

# Het Orale Poliovaccin

## en de rol van Coxsackie A recombinaatie



21-06-2011  
Bachelor Scriptie  
Leny Sprik  
S1798693

Foto voorkant: <http://www.vaccineinformation.org>

## **Inhoudsopgave**

Abstract	4
Inleiding	5
Hoofdstuk 1 Het poliovirus	6
Hoofdstuk 2 Vaccins	9
Hoofdstuk 3 Eliminatie programma WHO	12
Hoofdstuk 4 Coxsackie A recombinitie	14
Hoofdstuk 5 Implicaties	16
Slotwoord	17
Referenties	18

## Abstract

Het poliovirus is de veroorzaker van paralytische poliomyelitis. Hierbij tast het virus de neuronen van de hersenen of het ruggenmerg aan wat resulteert in verlamming, dit gebeurt in 1% van de gevallen. Er zijn twee vaccins op de markt een geïnactiveerd- (IPV) en een levend verzwakt virus (OPV). Deze vaccins geven goede levenslange immuniteit tegen de 3 serotypes.

Het orale poliovaccin (OPV) is een genetisch instabiel vaccin. Snel na vaccinatie vinden er genetische veranderingen plaats waardoor het vaccin weer virulent kan worden, de kans hierop is ongeveer 1 op 750.000. Gevaccineerde kunnen dus toch paralytische poliomyelitis krijgen (vaccine-associated paralytisch poliomyelitis VAPP). Ook is gebleken dat deze neurovirulente vaccins langdurig kunnen circuleren in de populatie en zo de ziekte verspreiden (vaccine-derived paralytische poliomyelitis VDPV).

Deze vaccinvirussen vertonen veel recombinitie met aanverwante Coxsackie A virussen. Het is gebleken dat deze recombinitie niet de oorzaak is voor het ontstaan van de VAPP en VDPV. Maar dat het waarschijnlijk een belangrijke rol speelt in de virulentie en overdraagbaarheid van het poliovirus.

## Inleiding

Het poliovirus is een humaan enterovirus wat paralytische poliomyelitis kan veroorzaken. Hierbij heeft het virus de neuronen van het ruggenmerg of de hersenen geïnfecteerd wat kan leiden tot spiervlamming, echter gebeurt dit maar in 1% van de gevallen.

In endemische landen infecteren wild type poliovirussen bijna de gehele populatie voor zijn eerste levensjaar (29). Polio is een seizoensziekte met de piek in de zomer en het dal in de winter. Tropische gebieden vertonen minder verschil in transmissie gedurende de seizoenen.

De virusdeeltjes repliceren voornamelijk in de darmen en worden uitgescheiden met de feces. Het virus is erg besmettelijk en wordt meestal verspreid via de fecale-orale route door de inname van besmet water of voedsel. In gebieden met goed sanitair en hygiëne wordt de ziekte verspreid via de orale-orale route. Tropische gebieden met slechte hygiëne, hoge geboortecijfers en grote groepen mensen zijn een ideale omgeving voor het poliovirus om zich snel te verspreiden (7).

Er zijn drie verschillende poliovirussen PV1, 2 en 3, ieder met een net even anders capsid-eiwit (29). Alle drie de virussen zijn extreem virulent en veroorzaken dezelfde symptomen. Type 1 wordt voornamelijk geassocieerd met paralytische poliomyelitis en type 2 het minst (42).

In de 19<sup>de</sup> eeuw was de ziekte zeldzaam en bekend als infantile paralysis, omdat het alleen bij kinderen voorkwam. Eind 19<sup>de</sup> eeuw/begin 20<sup>ste</sup> begonnen geïndustrialiseerde landen verbeteringen aan te brengen op het gebied van sanitaire voorzieningen en hygiëne. Dit had als gevolg dat zuigelingen later hun eerste polio-infectie kregen (bij 12 maanden in plaats van 6 maand) waardoor ze niet meer beschermd werden door maternale antilichamen (42). Het poliovirus heeft vanaf dat moment voor vele slachtoffers gezorgd, voornamelijk kinderen maar ook volwassenen. Rond 1900 ontstonden er kleine lokale polio epidemieën in Europa en de USA, die in de eerste helft van de 20<sup>ste</sup> eeuw uitgroeiden tot grote pandemieën.

In de jaren 50 werd het eerste vaccin ontwikkeld, een geïnactiveerd- en in de jaren 60 een levend verzwakt virus (54, 56). Al snel na de introductie daalde het aantal poliogegevallen enorm en met het opstarten van de polio eliminatie campagne van de WHO in 1988 ging het nog sneller.

Maar het levend verzwakte vaccin is genetisch instabiel. Na vaccinatie begint het virus te veranderen waardoor de kans bestaat dat neurovirulentie wordt terug verworven (kans is 1 op 750.000) (49).

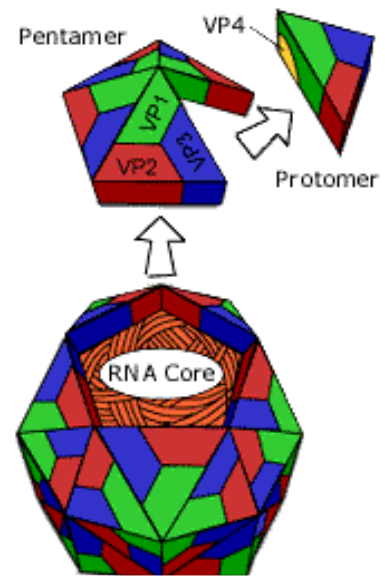
Gevaccineerde individuen kunnen toch paralytische poliomyelitis krijgen (Vaccin-associated paralytische poliomyelitis, VAPP). Er werd lang gedacht dat dit virulente vaccin niet overdraagbaar was maar in 2000 is het tegendeel bewezen (26).

Het vaccin is in staat om neurovirulentie terug te krijgen en te circuleren in de populatie (Vaccin-derived poliovirus, VDPV). Deze vaccinvirussen vertonen veel recombinitie met Coxsackie A virussen. Dit zijn aanverwante enterovirussen met grote overeenkomst in homologie. In deze scriptie wordt geprobeerd de vraag te beantwoorden wat de rol van deze recombinitie precies inhoud.

