-9}$
	2	744	3797	CVA20	Sabin 2	5'-NC, VP4, VP2, VP3, VP1, 2A	$4.387 \times 10^{-55}$	$2.583 \times 10^{-55}$	$4.658 \times 10^{-50}$	$1.824 \times 10^{-20}$	$2.852 \times 10^{-23}$	$3.291 \times 10^{-70}$	$1.618 \times 10^{-10}$
	3	744	3771	Sabin 3	Sabin 2	5'-NC, VP4, VP2, VP3, VP1, 2A	$7.153 \times 10^{-45}$	$2.747 \times 10^{-42}$	$9.075 \times 10^{-41}$	$3.372 \times 10^{-12}$	$1.062 \times 10^{-21}$	$5.799 \times 10^{-65}$	$1.715 \times 10^{-10}$
	4	3305	5578	Desconhecido - CVA13	CVA20	VP1, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C	$2.867 \times 10^{-33}$	-----	$5.708 \times 10^{-32}$	$4.203 \times 10^{-12}$	$1.596 \times 10^{-18}$	$3.572 \times 10^{-35}$	$1.332 \times 10^{-14}$
	5	3400	5710	CVA13	CVA11	2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C	$1.106 \times 10^{-15}$	-----	$6.333 \times 10^{-15}$	$1.595 \times 10^{-9}$	$1.110 \times 10^{-9}$	$9.698 \times 10^{-19}$	$1.332 \times 10^{-14}$

A Figura 4.7 apresenta a análise da sequência de LEV 45507 frente à sequência do genoma das cepas Sabin 1 (GenBank AY184219), Sabin 2 (GenBank AY184220) e Sabin 3 (GenBank AY184221) por meio de plotagem de similaridade e “Bootscan”.



**Figura 4.7. Análise de recombinação do genoma do isolado LEV 45507 e cepas Sabin tipo 1, tipo 2 e tipo 3, através de plotagem de similaridade e “bootscan” no programa Simplot.**

Em A e B são analisados, respectivamente, a similaridade e o percentual de árvores permutadas entre LEV44624 e cepas Sabin 1, 2 e 3. O evento único de recombinação Sabin 3/Sabin 2 é identificado aproximadamente na posição nt 3200 do genoma viral.

O genoma do vírus 45507 é caracterizado por um evento único de recombinação, que aconteceu dentro da região do capsídeo, no gene VP1. A recombinação intertípica encontrada é do tipo Sabin 3/Sabin 2, com junção de recombinação localizada entre os nucleotídeos 3249-3258 (dentro do gene VP1). Pelo menos 118 nt de Sabin 2 foram doados para a região do capsídeo de um vírus Sabin 3.

#### 4.6 Estimativa do tempo de replicação desde a dose vacinal

A fim de estimar o tempo de replicação aproximado dos isolados, desde a dose inicial da vacina, foi calculada a divergência nucleotídica entre o isolado e a respectiva cepa Sabin, na região P1/capsídeo.

Foram calculados os valores de substituições sinônimas por sítios sinônimos ( $K_s / D_s$ ), substituições não-sinônimas por sítio não-sinônimos ( $K_a / D_n$ ) e o número total de substituições por sítio ( $K_t$ ) para a região P1/capsídeo, sendo os resultados descritos na Tabela 4.6. No caso do vírus LEV 45507, a região doada por Sabin 2 no capsídeo (os últimos 118 nt de VP1) não foi considerada para o cálculo de tempo de evolução do isolado.

**Tabela 4.6. Valores de  $K_s$ ,  $K_a$  e  $K_t$  dos isolados LEV 44624 e LEV 45507, calculados a partir da divergência genética da cepa Sabin de referência para cada isolado.**

	<b>44624</b>	<b>45507</b>
	P1/capsídeo	P1/capsídeo
<b><math>K_s/D_s</math></b>	0,249	0,0077
<b><math>K_a/D_n</math></b>	0,008	0,0041
<b><math>K_t</math></b>	0,077	0.005

Utilizando os relógios moleculares  $K_s$  e  $K_t$ , estima-se que o tempo de evolução do isolado LEV 44624, em relação a Sabin 2, para a região P1, é de cerca de 8,5 anos de replicação, desde a dose inicial de VOP.

O valor da razão  $D_n/D_s$ , que funciona como um indicador da pressão seletiva que age sobre um gene codificante de uma proteína, é 0,033 para região P1/capsídeo de LEV 44624.

Para o vírus LEV 45507, estima-se que o tempo de evolução do isolado em relação a Sabin 3, para a região P1 (excluídos os 118 nt de Sabin 2), foi de 87 dias a partir do relógio  $K_s$  e 165 dias para o relógio  $K_t$ , o que indica que o isolado teve pouco tempo de replicação/evolução desde a dose inicial de VOP, e que o evento de recombinação ocorreu logo após a administração da dose vacinal, mais provavelmente durante a replicação do PV no indivíduo receptor da vacina.

#### **4.7 Análise filogenética**

Para identificar possíveis relações filogenéticas entre o vírus 44624 e cepas de origem vacinal PV tipo 2 recentemente isoladas ao redor do mundo, foi realizado o alinhamento da sequência completa do gene VP1 do vírus 44624 com as sequências de Sabin 2 (GenBank AY184220) e outros PVDV tipo 2 altamente divergentes isolados entre 1998 e 2015.

A árvore filogenética construída está representada na Figura 4.8. A investigação filogenética não revelou relação estreita entre o vírus LEV 44624 com nenhum dos PVDV analisados, portanto a origem geográfica do isolado permanece desconhecida.

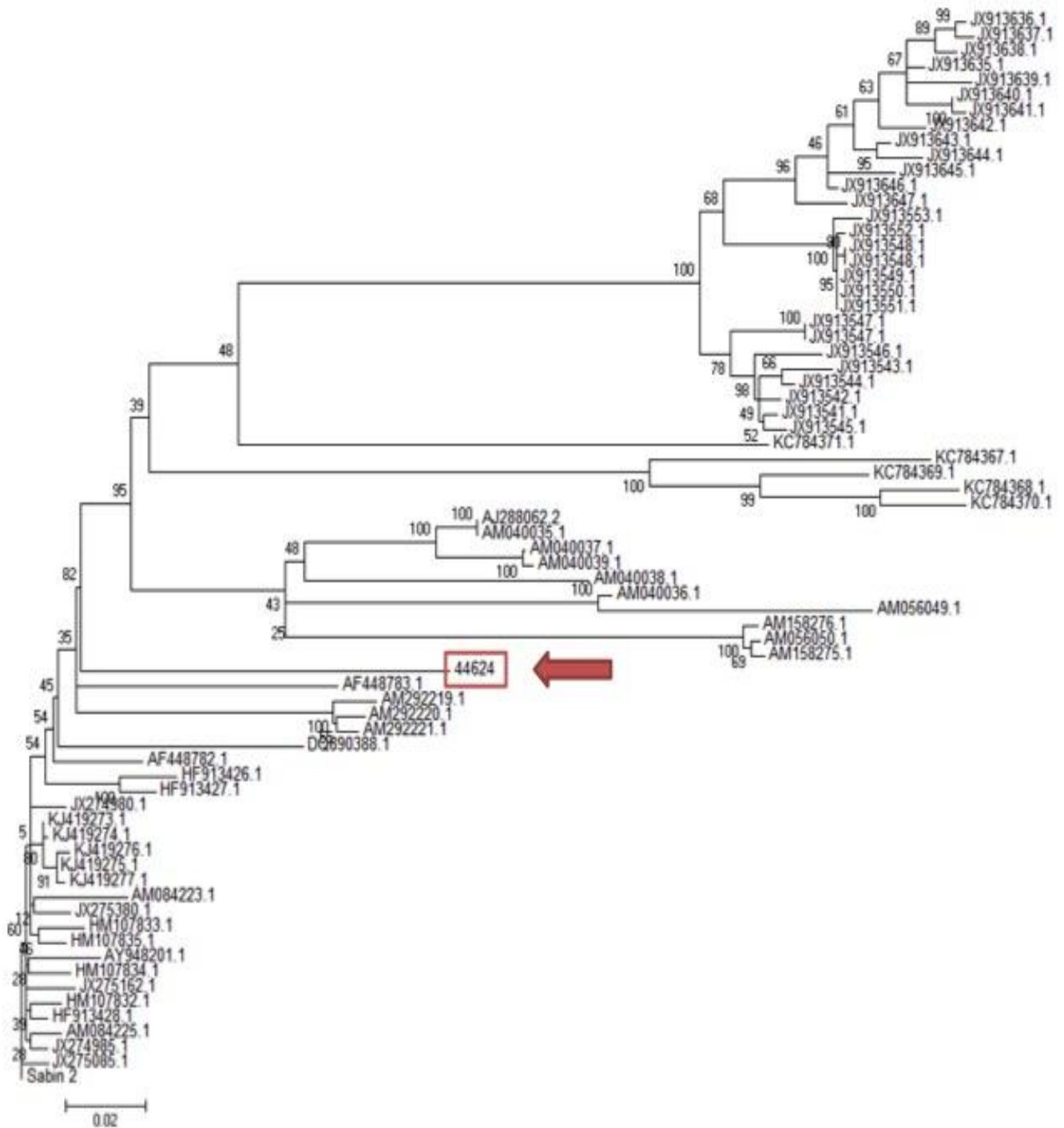


Figura 4.8. Análise filogenética das sequências de VP1 do isolado 44624 e outros PVDV tipo 2 isolados entre 1998 e 2015.

Uma amostragem maior de sequências de vírus relacionados à vacina Sabin 2 (~800 sequências), isolados ao redor do mundo, foram submetidas ao mesmo protocolo de análise filogenética, mas da mesma forma, nenhuma relação estreita foi encontrada entre estes vírus e o isolado LEV 44624 (dados não mostrados).

## 4.8 Características fenotípicas

### 4.8.1 Marcador RCT

O valor de RCT é definido como a diferença do título viral em log<sub>10</sub>, quando o vírus é submetido a replicação em diferentes condições de temperatura. As cepas atenuadas (Sabin) apresentam diferenças em sua capacidade replicativa mensurada a 36.5 °C (temperatura ótima) e 40 °C (temperatura supra-ótima). Os PVS replicam igualmente nas diferentes temperaturas.

Uma redução do título viral em mais que 2 logaritmos (RCT > 2) entre as temperaturas de 36.5 °C e 40 °C, caracteriza o vírus como termo-sensível, dentro do perfil de cepas Sabin atenuadas.

Os valores de título viral obtidos para replicação de cada vírus nas diferentes temperaturas testadas, estão descritos na Tabela 4.7, expressos em log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/0.1 mL.

**Tabela 4.7. Teste de capacidade replicativa em diferentes temperaturas (marcador RCT) dos isolados LEV 44624 e LEV 45507.**

Os vírus termo-sensíveis Sabin 2 e Sabin 3 são utilizados como controles. Os valores de título viral são expressos como log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/0,1 ml. O ΔRCT representa a variação no valor do marcador RCT entre as diferentes temperaturas testadas.

Vírus	Horas p.i.	TCID <sub>50</sub> 36.5 °C	TCID <sub>50</sub> 40 °C	ΔRCT
44624	8h	7.9	7.7	0.2
	24h	7.9	7.9	0.2
	48h	8.1	7.6	0.5
Sabin 2	8h	7.9	3.6	4.3
	24h	7.8	3.8	4.0
	48h	7.7	3.7	4.0
45507	8h	7.8	3.7	4.1
	24h	7.7	4.8	2.9
	48h	6.9	4.5	2.4
Sabin 3	8h	7.4	2.7	4.7
	24h	7.1	3.5	3.6
	48h	6.9	3	3.9



Os vírus Sabin 2, Sabin 3 (controles) e LEV 45507 apresentam valores de  $\Delta RCT > 2$ , sendo considerados termo-sensíveis. O vírus LEV 44624 apresentou valores de  $\Delta RCT < 2$ , sendo considerado termo-resistente, o que é um importante marcador de reversão para ao fenótipo neurotrópico.

#### 4.8.2 Curva de crescimento

Uma vez que o isolado LEV 44624 apresentou valores de marcador RCT muito diferentes de seu precursor Sabin 2, foi analisada também o perfil de replicação e o rendimento em cultura, em diferentes temperaturas (36.5 °C e 40 °C), e ao longo do tempo (curva de crescimento), em comparação com Sabin 2.

O isolado LEV 44624 apresentou uma cinética de crescimento bastante diferente da cepa Sabin 2 (Figura 4.9). A 36.5 °C, o isolado LEV 44624 apresentou uma maior taxa de replicação entre 4 e 6 h p.i., correspondente a fase exponencial da curva de replicação. Além disso, o rendimento final em cultura de células RD, ao final das 12 h p.i., mensurado por meio de  $TCID_{50}$ , foi maior para LEV 44624 que para Sabin 2.

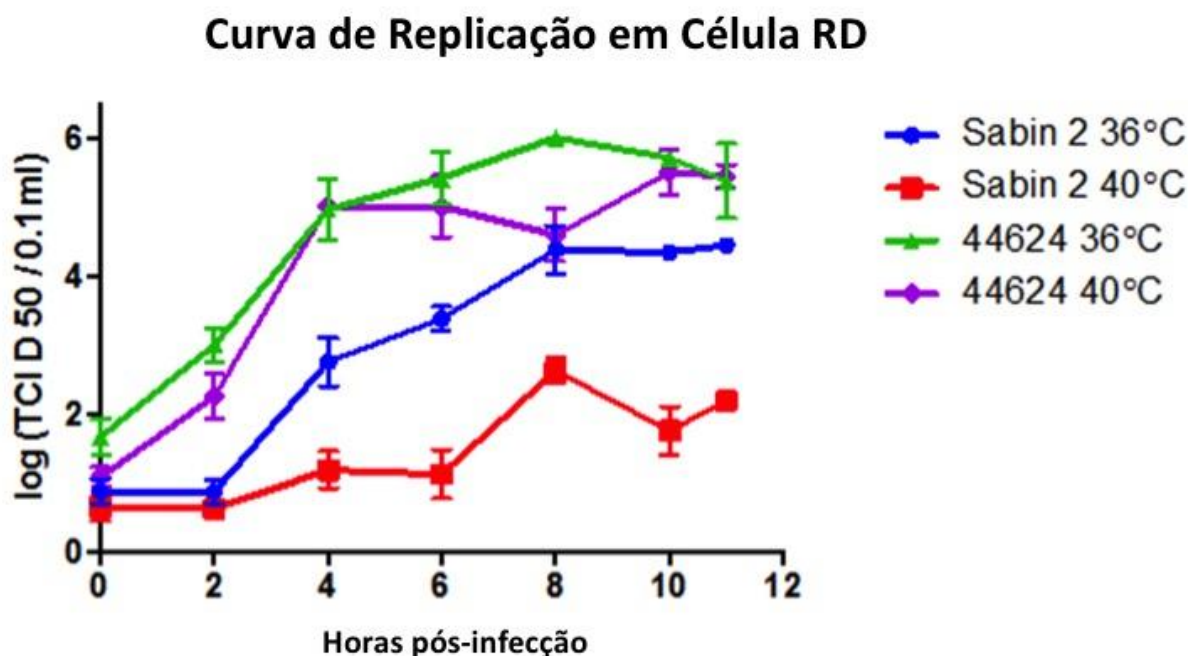


Figura 4.9. Curva de replicação do isolado LEV 44624 em cultura de células RD, em comparação com Sabin 2 em diferentes temperaturas.

Cada ponto representa a média + desvio padrão de títulos de vírus, a partir de três diferentes experimentos.

Como esperado, a cepa Sabin 2 se mostrou ineficiente para replicação a 40 °C, de acordo com seu fenótipo termo-sensível. Por sua vez, o isolado LEV 44624 apresentou uma elevada capacidade replicativa entre 4 e 6h. p.i., de forma semelhante ao resultado obtido a 36.5 °C. Portanto, o isolado LEV 44624 apresenta reversão ao fenótipo termo-resistente, com manutenção da capacidade replicativa em altas temperaturas, e ao longo do tempo. Três repetições independentes deste experimento mostraram resultados semelhantes.

## 5 DISCUSSÃO

Para direcionar a discussão, os resultados serão analisados em tópicos referentes às principais etapas deste trabalho. Primeiro, serão discutidos os dados de vigilância laboratorial de PV no Brasil (isolados a partir de casos de PFA e de amostras coletadas no ambiente) durante a série histórica 2008 - 2015. Em seguida, trataremos a discussão acerca da caracterização molecular e fenotípica dos isolados LEV 44624 e LEV 45507.

### 5.1 Vigilância laboratorial para poliovírus (2008-2015)

Um dos pilares centrais da Iniciativa Global para Erradicação da Poliomielite é a existência de um sistema de vigilância sensível e efetivo. A vigilância epidemiológica de casos de PFA funciona, especialmente em áreas não endêmicas, como um indicador da circulação residual de PV e como um medidor da eficácia dos esforços de erradicação (Levitt *et al.*, 2014).

Durante anos, o LEV vem monitorando a circulação de PV no Brasil em parceria com os serviços de vigilância dos estados. No período do estudo (2008 a 2015), foram analisadas 3242 amostras fecais provenientes de casos de PFA, das quais 81 (2,5%) apresentaram isolamento positivo para PV. Todos os estados das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, além dos estados da região Nordeste que se reportam diretamente ao LEV, enviaram amostras para diagnóstico durante o período do estudo. Todas as amostras enviadas pelo IEC com isolamento positivo para PV foram provenientes apenas do estado do Pará.

O maior número de amostras enviadas pelos estados do Nordeste e Sudeste do país tem relação com o maior contingente populacional residente nestas regiões do país, de acordo com o último censo demográfico realizado no país (IBGE, 2010). No entanto, em números relativos, o maior número de isolamento PV+ a partir das amostras do Sul e Sudeste pode ser um indicador da eficiência dos estados dessas regiões em identificar casos suspeitos de PFA e enviar as amostras para diagnóstico com qualidade (período de coleta, quantidade de amostra, temperatura de envio, entre outros fatores).

O país é considerado livre da poliomielite desde que o último caso autóctone associado ao WPV foi notificado em 1989, em Souza na Paraíba (Schatzmayr *et al.*, 2002). No período de 2008 a 2015, o diagnóstico molecular (PCR convencional e “Real-time” PCR) e sequenciamento do gene VP1 demonstraram a origem vacinal de todos PV isolados a partir de amostras de fezes de casos de PFA no Brasil. Este dado, somado ao levantamento prévio realizado por da Costa (2011), que dissertou acerca dos PV isolados no país nos anos de 1995 a 2007, corrobora a ausência de casos de poliomielite clássica causada por WPV no Brasil há pelo menos 20 anos, desde a certificação da eliminação da poliomielite das Américas em 1994.

Estes dois levantamentos (da Costa, 2011 e Cassemiro, 2016) estão sendo reunidos em único artigo (em redação) que fará a análise da vigilância laboratorial das PFA no Brasil entre 1995 e 2015, um trabalho com relevância tanto científica quanto documental/histórica, especialmente na fase final de eliminação da pólio do mundo.

O baixo número de mutações encontrado nos isolados é um indicador do pouco tempo de atividade replicativa destes vírus, o que sinaliza que seu isolamento aconteceu pouco tempo após a dose Sabin de origem. Este parâmetro é um excelente indicador da eficiência do sistema de vigilância, que vem sendo capaz de identificar os isolados circulantes precocemente, impedindo que o vírus se replique por muito tempo na população (GPEI, 2016d).

Quanto à frequência de isolamento por sorotipo, nos anos 2008 a 2015 o PV 2 foi o menos isolado no Brasil (25.69%), enquanto PV 1 e PV 3 apresentaram frequência de isolamento de 34.86% e 39.45%, respectivamente. Da Costa (2011), ao analisar a frequência de isolamento por sorotipo de PV, no Brasil nos anos de 1995 a 2007, relatou frequências de 40.44% para PV 1, 27.98% para PV 2 e 31.58% para PV 3, corroborando os dados de que o PV 2 é o sorotipo menos frequentemente recuperado a partir de amostras de PFA no Brasil. Este resultado diverge fortemente do relato de Tang e cols. (2014) em um levantamento realizado na China entre 2006 e 2010, no qual os autores descreveram o PV 2 como o sorotipo mais frequentemente isolado em casos de PFA com isolamento positivo para PV (PV 1 = 19.04%, PV 2 = 54.76% e PV 3 = 26.19%). No entanto, Kohler e cols. (2002) ao analisarem a frequência dos sorotipos em amostras de fezes em pacientes com PPAV na Índia em 1999, relataram um perfil bastante similar ao encontrado no Brasil (PV 1 = 37.34%, PV 2 = 24.68% e PV 3 = 38%). Em todos os

casos, foram excluídas as amostras com mistura de sorotipos, para padronizar as comparações entre os estudos.

Desde a década de 1960 até 2012, a poliomielite foi controlada no Brasil predominantemente pelo uso de VOP. Em decorrência dos casos de PPAV e da emergência de PVDV, a OMS recomendou que o uso de VOP fosse paulatinamente reduzido e futuramente interrompido em todo o mundo (OMS, 2016). A introdução de VIP no calendário vacinal brasileiro foi iniciada em agosto de 2012 (Brasil, 2012), em esquema sequencial com 2 doses de VIP e 2 doses de VOP, visando a minimização do risco de PPAV. Uma vez que o risco de PPAV não é igual em todas as doses de VOP dentro da série de vacinação, sendo de 7 a 21 vezes maior para a primeira dose que para qualquer outra dose de VOP na série (CDC, 2015), a adoção das duas doses VIP no início do esquema vacinal objetiva reduzir o risco de PPAV no país.

De acordo com Shahzad (2009), a mudança no esquema vacinal traz impactos diretos sobre o risco e a epidemiologia da PPAV, com redução e até eliminação do número de casos nos países que adotam unicamente VIP. Uma redução efetiva nos casos de PPAV foi observada na Dinamarca (3 doses VIP+3 doses VOP) (von Magnus & Petersen, 1984), Hungria (1 dose VIP + 3 doses VOP) (Domok, 1984) e Estados Unidos (2 doses VIP + 2 doses VOP) (Alexander et al., 2004) após introdução do esquema combinado VIP/VOP.

Como verificado por Kohler *et al.* (2002), quando um país faz uso unicamente de VOP, verifica-se um maior número de PV relacionados à vacina isolados a partir de casos de PFA imediatamente após a realização de ações de vacinação em massa, como as campanhas nacionais de imunização para pólio, geralmente realizados no Brasil em junho e em agosto.

Anteriormente à mudança no esquema vacinal (2008 – 2011), prevalecia no Brasil o isolamento de poliovírus SL nos meses de junho a setembro, indicando uma relação com as atividades das campanhas de vacinação. Entre os anos de 2012-2014, verifica-se uma discreta alteração nesse perfil, com uma maior distribuição dos PV isolados ao longo do ano, que pode estar associada com a mudança no esquema vacinal.

O ano de 2015, no entanto, apresentou um número mais elevado de PV isolados a partir de amostras de PFA que os anos de 2012-2014, valor este equivalente aos anos de 2010 e 2011, anteriores à mudança do esquema vacinal

(Figura 4.2). Os dados avaliados neste trabalho não foram capazes de explicar esse aumento no isolamento especificamente neste ano. Existe a possibilidade de uma melhora na eficiência da notificação e/ou no envio de amostras adequadas pelas vigilâncias estaduais, no entanto não podem ser excluídas as possibilidades de deficiência na notificação e/ou no envio de amostras adequadas para diagnóstico nos anos com menor isolamento (2012-2014). Faz-se necessário prosseguir com o acompanhamento por um maior período de tempo para melhor esclarecer esse fato.

A idade do indivíduo é reconhecida como um fator de risco para desenvolvimento de PFA. A distribuição por faixa etária dos casos de PFA no Brasil entre 2008 e 2015 foi de 44% em indivíduos com 0 a 5 anos, 51% em indivíduos de 6 até 15 anos e apenas de 2% maiores de 15. Enquanto no Brasil foi verificado uma maior incidência de PFA em indivíduos de 5-15 anos, Odoom e cols. (2014) relataram uma maior incidência de PFA em indivíduos apresentando 0-5 anos (78.44% para 0-5 anos, 21.08% para 5-15 anos e 0.5% para maiores de 15 anos). Da mesma forma, trabalhos realizados na Nigéria (Hamzat & Omotade, 2006; Bassey *et al.*, 2011) e Índia (Singh *et al.*, 2004) mostram uma maior incidência de PFA em crianças de 0-5 anos.

