



# Padronização de teste para quantificar anticorpos anti-poliovírus utilizando vírus vacinal

## Standardization of a test for quantifying the antibodies against poliovirus using the vaccine virus

RIALA6/1768

Elaine dos Santos LIMA<sup>1</sup>, Maria Isabel de MORAES-PINTO<sup>2</sup>, Roberta Morozetti BLANCO<sup>1</sup>, Celso Francisco Hernandes GRANATO<sup>3</sup>, Eliete Caló ROMERO<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, Brasil, Av. Dr Arnaldo, 351, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-902. Tel: 11 3068 2897. E-mail: [eliete\\_romero@yahoo.com.br](mailto:eliete_romero@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Laboratório de Virologia, Divisão de Doenças Infecciosas Universidade Federal de São Paulo

<sup>3</sup>Laboratório de Pesquisas, Disciplina de Infectologia Pediátrica, Universidade Federal de São Paulo

Recebido: 11.07.2018 - Aceito para publicação: 15.03.2019

### RESUMO

A poliomielite é uma doença endêmica no Afeganistão e no Paquistão, apesar dos esforços para ser erradicada, representando uma ameaça para outros países principalmente devido às viagens internacionais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem como objetivo erradicar a poliomielite causada pelo poliovírus selvagem no mundo. O requisito essencial para a erradicação da poliomielite é a eliminação da cepa do poliovírus selvagem, que é empregada no teste padrão-ouro. Com o intuito de auxiliar na erradicação do poliovírus selvagem, o objetivo deste estudo foi modificar o teste padrão-ouro usando o poliovírus derivado da vacina oral atenuada. Foram testados 63 soros pelo ensaio de neutralização utilizando-se antígenos vacinais. A concordância do sorotipo 1 ( $k=0,74$ ) foi considerada substancial, enquanto o sorotipo 2 ( $k=1,00$ ) e sorotipo 3 ( $k= 0,95$ ) foram consideradas quase perfeitas. A sensibilidade dos testes de soroneutralização utilizando os sorotipos 1, 2 e 3 foi de 94,83%, 100,00% e 100,00%, respectivamente. Em conclusão, o ensaio com antígenos vacinais pode ser usado como procedimento laboratorial seguro, especialmente em estudos de vigilância em larga escala.

**Palavras-chave.** poliovírus, poliovírus selvagem, poliomielite, poliovírus vacinal.

### ABSTRACT

Poliomyelitis is an endemic disease in Afghanistan and Pakistan in despite of the efforts to eradicate it, and it represents a threat to other countries mainly due to the international trips. The World Health Organization (WHO) aims at eradicating the polio disease worldwide. An essential requirement for eradicating the poliomyelitis is the elimination of the wild poliovirus strain, which is employed in the gold standard test. As a support for the eradication of wild poliovirus, the present study aimed at modifying the gold standard test by using poliovirus derived from the oral attenuated vaccine. Sixty-three sera samples were tested by neutralization assay using vaccine antigens. The degree of agreement of the serotype 1 ( $k=0.74$ ) was considered substantial, while the serotype 2 ( $k=1.00$ ) and 3 ( $k= 0.95$ ) showed almost perfect agreement. The sensitivity of serotypes 1, 2 and 3 was 94.83%, 100.00% and 100.00%, respectively. In conclusion, the assay with the vaccine antigens can be used as a safe application, especially for large-scale surveillance studies.

**Keywords.** poliovirus, wild poliovirus, poliomyelitis, poliovirus vaccine.

## INTRODUÇÃO

A poliomielite é uma doença que pode causar paralisia flácida dos membros inferiores, paralisia na via respiratória e óbitos. É causada pelo poliovírus, membro da família *Picornaviridae*, gênero *Enterovirus*<sup>1</sup>. Esses vírus possuem formato esférico, com o capsídeo constituído por quatro polipeptídios estruturais (VP1, VP2, VP3 e VP4), que se organizam com simetria icosaédrica e contém RNA acondicionado em seu interior<sup>2</sup>. Os poliovírus são classificados em sorotipos 1, 2 e 3 com base em diferentes determinantes antigênicos presentes no capsídeo viral<sup>2</sup>. Durante séculos, grande parte da população mundial foi atingida pela poliomielite e apenas após a introdução da vacina é que houve a redução do número de casos<sup>3</sup>.