# Hoofdstuk 1 Het poliovirus

## 1.1 Opbouw virus

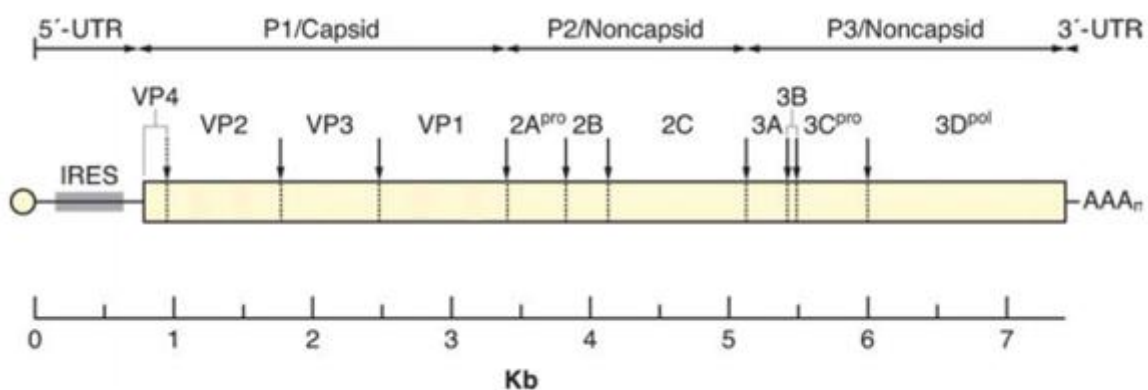
Het poliovirus is een enterovirus en lid van de Picornaviridae familie (32). Poliovirussen zijn opgebouwd uit positief enkelstrengs RNA dat omgeven is door een icosahedrale capside zonder envelop. Het capside (**Fig. 1**) is ongeveer 30 nm in diameter en is opgebouwd uit 60 kopieën van ieder capside eiwit VP1, VP2, VP3 en VP4. VP1, VP2 en VP3 bevinden zich aan de buitenzijde van het capside en VP4 aan de binnenzijde waar het voor stevigheid zorgt (22, 29,41). Antigeen variatie binnen VP1, VP2 en VP3 zorgen voor de 3 serotypes (29).



**Figuur 1. De icosahedrale capside van het poliovirus.** Het capside bestaat uit 12 pentamere hoekpunten, die weer bestaan uit 5 protomere eenheden. Een protomere bestaat uit VP1, VP2, VP3 en VP4.

Het positief enkelstrengs RNA genoom is ongeveer 7500 basen groot. Het heeft aan de 3' einde een poly-A staart en er is een klein eiwit VPg covalent verbonden aan het 5'einde. Het VPg eiwit speelt een belangrijke rol bij de RNA replicatie. Het coderende deel van het genoom wordt geflankeerd door een groot (~740 b) 5'untranslated region (5'UTR) en een klein 3'UTR (~70 b) (29). Het 5'UTR bevat een internal ribosomale entry site (*IRES*). Dit is een stem-loop structuur waaraan ribosomen kunnen binden en translatie wordt gestart (48). Het 3'UTR speelt een rol bij de RNA replicatie.

Het genoom wordt vertaald in een poly-eiwit (**Fig 2.**) dat geknipt wordt in 3 precursor eiwitten (P1, P2 en P3) en vervolgens in 11 individuele eiwitten. Dit knippen wordt gedaan door viraal gecodeerde proteases. Het P1 precursor eiwit bestaat uit de 4 structurele eiwitten. P2 en P3 coderen voor de niet-structurele onderdelen zoals de virale proteases, RNA-afhankelijk RNA polymerase en het VPg eiwit (22, 58).



**Figuur 2. Het polio genoom. (29)**

Het 5'UTR met het IRES. Het P1 precursor eiwit bestaat uit de vier capside-eiwitten. VP4 en VP2 worden geknipt uit VP0 tijdens virale assemblage. Het P2 precursor eiwit bestaat uit de 2A<sup>pro</sup>, 2B, 2BC, 2B en 2C. Het P3 precursor eiwit bestaat uit 3AB, 3CD<sup>pro</sup>, 3A, 3B, 3C<sup>pro</sup> en 3D<sup>pol</sup>. Het 3'UTR met de poly-A staart. 2A<sup>pro</sup>, 3CD<sup>pro</sup> en 3C<sup>pro</sup> zijn virale proteases, 3D<sup>pol</sup> is een RNA-afhankelijk RNA polymerase, 2C een helicase en 2B, 2BC, 3A, 3B en 3AB zijn geassocieerd met de virale RNA replicatie. Het VPg eiwit zit gelinkt aan het 5'UTR maar is gecodeerd binnen het 3B eiwit (58).

## 1.2 De levenscyclus

De levenscyclus (**Fig. 3**) van het poliovirus in een enkele cel duurt maar 3 a 4 uur. De eerste interactie van het poliovirus met de gastheercellen is de aanhechting met de poliovirus receptor (CD155). Deze receptor is alleen gevonden in humane cellen. De poliovirus receptor is lid van de immunoglobuline superfamilie. Deze familie wordt gekarakteriseerd worden door hun extracellulaire loop structuren. CD155 bezit er drie (D1-D3) (16). Het VP1 eiwit bezit een kloof structuur waarmee het bindt aan het D1 domein. Deze interactie heeft een conformationele verandering tot gevolg waarbij het VP4 deel verloren gaat en het virion verzwakt word. Vervolgens wordt het genoom in de cel geïnjecteerd door een kanaal dat gecreëerd wordt door het VP1 eiwit (22, 41).

In het cytoplasma van de cel wordt het VPg eiwit herkend door phosphodiesterases en eraf geknipt. Dit wordt gevolgd door binding van ribosomen aan het IRES en translatie gaat van start (22).

Zoals eerder beschreven ontstaat er een poly-eiwit dat in stukken word geknipt door virale proteases. Deze proteases zijn ook betrokken bij het remmen van de humane RNA- en eiwitsynthese. Het cap-binding eiwit (EIF4-G) wordt in stukken geknipt waardoor het mRNA niet aan de ribosomen kan binden. Zonder 5'cap is het mRNA onherkenbaar wat als gevolg heeft dat eiwitsynthese word geremd. Inhibitie van transcriptiefactoren zorgt ervoor dat mRNA transcriptie niet meer plaats vindt (29, 41).

RNA replicatie vindt plaats in de celkern en begint met de synthese van een negatieve RNA streng door het virale RNA-afhankelijke RNA polymerase. Het VPg eiwit dient als primer. De negatieve strengen worden gebruikt om positieve genomen te creëren (22).

Als de translatie en replicatie gelijktijdig hebben plaats gevonden vindt virus assemblage plaats. VP0, VP1 en VP3 vormen subunits, vijf subunits vormen een pentameer, en 12 pentameren vormen het procapside. Na de invoer van het genoom wordt VP0 in VP2 en VP4 geknipt waardoor het capsid compleet is (41). De cel wordt gelyseerd en de viruspartikels ,ongeveer 100.000, worden vrijgelaten en beginnen een nieuwe cyclus in een andere cel (29).

## 1.3 Pathogenese

Het virus komt het lichaam binnen via de oropharynx, darmen of bovenste luchtwegen en infecteert vervolgens onderliggend lymfe weefsel. Door maagzuur, gal of proteases wordt het virus niet tegengehouden want daar is het tegen bestand (41). Replicatie wordt in de darmen geblokkeerd door IgA. Neutraliserende IgG en IgM antilichamen in het bloed zorgen ervoor dat het virus zich niet verspreidt naar het centrale zenuwstelsel (CZS) (29).

Wordt het virus niet tegengehouden wordt door het immuunsysteem dan verspreidt het zich via het bloed (viremia) naar cellen met de CD155 receptor. De CD155 receptor is aanwezig in vele weefsels in het lichaam maar niet overal kan het virus repliceren. De geïnfecteerde weefsels bepalen het vervolg van de ziekte (41).