No entanto, D'Errico e cols. (2008), ao estudarem uma população na Itália, descreveram uma incidência de PFA de 37% em indivíduos <5 anos, 37% em indivíduos de 5 - 10 anos e 26% em indivíduos com 10-15 anos, mostrando que a proporção de casos de PFA por idade pode ser variável entre as populações, o que provavelmente está relacionado as diferentes etiologias das PFA.

Por sua vez, ao analisar a idade dos pacientes com amostras positivas para isolamento de PV neste estudo, verifica-se que do total de 81 PV isolados, 92.6% foram provenientes das amostras de pacientes entre 0 e 5 anos e idade, estabelecendo uma relação entre o maior isolamento de PV a partir de amostras de indivíduos em idade de vacinação.

Quanto às atividades de vigilância ambiental, o universo de amostras analisadas neste trabalho é proveniente de apenas dois estados, Rio de Janeiro e São Paulo, o que demonstra que a vigilância ambiental de PV no Brasil ainda é bastante incipiente. Apenas o estado de São Paulo possui atividade sistemática de monitoramento ambiental, a qual é coordenada e executada pela CETESB em parceria com o LEV, que colabora com a realização da diferenciação intratípica e sequenciamento dos isolados. Entre 2011 e 2012, o LEV realizou um estudo

investigativo da presença de PV em amostras de água em uma estação de tratamento na cidade do Rio de Janeiro (Pereira et al., 2016).

Entre 2008 e 2015, um total de 104/134 (77.6%) amostras analisadas foram positivas para o isolamento de um ou mais sorotipos de PV. Até 2013, apenas vírus SL foram identificados a partir de amostras do ambiente no Brasil. O isolamento de cepas SL no ambiente é bastante comum em países que fazem uso de VOP e vem sendo relatado inclusive em países que fazem uso exclusivo de VIP há muitos anos, como a Suíça (Zurbriggen *et al.*, 2008).

Em 2014 aconteceu o isolamento de dois vírus de interesse para a estratégia de erradicação: um WPV tipo 1 e um PVDV tipo 2, ambos isolados do ambiente por ações de vigilância ambiental. É interessante pensar que tais isolados foram recuperados a partir de atividades pontuais de vigilância. Em um país de dimensões continentais e grande fluxo de pessoas através das fronteiras, como é o caso do Brasil, a implementação de ações sistemáticas de vigilância ambiental em localidades estratégicas deve ser fortemente considerada, para que qualquer circulação residual de PV, mesmo na ausência de casos de paralisia, seja imediatamente investigada e enfrentada.

A análise filogenética destes isolados indica que ambos são vírus importados (OMS, 2014b; Casseiro *et al.*, 2016). O Brasil deve ser considerado um país em risco de importação de PV, por ser responsável pela atração de um grande contingente de pessoas todos os anos para atividades turísticas e profissionais, bem como para a realização de eventos de grande porte com importância global como a Jornada Mundial da Juventude (2013), a Copa do Mundo (2014) e as Olimpíadas (2016), que incentivam a imigração de pessoas com diferentes níveis de proteção vacinal, capacidade imunológica (imunodeficiências) ou até mesmo infecção por PV (sintomática ou não).

A OMS vem, cada vez mais, incentivando que as atividades de vigilância ambiental sejam implementadas como complemento à vigilância epidemiológica das PFA, em decorrência de sua elevada sensibilidade para identificação da circulação residual de PV, mesmo na ausência de casos detectados de PFA (Ashgar *et al.*, 2014; GPEI, 2015).

## 5.2 Vírus derivado vacinal tipo 2 - LEV 44624 (Artigo 1)

O vírus LEV 44624, isolado a partir de amostra de água do mar, no porto de São Sebastião, litoral norte do estado de São Paulo, é classificado como um vírus PVDV tipo 2 ambíguo (aPVDV), por sua elevada divergência genética (aproximadamente 8.6% em VP1), em relação à cepa de origem Sabin 2 (GenBank AY184220).

Uma vez que VOP tem sido administrada no Brasil por décadas, a presença de cepas Sabin no ambiente é considerada um evento comum. O isolamento de vírus PVDV, por outro lado, é um episódio alarmante. No Brasil, é a primeira vez que uma cepa PVDV foi isolada no ambiente e caracterizada, embora diversos trabalhos descrevam o isolamento de PVDV a partir do ambiente em diversos países do mundo onde já aconteceu a erradicação do WPV (Blomqvist *et al.*, 2004; Cheerkasova *et al.*, 2002; Shulman *et al.*, 2000; El Bassioni *et al.*, 2003), e diversos surtos tenham sido relatados associados a estes vírus, especialmente em locais que apresentam irregularidade na cobertura vacinal (CDC, 2001b; CDC, 2002; Kew *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003; ).

O isolado LEV 44624 não tem relação filogenética estreita com qualquer outro vírus (pólio ou Enterovírus não-pólio) isolado no Brasil, antes ou após este evento. O porto de São Sebastião é o maior porto do Brasil para graneis líquidos (petróleo e derivados), apresentando um alto fluxo de embarcações e pessoas de todo o mundo, o que suporta a hipótese que o vírus LEV 44624 isolado no Brasil é, na verdade, um vírus importado que não foi capaz de estabelecer uma cadeia de transmissão contínua na população local. No entanto, as evidências, embora assim indiquem fortemente, não são suficientes para excluir outras possibilidades para a origem do vírus (como a existência de um excretor crônico local).

No mês de isolamento do vírus LEV 44624 (janeiro de 2014), a cobertura global com 3 doses de vacina oral contra a poliomielite para crianças menores de 1 ano de idade, no Brasil e na localidade onde ocorreu o isolamento, atingiu valores de ~ 100% (dados disponíveis em <http://pni.datasus.gov.br>), o que potencialmente protegeu a população local e preveniu o vírus de estabelecer uma cadeia de transmissão ativa. O episódio não foi associado a casos de poliomielite paralítica.

O nucleotídeo 481, na região 5'-NC, bem como o aminoácido 143 da proteína VP1, são reconhecidamente regiões determinantes de atenuação em cepas Sabin 2



(Macadam *et al.*, 1993; Ren *et al.*, 1991). Ambos os determinantes apresentaram reversão para a sequência de PV2 selvagem (A481G e Ile143Thr). Estas substituições são frequentemente encontradas em vírus PVDV (Rousset *et al.*, 2003; Shulman *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2003) e isolados SL (Macadam *et al.*, 1993; Minor & Dunn, 1988; Yakovenko *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2002), o que sugere que estes alelos de atenuação estão sujeitos a uma intensa pressão seletiva durante a replicação das cepas vacinais no intestino humano (Minor & Dunn, 1988).

O elemento CRE, encontrado na proteína 2C do genoma dos PV, funciona como um elemento de regulação, de ação cis, envolvido na replicação viral. Nas cepas Sabin, existe uma região conservada AAACA, encontrada no loop estrutural do elemento CRE. No vírus 44624, o “motif” AAACA foi substituído por AAGCA, que é encontrado em cepas WPV tipo 2 (Goodfellow *et al.*, 2000; Rieder *et al.*, 2000).

As estimativas de tempo de evolução do isolado LEV 44624, calculados a partir da divergência nucleotídica na região P1/capsídeo, com relação a cepa de origem Sabin 2 (GenBank AY184220), indicam que LEV 44624 tem circulado por pelo menos 8,5 anos. PV apenas evoluem quando replicam em humanos e sua viabilidade no ambiente é finita, sendo bastante variável, podendo atingir meses sob condições favoráveis (Dowdle & Birmingham, 1997). Uma vez que o vírus LEV 44624 foi isolado a partir de amostra ambiental, é possível que a dose da vacina a partir da qual o vírus foi originado tenha sido administrada há mais de 8,5 anos.

O genoma recombinante LEV 44624 manteve apenas a região genômica de P1/capsídeo proveniente da cepa de origem Sabin 2, a qual determina as propriedades antigênicas do sorotipo viral (como confirmado por anticorpos policlonais), enquanto as outras porções do genoma foram derivadas de eventos de recombinação com outros vírus da espécie *Enterovirus C*. Como apresentado na Tabela 4.5, os vírus que apresentam maior indicação estatística ( $p$  valor < 0.05) de serem cepas parentais do isolado LEV 44624 são: Sabin 2 (GenBank AY184220), Sabin 3 (GenBank AY184221), CVA11 (GenBank AF499636), CVA13 (GenBank AF465511), CVA20 (GenBank AF499642) e CVA24 (GenBank EF026081).

No entanto, não foi possível determinar precisamente as estirpes parentais do isolado porque, para algumas regiões do genoma, mais de um evento de recombinação, com diferentes cepas parentais, foram preditos com significância estatística (ver eventos de recombinação 2 e 3 para as sequências do capsídeo VP4-a-VP1 e os eventos 4 e 5 para as sequências dos genes não estruturais 2A-a-

3C, como descrito na Tabela 4.5). É possível que informações mais precisas fossem obtidas ao analisar o genoma de LEV 44624 frente a sequências genômicas de vírus atualmente em circulação, em vez de estirpes de referência depositadas no GenBank. Essa análise, no entanto, foi impossibilitada pela ausência de uma base de dados de sequências de *Enterovirus C* circulantes no Brasil e pela dificuldade associada com a averiguação da grande quantidade de sequências de *Enterovirus C* disponíveis no GenBank.

A análise filogenética da sequência de VP1 de LEV 44624, frente a isolados recentes de PVDV de várias partes do mundo, não identificou sequências intimamente relacionados a LEV 44624. A impraticabilidade do rastreamento de todas as sequências Sabin tipo 2 disponíveis no GenBank, bem como a larga quantidade de sequências de vírus que não são depositadas, foram também pontos limitantes para determinação da origem do isolado LEV 44624. Portanto, a origem geográfica deste vírus permanece desconhecida.

O vírus LEV 44624 apresenta marcadores genéticos de reversão ao fenótipo de neurovirulência, adquiridos através de recombinações e/ou mutações. Tal reversão foi verificada também através da presença de marcadores fenotípicos de reversão (resistência a replicação em altas temperaturas e perfil da curva de replicação), a partir dos quais se verificou que o comportamento fenotípico do isolado diverge fortemente daquele das cepas atenuadas Sabin e se assemelha aos de vírus WPV e PVDV.

Durante sua evolução, vírus cPVDV e iPVDV estão sob pressões seletivas biológicas distintas, que resultam em diferenças nas propriedades fundamentais de cada tipo viral (Burns *et al.*, 2014). Analisando suas características genéticas, podemos sugerir que, provavelmente, o isolado LEV 44624 tem uma origem cPVDV, devido a:

- 1) Presença de diversos pontos de quebra no genoma, decorrentes de recombinação com vírus não-vacinais (enterovírus C não-pólio), o que ocorre com frequência durante a circulação sustentada de PV e indica a ocorrência de transmissão pessoa a pessoa (Brown *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003);

- 2) Baixa ocorrência de mutações nas regiões NA<sub>g</sub>, as quais não são frequentes em isolados cPVDV, mas são recorrentes em isolados iPVDV (DeVries *et al.*, 2011).

Embora não seja obrigatório para o surgimento de cepas cPVDV, nestes isolados é bastante frequente a ocorrência de eventos de recombinação entre cepas vacinais e não-vacinais, o que parece facilitar a substituição de diversas sequências determinantes de atenuação, em um único evento de recombinação genética (Jegouic *et al.*, 2009). Por sua vez, os isolados iPVDV são largamente conhecidos por sua grande variabilidade antigênica, com muitas mutações em/ou próximo aos sítios NAg (DeVries *et al.*, 2011), o que não foi observado no isolado LEV 44624.

Em acréscimo, a razão Dn / DS, que pode ser utilizada como um indicador da pressão seletiva que age sobre um gene codificante para determinada proteína, foi calculada como 0,033 para a região P1 / capsídeo, que é um valor mais baixo que o comumente estimado para os vírus iPVDV, os quais estão sujeitos à intensa pressão seletiva pela constante exposição ao sistema imune do hospedeiro crônico.

Dessa forma, os resultados indicam que o isolado LEV 44624 estabeleceu circulação sustentada durante sua história evolutiva, provavelmente envolvendo uma cadeia de transmissão pessoa a pessoa. A presença, no ambiente, de cepas altamente divergentes, com potencial reversão ao fenótipo de neurovirulência, é um risco potencial para a transmissão e disseminação de PV patogênicos. Os resultados deste estudo reiteram a vigilância ambiental como uma ferramenta sensível para a detecção de PV em baixos níveis de circulação e na ausência de casos de poliomielite paralisante (Hovi, 2006; Gary *et al.*, 1997; Bottiger & Herrstrom, 1992; Deshpande *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2013).

### **5.3 Vírus recombinante intertípico tipo 3/tipo 2 - LEV 45507 (Artigo 2)**

O isolado LEV 45507 é um vírus SL, que possui um único evento de recombinação em seu genoma, localizado na região do capsídeo, na porção final (3') do gene VP1. O vírus foi classificado como um recombinante natural intertípico na região do capsídeo (Sabin tipo 3/Sabin tipo 2).

LEV 45507 possui um genoma com poucas alterações em relação às cepas Sabin de origem (vírus SL), com apenas 22 mutações nucleotídicas ao longo de todo o genoma. Dentre os três principais determinantes de atenuação encontrados nos genomas de Sabin 3 (nt 472 em 5'-NC, nt 2034 em VP3 e nt 2493 em VP1), dois apresentaram mutações com reversão para a sequência do precursor neurovirulento

P3/Leon/EUA/1937: U472C e C2493U (Thr6Ile) (Westrop *et al.*, 1989). Ambas as mutações estão associadas com o aumento da neurovirulência em cepas Sabin 3 (Minor, 1992; Rezapkin *et al.*, 1995).

O vírus P3/Leon/EUA possui um resíduo citosina em nt 2034, com um aminoácido Ser na posição 91 de VP3. No entanto, em LEV 45507, é encontrada a mutação U2034A, com uma mutação Phe91Ile. O resíduo 91 de VP3, em cepas atenuadas, está associado a um defeito na montagem do vírus (Macadam *et al.*, 1989), que está ausente em cepas neurovirulentas, que apresentam o resíduo Serina. Mais estudos são necessários para entender o impacto da substituição Phe91Ile, descrita no isolado LEV 45507.

Com relação às mutações em sítios de neutralização antigênica, existe uma mutação dentro do sítio NAg3b (G1991A) de LEV 45507, resultando na substituição do aminoácido Asp76Asn em VP3. Além disso, foi descrita a mutação U2790C, associada com a substituição Met105Thr em VP1. O resíduo 105 de VP1 está localizado na proximidade do sítio NAg1, e do “loop” BD de VP1, estando provavelmente relacionado com a ligação ao receptor de poliovírus CD155 (Pliaka *et al.*, 2010).

A sequência doada por Sabin 2 ao capsídeo do vírus LEV 45507 resultou na troca de 6 resíduos de aminoácidos na sequência de Sabin 3: VP1-279, VP1-286, VP1-287, VP1-288, VP1-290 e VP1-293, os quais estão localizados na superfície do vírus, como parte do sítio antigênico NAg3a do capsídeo de PV (Minor *et al.*, 1986). Apesar de toda a região antigênica de NAg3a de um vírus Sabin 3 ter sido substituída por aminoácidos Sabin 2, não houve alteração na identidade antigênica do isolado, identificada por anticorpos policlonais anti-Sabin tipo 3, em teste de microneutralização (com ausência de reação cruzada com soro imune para Sabin tipo 2).

É possível que a inserção de sequências Sabin tipo 2, substituindo regiões de neutralização antigênica (NAg) de um vírus tipo 3, possa proporcionar benefícios para escape dos anticorpos sorotipo-específicos, durante a replicação do vírus no intestino humano, o que favoreceria o enriquecimento de cepas recombinantes.

O tempo de evolução do isolado 45507 foi estimado a partir das divergências genéticas entre as sequências de P1/capsídeo do vírus LEV 45507 e da cepa de referência Sabin 3. Os últimos 118 nt de VP1 (após a junção de recombinação) não foram considerados para análise. O tempo de evolução estimado de 87 dias (relógio

Ks) e 165 dias (relógio Kt) indica um curto tempo de replicação/evolução para o isolado LEV 45507, o que sugere que o evento de recombinação ocorreu logo após a administração da dose inicial de VOP, muito provavelmente durante a replicação do vírus no indivíduo receptor primário da vacina.

Apesar das mutações encontradas em sítios determinantes de atenuação, não foi possível verificar, em laboratório, alterações fenotípicas no isolado, que manteve as características de cepas Sabin atenuadas no teste RCT (fenótipo *ts*). Tao *et al.* (2010) e Zhang *et al.* (2010) encontraram resultados semelhantes ao avaliar a capacidade replicativa de vírus recombinantes na região do capsídeo, os quais se mantiveram sensíveis à replicação em elevadas temperaturas, sugerindo que o evento de recombinação não tem impacto direto no marcador RCT.

A administração da vacina VOP trivalente proporciona as condições ideais para múltiplas infecções nas células-alvo no intestino humano, o que favorece a ocorrência de eventos de recombinação entre genomas virais heterotípicos. A recombinação genômica, junto às mutações em nucleotídeos, são as principais ferramentas evolutivas do genoma de PV, gerando variabilidade genética. Portanto, eventos de recombinação ocorrem frequentemente em PV, e cepas recombinantes (especialmente relacionadas ao PV tipos 2 e 3) têm sido comumente isoladas a partir de pacientes saudáveis, bem como de pacientes com PPAV (Burns *et al.*, 2014; Razafindratsimandresy *et al.*, 2013).

As junções de recombinação em PV geralmente estão localizadas nas regiões não estruturais do genoma viral, com “hotspots” localizados em 2C, para recombinações intertípicas tipo 3/tipo x e, em 3D, para recombinações tipo 2/tipo x (Cuervo *et al.*, 2001; Paximadi *et al.*, 2006; Karakasiliotis *et al.*, 2004). A ausência de pontos de quebra para recombinação na região do capsídeo parece ter relação com a manutenção da integridade da estrutura do capsídeo, essencial para a viabilidade viral (Simmonds & Welch, 2006). Alguns estudos, inclusive, descrevem os PV com capsídeos quiméricos como, geralmente, não viáveis (Kohara *et al.*, 1988) ou instáveis (Kohara *et al.*, 1985), em comparação com as suas linhagens parentais.

A ocorrência natural de recombinação intertípica na região do capsídeo viral é apontada como muito rara e sabe-se muito pouco acerca de regiões em P1 que sejam suscetíveis a sofrer recombinação, com manutenção da viabilidade viral. Existem 22 vírus recombinantes Sabin 3/Sabin 2 descritos na literatura (Martín *et al.*,

2002; Blomqvist *et al.*, 2003; Blomqvist *et al.*, 2010; Dedepsideis *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Em todos os casos, as junções de recombinação estavam localizadas na porção 3' do gene VP1. A maior sequência de Sabin 2 já inserida num capsídeo de um vírus Sabin 3 compreende 136 nt (Zhang *et al.*, 2010). Em LEV 45507, a junção de recombinação localizada entre os nucleotídeos 3251-3258 do genoma, resultou na segunda maior sequência Sabin 2 (118 nt) já inserida num genoma Sabin 3, com descrição na literatura.

Em 2002, Martin e colaboradores isolaram um vírus recombinante Sabin 3/Sabin 2 na Bielorrússia, que possuía a mesma junção de recombinação 3251-3258 nt (Martin *et al.*, 2002). Além da junção de recombinação 3251-3258 nt, apenas os sítios 3233-3240 nt, 3275-3285 nt e 3314-3321 nt foram previamente descritos em isolados Sabin 3/Sabin 2 recombinantes no capsídeo (4 isolados, 4 isolados e 3 isolados, respectivamente).

Blomqvist *et al.* (2010) propuseram a existência de um “hotspot” para recombinação intertípica na porção terminal da proteína VP1. A caracterização do isolado LEV 45507 vem trazer suporte a esta hipótese, indicando que há uma maior probabilidade de que os eventos de recombinação que ocorram nesta região possam dar origem a vírus quiméricos Sabin 3/Sabin 2 viáveis (Blomqvist *et al.*, 2010).

Por meio deste trabalho, fica evidente o papel essencial desempenhado pelos laboratórios da RGLP, que produzem informações cruciais para os sistemas de vigilância como: confirmação de casos de pólio, detecção da importação de vírus, determinação de sua origem geográfica, identificação da emergência de PVDV e documentação da circulação de WPV (CDC, 2009). Estas informações permitem investigar casos e surtos oportunamente, construir séries históricas que descrevam a circulação dos vírus em determinado período, a existência de casos associados e a determinação de localidades críticas, o que torna possível a constante adequação das medidas de controle e prevenção às necessidades do programa de erradicação.

Em nosso país, é difícil sensibilizar a população para o risco envolvido com a infecção por PV, bem como para a relevância do sistema de vigilância, por conta da ausência de casos de poliomielite devido a WPV no país desde 1989. No entanto, enquanto o PV não for completamente erradicado de todas as partes do globo e enquanto a vacina VOP ainda for utilizada, existe risco constante de importação de

PV e da emergência de cepas derivadas vacinais, risco este que não pode ser subestimado.

## **6 PERSPECTIVAS**

- Publicação de artigo apresentando os dados da vigilância laboratorial de poliomielite no Brasil, desde 1995 até 2015, englobando os 20 anos da era pós-certificação da eliminação da pólio no Brasil.

- Dar continuidade às ações de vigilância laboratorial de PFA, com o monitoramento e caracterização dos poliovírus isolados.

- Ampliação das ações de vigilância ambiental na cidade do Rio de Janeiro, com desenvolvimento de projetos para vigilância de regiões estratégicas durante a realização dos Jogos Olímpicos 2016.



## 7 CONCLUSÕES

1. O sistema de vigilância das PFAs no Brasil, entre 2008 a 2015, se mostrou eficiente para identificação de PV a partir de amostras de fezes. Todos os vírus foram identificados como “Sabin-like”, apresentando pouca divergência genética em relação às cepas Sabin de referência, um indicador do pouco tempo de replicação dos isolados.

2. Não foi identificada a circulação de PV selvagem no Brasil, a partir de casos de PFA, confirmando que há ausência de transmissão ativa de PV selvagem no Brasil.

3. O isolamento de um vírus derivado vacinal tipo 2 (LEV 44624), altamente divergente, a partir de amostra do ambiente, tem enorme impacto para o Programa de Erradicação da Poliomielite. O isolamento do vírus se deu na ausência de casos de PFA, e nenhum caso de paralisia foi associado a este vírus no país, antes ou após seu isolamento. A maior probabilidade é que se trate de um vírus importado, embora não tenha sido possível identificar, neste estudo, a origem geográfica do isolado.

4. O vírus LEV 44624 apresenta marcadores genéticos de reversão ao fenótipo neurotrópico, adquiridos através de recombinações e/ou mutações. Existem diversos indicadores que apontam que o isolado tem procedência cPVDV (grande quantidade de mutações no genoma; diversidade de eventos de recombinação, que são indicativos de transmissão pessoa-pessoa; longo período de replicação).

5. O vírus recombinante LEV 45507, isolado a partir de um caso de PFA, apresenta um raro evento de recombinação na região de VP1, no capsídeo viral, apresentando padrão de recombinação intertípica tipo 3/tipo2. A sequência doada de Sabin 2 tem pelo menos 118 nucleotídeos, sendo uma das maiores já relatadas na literatura.

6. Este estudo reforça a hipótese da existência de um “hotspot” para ocorrência de recombinação intertípica no capsídeo de vírus Sabin 3, localizado na região 3' do gene VP1.

7. As substituições de aminoácidos nas regiões de neutralização antigênica (NAg), em decorrência de mutações (LEV 44624) ou recombinações (LEV 45507)

não foram capazes de alterar a capacidade dos isolados de serem reconhecidos pelo soro imune específico para sua sequência Sabin de origem.

8. A vigilância ambiental se mostrou altamente sensível para isolamento de PV, na ausência de casos de PFA, e merece destaque a coleta de amostras em áreas sujeitas à reintrodução de PV por importação (portos e aeroportos internacionais), que quando realizada de forma sistemática, foi capaz de identificar precocemente a introdução de cepas de importância em território nacional.

9. Esforços devem ser direcionados para que seja realizado seguimento de todos os pacientes com PFA, para diagnóstico etiológico diferencial de todos os casos. Para tanto, médicos, agentes de vigilância e trabalhadores da saúde envolvidos na vigilância de PFA devem receber formação continuada, através de reuniões de sensibilização e motivação, para que cada vez mais, as metas da OMS para as vigilâncias sejam plenamente cumpridas e seja alcançado o objetivo final de eliminação da pólio no mundo.