Existem dois tipos de vacinas contra a poliomielite: a Sabin - vacina oral contendo vírus atenuados<sup>4</sup> e a Salk-vacina injetável contendo vírus inativados<sup>3</sup>. A vacina oral poliomielite (VOP) é mais fácil de ser administrada, porém, apesar de raro, pode ocorrer a reversão da virulência e causar paralisia associada aos vírus vacinais<sup>5,6</sup>. A reversão da virulência pode ocorrer também em pacientes com imunodeficiência primária, pois excretam o poliovírus vacinais por períodos extremamente prolongados, tornando-os capazes de causar infecção na população susceptível<sup>7,8</sup>. No Brasil estima-se que ocorra um caso em 5 milhões de reversão de virulência na primeira dose de vacinação e de um caso em 10 milhões, nas doses subsequentes<sup>9</sup>. Com o intuito de minimizar os riscos da paralisia associada à vacina, houve a alteração do esquema vacinal contra pólio em 2012, com a introdução da vacina inativada poliomielite (VIP), em esquema sequencial com três doses da VIP e duas doses da VOP<sup>10</sup>.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) permanece com a incumbência de efetuar o monitoramento e as diversas ações para conter os surtos. Porém, mesmo após décadas de campanhas de vacinação e de esforços globais para erradicar esses vírus, eles permanecem endêmicos no Afeganistão e Paquistão<sup>11</sup>. De janeiro de 2017 a maio de 2018, foram reportados 31 casos de poliomielite causados pelo poliovírus 1, sendo 22 casos no Afeganistão e 9 no Paquistão<sup>11</sup>. Atualmente o poliovírus tipo 1 é o único sorotipo selvagem em circulação<sup>12</sup>. Desde 1999 não se detecta o sorotipo 2<sup>12</sup>. O último caso de identificação do poliovírus selvagem tipo 3 ocorreu na Nigéria, em 2012<sup>13</sup>.

Esses surtos de poliomielite aumentam o risco de transmissão do poliovírus selvagem para outras áreas, e impedem a erradicação<sup>12</sup>. Além disso, há a possibilidade de disseminação do vírus de tipo selvagem, devido à sua manipulação em procedimentos laboratoriais<sup>14</sup>. Neste contexto, a OMS desenvolveu estratégias que visam a contenção dos poliovírus selvagem em todo o mundo, proibindo os laboratórios de utilizarem essa cepa no diagnóstico laboratorial da poliomielite<sup>14,15</sup>. A metodologia utilizada é o teste de soroneutralização que quantifica os anticorpos neutralizantes contra o poliovírus nas amostras de soro de pacientes<sup>15</sup>. Este é o teste padrão-ouro empregado para avaliar a resposta imune induzida pela administração oral ou parenteral de imunógenos, principalmente em situações em que são avaliados os pacientes com imunodeficiência<sup>16</sup>. Atualmente, não existem alternativas disponíveis para este fim. Uma possibilidade seria usar o poliovírus em sua forma atenuada, presente na vacina oral Sabin, como alternativa simples e segura em comparação ao procedimento tradicional. Desta forma, o diagnóstico e a avaliação imunológica dos pacientes não seriam prejudicados e a contenção laboratorial poderia ser concluída de forma segura.