Wanneer de replicatie van het virus beperkt blijft tot de oropharynx en de ingewanden verloopt de infectie vrijwel asymptomatisch, dit gebeurt in 90 a 95% van de gevallen (22, 41).

In 4-8% van de gevallen ontstaat er viremia wat leidt tot een milde ziekte ook wel de prodromale fase genoemd. Deze fase gaat gepaard met niet specifieke symptomen zoals een zere keel, koorts, hangerigheid en malaise, dit begint 3 a 4 dagen na blootstelling (22, 41).

Vervolgens ontwikkelt 1 a 2% zich tot een major illness. Hierbij is het virus het centraal zenuwstelsel binnen gedrongen en zorgt voor aseptische meningitis met symptomen zoals hoofdpijn, nek en rug pijn, koorts, overgeven en lethargie (41).

De paralytische fase vertoont zich in 0.1 tot 2% van de gevallen en hierbij is het virus het ruggenmerg, motor cortex of hersenstam binnengedrongen. Het precieze mechanisme achter de invasie van het virus in het CNS wordt niet goed begrepen. De ernst van de verlamming is afhankelijk van hoe ver de neuronen

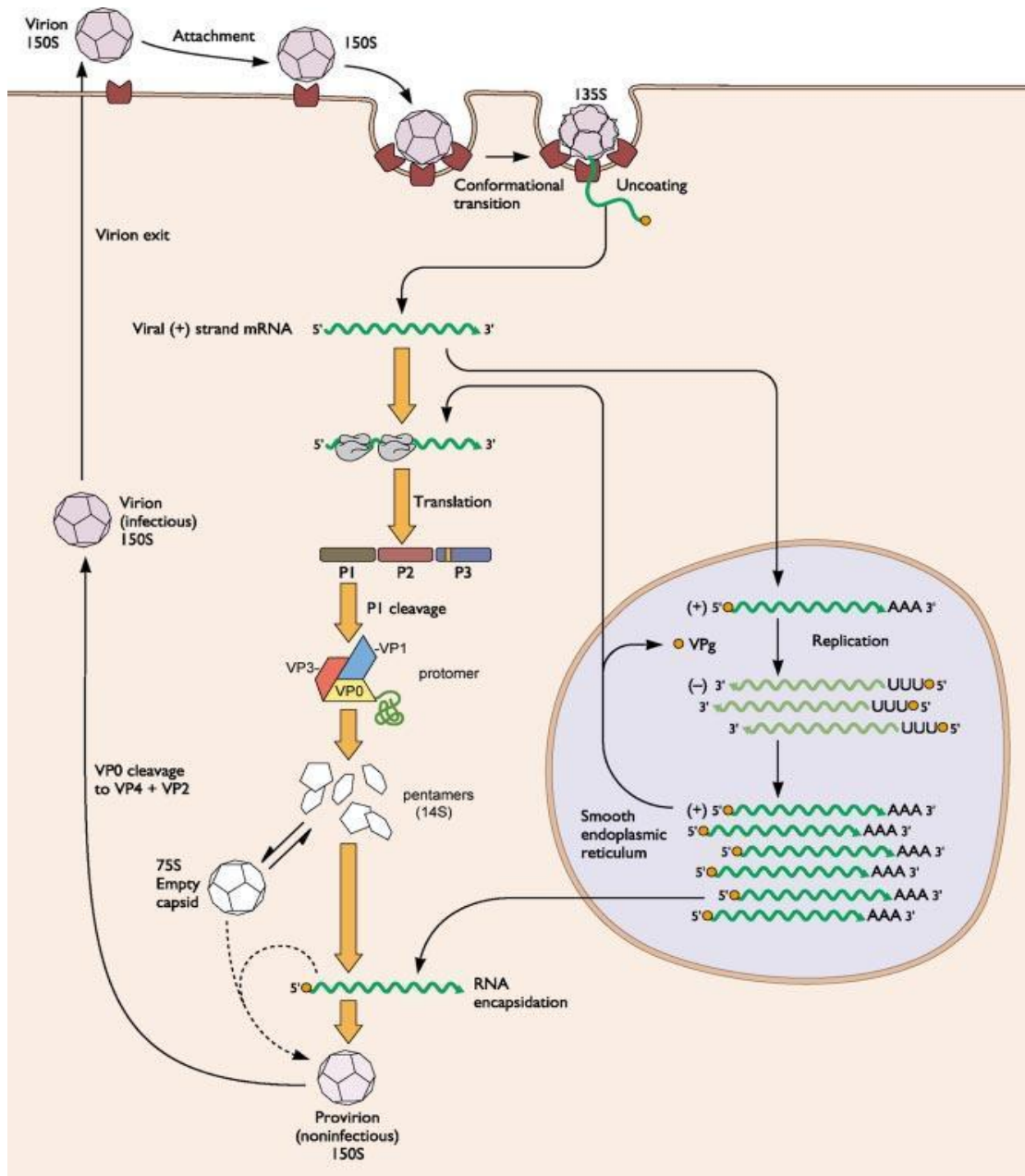
en welke neuronen zijn geïnfecteerd (41).

Paralytische poliomyelitis begint met een milde ziekte van enkele dagen gevolgd door een symptoom vrije periode van 1 tot 3 dagen. Hierna krijgt de geïnfecteerde een acute verlamming met koorts (29, 41).

Spinal polio is de meest voorkomende vorm van polio hierbij dringt het virus de anterior horns cellen van het ruggenmerg binnen en zorgt voor de verlamming van de skeletspieren.

Bulbar poliomyelitis is veel zeldzamer maar veel ernstiger, hierbij dringt het virus de hersenstam binnen en zorgt voor de verlamming van de ademhalingsspieren.

Een combinatie van beide is ook mogelijk, dit wordt bulbo-spinal poliomyelitis genoemd (29,41).



**Figuur 3. De levenscyclus van poliovirussen. (18)**

Het virion bind aan de CD155 receptor wat leidt tot een conformatie verandering, vervolgens wordt het virus de cel in geïnjecteerd via een porie. Daarna vindt er virale translatie en replicatie plaats waarbij nieuwe virale onderdelen ontstaan. Deze onderdelen worden geassembleerd tot een nieuw virus die vervolgens de cel verlaat.



## Hoofdstuk 2 Vaccins

Polio epidemieën kwamen op tegen het einde van de 19<sup>de</sup> eeuw en zorgden voor vele miljoenen slachtoffers in het eerste deel van de 20<sup>ste</sup> eeuw. Om deze aantallen te verminderen zijn er twee vaccins ontwikkeld. Het eerste is een geïnactiveerd virus (IPV) ontwikkeld door Jonas Salk en gelicentieerd in 1955. Het tweede is een levend verzwakt virus (OPV) ontwikkeld door Albert Sabin en op de markt gebracht in 1962 (55). Beide vaccins zorgen voor goede levenslange immuniteit tegen alle drie de serotypes van het virus (69). Mensen waarbij de vaccinatie niet leidt tot immuniteit of die niet gevaccineerd willen worden (vanwege geloofsovertuiging ed.) worden in een goed gevaccineerde omgeving beschermd door collectieve immuniteit (10).