10. Devido ao risco da importação de PV e aos riscos associados ao uso de VOP (emergência de PVDV e casos de PPAV), é necessária a manutenção das atividades de vigilância (epidemiológica, laboratorial e ambiental), a longo prazo, até a certificação de um mundo livre de poliovírus.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agol VI. The 5' untranslated region of picornaviral genomes. *Adv Virus Res.* 1991;40:103-80.

Agol VI. Molecular mechanisms of poliovirus variation and evolution. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;299:211-59.

Agol VI. Picornavirus as a model for studying the nature of RNA recombination. In: Ehrenfeld E, Domingo E, Ross RP (eds.). *The Picornaviruses.* Washington (DC): ASM; 2010. pp. 239–52.

Alexander JP, Ehresmann K, Seward J, Wax G, Harriman K, Fuller S, et al. Transmission of imported vaccine-derived poliovirus in an undervaccinated community in Minnesota. *J Infect Dis.* 2009 Feb;199:391-7.

Alexander LN, Seward JF, Santibanez TA, Pallansch MA, Kew OM, Prevots DR, et al. Vaccine policy changes and epidemiology of poliomyelitis in the United States. *JAMA.* 2004 Oct;292(14):1696-701.

Anis E, Kopel E, Singer S, Kaliner E, Moerman L, Moran-Gilad J, et al. Insidious reintroduction of wild poliovirus into Israel, 2013. *Euro Surveill.* 2013;18(38):20586.

Armstrong C. Successful transfer of the Lansing strain of poliomyelitis virus from the cotton rat to the white mouse. *Public Health Rep.* 1939;54:2302–5.

Asturias EJ, Grazioso CF, Luna-Fineman S, Torres O, Halsey NA. Poliovirus excretion in Guatemalan adults and children with HIV infection and children with cancer. *Biologicals.* 2006;34:109–12.

Atlas R. *Principles of Microbiology.* 2 ed. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers; 1997. 1298 p.

Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G, Malik F, Shetty S, Bassioni LE, et al. Environmental surveillance for polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis.* 2014 Nov;210(1):S294-303.

Bakker WA, Thomassen YE, van't Oever AG, Westdijk J, van Oijen MG, Sundermann LC, *et al.* Inactivated polio vaccine development for technology transfer using attenuated Sabin poliovirus strains to shift from Salk-IPV to Sabin-IPV. *Vaccine*. 2011;29:7188–96.

Bandyopadhyay AS, Garon J, Seib K, Orenstein WA. Polio vaccination: past, present and future. *Future Microbiol*. 2015;10(5):791-808.

Barbosa MRF [homepage da internet]. Monitoramento ambiental do poliovírus: Experiência do estado de São Paulo [acesso em 15 mai 2016]. Disponível em [http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/noticias/monitoramento\\_ambiental\\_do\\_polio\\_-\\_cetesb.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/noticias/monitoramento_ambiental_do_polio_-_cetesb.pdf).

Bassey EB, Gasasira A, Mitula P, Frankson UU, Adeniji JA. Surveillance of acute flaccid paralysis in Akwa Ibom State, Nigeria 2004–2009. *Pan African Med J*. 2011;9:32.

Blomqvist S, Bruu AL, Stenvik M, Hovi T. Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol*. 2003 Mar;84:573–80.

Blomqvist S, Savolainen C, Laine P, Hirttiö P, Lamminsalo E, Penttilä E, *et al.* Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated from sewage in Estonia. *J Virol*. 2004 May;78(9):4876-83.

Bodian D, Horstmann DH. Polioviruses. In: Horsfall FL, Tamm I (eds.). *Viral and Rickettsial Infections of Man*. 4 ed. Lippincott, Philadelphia, 1965. pp. 430–73.

Bodian D. Emerging concept of poliomyelitis infection. *Science*. 1955 Jul;122(3159):105-8.

Bolanaki E, Kottaridi C, Markoulatos P, Kyriakopoulou Z, Margaritis L, Katsorichis, T. Partial 3D gene sequences of Coxsackie viruses reveal interspecies exchanges. *Virus Genes*. 2007 Oct;35(2):129-40.

Boni MF, Posada D, Feldman MW. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics*. 2007 Jun; 176(2):1035–47.

Bonnet MC, Dutta A. World wide experience with inactivated poliovirus vaccine. *Vaccine*. 2008 Sep;26(39):4978-83.

Böttiger M, Herrstrom E. Isolation of polioviruses from sewage and their characteristics: experience over two decades in Sweden. *Scand J Infect Dis*. 1992; 24(2):151–5.

Böttiger M. Rct-marker tests on isolates from WM 3 and Sabin type 3 attenuated poliovirus vaccines. *Archiv für die gesamte Virusforschung*. 1968 Sep; 25(3):299–307.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Bases técnicas para a erradicação da transmissão autóctone da poliomielite. 2 ed. Brasília: Centro de Documentação do Ministério da Saúde; 1988.

Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Imunizações – 20 anos. Brasília: Ministério da Saúde; 1993.

Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Vol II. 5 ed. Brasília: FUNASA; 2002. 842 p.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações-30 anos. Série C. Projetos e Programas e Relatórios. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7 ed. Série A – Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Ministério da Saúde; 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Técnico da Introdução da Vacina Inativa Poliomielite (VIP). Brasília: Ministério da Saúde; 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Volume Único. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. Plano de Erradicação da Poliomielite: Estratégia no Brasil. Ano 2015. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.

Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch MA. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J Virol* 2003 Aug;77:8973–84.

Burnet FM, Macnamara J. Immunological differences between strains of poliomyelitic virus. *Br J Exp Pathol.* 1931;12:57–61.

Burns CC, Diop OM, Sutter RW, Kew OM. Vaccine-derived polioviruses. *J Infect Dis.* Nov 2014;210(1):S283–S93.

Cai JJ, Smith DK, Xuhua X, Kwok-yung Y. MBEToolbox: a Matlab toolbox for sequence data analysis in molecular biology and evolution. *BMC Bioinformatics.* 2005 Mar 22; 6:64.

Campos AL. Ciência médica e poliomielite no Brasil na primeira metade do século XX. *Tempos históricos* 2009;13(2):103-18.

Campos ALV, Nascimento DR, Maranhão ESP. A história da poliomielite no Brasil e seu controle por imunização. *Hist. cienc. saude-Manguinhos* 2003; 10(2):573-600.

Cassemiro KM, Burlandy FM, da Silva EE. Rare Natural Type 3/Type 2 Intertypic Capsid Recombinant Vaccine-related Poliovirus Isolated from a Case of Acute Flaccid Paralysis in Brazil, 2015. *J Gen Virol* Jul;97(7):1545-50.

Caverly CS. Preliminary report of an epidemic of paralytic disease occurring in Vermont in the Summer of 1894. In: *Infantile Paralysis in Vermont, 1894-1922: A Memorial to Charles S Caverly, MD 15-20.* Brattleboro, Vermont: State Department of Public Health; 1924.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. International Notes Certification of Poliomyelitis Eradication—the Americas. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1994 Oct; 43(39):720-2.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Status of Global Laboratory Network for Poliomyelitis Eradication. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1997 Aug;46(30):692-4.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Apparent global interruption of wild poliovirus type 2 transmission. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2001 Mar;50(12):222-4. Erratum in: *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2001 Apr;50(13):249. (CDC, 2001a).

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Circulation of a type 2 vaccine-derived poliovirus--Egypt, 1982-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2001 Jan; 50(3):41-2, 51. (CDC, 2001b).

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus—Philippines, 2001. *JAMA* 2002;287:311.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Laboratory surveillance for wild and vaccine-derived polioviruses - worldwide, January 2008-June 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009 Sep;58(34):950-4.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Update on vaccine-derived polioviruses—worldwide, April 2011–June 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report.* 2012 Sep;61(37):741-6.

Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Poliomyelitis. In: Hamborsky J, Kroger A, Wolfe S (eds.). *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases.* 13 ed. Washington (DC): Public Health Foundation; 2015.

Cherkasova EA, Korotkova EA, Yakovenko ML, Ivanova OE, Eremeeva TP, Chumakov KM, et al. Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol.* 2002 Jul; 76(13):6791-9.

Cochi SL, Dowdle DW. *Disease eradication in the 21st century: implications for global health.* Cambridge: MIT Press Books; 2011.

Cochi SL, Strebel PM, Papania M, Bellini WJ, Orenstein WA. The next target after polio: Global eradication of measles. In: Knobler S, Lederberg J, Pray LA (eds.) *Forum on Emerging Infections: Considerations for Viral Disease Eradication: Lessons Learned and Future Strategies: Workshop Summary.* Washington (DC): National Academies Press (US); 2002.

Couderc T, Guinguene B, Horaud F, Aubert-Combiescu A, Crainic R. Molecular pathogenesis of type 2 poliovirus in mice. *Eur J Epidemiol.* 1989 Sep; 5(3):270–4.

Cuervo NS, Guillot S, Romanenkova N, Combiescu M, Aubert-Combiescu A, Seghier M, et al. Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J Virol.* 2001 Jul;75:5740-51.

da Costa, EV. Perfil Genômico dos Poliovírus de Origem Vacinal Isolados de Casos de Paralisias Flácidas Agudas, no Brasil, no Período Pós-Eliminação dos Poliovírus Selvagens na Região das Américas. Tese [Doutorado em Ciências]. Fundação Oswaldo Cruz, 2011.

da Silva EE, Azevedo JPR, Costa EV. Enteroviroses de Importância Médica. In: Coura JR (Org.). Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. v.2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. pp.1681-700.

Dahourou G, Guillot S, Le Gall O, Crainic R. Genetic recombination in wild-type poliovirus. *J Gen Virol*. 2002 Dec; 83(12):3103–10.

Dedepsidis E, Pliaka V, Kyriakopoulou Z, Brakoulias C, Levidiotou-Stefanou S, Pratti A, et al. Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008 Apr;52(3):343-51

Deshpande JM, Shetty SJ, Siddiqui ZA. Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. *Appl Environ Microbiol*. 2003 May; 69(5):2919-27.

de Silva R, Gunasena S, Ratnayake D, Wickremesinght GD, Kumarasiri CD, Pushpakumara BA, et al. Prevalence of prolonged and chronic poliovirus excretion among persons with primary immune deficiency disorders in Sri Lanka. *Vaccine* 2012 Dec;30(52):7561-5.

DeVries AS, Harper J, Murray A, Lexau C, Bahta L, Christensen J, et al. Vaccine-derived poliomyelitis 12 years after infection in Minnesota. *N Engl J Med* 2011 Jun;364:2316-23.

D'Errico MM, Barbadoro P, Bacelli S, Esposto E, Moroni V, Scaccia F, et al. Surveillance of acute flaccid paralysis in the Marches region (Italy): 1997–2007. *BMC Infect Dis*. 2008 Oct;8:135.

Diament AJ, Kok F. Poliomielite. In: Doenças Infecciosas e parasitárias. Veronesi R. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 1082 p.

Domok I. Experiences associated with the use of live poliovirus vaccine in Hungary, 1959-1982. *Rev Infect Dis* 1984;6(2):S413-8.



Dotzauer WR, Kraemer L. Innate and adaptive immune responses against picornaviruses and their counteractions: An overview. *World J Virol.* 2012 Jun 12;1(3):91-107.

Dowdle WR, Birmingham ME. The Biologic Principles of Poliovirus Eradication. *J Infect Dis.* 1997 Feb;175(1):S286-S92.

Dowdle WR, De Gourville E, Kew OM, Pallansch MA, Wood DJ. Polio eradication: the OPV paradox. *Rev Med Virol.* 2003 Sep-Oct;13(5):277-91.

Dragunsky EM, Ivanov AP, Wells VR, Ivshina AV, Rezapkin GV, Abe S, et al. Evaluation of immunogenicity and protective properties of inactivated poliovirus vaccines: a new surrogate method for predicting vaccine efficacy. *J Infect Dis.* 2004 Oct; 190(8):1404–12.

Duggal R, Wimmer E. Genetic recombination of poliovirus in vitro and in vivo: Temperature-dependent alteration of crossover sites. *Virology.* 1999 May;258(1):30–41.

Dulbecco R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1952 Aug; 38(8):747–52.

Dunn G, Klapsa D, Wilton T, Stone L, Minor PD, Martin J. Twenty-Eight Years of Poliovirus Replication in an Immunodeficient Individual: Impact on the Global Polio Eradication Initiative. *PLoS Pathog* 11(8): e1005114.

Durante ALTC, Dal Poz MR. Saúde global e responsabilidade sanitária brasileira: o caso da erradicação da poliomielite. *Saúde Debate* 2014;38(100):129-38.

Eggers HJ. Milestones in Early Poliomyelitis Research (1840 to 1949). *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4533-5.

El Bassioni L, Barakat I, Nasr E, de Gourville EM, Hovi T, Blomqvist S, et al. Prolonged detection of indigenous wild polioviruses in sewage from communities in Egypt. *Am. J. Epidemiol.* 2003;158:807-15.

Enders JF, Weller TH, Robbins FC. Cultivation of the Lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues. *Science* 1949 Jan;109(2822):85-7.

Estívariz CF, Molnár Z, Venczel L, Kapusinszky B, Zingesser JA, Lipskaya GY, et al. Paralytic poliomyelitis associated with Sabin monovalent and bivalent oral polio vaccines in Hungary. *Am J Epidemiol.* 2011 Aug;174:316–25.

Estívariz CF, Pallansch MA, Anand A, Wassilak SG, Sutter RW, Wenger Jd, et al. Poliovirus vaccination options for achieving eradication and securing the endgame. *Curr Opin Virol.* 2013 Jun;3(3):309-15.

Ferreira W, Sousa J. *Microbiologia.* V. 3. Lisboa: Lidel; 2002. 466 p.

Furione M, Guillot S, Otelea D, Balanant J, Candrea A, Crainic R. Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology.* 1993 Sep;196(1):199-208.

Garon JR, Cochi SL, Orenstein WA. The Challenge of Global Poliomyelitis Eradication. *Infect Dis Clin N Am.* 2015 Dec;29(4):651-65.

Gary HE, Sanders R, Pallansch MA. A theoretical framework for evaluating the sensitivity of surveillance for detecting wild poliovirus: factors affecting detection sensitivity in a population with circulating wild poliovirus. *J Infect Dis.* 1997 Feb; 175(1):S141–5.

Georgescu MM, Delpeyroux F, Crainic R. Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J Gen Virol.* 1995 Sep;76(9):2343-8.

Gelfand HM, LeBlanc DR, Fox JP, Conwell DP. Studies on the development of natural immunity to poliomyelitis in Louisiana -- II: description and analysis of episodes of infection observed in study households. *Am J Hyg* 1957;65:367-85.

Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics.* 2000 Jul;16(7):573–82.

Gitlin L, Andino R. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *J. Virol.* 2003;77:7159–65.

Global Polio Eradication Initiative – GPEI. Guidelines on Environmental Surveillance for Detection of Poliovirus. Working Draft. 2015. 45 p.

Global Polio Eradication Initiative – GPEI [homepage na internet]. Polio cases worldwide. [acesso em 12 mai 2016]. Disponível em: <<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek/Poliocasesworldwide.aspx>. (GPEI, 2016a).

Global Polio Eradication Initiative – GPEI [homepage na internet]. Independent Monitoring Board [acesso em 18 abr 2016]. Disponível em <http://www.polioeradication.org/Aboutus/Governance/IndependentMonitoringBoard.aspx> (GPEI, 2016b).

Global Polio Eradication Initiative – GPEI [homepage na internet]. Polio and Prevention. [acesso em 18 abr 2016]. Disponível em <http://www.polioeradication.org/polioandprevention.aspx> (GPEI, 2016c).

Global Polio Eradication Initiative – GPEI [homepage na internet]. Standard Operating Procedures: Responding a poliovirus event and outbreak. Part 2 – Protocol for poliovirus type 2 [acesso em 21 jun 2016]. Disponível em: <http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/PolioEradicators/1a.PolioOutbreakGuideline201604part2.pdf>. (2016d).

Gmyl AP, Belousov EV, Maslova SV, Khitrina EV, Chetverin AB, Agol VI. Nonreplicative RNA recombination in poliovirus. *J Virol*. 1999 Nov;73(11):8958-65.

Goldman N, Yang Z. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol Biol Evol*. 1994 Sep;11(5):725–36.

Gomes Jr, FS. Epidemia de poliomyelite infantil em Villa Americana. São Paulo: Serviço Sanitário do Estado/Oficinas Gráficas Olegário Ribeiro; 1919.

Goodfellow I, Chaudhry Y, Richardson A, Meredith J, Almond JW, et al. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol*. 2000 May; 74(10):4590–600.

Guillot S, Caro V, Cuervo N, Korotkova E, Combiescu M, Persu A, et al. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol*. 2000 Sep;74(18):8434-43.

Halstead LS, Rossi CD. New problems in old polio patients: results of a survey of 539 polio survivors. *Orthopedics*. 1985 Jul;8(7):845-50.

Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. NK cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol*. 2005 Feb;17(1):29-35.

Hamzat TK, Omotade TT. Acute flaccid paralysis: a five year review of cases managed by physiotherapy at the University College Hospital, Ibadan. *Afr J Health Sci*. 2006;13(1–2):28–32.

Herold J, Andino R. Poliovirus RNA Replication Requires Genome Circularization through a Protein–Protein Bridge. *Molecular Cell*. 2001 Mar;7(3):581-91.

Hewlett MJ, Rose JK, Baltimore D. 5'-Terminal structure of poliovirus polyribosomal RNA is pUp. *Proc Natl Acad Sci. USA*. 1976 Feb;73(2):327-30.

Hird TR, Grassly NC. Systematic review of mucosal immunity induced by oral and inactivated poliovirus vaccines against virus shedding following oral poliovirus challenge. *PLoS Pathog*. 2012;8(4):e1002599.

Hirst GK. Genetic recombination with Newcastle disease virus, polioviruses, and influenza. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1962;27:303–9.

Hogle JM, Chow M, Filman, DJ. The three dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science*. 1985 Sep;229(4720):1358-65.

Hovi T, Shulman LM, van der Avoort H, Deshpande J, Roivainen M, DE Gourville EM. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiol Infect*. 2012 Jan;140(1):1-13.

Hovi, T. Surveillance for polioviruses. *Biologicals*. 2006 Jun;34(2):123-6.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo 2010 [acesso em 10 jul 2016]. Disponível em: <http://censo2010.ibge.gov.br>.

International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV. Virus Taxonomy: 2015 Release. EC 47, London, UK, July 2015 [acesso em 18 jul 2016] Disponível em <http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>.

Jaykus LA. Epidemiology and detection as option for control of viral and parasitic foodborne disease. *Emerg Infect Dis*. 1997 Oct-Dec;3(4):529–39.

Jegouic S, Joffret M-L, Blanchard C, Riquet FB, Perret C, Pelletier I, et al. Recombination between poliovirus and co-circulating Coxsackie A viruses: role in the emergence of pathogenic vaccine-derived poliovirus. *Plos Path.* 2009 May;5(5):e1000412.

Jiang P, Faase JA, Toyoda H, Paul A, Wimmer E, Gorbalenya AE. Evidence for emergence of diverse polioviruses from C- cluster coxsackie A viruses and implications for global poliovirus eradication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 May 29;104(22):9457-62.

Johnson VH; Semler BL. Defined recombinants of poliovirus and coxsackievirus: sequence-specific deletions and functional substitutions in the 59-noncoding regions of viral RNAs. *Virology* 1988 Jan;162(1):47–57.

Jorba J, Campagnoli R, De L, Kew O. Calibration of multiple poliovirus molecular clocks covering an extended evolutionary range. *J Virol.* 2008 May; 82(9):4429-40.

Karakasiliotis I, Markoulatos P, Katsorchis T. Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes.* 2004 Apr;18(2):103-9.

Karp. A photomicrograph of the thoracic spinal cord depicting degenerative changes due to Polio Type III. Public Health Image Library (PHIL). 2005. Centers for Disease Control and Prevention. [acesso em 25 mai 2016] Disponível em: <http://phil.cdc.gov/phil/details.asp?pid=2760>.

Kew OM, De L, Yang C, Nottay B, da Silva EE, Pallansch MA. The role of virologic surveillance in the global initiative to eradicate poliomyelitis. In: Kurstak E (ed.). *Control of Virus Diseases*, 2 ed, New York: Dekker; 1993. pp. 215–46.

Kew O, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, Garib Z, et al. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 2002;296:356-9.

Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GY, Da Silva EE, Pallansch MA. Molecular Epidemiology of polioviruses. *Semin Virol* 1995 Dec;6(6):401-14.

Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* 2005 Oct; 59:587–635.

Kew OM, Sutter RW, Nottay BK, McDonough MJ, Prevots DR, Quick L, et al. Prolonged Replication of a Type 1 Vaccine-Derived Poliovirus in an Immunodeficient Patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998 Oct;36(10):2893-9.

King AM. Preferred sites of recombination in poliovirus RNA: An analysis of 40 intertypic cross-over sequences. *Nucleic Acids Res*. 1988 Dec;16(24):11705-23.

Kinnunen L, Pöyry T, Hovi T. Generation of virus genetic lineages during an outbreak of poliomyelitis. *J Gen Virol*. 1991 Oct;72(10):2483-9.

Kirkegaard K, Baltimore D. The mechanism of RNA recombination in poliovirus. *Cell*. 1986 Nov;47(3):433-43.

Kohara M, Abe S, Komatsu T, Tago K, Arita M, Nomoto A. A recombinant virus between the Sabin 1 and Sabin 3 vaccine strains of poliovirus as a possible candidate for a new type 3 poliovirus live vaccine strain. *J Virol*. 1988 Aug;62(8):2828-35.

Kohara M, Omata T, Kameda A, Semler BL, Itoh H, Wimmer E, Nomoto A. In vitro phenotypic markers of a poliovirus recombinant constructed from infectious cDNA clones of the neurovirulent Mahoney strain and the attenuated Sabin 1 strain. *J Virol*. 1985 Mar;53(3):786-92.

Kohler KA, Banerjee K, Hlady WG, Andrus JK, Sutter RW. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in India during 1999: decreased risk despite massive use of oral polio vaccine. *Bull World Health Organ*. 2002;80(3):210-6.

Kopel E, Kaliner E, Grotto I. Lessons from a public health emergency – importation of wild Poliovirus to Israel. *N. Engl. J. Med*. 2014 Sep;371(11):981-3.

Kyriakopoulou Z, Kottaridi C, Dedepsidis E, Bolanaki E, Levidiotou-Stefanou S, Markoulatos P. Molecular characterization of wild-type polioviruses isolated in Greece during the 1996 outbreak in Albania. *J Clin Microbiol* 2006 Mar;44(3):1150-2.

Laassri M, Lottenbach K, Belshe R, Wolff M, Rennels M, Plotkin S, et al. Effect of different vaccination schedules on excretion of oral poliovirus vaccine strains. *J. Infect. Dis*. 2005 Dec;192(12):2092-8.

La Monica N, Meriam C, Racaniello VR. Mapping of sequences required for mouse neurovirulence of poliovirus type 2 Lansing. *J Virol*. 1986 Feb; 57(2):515–25.

Ledinko N. Genetic recombination with poliovirus type 1. Studies of crosses between a normal horse serum-resistant mutant and several guanidine-resistant mutants of the same strain. *Virology*. 1963 May;20:107-19.

Levitt A, Diop OM, Tangermann RH, Paladin F, Kamgang JB, Burns CC, et al. Surveillance systems to track progress toward global polio eradication—worldwide, 2012–2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2014 Apr 25;63(16):356-61.

Liu HM, Zheng DP, Zhang LB, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA. Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant polioviruses in China. *J Virol*. 2003 Oct;77(20):10994-1005.

Liu HM, Zheng DP, Zhang LB, Oberste MS, Pallansch MA, Kew OM. Molecular evolution of a type 1 wild-vaccine poliovirus recombinant during widespread circulation in China. *J Virol*. Dec;74(23):11153-61.

Liu X, Wu C, Chen A. Codon usage bias and recombination events for neuraminidase and hemagglutinin genes in Chinese isolates of influenza A virus subtype H9N2. *Arch Virol*. 2010 May;155(5):685–93.

Lole KS, Bollinger RC, Paranjape RS, Gadkari D, Kulkarni SS, Novak NG, et al. Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol*. 1999 Jan;73(1):152-60.

Lu HH, Wimmer E. Poliovirus chimeras replicating under the translational control of genetic elements of hepatitis C virus reveal unusual properties of the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Feb;93(4):1412-7.

Lukashev AN, Lashkevich VA, Ivanova OE, Koroleva GA, Hinkkanen AE, Ilonen J. Recombination in circulating enteroviruses. *J Virol*. 2003 Oct;77(19):10423–31.