Os objetivos deste estudo foram padronizar a técnica de soroneutralização utilizando-se os vírus atenuados vacinais provenientes da vacina oral Sabin; desenvolver a produção destes vírus atenuados a partir de cultura de células e comparar o resultado do teste de soroneutralização utilizando-se poliovírus vacinais (metodologia vacinal) com o do teste de soroneutralização, que emprega o antígeno selvagem (metodologia selvagem).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Expansão dos antígenos vacinais em cultura de células para a técnica de soroneutralização

#### *Cultivo Celular*

O cultivo de células foi realizado seguindo-se as recomendações do Manual da Poliomielite<sup>15</sup>. Foram utilizadas as células HEp-2 cultivadas em meio RPMI (meio Roswell Park Memorial Institute - Gibco/Invitrogen-EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco/Invitrogen-EUA) e estreptomicina 0,1% (Gibco/Invitrogen-EUA), em garrafas plásticas estéreis de fundo chato e descartáveis. O meio de crescimento

foi removido das culturas e o tapete de células formado no fundo da garrafa foi lavado com 5 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS) estéril. Após a remoção do PBS, foi adicionado 1 mL de reagente tripsina (Gibco/Invitrogen-EUA), para efetuar a dispersão celular; em seguida, a garrafa foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. Para realizar a interrupção da atividade enzimática da tripsina sobre as células foram adicionados 20 mL de meio de cultura contendo 10% de SFB (soro fetal bovino). As suspensões de células obtidas foram homogeneizadas, e 10 mL transferidos para as respectivas garrafas (repique 1:2). As garrafas foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub>, e as células foram repicadas a cada dois dias.

#### *Inoculação de poliovírus vacinais 1, 2 e 3 em culturas de células HEp-2*

Para a inoculação dos vírus vacinais na cultura de célula HEp-2, foram utilizadas garrafas contendo células com formação de tapete no fundo da garrafa. O meio de crescimento foi descartado, e as células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS estéril. Em seguida foram adicionados 100 µL de vacina oral de Sabin contendo concentração viral média de 7,6 log. Este procedimento foi repetido para cada um dos sorotipos virais. As garrafas foram incubadas durante 30 minutos a 37 °C e levemente agitadas a cada 10 minutos. Após o período de incubação e adsorção viral, foi adicionado 1 mL de meio RPMI contendo 1% de SFB. As garrafas foram novamente incubadas durante 24 horas.

Para favorecer o desenvolvimento celular e a multiplicação viral, foram feitas a troca do meio e o aumento da concentração do SFB para 5%. Os poliovírus, após a penetração nas células e multiplicação, ocasionaram alterações morfológicas e fisiológicas chamadas de efeito citopático. Como houve pouca expressão do efeito citopático após 24 horas de incubação, as garrafas foram incubadas novamente a 37°C por mais 24 horas, quando foi observado um intenso efeito citopático. O tapete celular contendo os vírus foi removido, e a suspensão de células foi homogeneizada com movimentos circulares. Em seguida, este material foi transferido para criotubos, que foram congelados em freezer a -80 °C, com o intuito de interromper o processo de destruição celular e manter a conservação dos vírus para a próxima etapa experimental.

#### **Quantificação de anticorpos neutralizantes do soro anti-poliiovírus**

Para efetuar a padronização da técnica utilizando-se os vírus vacinais, foi determinada a dose que infecta 50% das células (TCID<sub>50</sub>- *Tissue culture infective dose*), isto é, a menor quantidade de suspensão viral capaz de produzir a doença no hospedeiro susceptível ou de induzir o efeito citopático em culturas celulares. O cálculo da dose infectante com 50% de letalidade foi feito de acordo com Reed e Muench<sup>17</sup>. Como o Manual da Poliomielite<sup>15</sup> recomenda o uso de dose de 100 TCID<sub>50</sub>, esta quantidade foi utilizada no presente trabalho. Após a determinação de dose de 100 TCID<sub>50</sub> para cada sorotipo de poliovírus vacinal, o teste de soroneutralização foi processado usando-se os vírus vacinais e 63 amostras de soro de pacientes previamente avaliados pela metodologia padrão-ouro de soroneutralização e que apresentavam diferentes concentrações de anticorpos anti-poliiovírus selvagem. A análise foi realizada sem o conhecimento prévio dos resultados. Essas amostras de soro são oriundas do banco de soros do Fleury Diagnósticos e foram armazenadas em temperatura de -20 °C até o momento do uso.