### 2.1 Geïnactiveerd poliovaccin

Het geïnactiveerde poliovaccin (IPV) is het eerste vaccin wat ontwikkeld is tegen polio. Dit vaccin bestaat uit drie geïnactiveerde wild type virulente stammen: Mahoney of Brunenders type 1, MEF-1 type 2 en Saukett type 3. De stammen worden geïnactiveerd door ze 7 dagen te laten incuberen met een 1:8000 formalin oplossing bij 37°C met een pH van 7 (56). Het virus werd gekweekt in primaire monkey kidney cellen maar sinds 1978 in Vero cellen (monkey kidney cellen) of humane diploïde cellen voor een verbeterde werking van het vaccin (67).

Het vaccin wordt door middel van een intramusculaire of subcutane injectie toegediend door getrainde hulpverleners. Het geïnactiveerde virus zorgt voor een IgG en IgM antilichaam gemedieerde immuniteit in het bloed. De polio-infectie kan zich daardoor niet ontwikkelen tot viremia waardoor de motorneuronen beschermd blijven. Het IPV zorgt voor een gelimiteerde IgA immunisatie van de darmen. Hierdoor kan een wild type infectie in een geïmmuniseerd persoon alsnog in de darmen repliceren en zich verspreiden via de feces. Voor maximale dekking tegen de verschillende serotypes is het vereist om meerdere keren te vaccineren (69).

Het IPV zorgt voor een goede immunrespons met een langdurige immuniteit tegen alle drie de serotypes. Maar het grootste voordeel is dat het vaccin bestaat uit een dood virus. Hierdoor is er geen sprake van de ontwikkeling van vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP, zie §2.3) en vaccine-derived poliovirus (VDPV, zie §2.4) (69).

Het IPV is ongeveer 5 keer zo duur als het OPV wat een groot nadeel is. In enkele landen wordt dit opgelost door het vaccin gecombineerd met andere vaccins toe te dienen. Ook moet het virus geïnjecteerd worden waar opgeleide hulpverleners en steriele apparatuur voor nodig zijn. Een ander nadeel is dat door de beperkte immunreactie van de darmen virus transmissie niet wordt gestopt (69).

### 2.2 Oraal poliovaccin

Het oraal poliovaccin is een levend verzwakt virus wat oraal toegediend moet worden en bestaat uit de drie serotypes. De Sabin vaccins hebben alle drie een goede balans tussen lage neuropathologie, goede immunogeniteit en acceptabele niveaus van genetische instabiliteit (29).

Sabin type 1 (LS-c2ab) is ontstaan door herhaaldelijke passage van de neurovirulente stam (Mahoney) op sub-fysiologische temperaturen in niet humane cellen en weefsels. (54)

Het verschil tussen de Mahoney vaccin stam met Mahoney wild type 1 virus bestaat uit 57 nucleotide substituties waarvan er 5 belangrijk zijn voor het verzwakte fenotype. De belangrijkste bevindt zich in het IRES, de andere vier bevinden zich in de capsideregio, twee in VP1, een in VP3 en een in VP4 (25, 46). Sabin type 2 is een natuurlijk verzwakte stam P2/712 welke geïsoleerd is uit een gezond kind (54). Het verschil met wild type 2 bestaat uit 2 nucleotide substituties die beide bijdragen aan het verzwakte

fenotype. De eerste substitutie bevindt zich in het IRES en de tweede in het VP1 (36, 51).

Sabin type 3 (Leon 12 alb) is gemaakt door passage van een neurovirulente stam (Leon) op sub-fysiologische temperaturen door niet humane cellen en weefsels. Deze neurovirulente stam is geïsoleerd uit een kind wat is overleden aan bulbo-spinal poliomyelitis (54). Het verschil met wild type 3 bestaat uit 10 nucleotide substituties waarvan er 3 bijdragen aan het verzwakte fenotype. In het IRES bevindt zich er een en de andere twee bevinden zich in VP1 en VP3 (61, 66)

De belangrijkste verzwakking van alle drie de types bevinden zich in het IRES (14, 15). Deze substitutie zorgt voor verandering van de stem-loop structuur waardoor de interactie met translatie initiator factor eIF4G verminderd (44). De vaccins repliceren wel in de darmen maar niet in de neuronen, in darm cellen zijn dus factoren aanwezig die in neuronen ontbreken. Het polypyrimidine tract-binding eiwit (PTB) is een goede kandidaat. Dit eiwit is betrokken bij de translatie van het poliovirus en is hoog in darm cellen en laag in neuronen (72). Hoe de capside mutaties precies bijdragen is nog onduidelijk. Alle drie de Sabin types dragen temperatuur gevoelige verzwakkingen met zich mee waardoor er minder poliovirus wordt geproduceerd op lichaamstemperatuur dan het wild type (35, 47). Andere substituties dragen bij aan de stabiliteit van het verzwakte fenotype.

Door de vele substituties is Sabin type 1 genetisch erg stabiel. Omdat Sabin type 1 het meest virulente type is, is dit erg belangrijk (27). Sabin type 2 is minder stabiel vanwege de weinig verzwakkingen maar is ook het minst virulent van de serotypes (42). Sabin type 3 is genetische het minst stabiel van de drie en ligt tussen de twee anderen in qua virulentie (4, 42).

Meerdere dosissen van het vaccin zijn vereist voor een maximale bescherming. Omdat het vaccin oraal wordt ingenomen zijn er geen speciaal opgeleide hulpverleners nodig of steriele apparatuur.

Het verzwakte virus zorgt voor een IgG en IgM antilichaam gemedieerde immuniteit in het bloed. Ook zorgt het OPV voor een goede immuunreactie van de darmen waardoor transmissie van circulerende wild type virussen gestopt word. Tijdelijke uitscheiding van het verzwakte virus na vaccinatie zorgt ervoor dat mensen in de omgeving mogelijk ook gevaccineerd kunnen worden (69).

Het grootste nadeel van het vaccin is dat het een levend verzwakt virus is. Het vaccin kan genetische verandering zoals mutaties en recombinatie ondergaan waardoor de opgelegde verzwakkingen kunnen terugdraaien. In zeldzame gevallen kan het vaccin paralytische poliomyelitis veroorzaken (VAPP zie §2.3). Ook is het mogelijk dat deze geëvolueerde virussen kunnen gaan circuleren in de populatie (VDPV, zie §2.4) (69).

In immuungecomprimeerde individuen kan het vaccin een ernstige infectie veroorzaken (22).

Toen OPV op de markt kwam werd IPV al 6 jaar gebruikt, en had het voor een drastische daling van het aantal poliogevallen gezorgd (31, 45, 60, 64). Veel landen zijn vervolgens overgestapt naar het OPV omdat dat dit werd gezien als het perfecte vaccin (7). Vanwege de steeds opduikende VAPP gevallen zijn veel landen met hoge en midden inkomens overgegaan naar IPV (2). De meeste ontwikkelingslanden gebruiken nog OPV (69). In 1988 is de WHO een polio eliminatie programma gestart door middel van vaccinatie waarbij OPV het belangrijkste wapen is. In Hoofdstuk 3 meer over dit eliminatie programma.