Lyons T, Murray KE, Roberts AW, Barton DJ. Poliovirus 5'-terminal cloverleaf RNA is required in cis for VPg uridylylation and the initiation of negative-strand RNA synthesis. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):10696-708.

Macadam AJ, Pollard SR, Ferguson G, Skuce R, Wood D, Almond JW, et al. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. *Virology* 1993 Jan;192(1):18–26.

Macadam AJ, Arnold C, Howlett J, John A, Marsden S, Taffs F, et al. Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology*. 1989 Oct;172(2):408-14.

MacLennan C, Dunn G, Huissoon AP, Kumararatne DS, Martin J, O'Leary P, et al. Failure to clear persistent vaccine-derived neurovirulent poliovirus infection in an immunodeficient man. *Lancet*. 2004 May;363(9420):1509-13.

Maier MK, Seth S, Czeloth N, Qiu Q, Ravens I, Kremmer E, et al. The adhesion receptor CD155 determines the magnitude of humoral immune responses against orally ingested antigens. *Eur J Immunol*. 2007 Aug;37(8):2214-25.

Malathi K, Dong B, Gale M Jr, Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature*. 2007 Aug 16;448(7155):816-9.

Martin D, Rybicki E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*. 2000 Jun;16(6):562-3.

Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*. 2015;1:vev003.

Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C. A modified BOOTSCAN algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2005 Jan; 21(1):98-102.

Martin J, Samoilovich E, Dunn G, Lackenby A, Feldman E, Heath A, et al. Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol*. 2002;76:10921-8.

Más Lago P, Ferrer H, Goyenechea Á, Galindo A, Sarmiento L, Fonseca M, et al. Casos de poliomiélitis parálítica asociada a la vacuna oral antipoliomiéltica en Cuba (1963-2006). *Rev Cuba Hig Epidemiol*. 2008 May-Sep;46(2):1-14.

Maynard SJ. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol*. 1992 Feb; 34(2):126-9.

Maynard FM, Headley JL. Manual acerca dos efeitos tardios da poliomiélite, para médicos e sobreviventes. Coleção Rumos e Perspectivas, v.1. Saint Louis: Gazette International Networking Institute; 2000.



McDermott BM. Poliovirus receptor recognition: Visualization, kinetics, and thermodynamics. Columbia. Tese [Doutorado em Ciências]. Columbia University, 2001.

Mendelsohn CL, Wimmer E, Racaniello VR. Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*. 1989 Mar 10;56(5):855-65.

Minor PD. Antigenic structure of picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1990;161:124–34.

Minor PD. The molecular biology of poliovaccines. *J Gen Virol*. 1992 Dec;73(12):3065-77.

Minor PD. Attenuation and reversion of the Sabin vaccine strains of poliovirus. *Dev Biol Stand*. 1993;78:17-26.

Minor PD. Polio eradication, cessation of vaccination and re-emergence of disease. *Nature Reviews Microbiology*. 2004 Jun;2:473-82.

Minor PD. Vaccine-derived poliovirus (VDPV): impact on poliomyelitis eradication. *Vaccine*. 2009 May 5;27(20):2649-52.

Minor PD. The polio endgame. *Hum Vaccin Immunother*. 2014 Oct;10(7):2106-8.

Minor PD, Dunn G. The effect of sequences in the 5' non-coding region on the replication of polioviruses in the human gut. *J Gen Virol*. 1988 May;69(5):1091–6.

Minor PD, Ferguson M, Evans DM, Almond JW, Icenogle JP. Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J Gen Virol*. 1986;67(Pt 7):1283–1291.

Modlin JF. Poliomyelitis and Poliovirus Immunization. In: Rotbart HA (ed.). *Human Enterovirus Infections*. Washington (DC): ASM Press; 1995. pp.195-220.

Moore M, Morens DM. Enteroviruses, including Polioviruses. In: Belshe RB (ed.) *Textbook of Human Virology* (2 ed.) St Louis: Mosby; 1991.

Moss WJ, Clements CJ, Halsey NA. Immunization of children at risk of infection with human immunodeficiency virus. *Bull World Health Organ.* 2003;81:61–70.

Mueller JE, Bessaud M, Huang QS, Martinez LC, Barril PA, Morel V, et al. Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Córdoba Province, Argentina. *Appl Environ Microbiol.* 2009 Mar;75(5):1395-401.

Nakano JH, Milford MH, Thieme ML, Nottay B. Parameters for differentiating vaccine derived and wild poliovirus strains. In: Melnick JL, editor. *Progress in Medical Virology.* New York: S. Karger; 1978. pp.178–206.

Nascimento DR. As campanhas de vacinação contra a poliomielite no Brasil (1960-1990). *Ciênc. saúde coletiva* 2011;16(2):501-11.

Nathanson N. The pathogenesis of poliomyelitis: what we don't know. *Adv Virus Res.* 2008;71:1–50.

Nathanson N, Kew OM. From Emergence to Eradication: The Epidemiology of Poliomyelitis Deconstructed. *Am J Epidemiol* 2010 Dec;172(11):1213-29. Offit PA (eds.) *Vaccines* (6 ed.) Edinburgh: Elsevier/Saunders; 2013. pp.573–97.

Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York: Oxford University Press; 2000. 333 p.

Nicholson R, Pelletier J, Le SY, Sonenberg N. Structural and functional analysis of the ribosome landing pad of poliovirus type 2: in vivo translation studies. *J. Virol.* Nov 1991;65(11):5886-94.

Nkowane BM, Wassilak SG, Orenstein WA, Bart KJ, Schonberger LB, Hinman AR, et al. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis: United States: 1973 through 1984. *JAMA.* 1987 Mar; 257:1335–40.

Nomoto A, Arita I. Eradication of Poliomyelitis. *Nature Immunology* 2002;3:205 – 208. Odoom JK, Yunus Z, Dunn G, Minor PD, Martín J. Changes in population dynamics during long-term evolution of sabin type 1 poliovirus in an immunodeficient patient. *J Virol.* 2008 Sep; 82(18):9179-90.

Odoom JK, Ntim NAS, Sarkodie B, Addo J, Minta-Asare K, Obodai E, et al. Evaluation of AFP surveillance indicators in polio-free Ghana, 2009-2013. *BMC Public Health* 2014 Jul 5;14:687.

Odoom JK, Yunus Z, Dunn G, Minor PD, Martín J. Changes in population dynamics during long-term evolution of sabin type 1 poliovirus in an immunodeficient patient. *J Virol*. 2008 Sep;82(18):9179-90.

Oliveira ASB, Quadros AAJ. Síndrome pós-poliomielite (SPP): orientações para profissionais de saúde. São Paulo: Secretaria Estadual de Saúde do Governo de São Paulo; 2008.126 p.

Oprisan G, Combiescu M, Guillot S, Caro V, Combiescu A, Delpyroux F, et al. Natural genetic recombination between co-circulating heterotypic enteroviruses. *J Gen Virol*. 2002 Sep;83(9):2193-200.

Orenstein WA, Garon JR. Low oral poliovirus vaccine immunogenicity in developing countries. *Lancet Infect Dis*. 2016 May. [Epub ahead of print].

Organização Mundial de Saúde – OMS. Archives of the smallpox eradication programme, a guide and inventory. Vol 2. Geneva: OMS; 1982.

Organização Mundial de Saúde – OMS. Resolução WHA41.28, de maio de 1988. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. 41<sup>a</sup> Assembleia Mundial de Saúde. Genebra: OMS; 1988.

Organização Mundial de Saúde – OMS. Manual for the Virological Investigation of Poliomyelitis. Genebra: OMS; 1990. 107 p.

Organização Mundial de Saúde – OMS. Guidelines for environmental surveillance of poliovirus circulation. Genebra: WHO Press; 2003. 28p.

Organização Mundial de Saúde – OMS. Polio laboratory manual. 4 ed. Genebra: WHO Press; 2004. 157 p.

Organização Mundial de Saúde – OMS. Polio – Global Eradication Programme-Strategic Plan 2010-2012. WHO/polio/10.1 Genebra: OMS; 2010.

Organização Mundial de Saúde – OMS [homepage da internet]. Polio Eradication & Endgame Strategic Plan 2013-2018. Acesso em 18 mai 2016. Disponível em [http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/StrategyWork/PEESP\\_EN\\_US.pdf](http://www.polioeradication.org/Portals/0/Document/Resources/StrategyWork/PEESP_EN_US.pdf). (2013a).

Organização Mundial de Saúde – OMS. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, November 2012—conclusions and recommendations. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013 Jan 4;88(1):1-16. (2013b).

Organização Mundial de Saúde – OMS. Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 11–12 December 2013. *Wkly Epidemiol Rec* 2014;7(89): 53–60. (OMS, 2014a).

Organização Mundial de Saúde – OMS. Detection of poliovirus in sewage, Brazil. [acesso 10 jul 2016]. Disponível em: [http://www.who.int/csr/don/2014\\_6\\_23polio/en/](http://www.who.int/csr/don/2014_6_23polio/en/). (OMS, 2014b).

Organização Mundial de Saúde – OMS [homepage da internet]. Rationale and timelines for OPV withdrawal [acesso em 21 jun 2016] Disponível em: [http://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/endgame\\_objective2/oral\\_polio\\_vaccine/planning/en/](http://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/endgame_objective2/oral_polio_vaccine/planning/en/). (OMS, 2016).

Orsini M, de Freitas MRG, Reis CHM, Mello M, Porto F, Vaz AC, et al. Guia de Reabilitação Neurológica na Síndrome Pós-Poliomielite: Abordagem Interdisciplinar. *Rev Neuroc*. 2010;18(2):204-213.

Oshiumi H, Okamoto M, Fujii K, Kawanishi T, Matsumoto M, Koike S, *et al*. The TLR3/TICAM-1 pathway is mandatory for innate immune responses to poliovirus infection. *J Immunol*. 2011 Nov 15;187(10):5320-7.

Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 1999 Dec; 265(2):218–25.

Pallansch M, Roos R. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses. In: Knipe DM, Howley P (eds). *Fields Virology* (5 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Pavlov DN, Van Zyl WB, Van Heerden J, Kruger M, Blignaut L, Grabow WO, *et al*. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in stools of immunodeficient children in South Africa. *J Appl Microbiol*. 2006 Dec;101(6):1367-79.

Paximadi E, Karakasiliotis I, Mamuris Z, Stathopoulos C, Krikelis V, Markoulatos P. Genomic analysis of recombinant sabin clinical isolates. *Virus Genes* 2006 Apr; 32(2):203–10.

Pearce JMS. Poliomyelitis (Heine-Medin disease). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:128.

Pereira JSO, Silva LR, Nunes AM, Oliveira SS, da Costa EV, da Silva EE. Environmental Surveillance of Polioviruses in Rio de Janeiro, Brazil, in Support to the Activities of Global Polio Eradication Initiative. *Food Environ Virol* 2016; 8:27–33.

Picornaviridae Homepage [homepage na internet]. Enterovirus [acesso em 02 mai 2016] Disponível em: <http://www.picornaviridae.com/enterovirus/enterovirus.htm>.

Platt LR, Estívariz CF, Sutter RW. Vaccine-Associated Paralytic Poliomyelitis: A Review of the Epidemiology and Estimation of the Global Burden. *J Infect Dis*. 2014 Nov;210(1):S380-9.

Pliaka V, Ruether IG, Kyriakopoulou Z, Kioussi P, Plakokefalos E, Megalou M, et al. A seroprevalence study of poliovirus antibody against a collection of recombinant and non-recombinant poliovirus vaccine strains in the population of southern Greece. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Nov;16(11):1672-5.

Posada D, Crandall KA. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc Natl Acad Sci*. 2001 Nov;98(24):13757–62.

Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*. 1981 Nov;214(4523):916-9.

Racaniello VR. Early events in poliovirus infection: virus-receptor interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Oct;93(21):11378-81.

Racaniello VR. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology*. 2006 Jan;344(1):9-16.

Racaniello, VR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley P (eds). *Fields Virology* (5 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.

Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:235–40.

Razafindratsimandresy R, Joffret L, Rabemanantsoa S, Andriamamonjy S, Heraud J, Delpeyroux F. Reemergence of Recombinant Vaccine-derived Polioviruses in Healthy Children, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2013 Jun;19(6):1008-10.

Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 1938;27(3):493–7.

Ren R, Racaniello V. Human poliovirus receptor gene expression and poliovirus tissue tropism in transgenic mice. *J. Virol.* 1992 Jan;66(1):296-304.

Ren RB, Moss EG, Racaniello VR. Identification of two determinants that attenuate vaccine-related type 2 poliovirus. *J Virol.* 1991 Mar;65(3):1377–82.

Rezapkin GV, Norwood LP, Taffs RE, Dragunsky EM, Levenbook IS, Chumakov KM. Microevolution of type 3 Sabin strain of poliovirus in cell cultures and its implications for oral poliovirus vaccine quality control. *Virology*. 1995 Aug;211(2):377-84.

Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, Kew OM. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology*. 1987 Oct;160(2):311–22.

Rieder E, Paul AV, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol.* 2000 Nov;74(22):10371–80.

Rieder E, Xiang W, Paul A, Wimmer E. Analysis of the cloverleaf element in a human rhinovirus type 14/poliovirus chimera: correlation of subdomain D structure, ternary protein complex formation and virus replication. *J Gen Virol.* 2003 Aug;84(8):2203-16.

Risi Jr JB. The control of poliomyelitis in Brazil. *Rev Infect Dis.* 1984;6(2):S400-3.

Romanova LI, Blinov VM, Tolskaya EA, Viktorova EG, Kolesnikova MS, Guseva EA, et al. The primary structure of crossover regions of intertypic poliovirus recombinants: a model of recombination between RNA genomes. *Virology*. 1986 Nov;155(1):202-13.

Rousset D, Rakoto-Andrianarivelo M, Razafindratsimandresy R, Randriamanalina B, Guillot S, Balanant J, et al. Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jul;9(7):885-7.

Rueckert RR. Picornaviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.). *Fields Virology* (3 ed.); Vol 1. Philadelphia: Raven Press; 1996. pp.609-654.

Sabin AB. Immunization of chimpanzees and human beings with avirulent strains of poliomyelitis virus. *Ann N Y Acad Sci*. 1955 Sep;61(4):1050-6.

Sabin AB. Oral, live poliovirus vaccine for elimination of poliomyelitis. *Arch Intern Med*. 1960 Jul;106:5-9.

Sabin AB, Olitsky PK. Cultivation of poliomyelitis virus in vitro in human embryonic nervous tissue. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1936;34:357-9.

Saleh MC, Van Rij RP, Andino R. RNA silencing in viral infections: insights from poliovirus. *Virus Res*. 2004 Jun;102(1):11-7.

Salk JE. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress. *J Am Med Assoc*. 1953 Mar; 151(13):1081-98.

Santti J, Hyypia T, Kinnunen L, Salminen M. Evidence of recombination among enteroviruses. *J Virol*. 1999;73:8741-9.

São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Divisão de Doenças de Transmissão Hídricas e Alimentares. Síndrome pós-poliomielite. Informe técnico institucional. *Rev Saúde Pública* 2006;40(5):941-5.

São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças. Vigilância Epidemiológica das Paralisias Flácidas Agudas/Manutenção da Erradicação da Poliomielite – importância, atividades, rotinas, fluxos operacionais, avaliação e pactuação. Documento Técnico. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2007.

Sartori AMC, França FOS. Estratégias de Controle da Poliomielite no Brasil [acesso em 20 mai 2016]. Disponível em [http://www2.uol.com.br/sciam/noticias/estrategias\\_de\\_controle\\_da\\_poliomielite\\_no\\_brasil.html](http://www2.uol.com.br/sciam/noticias/estrategias_de_controle_da_poliomielite_no_brasil.html).

Sattar SA, Wetwood JCN. Isolation of apparently wild strains of poliovirus type 1 from sewage in the Ottawa area. *CMA Journal* 1977 Jan; 116:25-7.

Savolainen-Kopra C, Samoilovich E, Kahelin H, Hiekka AK, Hovi T, Roivainen M. Comparison of poliovirus recombinants: accumulation of point mutations provides further advantages. *J Gen Virol*. 2009 Aug;90(8):1859-68.

Savolainen-Kopra C, Blomqvist S. Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev Med Virol*. 2010 Nov;20(6):358-71.

Schatzmayr HG, Filippis AMB de, Friedrich F, Leal MLF. Erradicação da poliomielite no Brasil: a contribuição da Fundação Oswaldo Cruz. *Hist. cienc. saude-Manguinhos* 2002 Jan-Abr;9(1):11-24.

Schonberger LB, McGowan JE, Gregg MB. Vaccine-associated poliomyelitis in the United States, 1961–1972. *Am J Epidemiol*. 1976 Aug;104(2):202-11.

Shahmahmoodi S, Mamishi S, Aghamohammadi A, Aghazadeh N, Tabatabaie H, Gooya MM, *et al*. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in immunodeficient children, Iran, 1995–2008. *Emerg Infect Dis*. 2010 Jul;16:1133–6.

Shahzad A. Time for a Worldwide Shift from Oral Polio Vaccine to Inactivated Polio Vaccine. *Clin Infect Dis*. 2009 Oct 15;49(8):1287-8.

Shrivastav A, Gupta N, Upadhyay P, Puliye J. Caution needed in using oral polio vaccine beyond the cold chain: Vaccine vial monitors may be unreliable at high temperatures. *Indian J Med Res*. 2012 Apr;135(4):520–2.

Shulman LM, Handsher R, Yang CF, Yang SJ, Manor J, Vonsover A, *et al*. Resolution of the pathways of poliovirus type 1 transmission during an outbreak. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar;38(3):945–52.

Shulman LM, Manor Y, Handsher R, Delpeyroux F, McDonough MJ, Halmut T, *et al*. Molecular and antigenic characterization of a highly evolved derivative of the type 2 oral poliovaccine strain isolated from sewage in Israel. *J Clin Microbiol*. 2000 Oct;38(10):3729-34.

Silverstein A, Silverstein V, Nunn LS. *Polio. Diseases and People*. Berkeley Heights: Enslow Publishers; 2001.



Simmonds P, Welch J. Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol.* 2006 Jan;80(1):483-93.

Singh K, Kaur G, Kumar R. Acute paralytic poliomyelitis: change in number over years impact of PPI: sentinel centre experience. *Indian J Community Med* 2004; 29(2):82–3.

Stanway G, Knowles NJ. Taxonomic proposal to the ICTV executive committee to merge two existing species, 2008 [acesso em 02 mai 2016] Disponível em <http://talk.ictvonline.org/media/p/233.aspx>.

Strebel PM, Ion-Nedelcu N, Baughman AL, Sutter RW, Cochi SL. Intramuscular injections within 30 days of immunization with oral poliovirus vaccine—a risk factor for vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *N Engl J Med.* 1995 Feb;332(8):500-6.

Summers DF, Maizel JV Jr. Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1968 Mar;59(3):966-71.

Sutter RW, Cáceres VM, Mas Lago P. The role of routine polio immunization in the post-certification era. *Bull World Health Organ.* 2004 Jan;82(1):31-9.

Sutter RW, John TJ, Jain H, Agarkhedkar S, Ramanan PV, Verma H, et al. Immunogenicity of bivalent types 1 and 3 oral poliovirus vaccine: a randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet.* 2010 Nov;376(9753):1682-8.

Sutter RW, Kew OM, Cochi SL, Aylward RB. Poliovirus vaccine—live. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines* (6 ed.) Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013. pp.598–645.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol.* 2013 Dec;30(12):2725–9.

Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Mol Biol Evol.* 1992 Jul;9(4):678–87.

Tang J, Yoshida H, Ding Z, Tao Z, Zhang J, Tian B, et al. Molecular epidemiology and recombination of human enteroviruses from AFP surveillance in Yunnan, China from 2006 to 2010. *Sci Rep.* 2014 Aug;4:6058.

Tao Z, Zhang Y, Liu Y, Xu A, Lin X, Yoshida H, *et al.* Isolation and Characterization of a type 2 vaccine- derived poliovirus from environmental surveillance in China, 2012. *Plos One*. 2013 Dec;8(12):e83975.

Tolskaya EA, Romanova LI, Blinov VM, Viktorova EG, Sinyakov AN, Kolesnikova MS, *et al.* Studies on the recombination between RNA genomes of poliovirus: the primary structure and nonrandom distribution of crossover regions in the genomes of intertypic poliovirus recombinants. *Virology*. 1987 Nov;161(1):54-61.

Trojan DA, Cashman NR, Shapiro S, Tansey CM, Esdaile JM. Predictive factors for postpoliomyelitis syndrome. *Arch Phys Med Rehabil*. 1994 Jul;75(7):770-7.

UNICEF. UNICEF's engagement in the Global Polio Eradication Initiative [acesso em 12 mai 2016]. Disponível em [http://www.unicef.org/partners/files/Partnership\\_profile\\_2012\\_Polio\\_revised.pdf](http://www.unicef.org/partners/files/Partnership_profile_2012_Polio_revised.pdf).

United States Environmental Protection Agency (US EPA). Environmental Regulations and Technology. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. EPA/525/R-092/013. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency; 2003.

van der Marel TG, Hazendonk MA, Henneke AL, van Wezel. Induction of neutralizing antibodies by poliovirus capsid polypeptides VP1, VP2, and VP3. *Vaccine*. 1983 Dec;1(1):17-22.

Vidor E, Stanley A. Poliovirus vaccine-inactivated. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA (eds.) *Vaccines* (6 ed.) Edinburgh: Elsevier/Saunders; 2013. pp.573–97.

von Magnus H, Petersen I. Vaccination with inactivated poliovirus vaccine and oral poliovirus vaccine in Denmark. *Rev Infect Dis* 1984;6(2):S471-4.

Wang C, Jiang P, Sand C, Paul AV, Wimmer E. Alanine Scanning of Poliovirus 2C<sup>ATPase</sup> Reveals New Genetic Evidence that Capsid Protein/2C<sup>ATPase</sup> Interactions Are Essential for Morphogenesis. *J Virol*. Sep 2012;86(18):9964-75.

Ward CD, Flanagan JB. Determination of the poliovirus RNA polymerase error frequency at eight sites in the viral genome. *J Virol*. 1992 Jun; 66(6):3784-93.

Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro. *J Virol*. 1988 Feb; 62(2):558-62.

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 2001;411:834–42.

Watson JD, Hopkins NH, Roberts JW, Steitz JA, Weiner AM. RNA viruses. In: *Molecular Biology of the Gene* (4 ed.). New York: Cummings Publishing Company; 1987. pp. 910-915.

Wattigney WA, Mootrey GT, Braun MM, Chen RT. Surveillance for poliovirus vaccine adverse events, 1991 to 1998: Impact of a sequential vaccination schedule of inactivated poliovirus vaccine followed by oral poliovirus vaccine. *Pediatrics*. 2001 May;107(5):E83.

Wenner HA, Kamitsuka P. Primary sites of virus multiplication following intramuscular inoculation of poliomyelitis virus in cynomolgous monkeys. *Virology*. 1957 Jun;3(3):429-43.

Werner D. *Disabled Village Children. A guide for community health workers, rehabilitation workers, and families.* Palo Alto, CA: Hesperian Foundation, 1999. 676 p.

Westrop GD, Wareham KA, Evans DMA, Dunn G, Minor PD, Magrath DI, *et al.* Genetic basis of attenuation of the Sabin Type 3 Oral Poliovirus Vaccine. *J Virol*. 1989 Mar;63(3):1338-44.

Williams G. *Paralysed with Fear: The Story of Polio.* New York: Palgrave Macmillan, 2013. 354p.

Wimmer E, Hellen CU, Cao X. Genetics of poliovirus. *Annu Rev Genet*. 1993;27:353-436.

Wyatt, HV. The 1916 New York City Epidemic of Poliomyelitis: Where did the Virus Come From? *The Open Vaccine Journal*. 2011;4:13-7.

Yakovenko ML, Cherkasova EA, Rezapkin GV, Ivanova OE, Ivanov AP, Ereemeeva TP, *et al.* Antigenic Evolution of Vaccine-Derived Polioviruses: Changes in Individual Epitopes and Relative Stability of the Overall Immunological Properties. *J Virol*. 2006 Mar; 80(6): 2641–53.

Yang CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba J, Ahmed N, *et al.* Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol.* 2003 Aug;77(15):8366-77.

Yoshida H, Horie H, Matsuura K, Kitamura T, Hashizume S, Miyamura T. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in the environment. *J Gen Virol.* 2002 May; 83(5):1107–11.