Para efetuar esta técnica, os soros dos pacientes foram previamente inativados em banho-maria a 56°C por 30 minutos. Aliquotas de 25 µL de meio RPMI foram adicionadas nos poços da placa de microtitulação (Corning, EUA). Os soros dos pacientes, diluídos na razão 2 de 1:8 a 1:1024, foram distribuídos nas respectivas cavidades da placa. Em seguida, foram adicionados 100 µL de células 100 TCID<sub>50</sub>. Foram utilizados três poços para o controle negativo, contendo somente 25 µL de solução salina (PBS) e três poços como controle positivo, contendo somente 25 µL de 100 TCID<sub>50</sub> virais. Estes procedimentos foram repetidos para cada sorotipo de poliovírus estudado. A placa foi vedada e incubada em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante duas horas. Após esta etapa, as células HEp-2 foram acrescentadas na concentração de 200.000/mL. As placas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 48 horas. A leitura da reação foi realizada em microscópio óptico comum.

Os resultados foram considerados positivos quando os testes apresentaram títulos iguais ou superiores a 8 e negativos quando os títulos da reação foram menores do que 8. A presença de efeito citopático indica que o paciente não possui anticorpos capazes de neutralizar a ação do vírus (resultado <8). A ausência de efeito citopático significa que o paciente possui anticorpos capazes de neutralizar a ação viral (resultado ≥ 8).

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP 1589/08).

### Análise estatística

Como a avaliação de desempenho de um teste diagnóstico depende da ausência de desvios ou viés, além da análise de confiabilidade do teste, foram calculados os seguintes parâmetros: índice Kappa, exatidão, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e prevalência, além dos respectivos intervalos de confiança de 95%<sup>18-20</sup>. As análises estatísticas foram realizadas utilizando MedCalc para Windows, versão 15.1 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). O índice Kappa foi calculado utilizando GraphPad QuickCalcs Web site.

## RESULTADOS

Os resultados da expansão dos vírus em cultura de células HEp-2 possibilitou a produção de vírus vacinais e o estoque deste material foi utilizado na padronização da metodologia vacinal. Foram avaliadas 63 amostras

previamente analisadas pela metodologia selvagem para detecção de anticorpos anti-poliovírus tipos 1, 2 e 3. A metodologia selvagem apresentou resultados negativos em 5 amostras para detecção de anticorpos anti-poliovírus tipo 1, em 3 amostras para o tipo 2 e em 15 amostras para o tipo 3. Avaliando os resultados da metodologia vacinal em comparação à metodologia selvagem, foi demonstrado que para o poliovírus 1, 22 amostras apresentaram títulos discordantes e os títulos concordantes foram detectados em 41 amostras. Para o poliovírus 2 houve 21 amostras discordantes e 42 concordantes, e para o poliovírus 3 foram 18 discordantes e 45 concordantes. Na avaliação dos títulos discordantes, a diferença encontrada na maioria das amostras não ultrapassou um título. Esta diferença é aceitável e pode ocorrer quando se trata de teste de neutralização. Desconsiderando a discordância das amostras que apresentaram somente um título de diferença, as metodologias apresentaram resultados concordantes em 57 amostras para o poliovírus 1 e em 61 amostras para os poliovírus 2 e 3. A comparação entre as duas metodologias, selvagem e vacinal, está demonstrada na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Resultados das metodologias selvagem e vacinal realizadas com 63 amostras de soro

Amostra	Reação de soroneutralização					
	Cepa selvagem			Cepa vacinal		
	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3
1	64	256	256	64	512	256
2	64	128	128	64	128	256
3	8	16	8	16	16	8
4	128	1024	128	128	512	128
5	256	64	16	256	128	128
6	64	64	< 8	64	32	< 8
7	< 8	64	< 8	< 8	64	16
8	512	1024	512	512	1024	256
9	64	512	64	64	512	64
10	16	32	1024	128	512	1024
11	1024	1024	256	1024	1024	256
12	32	32	< 8	32	32	< 8
13	16	16	8	16	16	8
14	64	< 8	< 8	64	< 8	< 8
15	64	128	8	64	128	8
16	64	< 8	< 8	64	< 8	< 8
17	8	16	8	8	8	8
18	64	128	< 8	64	64	< 8