## 2.3 Vaccine-associated paralytic poliomyelitis (VAPP)

Het orale poliovaccin kan in zeldzame gevallen paralytische poliomyelitis veroorzaken die klinisch niet te onderscheiden is van de polio die door wild type virussen wordt veroorzaakt. Het levend verzwakte vaccin heeft zich veranderd en daarbij zijn de aangebrachte verzwakkingen teruggedraaid waardoor het weer een neurovirulent virus is geworden (29). Dit nieuwe virus is bijna identiek aan het Sabin vaccin, er is minder dan 1% genetisch verschil in de VP1 regio. Genetisch verschil tussen poliovirussen (wild type, VAPP, VDPV) wordt uitgedrukt in hoeveel % verschil er tussen de VP1 regionen zit, dit is de snelst veranderende regio (58).

1 op 750.000 gevaccineerde krijgt VAPP bij de eerste dosis, daarna daalt de kans drastisch per dosis (49). Jaarlijks zijn er ongeveer 250 tot 500 gevallen wereldwijd (12). VAPP wordt meestal geassocieerd met Sabin type 3 vervolgens 2 en als laatste 1. Deze volgorde heeft te maken met het aantal verzwakkingen en virulentie van de serotypes (33).

Individen met b-lymfocyt afwijkingen zijn vatbaarder voor VAPP, en moeten eigenlijk niet met OPV gevaccineerd worden (30).

## 2.4 Vaccine-derived poliovirus (VDPV)

Een lange tijd werd gedacht dat het genetisch veranderde virus dat verantwoordelijk is voor VAPP niet potent genoeg was om zich zelf te verspreiden, endat ondanks de terug verkregen neurovirulentie, de transmissie laag bleef (4, 35). In 2000 is gebleken dat een uitbraak in Hispaniola werd veroorzaakt door een circulerend virus dat genetisch verwant was aan het poliovaccin (26). Dit virus had naast de neurovirulentie ook het vermogen om zich te verspreiden teruggekregen.

Al snel na vaccinatie, gedurende de replicatie in de darmen, begint het OPV te veranderen (7, 58). Gevaccineerde scheiden virussen uit die genetische verschillen vertonen met het vaccin. Geïsoleerde virussen met minder dan 1% verschil (VP1 eiwit) worden OPV-like genoemd, en met meer dan 1% VDPV (29). Deze 1% houdt in dat er ongeveer 1 jaar replicatie heeft plaats gevonden, want poliovirussen evolueren ongeveer 1% per jaar (58). De verschillende definities zeggen niets over de biologische eigenschappen van de virussen.

Er zijn 2 types VDPV de immuundeficiënte geassocieerde VDPV (iVDPV) en de circulerende VDPV (cVDPV). Het iVDPV is geëvolueerde gedurende langdurige replicatie in een persoon met een verzwakt immuun systeem. Het immuun systeem van deze individuen is niet in staat om het virus binnen 6-8 weken te verwijderen. Het virus wordt daarom een langer tijd of soms zelfs levenslang uitgescheiden. iVDPV zijn zeldzame gevallen die gebeuren in ontwikkelde landen (immuundeficiënte individuen overlijden vaak voortijdig in ontwikkelingslanden) en onafhankelijk zijn van de OPV dekking. (28, 37, 30)

cVDPV circuleren door de populatie en worden overgedragen van persoon tot persoon. Het ontstaan van cVDPV gebeurt voornamelijk in poliovrije tropische ontwikkelingslanden met een lage OPV dekking (7).

Na de eerste ontdekking van cVDPV in Hispaniola zijn er uitbraken geweest in Madagaskar, Ethiopië, Afghanistan, China, Indonesië, Filipijnen, Birma, Somalië, Nigeria, Niger, Tsjaad, DR Congo en Cambodja. Technieken waarmee het genoom wordt gesequencet en fylogenetische relaties worden aangetoond zijn vrij nieuw (7). Hierdoor is ontdekt dat in Egypte van 1983 tot 1993 een type 2 VDPV circuleerde (71).

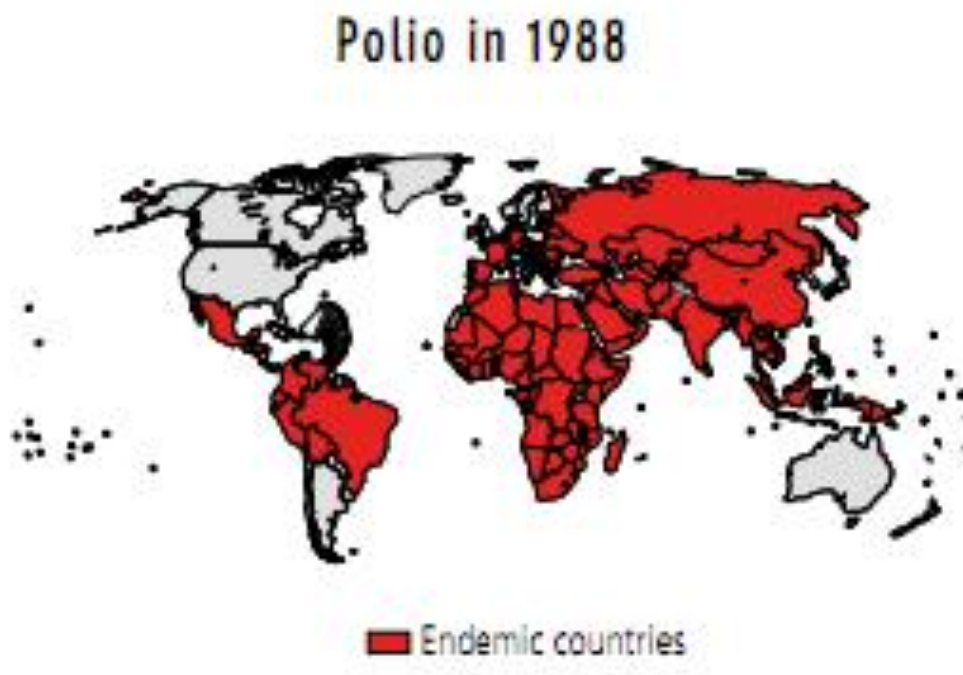
Hoeveel VDPV er sinds de invoer van het OPV hebben gecirculeerd is onbekend. In landen waar cVDPV uitbraken hebben plaatsgevonden waren geen wild type virussen van dat serotype aanwezig. De uitroeiing van wild type virussen heeft dus mogelijkheden gecreëerd voor het ontstaan van cVDPV (1, 7). In Hoofdstuk 4 staat meer informatie over de genetische veranderingen waardoor VAPP en VDPV ontstaan.