Zhang Y, Zhu S, Yan D, Liu G, Bai R, Wang D, *et al.* Natural type 3/type 2 intertypic vaccine-related poliovirus recombinants with the first crossover sites within the VP1 capsid coding region. *PLoS One.* 2010;5:e15300.

## 9 APÊNDICES E/OU ANEXOS

### 9.1 Artigo 1

#### **Molecular and Phenotypic Characterization of a Highly Evolved Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus Isolated from Seawater in Brazil, 2014.**

Casemiro KM, Burlandy FM, Barbosa MR, Chen Q, Jorba J, Hachich EM, Sato MI, Burns CC, da Silva EE.

PLoS One. 2016 Mar 28;11(3):e0152251. doi: 10.1371/journal.pone.0152251.

RESEARCH ARTICLE

# Molecular and Phenotypic Characterization of a Highly Evolved Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus Isolated from Seawater in Brazil, 2014

Klécia Marília S. de Melo Casseiro<sup>1</sup>, Fernanda M. Burlandy<sup>1</sup>, Mikaela R. F. Barbosa<sup>2</sup>, Qi Chen<sup>3</sup>, Jaime Jorba<sup>3</sup>, Elayse M. Hachich<sup>2</sup>, Maria I. Z. Sato<sup>2</sup>, Cara C. Burns<sup>3</sup>, Edson E. da Silva<sup>1\*</sup>

**1** Enterovirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Environmental Analysis Department, Environmental Company of São Paulo State, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Division of Viral Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, United States of America

\* [edson@ioc.fiocruz.br](mailto:edson@ioc.fiocruz.br)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Casseiro KMSdM, Burlandy FM, Barbosa MRF, Chen Q, Jorba J, Hachich EM, et al. (2016) Molecular and Phenotypic Characterization of a Highly Evolved Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus Isolated from Seawater in Brazil, 2014. PLoS ONE 11 (3): e0152251. doi:10.1371/journal.pone.0152251

**Editor:** Juan C. de la Torre, The Scripps Research Institute, UNITED STATES

**Received:** January 23, 2016

**Accepted:** March 11, 2016

**Published:** March 28, 2016

**Copyright:** This is an open access article, free of all copyright, and may be freely reproduced, distributed, transmitted, modified, built upon, or otherwise used by anyone for any lawful purpose. The work is made available under the [Creative Commons CC0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) public domain dedication.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** KMSMC was supported by the "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (URL: <http://cnpq.br/>). The study was supported by the "Fundação Oswaldo Cruz" (URL: <http://fiocruz.br/>) and CNPq. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

A type 2 vaccine-derived poliovirus (VDPV), differing from the Sabin 2 strain at 8.6% (78/903) of VP1 nucleotide positions, was isolated from seawater collected from a seaport in São Paulo State, Brazil. The P1/capsid region is related to the Sabin 2 strain, but sequences within the 5'-untranslated region and downstream of the P1 region were derived from recombination with other members of Human Enterovirus Species C (HEV-C). The two known attenuating mutations had reverted to wild-type (A481G in the 5'-UTR and Ile143Thr in VP1). The VDPV isolate had lost the temperature sensitive phenotype and had accumulated amino acid substitutions in neutralizing antigenic (NAg) sites 3a and 3b. The date of the initiating OPV dose, estimated from the number of synonymous substitutions in the capsid region, was approximately 8.5 years before seawater sampling, a finding consistent with a long time of virus replication and possible transmission among several individuals. Although no closely related type 2 VDPVs were detected in Brazil or elsewhere, this VDPV was found in an area with a mobile population, where conditions may favor both viral infection and spread. Environmental surveillance serves as an important tool for sensitive and early detection of circulating poliovirus in the final stages of global polio eradication.

## Introduction

The oral poliovirus vaccine (OPV), developed by Albert Sabin, has been effectively used for years in the control of poliomyelitis and elimination of wild polioviruses (WPV). Through its extensive use in mass vaccination campaigns, as part of the World Health Organization's (WHO) Global Polio Eradication Initiative (GPEI), it was possible to reduce the annual global incidence of polio from hundreds of thousands of cases to less than 70 in 2015, and now the

WPV circulation is restricted to only two countries, Afghanistan and Pakistan (<http://www.polioeradication.org/Dataandmonitoring/Poliothisweek.aspx>).

Although OPV presents many advantages (easy administration, low cost, effective intestinal immunity and durable humoral immunity), Sabin strains are inherently genetically unstable [1, 2]. Due to the plasticity and rapid evolution of poliovirus genomes during replication in human gut, the strains evolve by reversion of known attenuating mutations and recombination with other members of Human Enterovirus C Species (HEV-C), leading to phenotypic changes and an increase in neurovirulence [3–6]. As a consequence of the genetic instability of OPV strains, vaccine-derived polioviruses (VDPV) have emerged on occasion in immunodeficient patients or under conditions of low population immunity, low vaccine coverage, poor sanitation and tropical conditions [7–9].

VDPVs are vaccine-related isolates whose genetic divergence from the parental OPV strains indicates prolonged replication or circulation [10,11]. Gaps in vaccination coverage may allow for circulation and antigenic drift of OPV strains. Type 1 and type 3 isolates that are >1.0% divergent and type 2 isolates that are >0.6% divergent in VP1 sequences from the corresponding Sabin strain are classified as VDPVs [12]. Ultimately, VDPV are particularly important for GPEI strategies, since the divergent strains regained the ability to cause paralytic polio in humans and the potential for sustained circulation, similar to wild-type virus, with a direct impact on polio eradication [1,10].

VDPVs are categorized as: 1) Circulating VDPVs (cVDPV), related to person-to-person transmission, 2) Immunodeficiency-associated VDPVs (iPVDPV), isolated from individuals with primary immunodeficiency, and 3) Ambiguous VDPVs (aVDPV), which are isolates that cannot be classified definitively because they have no known source [10,12]. In recent years, 24 cVDPV outbreaks were identified in 21 countries, resulting in more than 750 cases of paralytic poliomyelitis [13].

Brazil has a decades-long record of elimination of WPV transmission, and no report of wild-type paralytic poliomyelitis since 1989 [14]. In January 2014, a highly evolved type 2 VDPV was isolated from seawater, during environmental surveillance in São Sebastião Seaport, located on the north coast of São Paulo State, in the Southeast of the country. This seaport is Brazil's biggest port for liquid bulks, handling 26% of all of Brazil's liquid cargos and counting with a high flow of vessels and people from all over the world. No VDPV had been reported from the environment or clinical samples in the Brazilian territory before or after this event, and no paralytic cases were linked to this isolate. The origin of the virus and the shedding individual are unknown, and calculations indicate that the original Sabin dose was given more than 8 years ago. In this report, we describe the genome characterization, phenotypic features and phylogenetic analysis of this highly divergent virus, and emphasize the need for sustained environmental surveillance, even in countries with a long period of interruption of indigenous transmission of WPV.

## Material and Methods

### Virus Isolation

L20B (NIBSC Accession No. 081102), RD (NIBSC Accession No. 081003) and HEp-2 (NIBSC Accession No. 740502) cell lines were provided by the WHO Global Polio Laboratory Network (GPLN) and used for virus isolation. The Oral Poliovaccine Sabin Type 2 reference strain (NIBSC code 01/530) was also provided by WHO.

The Environmental Company of the São Paulo State (CETESB) is the state government agency responsible for diagnosis and monitoring of environmental quality at São Paulo State, Brazil. CETESB works in the field of Environmental Virology for about 40 years and since

1999 develops a Surveillance Program for Enterovirus in collaboration with the Center of Epidemiological Surveillance of São Paulo State. The surveillance is based on bi-weekly routine examination of sewage samples from potential points of foreign people such as international airport and seaports, and from wastewater treatment plants. All poliovirus isolated are referred to the Enterovirus Laboratory at Oswaldo Cruz Foundation in Rio de Janeiro, Brazil (WHO Regional Reference Laboratory) for further characterization.

Among its activities, CETESB conducts environmental poliovirus surveillance through routine sampling and laboratory analysis of seawater from the pier in São Sebastião seaport at São Paulo State cost. No specific permissions are required for developing these activities at this location. This field study did not involve endangered or protected species.

Sampling (Moore swab), concentration (organic flocculation) and processing (chloroform clarification) of samples were performed as described in Sattar & Westwood [15] and USEPA [16]. Poliovirus was isolated according to the WHO alternative test algorithm [17] and submitted to intratypic differentiation using WHO guidelines for Polio laboratories [18].

Individual isolates had been named according to the following convention: PV (poliovirus) followed by the number denoting the type/isolate number/3-letter country followed by the year of isolation (e.g. PV2/44624/BRA2014). For use in this report, the type 2 VDPV isolate name has been shortened to 44624.

### Primary characterization of isolate 44624

The sequences for all primers used in this study are described in [S1 Table](#). Initial virus characterization (intratypic differentiation) was performed using real-time reverse transcription–polymerase chain reaction (rRT-PCR) nucleic acid amplification, provided by the Centers of Disease Control and Prevention–CDC, according to GPLN guidelines [12]. The VDPV screening assay is targeted to nucleotide substitutions that typically revert to the parental WPV sequence during replication of OPV in the human intestine [19]. Viral RNA was extracted from an aliquot of 140µL of L20B cell culture supernatant, using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and stored at -80°C for further use. Two different reactions of One-Step Real-time PCR were successively performed in a ABI 7500 Real Time machine (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA): a Real-time ITD Test, using six set of primers, namely: Pan-Enterovirus, Pan-Poliovirus, Serotype 1, Serotype 2, Serotype 3, and Sabin Multiplex (1, 2 and 3); and a Real-time VDPV Screening Assay, targeting regions in Sabin 1, 2 and 3 known to be involved in reversion to a neurovirulent phenotype. For all Real-Time PCR reactions, the Ct value cutoff for positive reactions was cycle 30.

Candidate VDPVs identified by rRT-PCR screening were sequenced in the VP1 gene (903 nt) for definitive analysis [17,18]. cDNA was prepared from 10 µL of stock viral RNA using 1µL of Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), primed by S2 7439R\_Sal (described in [S1 Table](#)), and performed at 42°C for 50 minutes, followed by 15 minutes of enzyme inactivation at 70°C. The RNA in the RNA-DNA dimer was specifically degraded by the action of 1µL of Ribonuclease H (Promega, Madison, WI, USA) at 37°C for 30 minutes. The VP1 coding region was amplified and sequenced using the primers Y7/Q8 [20]. The PCR product was purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and cycle sequencing reactions were carried out using BigDye terminator chemistry version 3.0 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) on an ABI 3130XL instrument.

### Cross-reactivity using polyclonal antibodies

In order to determine the antigenic characteristics of isolate 44624, a micro neutralization test was performed according to WHO recommendations [21], using serotype-specific PV1, PV2



and PV3 polyclonal antibodies and RD cells. Briefly, two-fold dilutions of polyclonal serum specific for each serotype (WHO/EPI/POLIO) (from 1:2 to 2048) in Eagle-Earle medium were incubated with 100 TCID<sub>50</sub> of each poliovirus serotype at 37°C for 1 h. One hundred microliters of Eagle-Earle medium with 2% Fetal Calf Serum, containing 20000 RD cells, were added to the neutralizing mixture (100 ml). Plates were incubated at 37°C for 7 days, and examined for the appearance of CPE with an inverted microscope. Neutralizing antibody titers were calculated by the Karber formula, and expressed as the highest serum dilution neutralizing 50% of the infected cultures.

## Full-length genome amplification

The complete genome of VDPV2 44624 was sequenced for high-resolution analysis. Two long-distance PCR reactions were performed by using the Expand Long Template PCR System (Roche). The two sets of sense/antisense primer pairs 001F\_Hind/Q8 and Y7/S2 7439R\_Sal were used to amplify two overlapping fragments of 3.57 kb and 5.28 kb, respectively. The PCR mixture for each reaction consisted of 3  $\mu$ L of cDNA, 300nM sense primer, 300nM antisense primer, 350 $\mu$ M dNTP's, 5 $\mu$ L 10x PCR buffer 3 with MgCl<sub>2</sub>, 0,75 $\mu$ L Expand Long Template enzyme mix and DNase/RNase-free water into a 50 $\mu$ L final volume. The cycling parameters for the 3.57kb fragment were 94°C for 2min, 10 cycles of 94°C for 15s, 50°C for 30s and 68°C for 3:30min, followed by 25 cycles of 94°C for 15s, 58°C for 30s and 68°C for 3min30s, with a final extension at 68°C for 10min. For the 5.28kb fragment, the same reaction parameters were used, except for extension periods of 4 minutes and 30 seconds.

The two fragments were purified using QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Cycle sequencing reactions were carried out using BigDye terminator chemistry version 3.0 (Applied Biosystems, CA, USA), using the primers described in [S1 Table](#). Sequencing was bi-directional, and every nucleotide position was sequenced at least once from each strand. The 3'-end segment sequences were determined by using the 3' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Life Technologies, USA). Isolate 44624 was also referred to the Centers for Disease Control and Prevention (Atlanta, USA).

The nucleotide and amino acid sequences of isolate 44624 were aligned with the Sabin 2 reference strain (GenBank accession number AY184220) using ClustalW, and molecular evolutionary analyses were performed using MEGA program v6.0 [22]. After analysis of mutational sites, for visualization of the observed amino acid substitutions, the amino acid positions were placed in the 3-dimensional structure model of poliovirus capsid protomer, based on x-ray crystallographic analysis of type 2 poliovirus strain Lansing (PDB ID: 1EAH) [23] using the software Swiss-PdbViewer [24]. The GenBank accession number of isolate 44624 complete genome sequence is KU372652.

## Time of divergence of the isolate 44624 from the original Sabin 2 strain

The time interval between the date of OPV administration and the data of sampling of the VDPV2 44624 was estimated from the nucleotide divergence between the P1/capsid and VP1 sequences of the virus 44624 and Sabin 2 reference strain (GenBank accession number AY184220). The other parts of the genome (containing potential recombination regions) were not included in this analysis. Maximum-likelihood estimates of synonymous substitutions per synonymous sites ( $K_s$ ) and nonsynonymous substitutions per nonsynonymous sites ( $K_a$ ) were obtained following a modified version of Goldman-Yang codon model of evolution [25] as implemented in MBEToolbox [26]. Total number of substitutions per site ( $K_t$ ) was estimated using the T92 model of nucleotide evolution implemented in MBEToolbox [27].

## Recombination events

The aligned full-length genome sequences of isolate 44624 and members of Human Enterovirus C Species (GenBank accession numbers for reference strains Sabin 1 (AY184219), Sabin 2 (AY184220), Sabin 3 (AY184221), Coxsackie virus 1 (CVA1) (AF499635), CVA11 (AF499636), CVA13 (AF465511), CVA17 (AF499639), CVA19 (AF499641), CVA20 (AF499642), CVA21 (AF465515 and D00538), CVA24 (EF026081), Enterovirus C96 (HQ415759), Enterovirus C99 (KJ857508), Enterovirus 104 (JX982259) and Enterovirus C109 (GQ865517)) were subjected to recombination analysis. The RDP4 algorithm package was used to detect homologous recombination events [28] using the default parameters for the methods GENECOV [29], Bootscan [30], Chimaera [31], MaxChi [32], SiScan [33], 3Seq [34] and RDP [35]. As selection criteria for statistical analysis, a putative recombination event was referred to subsequent analysis only when it was consistently identified by at least three of these seven RDP algorithms [36]. The P-value cutoff was chosen as 0.05 and the best signals for recombination are associated with the lowest P-values, which indicates the approximate likelihood for the occurrence of exchange of sequences between genomes (recombination) rather than the probability of convergent evolution of the sequences.

## Phylogenetic analysis

For analysis of divergence and evolution of Brazilian isolate 44624, a phylogenetic tree was constructed for complete VP1 sequences (903nt), using Mega software package, version 6.0 [22]. The 44624 VP1 sequence was aligned to VP1 sequences of Sabin 2 (GenBank accession number AY184220) and a set of divergent type 2 VDPVs identified between 1998–2015, in China (GenBank accession numbers KJ419273-KJ419277, AY948201, HM107832–HM107835) [37–39], Egypt (GenBank accession numbers AF448782 and AF448783) [40], Madagascar (GenBank accession numbers HF913426–HF913428, AM084223, AM084225) [41, 42], Nigeria (GenBank accession numbers JX274980, JX275085, JX274985, JX275162, JX275380, DQ890388) [43, 44], Israel (GenBank accession numbers AJ288062, AM040035–39, AM056049–50, AM158275–6, AM292219–21) [45], Slovakia (GenBank accession numbers JX913541–JX913553, JX913635–913647) [46] and Estonia (GenBank accession numbers KC784367–KC784371) [47].

The evolutionary history was inferred using the Maximum Likelihood Method based on the Kimura-2 parameters [48], the best-fit substitution model indicated by Mega6 software [22] for this dataset. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

## Temperature Sensitivity

Reproductive capacity at different temperatures (RCT marker) of isolate 44624 was evaluated on monolayers of RD cells in 6-well plates by an RCT test, in comparison to the Sabin 2 reference strain. A total of  $6.5 \times 10^5$  cells were seeded per well, and after attachment, 200  $\mu$ L of virus stocks were inoculated and incubated separately at 36.5°C or 40°C for virus absorption for 1 hour, after which the cells were washed, and 3ml of maintenance medium were added per well, followed by incubation at 36.5°C or 40°C, separately. After 8, 24 and 48 h, the cells were harvested, and the TCID50s were calculated in 96-well plates. More than 2 logarithms reduction of the titers at different temperatures was considered to be temperature sensitive [49, 50]. In order to minimize experimental error, the assay was conducted three times.

## One-step growth curve

One-step growth curve experiments were performed in RD cells at 36.5°C and 40°C, with a multiplicity of infection of 10 as determined by TCID50 infectivity titration of virus stocks on

RD cells. The used protocol was previously described in [51]. Briefly,  $2 \times 10^4$  RD cells were added into each well of fourteen 96-well culture plates. After attachment, isolate 44624 and Sabin 2 reference strains were inoculated into three replica wells of 96-well cell culture plates. The plates were incubated at 37°C for 2 hours, and the cells were washed twice with 300  $\mu$ L of Eagle-Earle medium to remove unbound virus. Then, 100  $\mu$ L of Eagle-Earle was added per well and plates were incubated at 36.5°C or 40°C for 0, 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours. The plates were subjected to three consecutive freeze-thaw cycles and the viral titers were determined by the TCID<sub>50</sub> assay on RD cells at 36.5°C for each time point. In order to guarantee reproducible results, the titration was repeated three independent times for each tested condition.

## Results

### Preliminary Characterization of the Isolate

The virus 44624 was isolated from seawater collected in São Sebastião Seaport, São Paulo, in January 2014. Diagnostic rRT-PCR proved that it is a type 2 VDPV. Compared to Sabin 2 original strain, the isolate 44624 showed 8.6% nucleotide divergence (78/903 nt) in VP1. Among the 9 amino acid changes found, the substitution Ile143Thr, located inside the VP1 DE-loop, is a common substitution in VDPV2 isolates [1, 45, 52], and characterizes the loss of a known major signature of Sabin 2 attenuation [1]. No recombination event was found in the VP1 region.

### Complete sequence of isolate 44624

The full-length genome of isolate 44624 contains 7439 nucleotides plus the polyA tail, with an open reading frame (ORF) of 2207 amino acids. In a comparative analysis with available GenBank sequences, the closest relative in the capsid region appeared to be Sabin 2 strain, although the genetic and amino acid divergences between strains were noteworthy (Table 1). Although the P1 region/capsid is colinear with that of Sabin 2, regions of the 5'-UTR, P2, P3 and 3'-UTR contain sequences derived from other HEV-C Enterovirus.

The 5'-UTR region of 44624 and Sabin 2 have the same size (747 nt.), but differ greatly from each other in the hyper variable region of the 5'-UTR (approximately the last 100nt. before the initiation codon) due to a large number of nucleotide substitutions, insertions and deletions. Position 481 in the 5'-UTR, another major determinant of the attenuated phenotype of Sabin 2, had reverted from A in the Sabin 2 to G found in WPV strains. This transition is frequently observed in VDPV-associated paralytic poliomyelitis cases and is correlated with neurovirulence and efficiency of genomic translation [1, 53].

The P1 capsid region contains a total of 188 nt. substitutions, and 14 predicted amino acid substitutions. The mutational pattern of the capsid was characterized by a preponderance of synonymous substitutions (92.02%) over nonsynonymous mutations (7.98%). Nonsynonymous mutations identified in the capsid protomer are shown in Fig 1, while the reconstruction of a capsid pentamer (intern and extern view) of isolate 44624 is available in S1 Fig.

Only synonymous mutations were found in VP4. VP2 accounts for 2 nonsynonymous mutations, Thr45Ser and Lys152Arg, the former representing a reversion to the amino acid residues found in both MEF-1 (GenBank accession number AY238473), a laboratory reference wild-type PV2 strain, and Lansing (GenBank accession number M12197), a wild-type PV2 strain associated with fatal paralytic disease in mice after intracerebral inoculation [54–56].

VP3 coding region has three nonsynonymous mutations (Ser73Asn; Thr75Ala; Ile103Val). The substitutions in amino acids 73 and 75 of VP3 are located in NA<sub>g</sub> 3a and 3b of PV serotype 2, respectively (Fig 2). Another modification in the NA<sub>g</sub> region was found in VP1 coding region, also in NA<sub>g</sub>3a (Thr291Ala). VP1 coding region of isolate 44624 contains other 7

**Table 1. Analysis of nucleotide differences between the genome of isolate 44624 and Sabin 2.**

Genome region	Nucleotides			Amino acids			Relevant mutations
	Length*	Number of nt. substitutions	% Identity	Length**	Number of aa. substitutions#	% Identity	
5'-UTR	747	128	82.86	NA	NA	NA	5'-UTR hyper variable region; A481G
P1 region	2637	192	92.72	879	14	98.41	
VP4	207	13	93.71	69	0	100	
VP2	813	46	94.34	271	2	99.26	Thr45Ser; Lys152Arg
VP3	714	52	92.71	238	3	98.74	Ser73Asn; Thr75Ala
VP1	903	81	91.03	301	9	99	Ile143Thr; Thr291Ala
P2 region	1725	153	91.13	575	15	97.39	
2A	447	36	91.94	149	4	97.31	
2B	291	57	80.41	97	4	95.88	
2C	987	60	93.92	329	7	97.87	"cre element"
P3 region	2259	175	92.25	753	14	98.14	
3A	261	47	81.99	87	4	95.40	
3B	66	11	83.33	22	1	95.45	
3C	366	45	87.70	122	2	98.36	
3D	1557	72	95.37	519	7	98.66	
3'-UTR	71	2	97.18	NA	NA	NA	
Entire genome	7439	650	91.26	2207	43	98.05	

\*The figures are for isolate 44624.

\*\*The ORF length was identical for both strains.