*Continua na página 5/9*

Amostra	Cepa selvagem			Cepa vacinal		
	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3
19	32	64	32	32	64	32
20	128	64	256	64	64	128
21	< 8	8	< 8	< 8	8	< 8
22	256	64	256	128	64	256
23	1024	1024	256	1024	1024	512
24	512	256	128	512	128	256
25	16	64	< 8	16	64	< 8
26	512	128	16	512	128	16
27	8	16	16	16	8	16
28	8	16	8	8	16	8
29	32	64	64	32	64	128
30	8	128	16	< 8	128	8
31	32	64	128	64	64	256
32	16	64	< 8	16	64	< 8
33	128	64	256	128	64	128
34	32	64	64	16	32	64
35	64	256	128	64	128	64
36	32	64	32	16	32	16
37	16	64	< 8	< 8	64	< 8
38	64	8	32	32	8	16
39	1024	1024	1024	1024	1024	1024
40	128	128	128	128	128	256
41	128	1024	1024	128	1024	1024
42	64	128	< 8	64	16	< 8
43	512	128	16	512	64	32
44	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8	< 8
45	1024	1024	1024	1024	512	1024
46	8	16	32	< 8	8	32
47	32	64	32	16	32	64
48	128	64	64	128	64	32
49	64	1024	32	16	1024	32
50	512	256	64	512	128	64
51	32	512	64	32	512	64
52	128	128	256	64	128	256
53	128	128	16	64	64	16
54	64	32	32	8	32	32
55	128	256	16	64	256	16
56	32	64	16	16	64	16
57	256	64	256	128	64	256

*Continua na página 6/9*

Amostra	Cepa selvagem			Cepa vacinal		
	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3
58	1024	1024	256	1024	1024	256
59	< 8	8	< 8	< 8	16	< 8
60	< 8	64	< 8	< 8	32	< 8
61	256	128	32	128	128	32
62	256	64	32	256	64	32
63	16	8	< 8	8	8	< 8

Para fins de análises estatísticas foram calculados exatidão, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, prevalência e

os respectivos intervalos de confiança de 95%, utilizando-se a metodologia selvagem como referência. Os resultados encontrados estão apresentados na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Avaliação da metodologia vacinal

	Reação de soroneutralização		
	Poliovírus tipo 1	Poliovírus tipo 2	Poliovírus tipo 3
Exatidão	95,24%	100,00%	98,41%
(95%IC)	(86,71 a 99,01%)	(94,31 a 100,00%)	(91,47 a 99,96%)
Sensibilidade	94,83%	100,00%	100,00%
(95%IC)	(85,62 a 98,92%)	(94,04 a 100,00%)	(92,60 a 100,00%)
Especificidade	100,00%	100,00%	93,33%
(95%IC)	(47,82 a 100,00 %)	(29,24 a 100,00 %)	(68,05 a 99,83%)
Valor preditivo positivo	100,00%	100,00%	97,96%
(95%IC)	(100,00 a 100,00%)	(100,00 a 100,00%)	(87,84 a 99,69%)
Valor preditivo negativo	62,50%	100,00%	100,00%
(95%IC)	(35,64 a 83,38%)	(100,00 a 100,00%)	(100,00 a 100,00%)
Prevalência	92,06%	95,24%	76,19 %
(95%IC)	(82,44 a 97,37%)	(86,71 a 99,01%)	(63,79 a 86,02%)

O índice Kappa foi empregado para efetuar a análise da confiabilidade dos testes. Os valores obtidos foram de 0,74 (95% IC= 0,47-1,00) para o poliovírus tipo 1, 1,00 (95% IC= 1,00-1,00) para o tipo 2 e 0,95 (95% IC= 0,87-1,00) para o tipo 3.