## Hoofdstuk 3 Eliminatie programma WHO

De World Health Organisation (WHO) is een speciale afdeling binnen de Verenigde Naties (VN). Het is de organiserende autoriteit op het gebied van de publieke gezondheid wereldwijd. De WHO is begonnen op 7 april 1947 en is onderverdeeld in 6 regio's Afrika, Europa, Zuidoost-Azië (o.a. India en Indonesië), Oost Mediterrane (o.a. Libië, Egypte, Soedan en het Midden-Oosten), West Pacific (o.a. Australië, China en Japan) de Amerika's (Noord en Zuid Amerika).

In 1988 is de WHO een wereldwijd eliminatie programma tegen polio gestart door middel van vaccinatie. Het doel is om alle poliovirussen te elimineren waardoor er geen gevallen van paralytische poliomyelitis meer zijn (68).

Polio is een elimineerbaar virus omdat alleen mensen worden aangedaan, er geen sprake is van extra humane dragers, niet lang overleefd buiten de mens en immuniteit levenslang is. Bij de start van het programma was het virus endemisch in 125 landen en waren er meer dan 350.000 gevallen van paralytische poliomyelitis per jaar (68) (Fig. 4).



**Figuur. 4 Polio in 1988.** Polio is endemisch in 125 landen in 1988 (70)

De WHO heeft vier kernpunten opgesteld voor de vaccinatiestrategie tegen polio (69).

### 1 Routine immunisatie

Hoge immunisatie van kinderen in hun eerste levensjaar met minimaal 3 OPV/IPV dosissen om een dekkingsgraad van meer dan 80% te krijgen. Goede OPV dekking zorgt voor populatie immuniteit wat de incidentie van polio vermindert waardoor eliminatie makkelijker wordt. In poliovrije landen moet ook een hoge polio dekkingsgraad behouden worden. Dit is vanwege het risico op de terugkeer door internationale reizigers, migranten of mensen die vaccinatie weigeren.

## **2 Nationale immunisatie dagen**

Nationale immunisatie dagen (NID) om de circulerende poliovirussen te stoppen. Alle kinderen onder de vijf jaar in een land krijgen twee maal een OPV dosis. Ieder kind is nu beschermd tegen polio op hetzelfde tijdstip waardoor het virus een vruchtbare voortplantingsbodem is ontnomen. Deze dagen zijn bedoeld ter ondersteuning van de routinematige immunisatie bij pasgeborenen (69).

## **3 Surveilleren**

Het actief surveilleren naar gevallen van acute verlamming bij kinderen onder de 15 jaar. Wanneer er een verlamingsgeval is geconstateerd, wordt er direct een fecesmonster naar het laboratorium gestuurd waar het virus wordt geïsoleerd en geanalyseerd (wil type of VDPV en welke stam)(69).

## **4 Doelgerichte immunisatieacties**

Deze doelgerichte immunisatieacties zijn te vergelijken met de NID maar op kleinere schaal. Het zijn deur tot deur immunisatie in gebieden waar bekend is dat het virus circuleert of er verdacht van wordt (69).

Het nastreven van deze vier punten heeft sinds 1988 enorm veel succes gehad. In 1994 werden Noord en Zuid Amerika polio vrij verklaard. In 1999 was het laatste geval van polio veroorzaakt door wild type 2 virus. De enige type 2 poliovirus infecties zijn van OPV afgeleide virussen. In 2000 werd de West Pacific vrij verklaard en in 2002 Europa.

Er zijn ook gebeurtenissen geweest die voor een terugval hebben gezorgd in het eliminatie proces. Zo heeft Nigeria in 2003 de verspreiding van het OPV stop gezet wegens valse geruchten dat het vrouwen onvruchtbaar maakt. Deze boycot heeft geleid tot een wereldwijde polio-uitbraak, de ziekte verspreidde zich naar 20 landen in Afrika, het Midden-Oosten en Zuidoost Azië. Na 10 maanden is men weer begonnen met de verspreiding van OPV maar de gevolgen zijn nog steeds merkbaar. Polio is nog steeds endemisch in Nigeria. In Tsjaad, DR Congo en Angola is polio bezig met een terugkeer (24, 40).

De situatie anno 2011 is dat polio endemisch is in vier landen India, Pakistan, Afghanistan en Nigeria. Er zijn per jaar minder dan 2000 gevallen wat een afname is van meer dan 99% vergeleken met 1988.

In de toekomst is het de bedoeling om de wereld polio vrij te krijgen, maar om die laatste 1% te behalen is erg lastig en duur. Er zijn vele obstakels die het verhinderen om de laatste 4 endemische landen polio vrij te maken. De WHO heeft te maken met een slechte infrastructuur, moslim fundamentalisten, burgeroorlogen, religieuze en politieke redenen en een lage OPV dekking (40).

Maar het grootste obstakel is toch wel de opkomst van de cVDPV de afgelopen jaren. In het jaar 2000 is het bestaan van deze cVDPV ontdekt tijdens een uitbraak in Hispaniola (71). Vanaf dat moment zijn er ieder jaar 1 a 2 cVDPV uitbraken gerapporteerd (40). Hoe deze cVDPV ontstaan wordt behandeld in hoofdstuk 4.

## Hoofdstuk 4 Coxsackie A recombinitie

### 4.1 Genetische evolutie

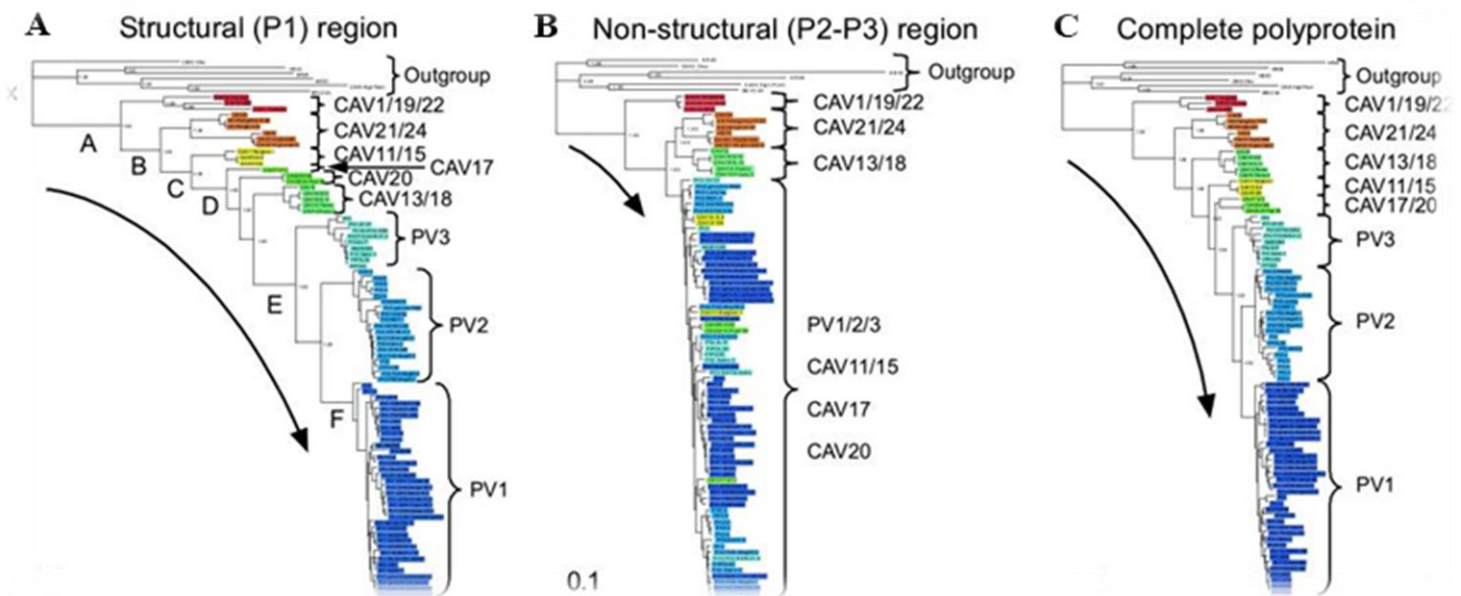
Om cVDPV te krijgen moeten de aangebrachte verzwakkingen van het OPV teruggekeerd worden. Poliovirussen hebben net als alle RNA-virussen een hoge mutatie snelheid en recombinitiefrequentie welke zorgen voor genetische evolutie. De mutatiesnelheid is gemiddeld  $10^{-4}$  per replicatie en wordt veroorzaakt door de afwezigheid van het proof-reading mechanisme van het viraal RNA-afhankelijke RNA polymerase (17).