NA, not applies.

doi:10.1371/journal.pone.0152251.t001

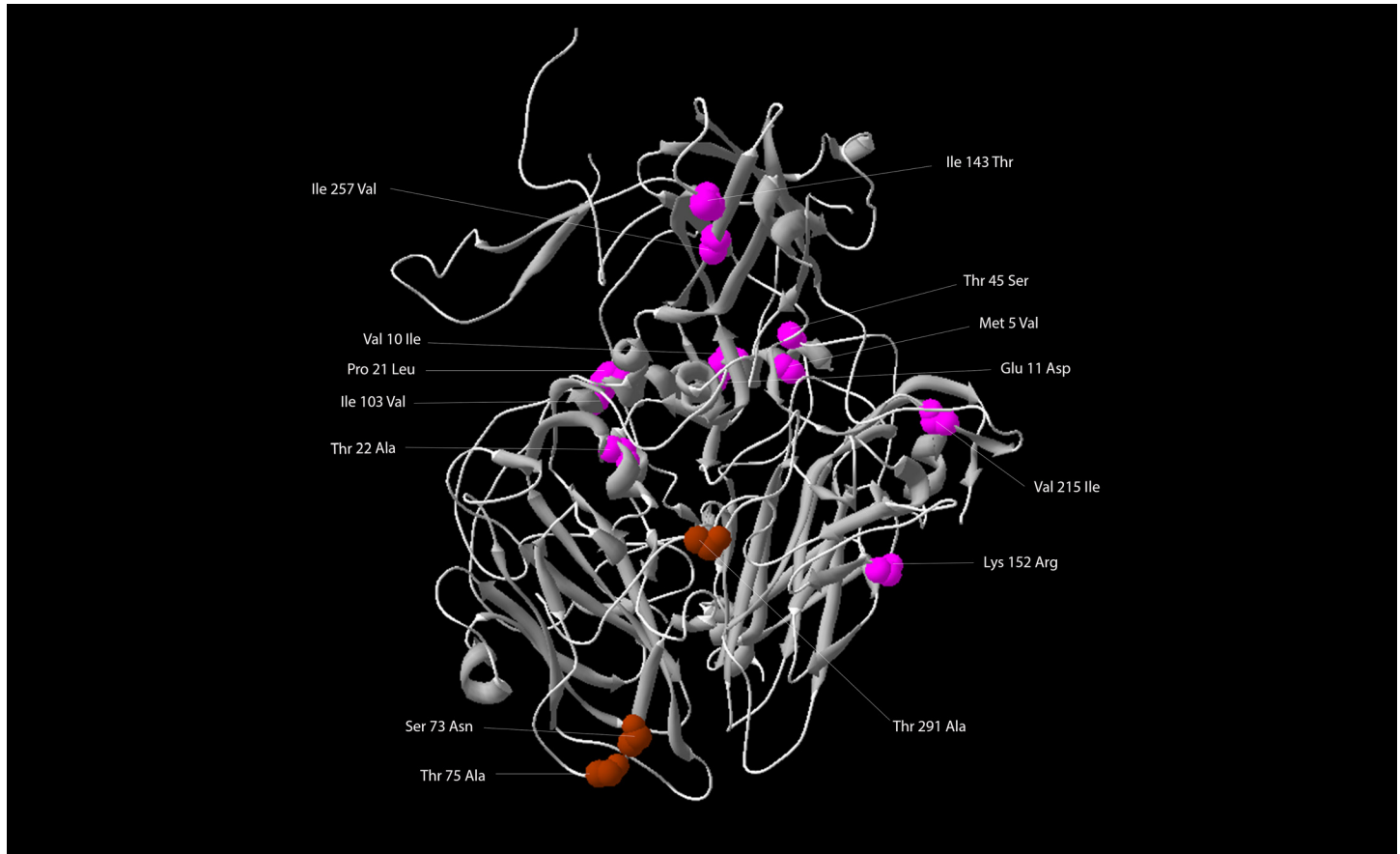
nonsynonymous substitutions (Met5Val; Val10Ile; Glu11Asp; Pro9Leu; Thr10Ala; Val215Ile; Ile257Val). In spite of amino acid substitutions inside and near NAg sites, micro neutralization assay with polyclonal PV1-, PV2- and PV3-specific antisera showed that isolate 44624 was completely neutralized by polyclonal PV2-specific antisera, and had no cross-neutralization with PV1- and PV3-specific antisera.

The cis-acting replication element (*cre* element, nt. 4443–4503) in the 2C coding region contained 9 substitutions in comparison with the Sabin 2 reference sequence. Importantly, the Sabin 2 conserved AAACA motif, placed inside the loop of the *cre* structure, was substituted by an AAGCA motif in the isolate 44624. The AAGCA motif is found in the type 2 WPV *cre* element [57, 58].

### Analyses of putative recombination events

The complete genome of isolate 44624 and other polio and non-polio HEV-C species were analyzed by using the algorithms available in the RDP package software in search for putative recombination break points. We were able to find five statistically significant (P-value < 0.05) putative recombination events between 44624 genome and other Enterovirus HEV-C reference sequences (Table 2), what strongly indicates that isolate 44624 was a product of recombination between Sabin 2 and other HEV-C viruses.

The reference sequences of Sabin 2 (AY184220), Sabin 3 (AY184221), CVA11 (AF499636), CVA13 (AF465511), CVA20 (AF499642) and CVA24 (EF026081) were presented as putative parental strains of isolate 44624 by the RDP algorithms (P-value < 0.05). However, it is



**Fig 1. Amino acid substitutions in the capsid protomer of isolate 44624.** VP1, VP2, VP3 and VP4 are represented as a 3-dimensional structured protomer. The image was generated using the software Swiss-PdbViewer [24], based on X-ray crystallographic analysis of type 2 poliovirus strain Lansing (Protein Data Bank accession number 1EAH.pdb) [23]. Colour codes: Substitutions at known antigenic sites, brown. Substitutions elsewhere, pink. The BC-loop of VP1 is not visible in this model.

doi:10.1371/journal.pone.0152251.g001

difficult to precisely determine the parental strains of the isolate 44624 because sometimes two different pairs of major/minor parental strains were predicted with statistical significance for the same genomic region (see predicted recombination events 2 and 3 for VP4-to-VP1 capsid sequences and events 4 and 5 for 2A-to-3C non-structural gene sequences, as described in Table 2).

No close relationship was found by comparing isolate 44624 with sequences belonging to Enterovirus HEV-A, -B or -D species (data not shown). These results suggest that the donors

	VP2			VP3			VP1		
	NAg3b	NAg2	NAg2	NAg3a	NAg3A	NAg3b	NAg1	NAg2	NAg3a
	71	163	268	54	70	75	86	220	286
Sabin 2	WRK	DTNATNPARN	PRT	PLNLTSQR	VELSD	TAHSD	AIIEVDNDAPTKRASRLFS	STEGD	KDGLT
44624	...	.....	...	.....	...N.	A....	.....	.....	....A

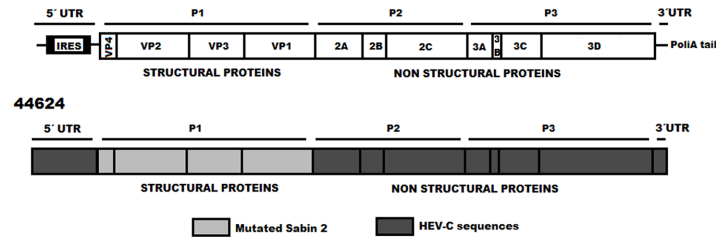
**Fig 2. Alignment of amino acids residues of neutralizing antigenic (NAg) sites for Sabin 2 (GenBank accession number AY184220) and isolate 44624.** Amino acid positions are numbered according to Sabin 2 NAg1 (VP1 88–106), NAg2 (VP2 163–169; VP2 268–270; VP1 220–225), NAg3a (VP3 54–61; VP3 70–74; VP1 286–291) and NAg3b (VP2 71–73; VP3 75–79).

doi:10.1371/journal.pone.0152251.g002

**Table 2. Recombination events predicted by RDP algorithms for the genome of isolate 44624 and putative parental sequences.** Break points consist of the beginning nucleotide (BN) and the ending nucleotide (EN) of recombination fragment detected in the break point analysis. The figures are for isolate 44624. RDP software considers the major parent as the sequence closely related to that from which the greater part of the recombinant's sequence may have been derived, and the minor parent is pointed as the sequence closely related to that from which sequences in the proposed recombinant region may have been derived.

Recombinant	Event #	Break points		Parents			Genes							Average P-value						
		BN	EN	Major	Minor	Genes							RDP	GENECON	Bootscan	MaxChi	Chimaera	SIScan	3Seq	
						5'-UTR	VP1, 2A	VP2, VP3, VP4	VP1, 2A	VP2, VP3, VP4	VP1, 2A	VP2, VP3, VP4								VP1, 2A
44624	1	96	509	Sabin 3	CVA24	5'-UTR	1.187x10 <sup>-9</sup>	1.059x10 <sup>-3</sup>	1.732x10 <sup>-11</sup>	2.155x10 <sup>-2</sup>	4.668x10 <sup>-2</sup>	6.092x10 <sup>-7</sup>	4579x10 <sup>-9</sup>							
	2	744	3797	CVA20	Sabin 2	5'-UTR, VP4, VP2, VP3, VP1, 2A	4.387x10 <sup>-55</sup>	2.583x10 <sup>-55</sup>	4.658x10 <sup>-50</sup>	1.824x10 <sup>-20</sup>	2.852x10 <sup>-23</sup>	3.291x10 <sup>-70</sup>	1.618x10 <sup>-10</sup>							
	3	744	3771	Sabin 3	Sabin 2	5'-UTR, VP4, VP2, VP3, VP1, 2A	7.153x10 <sup>-45</sup>	2.747x10 <sup>-42</sup>	9.075x10 <sup>-41</sup>	3.372x10 <sup>-12</sup>	1.062x10 <sup>-21</sup>	5.799x10 <sup>-65</sup>	1.715x10 <sup>-10</sup>							
	4	3305	5578	Unknown—CVA13	CVA20	VP1, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C	2.867x10 <sup>-33</sup>	-----	5.708x10 <sup>-32</sup>	4.203x10 <sup>-12</sup>	1.596x10 <sup>-18</sup>	3.572x10 <sup>-35</sup>	1.332x10 <sup>-14</sup>							
	5	3400	5710	CVA13	CVA11	2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C	1.106x10 <sup>-15</sup>	-----	6.333x10 <sup>-15</sup>	1.595x10 <sup>-9</sup>	1.110x10 <sup>-9</sup>	9.698x10 <sup>-19</sup>	1.332x10 <sup>-14</sup>							

doi:10.1371/journal.pone.0152251.t002



**Fig 3. Schematic representation of the genome of recombinant aVDPV 44624, isolated in Brazil.** Non-vaccine sequences (HEV-C species) are represented in light blue. Highly mutated Sabin 2 regions are represented in gray.

doi:10.1371/journal.pone.0152251.g003

of non-capsid sequences of isolate 44624 were unidentified strains possibly belonging to Enterovirus HEV-C species. A schematic representation of the proposed mosaic genome of 44624 is presented in Fig 3.

### Time of divergence of the isolate 44624 from the Sabin 2 strain

In order to estimate the time of divergence of the isolate 44624 from the original Sabin 2 strain (GenBank accession number AY184220), the approximate evolution time of isolate 44624 relative to Sabin 2 was calculated for both complete P1/capsid and VP1 sequences. It would be an indication of both the date of initial OPV administration and the time of replication of the isolate 44624.

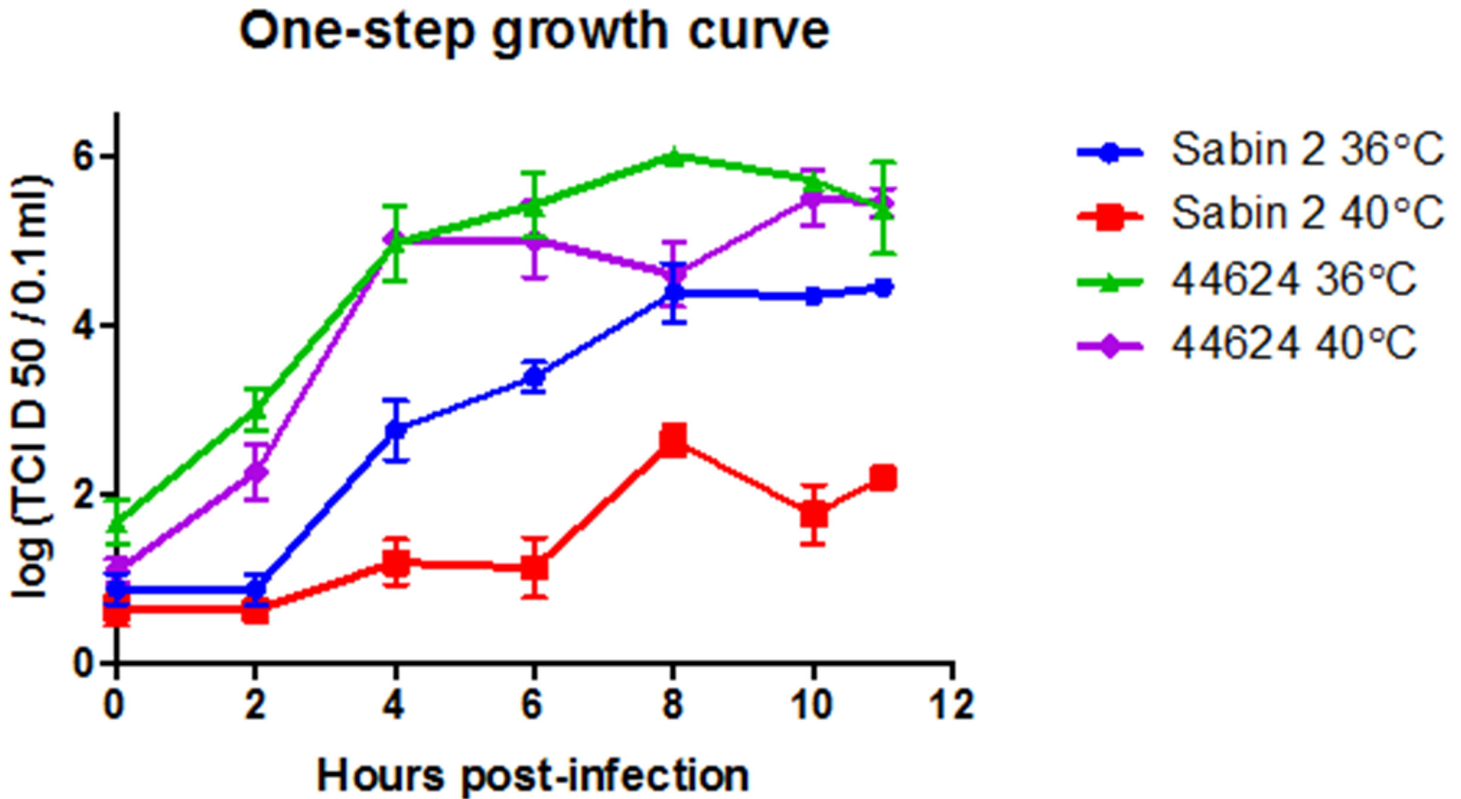
The estimated proportions for  $Ks/dS$  were 0.249 and 0.301 synonymous substitutions *per* synonymous sites for P1/capsid and VP1 sequences, respectively. The values of 0.008 (P1/capsid) and 0.015 (VP1) were found for nonsynonymous substitutions per nonsynonymous sites ( $Ka/dN$ ), and the  $Kt$  values were estimated to be 0.077 and 0.094 total substitutions per sites for P1/capsid and VP1 sequences, respectively. The evolution time of isolate 44624 relative to Sabin 2 strain, calculated for the entire P1 region, is about 8.5 years (using  $Ks$  and  $Kt$  clocks), indicating the long time of replication of the isolate 44624 since the OPV initial dose. The calculated value for  $dN/dS$ , which can be used as an indicator of selective pressure acting on a protein-coding gene, is 0.033 for P1/capsid (0.051 for VP1 sequence), what is lower than the  $dN/dS$  values estimated for iVDPVs datasets (J. Jorba, personal communication).

### Phylogenetic Analysis

The phylogenetic relatedness among isolate 44624 and other VDPV2 sequences available in GenBank was evaluated with MEGA6 software [22]. Phylogenetic investigation revealed no close relationship with the other VDPV analysed (Fig 4); therefore, the geographic origin of the Brazilian VDPV isolate remains unknown.

### RCT marker test

The temperature sensitivity assay showed that there is no significant difference between titer of isolate 44624 at 36.5°C and at 40°C (Table 3), signifying that VDPV2 44624 had lost the attenuated temperature-sensitive (*ts*) phenotype and can efficiently replicate at elevated temperatures, similarly to WPV. For the Sabin 2 reference strain, the >2 log titer difference at 36.5°C and at 40°C is consistent with the *ts* phenotype of Sabin strains. Tests carried out in triplicate showed similar results.



**Fig 4. Phylogenetic analysis of VP1 sequences of isolate 44624 and a set of type 2 VDPV isolated between 1998 and 2015.** Evolutionary distances were computed using Maximum Composite Likelihood method and Neighbor-joining tree. Consensus from 1000 bootstrap replicates is shown.

doi:10.1371/journal.pone.0152251.g004

### One-step growth curve

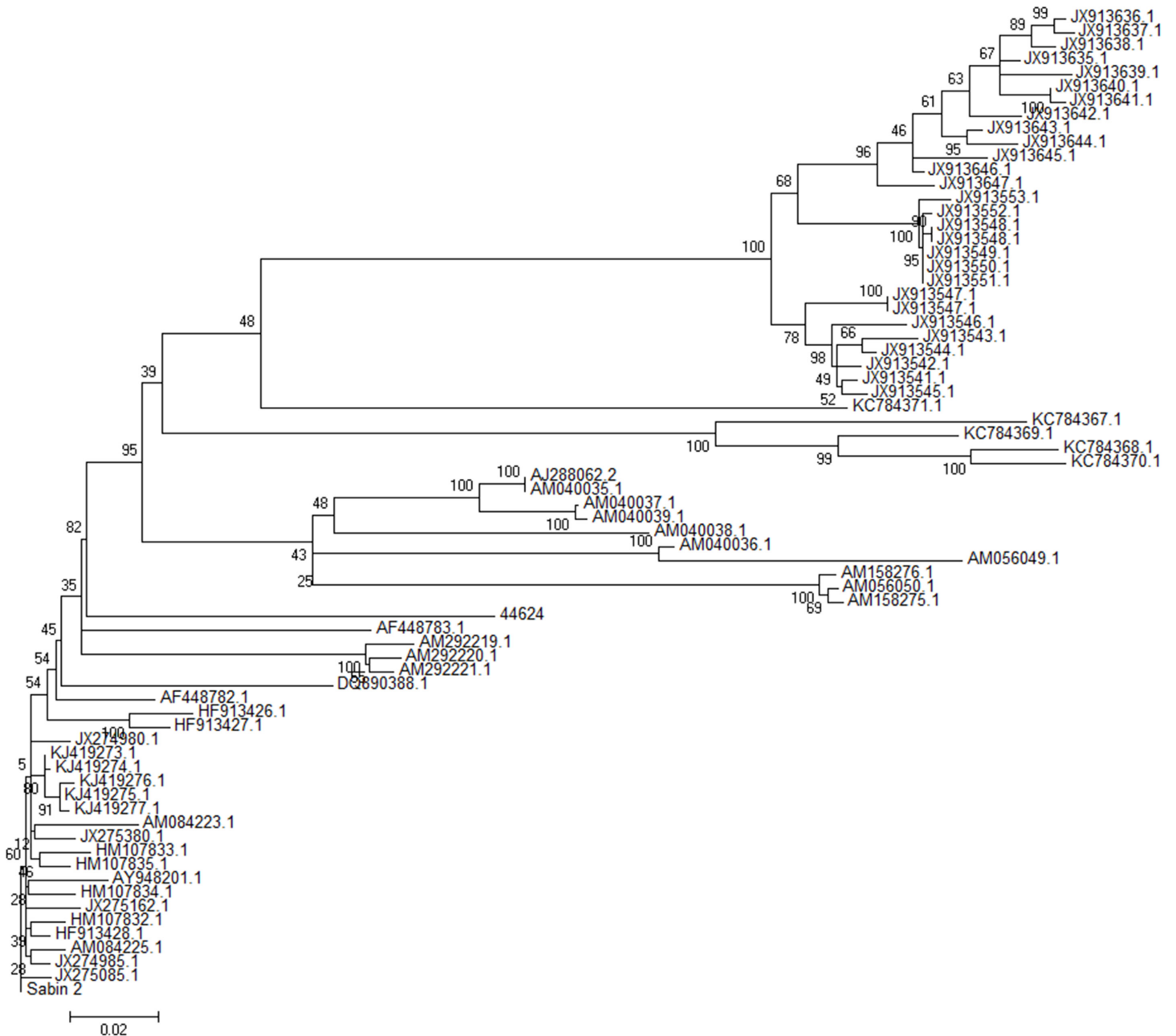
The growth rate and virus yields of isolate 44624 were compared with those of Sabin 2 in one-step growth curve experiments at 36.5°C and 40°C in RD cells (Fig 5). The isolate 44624 showed different growth kinetics from that of its Sabin 2 progenitor. At 36.5°C, 44624 had faster growth rates between 4 and 6 h p.i., presenting a curve slope essentially steeper than Sabin 2 strain, what indicates a faster growth rate at the exponential phase of the replication cycle in RD cells. Also, Sabin 2 had a lower final titer at 12 h p.i. At 40°C, 44624 again grew

**Table 3. Reproductive capacity of VDPV2 isolate 44624 and Sabin 2 strain at different temperatures (RCT marker).** The RCT value is defined as the difference between the log<sub>10</sub> virus titer of the viral stock measured at the optimal temperature 36.5°C and supraoptimal temperature 40°C. The values are expressed as log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub> / 0.1ml. Virus were considered thermosensitive if the ΔRCT value was greater or equal to 2, and thermo resistant when RCT value was inferior to 2.00.

Virus	Hours p.i.	Titer at 36,5°C	Titer at 40°C	Log titer reduction Δ
44624	8h	7.9	7.7	0.2
	24h	7.9	7.9	0.2
	48h	8.1	7.6	0.5
Sabin 2	8h	7.9	3.6	4.3
	24h	7.8	3.8	4.0
	48h	7.7	3.7	4.0

doi:10.1371/journal.pone.0152251.t003





**Fig 5. One-step growth curve analysis of isolate 44624 in comparison with Sabin 2 in RD cells.** Cells were infected at a MOI of 10 and incubated at 37 or 40°C. Total virus production at different times (0-12h) post-infection were determined by TCID<sub>50</sub> assays on RD cells. Each point represents the mean + standard deviation of virus titers from three different experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0152251.g005

more efficiently between 4 and 6 h. p.i., presenting a result similar of those at 36.5°C, and still a better performance than Sabin 2 at 36,5°C. As expected, Sabin 2 presented lower efficiency of replication at 40°C (*ts* phenotype), and the lowest final titer. As indicated in RCT test, isolate 44624 had lost its temperature sensitivity, and replicated equally well at both tested temperatures. Triplicate tests showed similar results.

## Discussion

This study aimed to assess the molecular and phenotypic characterization of a highly divergent type 2 ambiguous VDPV (aVDPV) isolated from seawater at the São Sebastião Seaport, located on the northern coastline of São Paulo state. The estimates of evolution time of isolate 44624, calculated from the nucleotide divergence from Sabin 2 original strain (AY184220), indicate that the isolate 44624 has been circulating for at least 8.5 years. At the time of 44624 isolation, the overall coverage with 3 doses of oral polio vaccine for children under 1 year old was about ~100% for both Brazil and the town of São Sebastião (Data available at <http://pni.datasus.gov.br>). The episode was not associated with reported cases of paralytic poliomyelitis.

The last report of indigenous transmission of WPV in Brazil dates back to 1989 [14]. To begin the withdrawal of OPV from the vaccination calendar, Brazil changed to a combined vaccination schedule (2 IPV doses followed by 2 OPV doses) in 2012. Since OPV has been administered in the country for decades, the detection of Sabin strains from the environment is a frequent event. However, it was the first time that a VDPV strain has been reported in Brazil.

The isolate 44624 has no close relationship with either other polio or non-polio Enteroviruses isolated in Brazil before or after this event. Because the seaport is subject to a large flow of people from around the world, it is likely to be an imported virus, with no establishment of a continuous transmission chain in the local population. However, the evidence is insufficient to exclude other possibilities (like the existence of a local chronic excretor).

During evolution, cVDPV and iVDPV are under distinct biological selective pressures, which result in differences in key properties [10]. Isolate 44624 likely has a cVDPV origin, due to the presence of recombination breakpoints with non-vaccine HEV-C Enteroviruses, which frequently occurs during poliovirus circulation and suggests the occurrence of person-to-person transmission [59, 60]. Although it is not mandatory for cVDPV emergence, vaccine/non-vaccine recombination appears to facilitate the replacement of attenuating sequences in a single event [61]. Moreover, iVDPV isolates are widely known to have extensive antigenic variability (many mutations in or near NAg sites), which is not common in cVDPV strains [62] and was not observed in isolate 44624.

The A481G change in the 5'-UTR, along with the amino acid substitution Ile143Thr in VP1 are well known to be the two major determinants of the attenuated phenotype of Sabin 2 [63, 64], and both sites had reverted to the wild-type nt. in isolate 44624. These substitutions are frequently found in VDPV [40, 41, 65] and many OPV-like isolates [63, 66–68], which is probably indicative of the intense selective pressure against these attenuating alleles as OPV replicates in the human intestine [66].

The 44624 recombinant genome has kept only the P1 region/capsid from the original Sabin 2 strain, which determines the antigenic properties of the viral serotype, while all other parts of the genome are derived from recombination with other HEV-C species. As presented in Table 2, between the evaluated sequences of HEV-C species, the strains that statistically are more likely to be parental strains for isolate 44624 are Sabin 2 (AY184220), Sabin 3 (AY184221), CVA11 (AF499636), CVA13 (AF465511), CVA20 (AF499642) and CVA24 (EF026081), but the parental strains could not be precisely determined because there are more than one statistically acceptable event for the majority of putative recombination events. It is possible that more accurate predictions would be achievable through analysis of sequences currently in circulation, instead of reference strains. The absence of a sequence database from HEV-C species currently circulating in Brazil and the impossibility to test the large quantity of HEV-C sequences available at the GenBank were limiting factors of this analysis.