## DISCUSSÃO

A contenção adequada do poliovírus selvagem nos laboratórios é fator importante para fins de erradicação. Por estas razões, em 2003 a Organização Mundial de Saúde publicou o Plano Mundial de Ação para a Contenção de Poliovírus Selvagem em Laboratórios, que

promove uma série de medidas de segurança, com escopo global para evitar a reintrodução de poliovírus selvagem na comunidade<sup>14</sup>. Na América Latina, os últimos casos de poliomielite do tipo selvagem ocorreram em 1989 no Brasil e em 1991 no Peru. Mesmo após receber o Certificado de Erradicação da Poliomielite, o Brasil mantém a vigilância para novos casos de paralisia flácida aguda<sup>21</sup>.

Com base nos requisitos da OMS e consciente da importância de utilizar um teste de sorodiagnóstico seguro, para a comunidade e para laboratoristas, o presente estudo avaliou um novo componente para padronizar o teste de soroneutralização, utilizando-se as estirpes de vacina. Todo o processo seguiu as diretrizes do Manual da Poliomielite<sup>15</sup>.



Pela análise do resultado do teste de soroneutralização empregando-se o poliovírus tipo 1 vacinal, foi demonstrada sua alta sensibilidade (94,83%), o que indica que o teste é adequado para detectar a presença de pequenas quantidades de anticorpos específicos. A especificidade para o poliovírus 1 foi de 100,00% não tendo apresentado nenhum resultado falso positivo. O valor preditivo negativo foi satisfatório (62,50%), porém o valor preditivo positivo (100,00%) e a prevalência (92,06%) apresentaram valores elevados, pois a maioria dos pacientes apresentou resultados positivos, confirmando-se o estado imunológico contra o poliovírus 1, que mostrou ser altamente imunogênico. O teste apresentou alta precisão, o que indica alta confiabilidade no resultado final e valida o procedimento em questão.

Ao avaliar o teste empregando-se a vacina de poliovírus tipo 2, o dado obtido foi muito próximo aos resultados de soroneutralização realizada com a cepa selvagem (exatidão, sensibilidade, especificidade e valores preditivos de 100%). O teste em estudo não apresentou reações falsamente positivas e/ou falsamente negativas, e os resultados obtidos foram muito semelhantes ao de teste de referência. Comparando-se os testes que utilizaram o poliovírus 3, observou-se maior número de resultados negativos, o que reduziu a soroprevalência (76,19%). O sorotipo 3 é considerado menos imunogênico em comparação ao poliovírus 1 e 2<sup>22</sup> e este fato foi confirmado no presente estudo. Para esse sorotipo, foram observadas alta sensibilidade (100,00%), especificidade (93,33%), valores preditivos positivos (97,96%) e negativos (100,00%) e exatidão (98,41%), apropriadas para teste laboratorial com bom desempenho. As comparações feitas por meio de índice Kappa permitiram concluir que há bom acordo entre os testes, variando-se de concordância substancial a quase perfeita.

Desde os primeiros estudos publicados sobre as técnicas de soroneutralização têm sido observadas pequenas diferenças entre os resultados obtidos do teste de neutralização utilizando-se diferentes estirpes de poliovírus. Paul e Trask<sup>23</sup> avaliaram duas diferentes estirpes selvagens e concluíram que havia diferença de aproximadamente 25% entre os testes de soroneutralização empregando-se diferentes cepas de poliovírus. Howitt<sup>24</sup> ao utilizar o teste de soroneutralização, para avaliar o estado imunológico de indivíduos saudáveis e doentes, mostrou a ausência de diferenças significativas no teste de neutralização, independentemente das estirpes utilizadas. O presente estudo apresentou alto grau de concordância entre o teste de referência e aquele que utiliza o vírus da vacina. As várias passagens em cultura celular das

estirpes selvagens utilizadas no laboratório de referência, que têm ocorrido ao longo dos últimos 30 anos, podem ter atenuado a ação viral, tornando muito próximo o desempenho dos testes de soroneutralização.