Onder recombinitie wordt verstaan dat er genetisch materiaal tussen twee verschillende virussen wordt uitgewisseld. In het geval van poliovirussen kan dit binnen serotypes, tussen serotypes en met non-poliovirussen zoals coxsackie A virussen gebeuren. Een belangrijk vereiste is dat beide virussen tegelijkertijd aanwezig moeten zijn in de cel. Tijdens de replicatie van een van de twee virussen switcht het virale RNA-afhankelijke RNA polymerase van het ene RNA molecuul naar het andere wat leidt tot een RNA molecuul welke bestaat uit 2 genomen, dit wordt het strand-switching model genoemd (19). De recombinitiefrequentie wordt beïnvloed door homologie en het serotype. Type 3 ondergaat de meeste recombinitie gevolgd door 2 en 1 maar zelden (11). Recombinitie vindt voornamelijk plaats in de niet-structurele delen (P2 en P3), minder in het 5'UTR en is zeldzaam in de structurele delen (13, 38). Levensvatbare recombinanten worden gegenereerd met de frequentie van  $10^{-6}$  (23).

### 4.2 Coxsackie A virus

Sinds het eerste geval van VDPP in 1962 is bekend dat het poliovaccin in staat is om zijn neuro pathogene vorm terug te krijgen (63). In 2000 is ontdekt dat dit poliovaccin afgeleide virus in staat is om van mens op mens overgedragen te worden. Het VDPV heeft de twee belangrijkste biologische eigenschappen van het wild type virus terug verworven.

De meeste cVDPV uitbraken zijn veroorzaakt door recombinanten bestaand uit een Sabin vaccin- en coxsackie A virus (9, 50, 59, 65, 71). Coxsackie A virussen (CAV) behoren net als de poliovirussen bij de enterovirussen. Gebaseerd op genotypische overeenkomst zijn de 3 poliovirussen en 9 coxsackie A virussen geclassificeerd als humane enterovirussen type C (HEV-C). Beide virustypes gebruiken de darmen als primaire replicatieplaats, maar veroorzaken verschillende ziekten in mensen. Polio zorgt na viremia voor verlamming en CAV voor hand-, voet- en mondziekte en herpanglia. Dit onderscheid wordt veroorzaakt doordat de virussen gebruik maken van verschillende receptoren, polio van de CD155 receptor en CAV van de ICAM-1 (intracellulair adhesie molecule 1). Polio- en coxsackievirussen vertonen veel overeenkomst in genoomstructuur, genoomcompositie en sequentie (3). Dit komt omdat poliovirussen waarschijnlijk geëvolueerd zijn uit een CAV-voorouder. Een mutatie in de capsideregio heeft voor een receptor switch gezorgd, van ICAM-1 naar CD155 (23). De grote overeenkomst in homologie (**Fig. 6**) wordt zo verklaard.



**Figuur 6. Fylogenetische analyse van polio- en coxsackievirussen. (23)**

A. boom van de P1 structurele regio. B. boom van de P2-P3 niet structurele regio. C. boom van het gehele poly-eiwit. Als outgroup zijn er 6 Picorna sequenties gebruikt die niet gerelateerd zijn aan HEV-C.

Er is een duidelijk onderscheid in homologie tussen de structurele en niet-structurele regio. CAV 11, 15, 17 en 20 zijn het meest verwant aan de PV.

### 4.3 Recombinatie

De belangrijkste verzwakking van alle 3 de vaccins bevindt zich in het IRES (Sabin 1 A480G, Sabin 2 G481A en Sabin 3 C472U). Door deze substitutie wordt de "stem-loop" structuur veranderd waardoor er een translatie-deficiëntie optreedt. Deze substitutie moet terug veranderd (mutatie) of vervangen (recombinatie) worden om van de vaccins een neurovirulent virus te maken. De kans dat precies deze substitutie terugmuteert is erg klein daarom is het aantal gevallen van VAPP erg laag maar door de relatief hoge mutatiesnelheid gebeurt het wel (57, 58).

De waarschijnlijkheid dat dit door recombinatie met CAV gebeurt is niet erg groot. In de eerste plaats omdat de verzwakkende substituties zich in 5'UTR en de capsideregio bevinden, maar de meeste recombinatie vindt plaats in de niet-structurele regio. Ten tweede omdat frequente genetische uitwisseling tussen CAV en (wild type of vaccine-derived) poliovirussen karakteristiek schijnt te zijn voor circulerende poliovirussen (29, 7).

Ook is gebleken dat er uitbraken van cVDPV zijn geweest in China en Roemenië waarbij geen vaccin/CAV recombinant betrokken waren (6, 34). Hieruit blijkt dat recombinatie niet essentieel is voor het ontstaan van VDPV.

Snel na vaccinatie begint het OPV te veranderen. De opgelegde verzwakkingen veranderen terug door mutaties, waardoor het vaccin neurovirulent kan worden. In een volgend stadium vindt er recombinatie met CAV plaats (5, 58). Het is nog onbekend wat de precieze bijdrage is van de recombinatie. Maar er wordt gesuggereerd dat gerecombineerde niet structurele delen kunnen bijdragen aan de overdraagbaarheid en virulentie van de VDPV. De hoge frequentie van recombinatie tussen Sabbin vaccins en CAV suggereert dat er een voordeel is voor het virus. Recombinatie tussen coxsackie A en poliovirussen draagt zeker bij aan de genetische en fenotypische biodiversiteit van poliovirussen. (20, 29, 52). In het laboratorium zijn er PV/CAV recombinanten gegenereerd om hier verder onderzoek naar te doen (20). cVDPV zijn een serieuze bedreiging voor de wereld wijde eliminatie van polio. De implicaties staan beschreven in hoofdstuk 5.