Likewise, phylogenetic analysis did not identify closely related VDPV sequences for isolate 44624. The impracticality to screen all Sabin 2-related sequences available in GenBank and the

huge amount of non-deposited sequences were also limitation steps of this analysis. Therefore, the origin of isolate 44624 remains unknown.

The findings presented here indicate that the aVDPV isolate 44624 has been subjected to a long period of circulation and probably person-to-person transmission [10]. The presence of highly drifted, neurovirulent strains in the environment is a potential risk for transmission and spread of pathogenic polioviruses. The findings of this study reiterate the environmental surveillance as a sensitive tool for detection of poliovirus at low levels of circulation and in the absence of paralytic poliomyelitis cases [69–73]. Therefore, the authors encourage the enhancement and expansion of environmental surveillance to help identify any residual transmission in endemic areas and to provide early indication of new importations or emergence of VDPV strains, in order to deliver a world free of polio in the years to come.

## Supporting Information

**S1 Fig. Location of substituted amino acid sites in 3-dimensional structure model of poliovirus capsid protein pentamer.** Visualization is based on x-ray crystallographic analysis of type 2 poliovirus strain Lansing (PDB ID: 1EAH). Panel A, view from outside of virion; Panel B, view from inside the capsid wall. Locations of amino acids substituted in isolate 44624 in comparison to Sabin 2 are indicated. Colour codes: VP1, white; VP2, blue; VP3, cyan; VP4, red. Substitutions at known antigenic sites, brown. Substitutions elsewhere, magenta. The BC-loop of VP1 is not visible in this model.

(PDF)

**S1 Table. Primers used for complete genomic sequencing of isolate 44624.**

(DOCX)

## Acknowledgments

The authors would like to thank the technical assistance of Amanda de M. Neves and Jaqueline Silva from Enterovirus Laboratory and Suzi C. Garcia and Vilma M.B. dos Santos from CETESB Virology Laboratory.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: EES MIZS CCB KMSMC. Performed the experiments: KMSMC FMB MRFB QC EMH. Analyzed the data: KMSMC FMB JJ EES. Contributed reagents/materials/analysis tools: KMSMC JJ. Wrote the paper: KMSMC MIZS CCB EES.

## References

1. Kew OM, Sutter RW, de Gourville EM, Dowdle WR, Pallansch MA. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu Rev Microbiol* 2005 Oct; 59:587–635. PMID: [16153180](#)
2. Sutter RW, Kew OM, Cochi SL, Aylward RB. Poliovirus vaccine—live. In: Plotkin SA, Ornstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines*. London: W. B. Saunders; 2013. p. 598–645.
3. Equestre M, Genovese D, Cavalieri F, Fiori L, Santoro R, Perez Bercoff R. Identification of a consistent pattern of mutations in neurovirulent variants derived from the Sabin vaccine strain of poliovirus type 2. *J Virol* 1991 May; 65(5):2707–10. PMID: [1850043](#)
4. Famulare M, Chang S, Iber J, Zhao K, Adeniji JA, Bukbuk D, et al. Sabin vaccine reversion in the field: a comprehensive analysis of Sabin-like poliovirus isolates in Nigeria. *J Virol* 2015 Oct. doi: [10.1128/JVI.01532-15](#)
5. Gnanashanmugam D, Falkovitz-Halpern MS, Dodge A, Fang M, Wong LJ, Esparza M. Shedding and reversion of oral polio vaccine type 3 in Mexican vaccines: comparison of mutant analysis by PCR and

- enzyme cleavage to a real-time PCR assay. *J Clin Microbiol* 2007 Aug; 45(8):2419–2425. PMID: [17581940](#)
6. Otelea D, Guillot S, Furione M, Combiescu AA, Balanant J, Candrea A, et al. Genomic modifications in naturally occurring neurovirulent revertants of Sabin 1 poliovirus. *Dev Biol Stand* 1993 78:33–38. PMID: [8099049](#)
  7. Bellmunt A, May G, Zell R, Pring-Akerblom P, Verhagen W, Heim A. Evolution of poliovirus type 1 during 5.5 years of prolonged enteral replication in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol* 1998 Dec 20; 265(2):178–84.
  8. Kew OM, Sutter RW, Nottay BK, McDonough MJ, Prevots DR, Quick L, et al. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol* 1998 Oct; 36(10):2893–9. PMID: [9738040](#)
  9. Kew OM, Morris-Glasgow V, Landaverde M, Burns C, Shaw J, et al. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 2002 Apr 12; 296(5566):356–9. PMID: [11896235](#)
  10. Burns CC, Diop OM, Sutter RW, Kew OM. Vaccine-derived polioviruses. *J Infect Dis* 2014 210 (suppl 1):S283–S293. doi: [10.1093/infdis/jiu295](#) PMID: [25316847](#)
  11. Diop OM, Burns CC, Sutter RW, Wassilak SG, Kew OM. Update on vaccine-derived poliovirus—worldwide, January 2014–March 2015. *MMW Morb Mortal Wkly Rep* 2015 Jun 19; 64(23):640–646.
  12. Diop OM, Burns CC, Wassilak SG, Kew OM. Update on vaccine-derived poliovirus—worldwide, July 2012–December 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2014 Mar 21; 63(11):242–248. PMID: [24647401](#)
  13. Global Polio Eradication Initiative. Vaccine-associated paralytic polio (VAPP) and vaccine-derived poliovirus (VDPV). Fact Sheet—February 2015. [Internet] Available from: [http://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/endgame\\_objective2/oral\\_polio\\_vaccine/VAPPandcVDPVFactSheet-Feb2015.pdf](http://www.who.int/immunization/diseases/poliomyelitis/endgame_objective2/oral_polio_vaccine/VAPPandcVDPVFactSheet-Feb2015.pdf)
  14. World Health Organization. Detection of poliovirus in sewage, Brazil. 2014. [Internet] Available from: [http://www.who.int/csr/don/2014\\_6\\_23polio/en/](http://www.who.int/csr/don/2014_6_23polio/en/)
  15. Sattar SA, Wetwood JCN. Isolation of apparently wild strains of poliovirus type 1 from sewage in the Ottawa area. *CMA Journal* 1977 Jan 116:25–7.
  16. USEPA 2003. Environmental Regulations and Technology. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. EPA/525/R-092/013. Jul 2003.
  17. World Health Organization. Polio Lab Network. Quartely update. New test algorithm to be implemented in 2007. Vol. XXXIII (issue 4): 2006.
  18. World Health Organization. Polio Laboratory Manual. 4<sup>th</sup> edition. Geneva. Switzerland. 2004.
  19. Kilpatrick DR, Ching K, Iber J, et al. Identification of vaccine-derived polioviruses using dual-stage real-time RT-PCR. *J Virol Methods* 2014 Mar; 197:25–8. doi: [10.1016/j.jviromet.2013.11.017](#) PMID: [24321704](#)
  20. Rico-Hesse R, Pallansch MA, Nottay BK, Kew OM. Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* 1987 Oct; 160(2):311–22. PMID: [2821678](#)
  21. World Health Organization. Manual for the Virological Investigation of Polio. Geneva: World Health Organization; 1997. 66 p.
  22. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013 Dec; 30(12):2725–9. doi: [10.1093/molbev/mst197](#) PMID: [24132122](#)
  23. Lentz KN, Smith AD, Geisler SC, Cox S, Buontempo P, Skelton A, et al. Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: comparison of the structural and biological properties of three poliovirus serotypes. *Structure* 1997 Jul 15; 5(7):961–78. PMID: [9261087](#)
  24. Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997 Dec; 18(15):2714–23. PMID: [9504803](#)
  25. Goldman N, Yang Z. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol Biol Evol* 1994 Sep; 11(5):725–36. PMID: [7968486](#)
  26. Cai James J, Smith David K, Xia Xuhua, Yuen Kwok-yung. MBEToolbox: a Matlab toolbox for sequence data analysis in molecular biology and evolution. *BMC Bioinformatics* 2005 Mar 22; 6:64. PMID: [15780146](#)
  27. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 1992 Jul; 9(4):678–87. PMID: [1630306](#)
  28. Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A, & Muhire B. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* 2015; 1:vev003.

29. Padidam M, Sawyer S, Fauquet CM. Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 1999 Dec; 265(2):218–25. PMID: [10600594](#)
30. Martin DP, Posada D, Crandall KA, Williamson C. A modified BOOTSCAN algorithm for automated identification of recombinant sequences and recombination breakpoints. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005 Jan; 21(1):98–102. PMID: [15665649](#)
31. Posada D, Crandall KA. Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. *Proc Natl Acad Sci* 2001 Nov; 98(24):13757–62. PMID: [11717435](#)
32. Maynard Smith J. Analyzing the mosaic structure of genes. *J Mol Evol* 1992 Feb; 34(2):126–9. PMID: [1556748](#)
33. Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ. Sister-Scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 2000 Jul; 16(7):573–82. PMID: [11038328](#)
34. Boni MF, Posada D, Feldman MW. An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 2007 Jun; 176(2):1035–47. PMID: [17409078](#)
35. Martin D, Rybicki E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics* 2000 Jun; 16(6):562–3. PMID: [10980155](#)
36. Liu X, Wu C, Chen A. Codon usage bias and recombination events for neuraminidase and hemagglutinin genes in Chinese isolates of influenza A virus subtype H9N2. *Arch Virol* 2010 May; 155(5):685–93. doi: [10.1007/s00705-010-0631-2](#) PMID: [20300785](#)
37. Zhang Y, Yan D, Zhu S, Wen N, Li L, Wang H, et al. Type 2 vaccine-derived poliovirus from patients with acute flaccid paralysis in China: current immunization strategy effectively prevented its sustained transmission. *J Infect Dis* 2010 Dec 15; 202(12):1780–8. doi: [10.1086/657410](#) PMID: [21050127](#)
38. Zhang Y, Wang H, Zhu S, Li Y, Song L, Liu Y, et al. Characterization of a rare natural intertypic type 2/type 3 penta-recombinant vaccine-derived poliovirus isolated from a child with acute flaccid paralysis. *J Gen Virol* 2010 Feb; 91(Pt 2):421–9. doi: [10.1099/vir.0.014258-0](#) PMID: [19846676](#)
39. Yan D, Zhang Y, Zhu S, Chen N, Li X, et al. Limited and Localized Outbreak of Newly Emergent Type 2 Vaccine-Derived Poliovirus in Sichuan, China. *Clin Vaccine Immunol* 2014 Jul; 21(7):1012–8. doi: [10.1128/CVI.00196-14](#) PMID: [24850620](#)
40. Yang CF, Naguib T, Yang SJ, Nasr E, Jorba J, Ahmed N, et al. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol* 2003 Aug; 77(15):8366–77. PMID: [12857906](#)
41. Rousset D, Rakoto-Andrianarivelo M, Razafindratsimandresy R, Randriamanalina B, Guillot S, Bala-nant J, et al. Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2003 Jul; 9(7):885–887. PMID: [12899139](#)
42. Razafindratsimandresy R, Joffret L, Rabemanantsoa S, Andriamamonjy S, Heraud J, et al. (2013) Reemergence of Recombinant Vaccine-derived Polioviruses in Healthy Children, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2013 Jun; 19(6):1008–10. doi: [10.3201/eid1906.130080](#) PMID: [23735779](#)
43. Burns CC, Shaw J, Jorba J, Bukbuk D, Adu F, Gumede N, et al. Multiple independent emergences of type 2 vaccine-derived polioviruses during a large outbreak in northern Nigeria. *J Virol* 2013 May; 87(9):4907–22. doi: [10.1128/JVI.02954-12](#) PMID: [23408630](#)
44. Adu F, Iber J, Bukbuk, Gumede N, Yang SJ, Jorba J, et al. Isolation of recombinant type 2 vaccine-derived poliovirus (VDPV) from a Nigerian child. *Virus Res* 2007 Jul; 127(1):17–25. PMID: [17449127](#)
45. Shulman LM, Manor Y, Sofe D, Handsher R, Swartz T, Delpyroux F, et al. Neurovirulent vaccine-derived polioviruses in sewage from highly immune populations. *PLoS One* 2006 Dec 20; 1:e69. PMID: [17183700](#)
46. Hovi T, Paananen A, Blomqvist S, Savolainen-Kopra C, Al-Hello H, Smura T, et al. Characteristics of an Environmentally Monitored Prolonged Type 2 Vaccine Derived Poliovirus Shedding Episode that Stopped without Intervention. *PLoS One* 2013 Jul 31; 8(7):e66849. doi: [10.1371/journal.pone.0066849](#) PMID: [23935826](#)
47. Al-Hello H, Jorba J, Blomqvist S, Raud R, Kew O, Roivainen M. Highly Divergent Type 2 and 3 Vaccine-Derived Polioviruses Isolated from Sewage in Tallinn, Estonia. *J Virol* 2013 Dec; 87(23):13076–80. doi: [10.1128/JVI.01174-13](#) PMID: [24049178](#)
48. Nei M, Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York: Oxford University Press; 2000. 333 p.
49. Nakano JH, Milford MH, Thieme ML, Nottay B. Parameters for differentiating vaccine derived and wild poliovirus strains. In: Melnick JL, editor. *Progress in Medical Virology*. New York: S. Karger; 1978. p. 178–206.
50. Böttiger M. Rct-marker tests on isolates from WM 3 and Sabin type 3 attenuated poliovirus vaccines. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 1968 Sep; 25(3):299–307. PMID: [4303675](#)

51. Pliaka V, Dedepisdas E, Kyriakopoulou Z, Papadi G, Tsakogiannis D, Pratti A, et al. Growth kinetic analysis of bi-recombinant poliovirus vaccine strains. *Virus Genes* 2010 Apr; 40(2):200–11. doi: [10.1007/s11262-010-0448-9](https://doi.org/10.1007/s11262-010-0448-9) PMID: [20091423](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20091423/)
52. Korotkova EA, Park R, Cherkasova EA, Lipskaya GY, Chumakov KM, Feldman E, et al. Retrospective analysis of a local cessation of vaccination against poliomyelitis: a poliomyelitis: a possible scenario for the future. *J Virol* 2003 Dec; 77(23):12460–5. PMID: [14610170](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14610170/)
53. Ren RB, Moss EG, Racaniello VR. Identification of two determinants that attenuate vaccine-related type 2 poliovirus. *J Virol* 1991 Mar; 65(3):1377–82. PMID: [1847458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1847458/)
54. La Monica N, Meriam C, Racaniello VR. Mapping of sequences required for mouse neurovirulence of poliovirus type 2 Lansing. *J Virol* 1986 Feb; 57(2):515–25. PMID: [3003384](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3003384/)
55. Dragunsky EM, Ivanov AP, Wells VR, Ivshina AV, Rezapkin GV, Abe S, et al. Evaluation of immunogenicity and protective properties of inactivated poliovirus vaccines: a new surrogate method for predicting vaccine efficacy. *J Infect Dis* 2004 Oct; 190(8):1404–12. PMID: [15378432](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15378432/)
56. Couderc T, Guinguene B, Horaud F, Aubert-Combescu A, Crainic R. Molecular pathogenesis of type 2 poliovirus in mice. *Eur J Epidemiol* 1989 Sep; 5(3):270–4. PMID: [2551721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2551721/)
57. Goodfellow I, Chaudhry Y, Richardson A, Meredith J, Almond JW, et al. Identification of a cis-acting replication element within the poliovirus coding region. *J Virol* 2000 May; 74(10):4590–600. PMID: [10775595](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10775595/)
58. Rieder E, Paul AV, Kim DW, van Boom JH, Wimmer E. Genetic and biochemical studies of poliovirus cis-acting replication element cre in relation to VPg uridylylation. *J Virol* 2000 Nov; 74(22):10371–80. PMID: [11044081](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11044081/)
59. Brown B, Oberste MS, Maher K, Pallansch M. Complete genomic sequencing shows that poliovirus and members of human enterovirus species C are closely related in the non-capsid coding region. *J Virol* 2003 Aug; 77(16): 8973–8984. PMID: [12885914](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12885914/)
60. Liu H-M, Zheng D-P, Zhang L-B, Oberste MS, Kew OM, Pallansch MA. Serial recombination during circulation of type 1 wild-vaccine recombinant poliovirus in China. *J Virol* 2003 Oct; 77(20): 10994–11005. PMID: [14512548](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14512548/)
61. Jegouic S, Joffret M-L, Blanchard C, Riquet FB, Perret C, Pelletier I, et al. Recombination between poliovirus and co-circulating Coxsackie A viruses: role in the emergence of pathogenic vaccine-derived poliovirus. *Plos Path* 2009 May; 5(5):e1000412.
62. DeVries AS, Harper J, Murray A, Lexau C, Bahta L, Christensen J, et al. Vaccine-derived poliomyelitis 12 years after infection in Minnesota. *N Engl J Med* 2011 Jun 16; 364(24):2316–23. doi: [10.1056/NEJMoa1008677](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1008677) PMID: [21675890](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21675890/)
63. Macadam AJ, Pollard SR, Ferguson G, Skuce R, Wood D, Almond JW, et al. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. *Virology* 1993 Jan; 192(1):18–26. PMID: [8390752](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8390752/)
64. Ren RB, Moss EG, Racaniello VR. Identification of two determinants that attenuate vaccine-related type 2 poliovirus. *J Virol* Mar; 65(3):1377–82.
65. Shulman LM, Handsher R, Yang CF, Yang SJ, Manor J, Vonsover A, et al. Resolution of the pathways of poliovirus type 1 transmission during an outbreak. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar; 38(3):945–52. PMID: [10698978](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10698978/)
66. Minor PD, Dunn G. The effect of sequences in the 5' non-coding region on the replication of polioviruses in the human gut. *J Gen Virol* 1988 May; 69 (Pt 5):1091–6. PMID: [2836553](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2836553/)
67. Yakovenko ML, Cherkasova EA, Rezapkin GV, Ivanova OE, Ivanov AP, Ereemeeva TP, et al. Antigenic Evolution of Vaccine-Derived Polioviruses: Changes in Individual Epitopes and Relative Stability of the Overall Immunological Properties. *J Virol* 2006 Mar; 80(6):2641–53. PMID: [16501074](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16501074/)
68. Yoshida H, Horie H, Matsuura K, Kitamura T, Hashizume S, Miyamura T. Prevalence of vaccine-derived polioviruses in the environment. *J Gen Virol* 2002 May; 83(Pt 5):1107–11. PMID: [11961265](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11961265/)
69. Hovi T. Surveillance for polioviruses. *Biologicals* 2006 Jun; 34(2):123–6. PMID: [16678443](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16678443/)
70. Gary HE, Sanders R, Pallansch MA. A theoretical framework for evaluating the sensitivity of surveillance for detecting wild poliovirus: factors affecting detection sensitivity in a population with circulating wild poliovirus. *J Infect Dis* 1997 Feb; 175 Suppl 1:S141–5. PMID: [9203706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9203706/)
71. Bottiger M, Herrstrom E. Isolation of polioviruses from sewage and their characteristics: experience over two decades in Sweden. *Scand J Infect Dis* 1992; 24(2):151–5. PMID: [1322558](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1322558/)
72. Deshpande JM, Shetty SJ, Siddiqui ZA. Environmental surveillance system to track wild poliovirus transmission. *Appl Environ Microbiol* 2003 May; 69(5):2919–27. PMID: [12732567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12732567/)

73. Tao Z, Zhang Y, Liu Y, Xu A, Lin X, Yoshida H, et al. Isolation and Characterization of a type 2 vaccine-derived poliovirus from environmental surveillance in China, 2012. *Plos One* 2013 Dec 26; 8(12): e83975. doi: [10.1371/journal.pone.0083975](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083975) PMID: [24386319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24386319/)

## **9.2 Artigo 2**

### **Rare Natural Type 3/Type 2 Intertypic Capsid Recombinant Vaccine-related Poliovirus Isolated from a Case of Acute Flaccid Paralysis in Brazil, 2015.**

Casemiro KM, Burlandy FM, da Silva EE.

J Gen Virol. 2016 Jul;97(7):1545-50.



Short  
Communication

## Rare natural type 3/type 2 intertypic capsid recombinant vaccine-related poliovirus isolated from a case of acute flaccid paralysis in Brazil, 2015

Klécia M. S. M. Cassemiro, Fernanda M. Burlandy and Edson E. da Silva

Enterovirus Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

## Correspondence

Edson E. da Silva  
edson@ioc.fiocruz.br

Received 3 March 2016

Accepted 15 April 2016

A natural type 3/type 2 intertypic capsid recombinant vaccine-related poliovirus was isolated from an acute flaccid paralytic case in Brazil. Genome sequencing revealed the uncommon location of the crossover site in the VP1 coding region (nucleotides 3251–3258 of Sabin 3 genome). The Sabin 2 donor sequence replaced the last 118 nt of VP1, resulting in the substitution of the complete antigenic site IIIa by PV2-specific amino acids. The low overall number of nucleotide substitutions in P1 region indicated that the predicted replication time of the isolate was about 8–9 weeks. Two of the principal determinants of attenuation in Sabin 3 genomes were mutated (U472C and C2493U), but the temperature-sensitive phenotype of the isolate was preserved. Our results support the theory that there exists a PV3/PV2 recombination hotspot site in the tail region of the VP1 capsid protein and that the recombination may occur soon after oral poliovirus vaccine administration.

Polioviruses (PV) are in a constant process of evolution, driven by their high mutational rate and genomic recombination (Savolainen-Kopra & Blomqvist, 2010). RNA recombination facilitates the exchange of genetic information between genomes, granting evolutionary advantages by the generation of variability and reduction of mutational load (reviewed by Simon-Loriere & Holmes, 2011). The Sabin Oral Poliovirus Vaccine (OPV types 1, 2 and 3 strains) provides optimal conditions for multiple infections of human intestinal target cells, favouring the occurrence of intermolecular recombination between heterotypic genomes (Egger & Bienz, 2010).

The recombination junctions appear to follow a systematic distribution throughout the PV genome, since they are preferably correlated with RNA secondary structure elements identical to both recombination partners (Dedepisdís *et al.*, 2010). The majority of the crossover sites are located in the nonstructural coding regions of the genome (P2 and P3 regions), with recombination hotspots located in the 2C and 3D genomic regions for recombination junctions of type 3/type x and type 2/type x, respectively (Cuervo *et al.*, 2001; Karakasiliotis *et al.*, 2004; Paximadi *et al.*, 2006). The natural occurrence of intertypic capsid recombinants is very rare in nature, and seems to be a consequence of structural constraints that maintain the integrity of the capsid shell

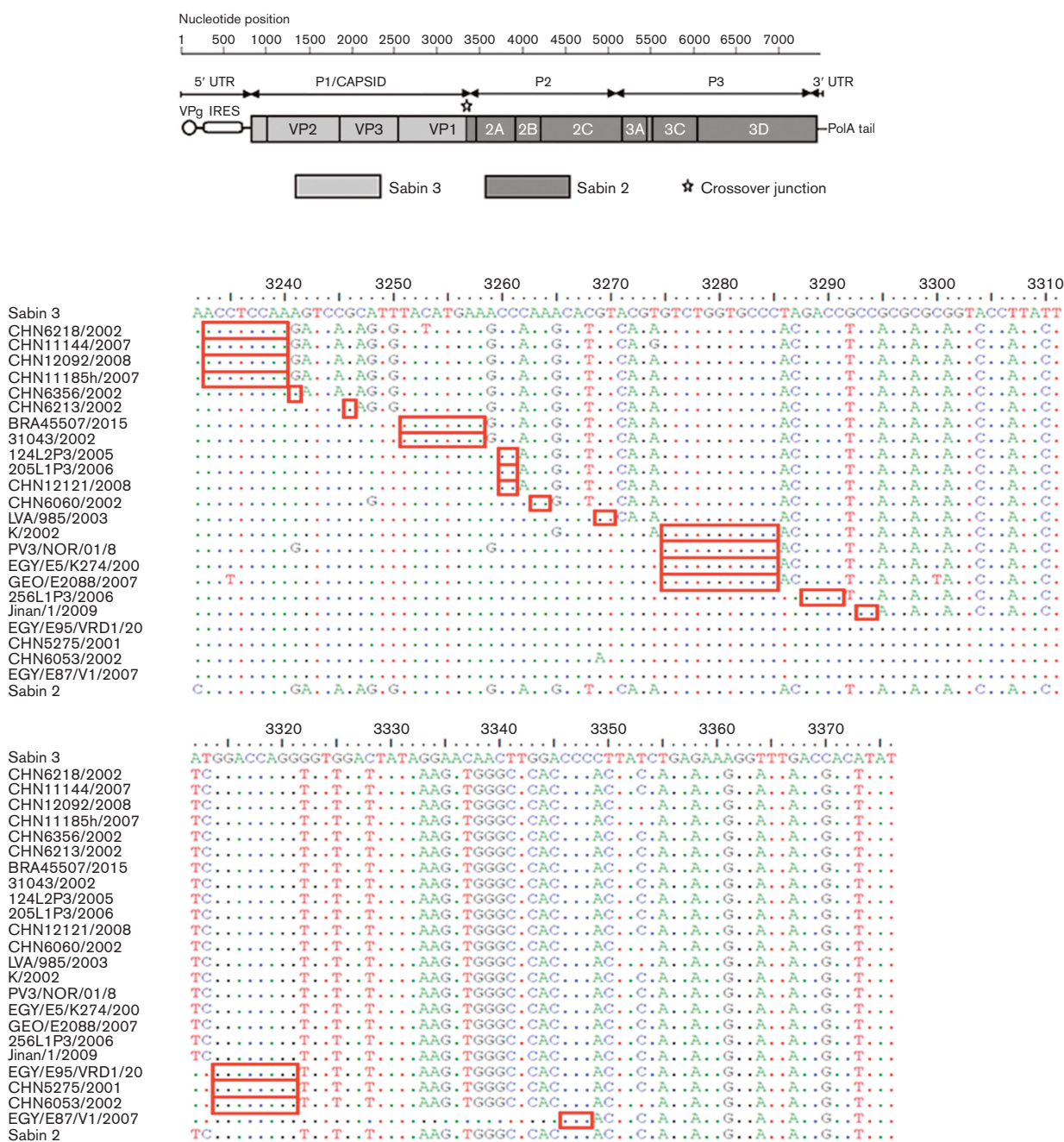
(Simmonds & Welch, 2006). Previous studies have shown that capsid recombinants chimeras are usually nonviable (Kohara *et al.*, 1988) or unstable in comparison to parental strains (Kohara *et al.*, 1985).