Diversos testes foram desenvolvidos com o objetivo de serem mais rápidos que o teste de soroneutralização e não utilizarem vírus vivos para sua realização, porém os resultados demonstraram menores valores de sensibilidade, principalmente em soros com títulos baixos, não sendo recomendada a substituição do teste de soroneutralização por estes testes<sup>25-28</sup>.

Baseando-se nos resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que esta técnica poderia ser utilizada nos trabalhos de rotina de laboratórios clínicos. Esta conduta poderia proporcionar uma boa alternativa para substituir as cepas de tipo selvagem no atual procedimento de avaliação do estado vacinal e da resposta imunológica para os três sorotipos virais. A avaliação da imunidade é muito importante principalmente para os pacientes imunodeprimidos, como os pacientes HIV positivos e os indivíduos que realizaram transplante de medula óssea<sup>7</sup>. Para estes últimos pacientes, a reconstituição da imunidade é realizada por meio de revacinação. Desta forma, a dosagem periódica dos anticorpos anti-poliovírus é utilizada para verificar a eficácia do organismo em produzir proteção contra o poliovírus<sup>16</sup>.

Devido à alta cobertura vacinal brasileira para poliovírus, o estudo apresentou limitações quanto ao número de soros negativos utilizados nas análises estatísticas para avaliação do desempenho do teste estudado.

A utilização da metodologia vacinal permitiria o uso seguro do teste de soroneutralização em laboratórios de pesquisa e de diagnóstico, por mais alguns anos, até que a erradicação total do poliovírus seja realizada. Provavelmente, este fato ocorrerá quando qualquer manipulação de cepas de poliovírus, mesmo atenuadas, for futuramente proibida. Os resultados do presente estudo demonstram que o uso desta nova abordagem, baseada na soroneutralização do vírus atenuado da vacina oral Sabin, pode ser incorporado na prática em laboratórios para avaliar o estado de vacinação, além de ser apropriado nesta fase de erradicação global da poliomielite.

## AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Virologia-Unifesp, ao Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos da Fundação Oswaldo Cruz (Bio-Manguinhos/Fiocruz), por ceder as cepas vacinais, e

ao Fleury Diagnósticos, pela disponibilidade e cessão de amostras de soros dos pacientes e das células HEp-2. Financiamento da pesquisa: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP: 2008/58148-5)

## REFERÊNCIAS

1. Racaniello VR. The poliovirus receptor: a hook, or an unzipper? *Structure*. 1996;4(7):769-73. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00083-4](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00083-4)
2. Hogle JM, Chow M, Filman DJ. The structure of poliovirus. *Sci Am*. 1987;256(3):42-9. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0387-42>
3. Salk JE. Studies in human subjects on active immunization against poliomyelitis. I. A preliminary report of experiments in progress. *J Am Med Assoc*. 1953;151(13):1081-98.
4. Sabin AB. Properties and behavior of orally administered attenuated poliovirus vaccine. *J Am Med Assoc*. 1957;164(11):1216-23. <https://doi.org/10.1001/jama.1957.62980110008008>
5. Friedrich F. Rare adverse events associated with oral poliovirus vaccine in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(6):695-703. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1997000600001>
6. 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;257(10):1335-40. <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1987.03390100073029>
7. Costa-Carvalho BT, Sullivan KE, Fontes PM, Aimé-Nobre F, Gonzales IGS, Lima ES et al. Low rates of poliovirus antibodies in primary immunodeficiency patients on regular intravenous immunoglobulin treatment. *J Clin Immunol*. 2018;38(5):628-34. <https://doi.org/10.1007/s10875-018-0531-x>
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;36(10):2893-9.
9. Dias-Tosta E, Kückelhaus CS. Neurological morbidity in vaccine-associated paralytic poliomyelitis in Brazil from 1989 up to 1995. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62(2):414-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-282X2004000300008>
10. Ministério da Saúde - Brasil. Informe Técnico da introdução da vacina inativada poliomielite. [acesso 2018 Jun 22]. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/arquivos/2012-08/informe-tecnico-introducao-da-vacina-inativada-poliomielite-vip-2012.pdf>
11. Iniciativa de Erradicação Global da Pólio. Pólio hoje. [acesso 2018 Jun 05]. Disponível em: <http://polioeradication.org/polio-today/polio-now/this-week/>
12. World Health Organization - WHO. Polio Global Eradication Initiative-Polio Eradication & Endgame Strategic Plan 2013-2018.[acesso 2018 Jun 13]. Disponível em: [http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/PEESP\\_EN\\_A4.pdf](http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/PEESP_EN_A4.pdf)
13. World Health Organization - WHO. Weekly epidemiological record. 2016;91(19):249-256. [acesso 2018 Mai 28]. Disponível em: <http://www.who.int/wer/2016/wer9119/en/>
14. World Health Organization - WHO. Global action plan for laboratory containment of wild polioviruses. 2.ed. Geneva:WHO;2003. [acesso 2018 Mai 29]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68205/WHO\\_V\\_03.11\\_eng.pdf;jsessionid=2900A123BAB08299F0BBC7A87BC1D51F?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68205/WHO_V_03.11_eng.pdf;jsessionid=2900A123BAB08299F0BBC7A87BC1D51F?sequence=1)
15. World Health Organization - WHO. Polio laboratory manual. 2.ed. Geneva: WHO; 2004. [acesso 2018 Mai 29]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68762/WHO\\_IVB\\_04.10.pdf?sequence](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68762/WHO_IVB_04.10.pdf?sequence)



16. Machado CM. Reimmunization after bone marrow transplantation--current recommendations and perspectives. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(1):151-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X2004000100021>
17. Reed L, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am J Hyg*. 1938;27(3):493-7.
18. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
19. Fleiss JL. The measurement of interrater agreement. *In: Fleiss JL, Statistical Methods for Rates and Proportions*. New York: John Wiley;1981.p.212-36.
20. Siegel S, Castellan N. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2.ed. New York: McGraw-Hill;1988.
21. Sistema de Informação de agravos de Notificação – SINAM. Paralisia flácida aguda/Poliomielite. [acesso 2018 Jun 5]. Disponível em: <http://portalsinan.saude.gov.br/paralisia-flacida-aguda-poliomielite>
22. Barbosa V, Stewien KE, Rosenburg CP. Estado vacinal, tipo de habitação e nível cultural da mãe e sua relação com o estado imunitário à poliomielite, em uma amostra de escolares do município de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública*. 1977;11:330-7.
23. Paul JR, Trask JD. The neutralization test in poliomyelitis. Comparative results with four strains of the virus. *J Exp Med*. 1935; 61(4):447–64. <https://doi.org/10.1084/jem.61.4.447>
24. Howitt BF. Poliomyelitis: in vitro neutralization tests, using normal adult and convalescent human serums. *Cal West Med*. 1935;43(6):407-11.
25. Herremans MM, Reimerink JH, Ras A, Van Der Avoort HG, Kimman TG, Van Loon AM et al. Evaluation of a poliovirus-binding inhibition assay as an alternative to the virus neutralization test. *Clin Diagn Lab Immunol*. 1997;4(6):659–64.
26. Hashido M, Horie H, Abe S, Doi Y, Hashizume S, Agboatwalla M et al Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on binding inhibition for type-specific quantification of poliovirus neutralization-relevant antibodies. *Microbiol Immunol*. 1999;43(1):73–7. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1999.tb02375.x>
27. Ivanov AP, Dragunsky EM. ELISA as a possible alternative to the neutralization test for evaluating the immune response to poliovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2005;4(2):167-72. <https://doi.org/10.1586/14760584.4.2.167>
28. Schepp RM, Berbers GAM, Ferreira JA, Reimerink JH, Van der Klis FR. A novel multiplex poliovirus binding inhibition assay applicable for large serosurveillance and vaccine studies, without the use of live poliovirus. *J Virol Methods*. 2017;241:15–23. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.12.006>