Very little is known about the capsid regions susceptible to undergoing recombination that maintain viral viability. There are few descriptions of S3/S2 recombinants in the literature (Blomqvist *et al.*, 2003, 2010; Dedepisdís *et al.*, 2008; Martín *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). In all cases, the recombination junctions were placed in the tail of the VP1 coding region, with Sabin 2 donated sequences ranging from 28 nt (Blomqvist *et al.*, 2010) to 136 nt (Zhang *et al.*, 2010) in the P1 region of Sabin 3 genomes, as seen in Fig. 1.

In this study we investigated the genome and the phenotypic characteristics of a natural type3/type2 capsid recombinant poliovirus isolated from a faecal specimen of an 8-month-old boy with acute flaccid paralysis symptoms.

Faecal samples were collected for the purpose of epidemiologic surveillance in São Paulo state, Brazil, in January 2015, four days after the onset of paralytic symptoms. Virus isolation attempts were performed in L20B [National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) accession no. 081102] and RD (NIBSC accession no. 081003) cell lines, according to the WHO algorithm for poliovirus isolation (World Health Organization, 2006), and intratypic differentiation and preliminary characterization were determined by real-time PCR

The GenBank/EMBL/DDBJ accession number for the complete genome sequence of isolate 45507 is KU763188.



**Fig. 1.** Genomic characterization of isolate 45507. (a) Schematic representation of the entire sequence of isolate 45507, indicating the putative crossover junction. (b) Nucleotide alignment of the 3' end of VP1 sequences of the parental strains Sabin 3 and Sabin 2, and the S3/S2 intertypic VP1 capsid recombinants described in the literature (Blomqvist *et al.*, 2003, 2010; Dedepisdid *et al.*, 2008; Martin *et al.*, 2002; Mueller *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010), and the 45507 recombinant. Red open rectangles indicate the suggested crossover junctions for each strain.

assay and VP1 sequencing, according to standard protocols (CDC, 2009; World Health Organization, 2004).

Viral RNA was extracted from an aliquot of 140 µl L20B cell culture supernatant presenting cytopathic effect, using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen). cDNA synthesis was

performed by using the specific primer S2\_7439R (5'-TCGA TAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCCGAA TT-3') and Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). The entire VP1 coding region (900 nt) was amplified and sequenced using the primers Y7 and Q8 (Rico-Hesse *et al.*,

**Table 1.** Nucleotide and amino acid substitutions in the 45507 recombinant virus compared to Sabin 3 (GenBank accession no. AY184221) and Sabin 2 (AY184220) reference sequences

The nucleotide and amino acid positions are related to the 45507 genome (GenBank accession no. KU763188). Mutations that resulted in reversion to the respective wild-type sequences Poliovirus type 3 Leon/37 (GenBank accession no. K01392) and Poliovirus type 2 Lansing (GenBank accession no. M12197) are indicated. Mutations in the determinants of attenuation for Sabin 3 genomes are underlined.

Sabin origin	Region	Nucleotide position*	Nucleotide substitution	Amino acid position*	Amino acid substitution	Reversion to wild-type
Type 3	5'-UTR	121	U-to-C			
		190	C-to-U			
		<u>472</u>	<u>U-to-C</u>			Yes
	VP2	1035	C-to-U	29	A-to-V	
		1158	U-to-C	70	M-to-T	
		1455	C-to-A	169	P-to-Q	
	VP3	1852	C-to-U			
		1991	G-to-A	76	D-to-N	
		2001	A-to-G	80	Q-to-R	
		<u>2033</u>	<u>U-to-A</u>	<u>91</u>	<u>F-to-I</u>	
		2188	C-to-U			
		2266	G-to-A			
		2479	U-to-G			
	VP1	<u>2493</u>	<u>C-to-U</u>	<u>6</u>	<u>T-to-I</u>	Yes
2509		G-to-A				
2749		C-to-U				
Type 2	2A	3531	C-to-A			
	2C	4533	U-to-C			
	3A	5265	A-to-U			
	3B	5391	A-to-C			
	3C	5676	C-to-U			
	3D	5925	U-to-C			

\*The figures are for isolate 45507 (GenBank accession no. KU763188).

1987). The complete genomic sequence of isolate 45507 was amplified from two overlapping PCR products of 3.57 kb and 5.28 kb, respectively, using the Expand Long Template PCR System (Roche) and two sets of sense–antisense primers: 001F\_Hind (5'-TCGATGTCGACTAATACGACTCACTA TAGGTTAAAACAGCTCTGGGG-3')–Q8 and Y7–S2\_7439R. The two fragments were purified using a QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and cycle sequencing reactions were carried out using BigDye terminator chemistry version 3.0 (Applied Biosystems) on an ABI 3730XL instrument.

Sequence analyses were performed using BioEdit (Hall, 1999) and MEGA 6.0 software package (Tamura *et al.*, 2013). Recombination events were evaluated by the Simplot program v3.5.1 (Lole *et al.*, 1999). The evolution time of isolate 45507 was estimated by calculations of synonymous substitutions per synonymous sites ( $K_s$ ) and non-synonymous substitutions per non-synonymous sites ( $K_a$ ) by using a modified version of the Goldman–Yang codon model of evolution (Goldman & Yang, 1994) as implemented in MBEToolbox v.3.0 (Cai *et al.*, 2005,

2007), and the total number of substitutions per site ( $K_t$ ) was estimated using the Tamura 92 (3-parameter) model of nucleotide evolution (Tamura, 1992), also available in MBEToolbox v.3.0.

Cross-reactivity using serotype-specific hyperimmune sera and reproductive capacity at high temperatures (RCT marker) were performed in order to determine the antigenic characteristics of isolate 45507. The cross-reactivity was tested in a microneutralization assay in RD cells, according to WHO protocols (World Health Organization, 2004). The reproductive capacity of isolate 45507 was tested at different temperatures (RCT test for 36.5 °C and 40 °C) at 8, 24 and 48 h post-infection in RD cells, in comparison to Sabin-2 (NIBSC code 01/530) and Sabin-3 (NIBSC code 01/532) reference strains. The RCT value is defined as the difference between the  $\log_{10}$  virus titre of the viral stock measured at the optimal temperature 36.5 °C and supraoptimal temperature 40 °C. The values are expressed as  $\log_{10}$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml. Viruses were considered thermosensitive (*ts* sensitive phenotype) if the  $\Delta$ RCT value was greater than or equal to 2, and

**Table 2.** Reproductive capacity of S3/S2 capsid recombinant 45507, Sabin-3 and Sabin 2 strains at different temperatures (RCT marker)

Data from representative experiment. Tests carried out in triplicate showed similar results.

Virus	Times p.i. (h)	Titres at 36.5 °C	Titres at 40 °C	ΔRCT
45507	8	7.8	3.7	4.1
	24	7.7	4.8	2.9
	48	6.9	4.5	2.4
Sabin 2	8	7.9	3.6	4.3
	24	7.8	3.8	4.0
	48	7.7	3.7	4.0
Sabin 3	8	7.4	2.7	4.7
	24	7.1	3.5	3.6
	48	6.9	3	3.9

thermoreistant when the RCT value was less than 2.00 (Nakano *et al.*, 1978).

Isolate 45507 was characterized as a type 3 Sabin-like poliovirus by real-time PCR assay. VP1 sequence analysis revealed a crossover junction placed in the 3'-end of the capsid coding region, at nucleotide positions 3251–3258 of the Sabin 3 genome (Fig. 1). The last 118 nt of the VP1 gene were found to have 100% identity with the Sabin-2 reference strain, which characterizes the virus 45507 as a natural intertypic S3/S2 vaccine-related capsid recombinant. The recombination event resulted in replacement of six capsid amino acid residues from the Sabin 3 genomic background to the Sabin 2 donor sequence: VP1-279, VP1-286, VP1-287, VP1-288, VP1-290 and VP1-293, which are located on the surface of the virion, as part of the antigenic site IIIa (Nag IIIa) of poliovirus capsid (Minor *et al.*, 1986), with implications for receptor binding and determination of virus serotype.

The nucleotide and amino acid changes between isolate 45507 and the respective Sabin strains are presented in Table 1. The entire genome of isolate 45507 comprises 7431 nucleotides plus the polyA tail, with an open reading frame of 2207 amino acids. No other recombination junction was encountered throughout the genome (Fig. 1a). There were 22 nucleotide substitutions throughout the genome. A total of seven amino acid substitutions were noted, all placed before the crossover site, in the Sabin 3 background.

There are three main determinants of the attenuated phenotype in Sabin 3 genomes: nucleotides (nt) 472 (5'-UTR), 2034 (VP3aa91) and 2493 (VP1aa6) (Westrop *et al.*, 1989). Importantly, two of them in isolate 45507, nt 472 in the domain V of the 5'-UTR (U-to-C) and nt 2493 in the VP1 coding region (C-to-U, which leads to a Thr-to-Ile amino acid substitution in VP1aa6), had reverted to sequences present in the neurovirulent precursor of Sabin 3, P3/Leon/

USA/1937 (Minor *et al.*, 1993; Westrop *et al.*, 1989). These mutations are associated with the increased neurovirulence of Sabin 3 strains (Minor, 1992; Rezapkin *et al.*, 1995). The U-to-C reversion in the determinant for attenuation nt 2034, which leads to a Phe-to-Ser mutation in VP3aa91, was not found in isolate 45507. However, isolate 45507 contains a U-to-A mutation in nt 2033, resulting in a Phe-to-Ile mutation in VP3aa91, which is not found in the neurovirulent precursor P3/Leon/USA/1937 nor in Sabin 3 sequences. The Phe-to-Ser mutation in residue VP3aa91 is known to restore a defect in virus assembly (Macadam *et al.*, 1989). More studies are needed to understand the impact of the Phe-to-Ile substitution described in VP3aa91 of isolate 45507.

Additionally, isolate 45507 presented a mutation placed inside the NAg3b of isolate 45507 (G1991A), leading to the amino acid substitution Asp-to-Asn at position VP3aa76.

The evolution time of isolate 45507 was estimated from the differences presented in the P1/capsid sequence between virus 45507 and the Sabin 3 reference strain (the last 118 nt in the VP1 coding region, after the crossover site, were not considered for analysis). For the P1/capsid region of isolate 45507, the corrected proportion of synonymous substitutions per synonymous sites ( $K_s$ ) and total substitutions ( $K_t$ ) were 0.77% and 0.5%, respectively. By assuming the constant nucleotide substitution rates of 3.2% synonymous substitutions per synonymous sites per year, and 1.1% total substitutions per site per year in the P1/capsid region (Jorba *et al.*, 2008), we estimated the ages of evolution for isolate 45507 to be 87 days from the  $K_s$  clock and 165 days for the  $K_t$  clock. Since isolate 45507 has been replicating for a short time, it is suggested that the recombination event occurred soon after OPV administration, most probably during poliovirus replication in the primary vaccinee.

Isolate 45507 was fully neutralized with PV type 3 antisera, but polyclonal sera specific for PV type 1 or 2 did not neutralize its infectivity. Though alterations in antigenicity had not been noted with polyclonal serum, it is possible that insertion of the type 2 sequences of antigenic site IIIa in the capsid of virus 45507 might provide benefits for escaping serotype-specific antibodies during replication in the human gut, which could favour the enrichment of polio strains with chimeric VP1 capsid protein.

When compared to Sabin 3 and Sabin 2 strains regarding its capacity to replicate at elevated temperatures (RCT marker), the isolate maintained the *ts* phenotype characteristic of attenuated Sabin strains, presenting a greater than 2 log titre difference at 36.5 °C and at 40 °C (Table 2). Tests carried out in triplicate showed similar results. This result was similar to previous reports (Tao *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010), which also found capsid recombinants that had maintained the temperature sensitivity, suggesting that the recombination event has no direct impact on the RCT marker. However, it is noteworthy that, although the titre reduction of isolate 45507 at 8 h post-infection was quite significant, the ΔRCT at 24 or 48 h post-infection were

slightly lower than Sabin strains, suggesting that during evolution of isolate 45507, its temperature sensitivity was somewhat weakened. It had been reported that the temperature sensitivity phenotype of type 3 poliovirus is strongly attributable to a difference in residue 91 of the VP3 capsid protein (Minor *et al.*, 1989). Residue 91 of VP3 in the 45507 isolate does present an amino acid substitution (Phe-to-Ile), but it is not a reversion to the serine residue present in the neurovirulent precursor P3/Leon/USA/1937. It is suggested that the mutation at residue 91 of VP3 acts with one or more unidentified additional mutations to generate the full *ts* phenotype of the Sabin type 3 vaccine strain (Minor *et al.*, 1989). Fig. 1b shows all crossover sites in S3/S2 recombinants described so far in the literature. The crossover junction 3251–3258 nt found in isolate 45507 is the same as that described by Martín *et al.* (2002) in isolate 31043. It represents the second larger Sabin 2 donated sequence to a Sabin 3 genome. Also, strain 45507 was simpler in that it had only one crossover site throughout the entire genome, representing the longest Sabin 2 sequence ever reported to be naturally inserted in a Sabin 3 background.

Besides the crossover junction 3251–3258 nt, only the crossover sites 3233–3240 nt, 3275–3285 nt and 3314–3321 nt have been described in more than one S3/S2 capsid recombinant isolate (four isolates, four isolates and three isolates, respectively). The recurrent report of these regions as crossover junctions in S3/S2 recombinants suggests that the tail region of VP1 capsid protein is a viable site for S3/S2 capsid recombination events, and that these are the preferable recombination sites. The authors believe that, as was previously proposed by Blomqvist and colleagues (Blomqvist *et al.*, 2010) and is reinforced by the present findings, the tail of the VP1 coding region works as a capsid hotspot for the formation of viable capsid recombinants.

## Acknowledgements

This work was supported by the National Council for Scientific and Technological Development in Brazil (CNPq) and the Oswaldo Cruz Foundation. The authors would like to thank Amanda Neves, Cristiane Souza, Jaqueline das Graças, Valdemar de Paula, Elaine Silva and Silas Oliveira for their technical assistance.

## References

- Blomqvist, S., Bruu, A. L., Stenvik, M. & Hovi, T. (2003). Characterization of a recombinant type 3/type 2 poliovirus isolated from a healthy vaccinee and containing a chimeric capsid protein VP1. *J Gen Virol* **84**, 573–580.
- Blomqvist, S., Savolainen-Kopra, C., Paananen, A., El Bassioni, L., El Maamoun Nasr, E. M., Firstova, L., Zamiatina, N., Kutateladze, T. & Roivainen, M. (2010). Recurrent isolation of poliovirus 3 strains with chimeric capsid protein Vp1 suggests a recombination hot-spot site in Vp1. *Virus Res* **151**, 246–251.
- Cai, J. J., Smith, D. K., Xia, X. & Yuen, K. Y. (2005). MBEToolbox: a MATLAB toolbox for sequence data analysis in molecular biology and evolution. *BMC Bioinformatics* **6**, 64.
- Cai, J. J., Smith, D. K., Xia, X. & Yuen, K. Y. (2007). MBEToolbox 2.0: an enhanced version of a MATLAB toolbox for molecular biology and evolution. *Evol Bioinform Online* **2**, 179–182.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009). Laboratory surveillance for wild and vaccine-derived polioviruses - worldwide, January 2008-June 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **58**, 950–9954.
- Cuervo, N. S., Guillot, S., Romanenkova, N., Combiescu, M., Aubert-Combiescu, A., Seghier, M., Caro, V., Crainic, R. & Delpeyroux, F. (2001). Genomic features of intertypic recombinant sabin poliovirus strains excreted by primary vaccinees. *J Virol* **75**, 5740–5751.
- Dedepisdid, E., Pliaka, V., Kyriakopoulou, Z., Brakoulis, C., Levidiotou-Stefanou, S., Pratti, A., Mamuris, Z. & Markoulatos, P. (2008). Complete genomic characterization of an intertypic Sabin 3/Sabin 2 capsid recombinant. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 343–351.
- Dedepisdid, E., Kyriakopoulou, Z., Pliaka, V. & Markoulatos, P. & Markoulatos, P. (2010). Correlation between recombination junctions and RNA secondary structure elements in poliovirus Sabin strains. *Virus Genes* **41**, 181–191.
- Egger, D. & Bienz, K. (2002). Recombination of poliovirus RNA proceeds in mixed replication complexes originating from distinct replication start sites. *J Virol* **76**, 10960–10971.
- Goldman, N. & Yang, Z. (1994). A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol Biol Evol* **11**, 725–736.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41**, 95–98.
- Jorba, J., Campagnoli, R., De, L. & Kew, O. (2008). Calibration of multiple poliovirus molecular clocks covering an extended evolutionary range. *J Virol* **82**, 4429–4440.
- Karakasiliotis, I., Markoulatos, P., Katsorchis, T., Markoulatos, P. & Katsorchis, T. (2004). Site analysis of recombinant and mutant poliovirus isolates of Sabin origin from patients and from vaccinees. *Mol Cell Probes* **18**, 103–109.
- Kohara, M., Omata, T., Kameda, A., Semler, B. L., Itoh, H., Wimmer, E. & Nomoto, A. (1985). *In vitro* phenotypic markers of a poliovirus recombinant constructed from infectious cDNA clones of the neurovirulent Mahoney strain and the attenuated Sabin 1 strain. *J Virol* **53**, 786–792.
- Kohara, M., Abe, S., Komatsu, T., Tago, K., Arita, M. & Nomoto, A. (1988). A recombinant virus between the Sabin 1 and Sabin 3 vaccine strains of poliovirus as a possible candidate for a new type 3 poliovirus live vaccine strain. *J Virol* **62**, 2828–2835.
- Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W. & Ray, S. C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J Virol* **73**, 152–160.
- Macadam, A. J., Arnold, C., Howlett, J., John, A., Marsden, S., Taffs, F., Reeve, P., Hamada, N., Wareham, K. & other authors (1989). Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virology* **172**, 408–414.
- Martin, J., Samoilovich, E., Dunn, G., Lackenby, A., Feldman, E., Heath, A., Svirchevskaya, E., Cooper, G., Yermalovich, M. & other authors (2002). Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* **76**, 10921–10928.
- Minor, P. D., Ferguson, M., Evans, D. M., Almond, J. W. & Icenogle, J. P. (1986). Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1, 2 and 3. *J Gen Virol* **67**, 1283–1291.

- Minor, P. D., Dunn, G., Evans, D. M., Magrath, D. I., John, A., Howlett, J., Phillips, A., Westrop, G., Wareham, K. & other authors (1989). The temperature sensitivity of the Sabin type 3 vaccine strain of poliovirus: molecular and structural effects of a mutation in the capsid protein VP3. *J Gen Virol* **70**, 1117–1123.
- Minor, P. D. (1992). The molecular biology of poliovaccines. *J Gen Virol* **73**, 3065–3077.
- Minor, P. D. (1993). Attenuation and reversion of the Sabin vaccine strains of poliovirus. *Dev Biol Stand* **78**, 17–26.
- Mueller, J. E., Bessaud, M., Huang, Q. S., Martinez, L. C., Barril, P. A., Morel, V., Balanant, J., Bocacao, J., Hewitt, J. & other authors (2009). Environmental poliovirus surveillance during oral poliovirus vaccine and inactivated poliovirus vaccine use in Córdoba Province, Argentina. *Appl Environ Microbiol* **75**, 1395–1401.
- Nakano, J. H., Hatch, M. H., Thieme, M. L., Nottay, B. & Milford, M. H. (1978). Parameters for differentiating vaccine-derived and wild poliovirus strains. *Prog Med Virol* **24**, 178–206.
- Paximadi, E., Karakasiliotis, I., Mamuris, Z., Stathopoulos, C., Krikelis, V. & Markoulatos, P. (2006). Genomic analysis of recombinant Sabin clinical isolates. *Virus Genes* **32**, 203–210.
- Pliaka, V., Kyriakopoulou, Z., Tsakogiannis, D., Ruether, I. G., Gartzonika, C., Levidiotou-Stefanou, S., Krikelis, A., Markoulatos, P. & Ruether, I. G. (2010). Correlation of mutations and recombination with growth kinetics of poliovirus vaccine strains. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **29**, 1513–1523.
- Rezapkin, G. V., Norwood, L. P., Taffs, R. E., Dragunsky, E. M., Levenbook, I. S. & Chumakov, K. M. (1995). Microevolution of type 3 Sabin strain of poliovirus in cell cultures and its implications for oral poliovirus vaccine quality control. *Virology* **211**, 377–384.
- Rico-Hesse, R., Pallansch, M. A., Nottay, B. K. & Kew, O. M. (1987). Geographic distribution of wild poliovirus type 1 genotypes. *Virology* **160**, 311–322.
- Savolainen-Kopra, C. & Blomqvist, S. (2010). Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev Med Virol* **20**, 358–371.
- Simmonds, P. & Welch, J. (2006). Frequency and dynamics of recombination within different species of human enteroviruses. *J Virol* **80**, 483–493.
- Simon-Loriere, E. & Holmes, E. C. (2011). Why do RNA viruses recombine? *Nat Rev Microbiol* **9**, 617–626.
- Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol Biol Evol* **9**, 678–687.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipowski, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729.
- Tao, Z., Wang, H., Xu, A., Zhang, Y., Song, L., Zhu, S., Li, Y., Yan, D., Liu, G. & other authors (2010). Isolation of a recombinant type 3/type 2 poliovirus with a chimeric capsid VP1 from sewage in Shandong, China. *Virus Res* **150**, 56–60.
- Westrop, G. D., Wareham, K. A., Evans, D. M., Dunn, G., Minor, P. D., Magrath, D. I., Taffs, F., Marsden, S., Skinner, M. A. & other authors (1989). Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J Virol* **63**, 1338–1344.
- World Health Organization (2004). *Polio Laboratory Manual WHO/IVB/04*, 4th edn, Geneva, Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization, Vaccine and Biologicals. Global Poliomyelitis Eradication Initiative (2006). Polio Lab Network Quarterly Update. New test algorithm to be implemented in 2007. XIII (issue 4). Available at: [http://apps.who.int/immunization\\_monitoring/VolXIIIIDec06.pdf?ua=1](http://apps.who.int/immunization_monitoring/VolXIIIIDec06.pdf?ua=1).
- Zhang, Y., Zhu, S., Yan, D., Liu, G., Bai, R., Wang, D., Chen, L., Zhu, H., An, H. & other authors (2010). Natural type 3/type 2 intertypic vaccine-related poliovirus recombinants with the first crossover sites within the VP1 capsid coding region. *PLoS One* **5**, e15300.