## Hoofdstuk 5 Implicaties

Het aantal paralytische poliomyelitis gevallen is sinds 1988 gereduceerd met meer dan 99% en wild type 2 poliovirus is uitgeroeid. Wild type 1 en 3 virussen zijn nog endemisch in 4 landen. Deze prestaties zijn te danken aan het orale poliovaccin. Er zit alleen een groot nadeel aan dit vaccin. Door het genetisch instabiele karakter ontstaan Vaccin-associated paralytische poliomyelitis, immuundeficiënte vaccin-derived poliovirus en circulerend vaccin-derived poliovirus. Hierdoor blijft het aantal polio gevallen per jaar constant (1000 á 2000), al 10 jaar lang. De dalende trend is gestagneerd. Sinds 2000 zijn er 15 cVDPV uitbraken geweest die een gemeenschappelijk epidemiologisch karakter hebben. Ze hebben plaats gevonden in gebieden waar de OPV dekking te kort schiet en waar minder dan 50% van de kinderen geïmmuniseerd is (39). Onder deze omstandigheden kan VDPV langdurig blijven circuleren, vele mensen infecteren en uitbraken van paralytische poliomyelitis veroorzaken. De meeste uitbraken hebben plaats gevonden in gebieden met tropische temperaturen. Humaan enterovirus type C virussen gedijen goed bij tropische temperaturen dus recombinatie met CAV vindt veelvuldig plaats (1, 7). Ook al is de rol van CAV recombinatie nog niet helemaal duidelijk dit mag niet onderschat worden. De opkomst van de cVDPV heeft doen inzien dat vuur wordt bestreden met vuur (40, 43).

Om VAPP en VDPV te voorkomen moet er geswitcht worden van OPV naar IPV. Dat dit nog niet gebeurd is heeft onder andere te maken met de hoge kosten die daar gepaard mee gaan. De meeste rijke landen zijn overgestapt op het IPV of een combinatie van OPV-IPV. Armere landen zijn niet in staat dit te betalen zonder gesponsord te worden. Deze landen zullen ook hulp nodig hebben om ervoor te zorgen dat een hoge dekking gehandhaafd kan worden. Bijkomende problemen zijn de verminderde kudde immuniteit door beperkte IgA immunisatie van de darmen en het gebrek aan goed en steriel materiaal.

Eenmaal ontdekt waren de meeste cVDPV goed te controleren, behalve die in Nigeria. Nigeria heeft sinds 2005 last van een VDPV type 2 uitbraak die nu nog steeds voortduurt. Deze uitbraak is een voorbeeld van wat er kan gebeuren als er transmissie en evolutie van VDPV in een slecht geïmmuniseerde populatie plaats vindt (21). Door deze uitbraak is het duidelijk dat er afgerekend moet worden met alle circulerende virussen door middel van het gebruik van IPV.

Dit moet gedaan worden op een gecoördineerde manier en overal ter wereld. Want als er ook maar één land OPV blijft gebruiken dan zijn de risico's nog steeds aanwezig.

Mocht polio binnen een korte tijd uitgeroeid worden dan moet vaccinatie blijven gebeuren. Onontdekte cVDPV kunnen enkele jaren in populaties blijven circuleren, en levende virussen kunnen opnieuw geïntroduceerd worden door immuundeficiënte patiënten die iVDPV uitscheiden (8).

Het is belangrijk dat populaties goed beschermd blijven want herintroductie in een niet geïmmuniseerde populatie brengt nog veel ergere gevolgen met zich mee (5).



## Slotwoord

Recombinatie met Coxsackie A virus komt veel voor bij cVDPV. In deze scriptie is geprobeerd te beantwoorden. Er is gebleken dat het niet waarschijnlijk is dat VAPP en VDPV ontstaan door middel van de recombinatie. Doordat bijna alle cVDPV uitbraken bestonden uit vaccin/coxsackie A recombinanten suggereert dat er een voordeel is voor het virus. Men denkt dat recombinatie van de niet-structurele delen kan bijdragen aan de overdraagbaarheid en de virulentie van het VDPV. Wel staat vast dat recombinatie bijdraagt aan verrijking van de genotypische en fenotypische biodiversiteit van poliovirussen maar ook van coxsackie A virussen. Het is erg belangrijk dat er onderzoek gedaan blijft worden naar de precieze rol van recombinatie. Want deze cVDPV zijn een bedreiging voor de wereldwijde uitroeiing van de poliovirussen. Misschien vindt er wel recombinatie tussen de capsid delen plaats en ontstaat er een nieuw serotype. Tegen dit serotype bestaat geen enkele immuniteit bij niemand. Een studie heeft uitgewezen dat poliovirussen en coxsackie A virussen een gezamenlijke voorouder hebben. Bij deze voorouder heeft verandering plaatsgevonden wat leidde tot een receptor switch (2). Bij een circulerende coxsackie A virus zou dat ook plaats kunnen vinden en dan ontstaat er een nieuw en onbekend 'poliovirus'. Dit is misschien wat extreem maar het is om aan te geven dat we niet precies weten hoe het gaat want virussen zijn onvoorspelbaar.

## Referenties

1. Arita M, Shuang-Li Z, *et al.* 2005. A Sabin 3-Derived Poliovirus Recombinant Contained a Sequence Homologous with Indigenous Human Enterovirus Species C in the Viral Polymerase Coding Region. *J. Virol.* 79(20):12650
2. Bonnet MC & Dutta A. 2008. World wide experience with inactivated poliovirus vaccine. *Vaccin.* 26(3):4978-4983
3. Brown B, Oberste MS, *et al.* 2003. Complete genomic sequencing shows that polioviruses and members of human enterovirus species C are closely related in the noncapsid coding region. *J. Virol.* 77(6):8973-8984
4. Chumakov KM, Norwood LP, *et al.* 1992. RNA sequence variants in live poliovirus vaccine and their relation to neurovirulence. *J. Virol.* 66:966–70
5. Chumakov K, Ehrenfeld E, *et al.* 2007. Opinion: Vaccination against polio should not be stopped. *Nature Reviews Microbiol.* 5:952-958
6. Combiescu M, Guillot S, *et al.* 2007. Circulation of a type 1 recombinant vaccine-derived poliovirus strain in a limited area in Romania. *Arch. Virol.* 152(4):727-738
7. Dowdle WR, de Grouville E, *et al.* 2003. Review: Polio eradication: the OPV paradox. *Rev. Med. Virol.* 13:277-291
8. Ehrenfeld E, Modlin J, *et al.* Review: Future of polio vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 8(7):899;905
9. Estivariz CF, Watkins MA, *et al.* 2008. A large vaccine-derived poliovirus outbreak on Madura island-Indonesia, 2005. *J. Infect. Dis.* 197(3):347-354
10. Fine P. 1993. Herd immunity: History, theory, practice. *Epidemiol Rev* 15(2):265-302
11. Furione M, Guillot S, *et al.* 1993. Polioviruses with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virol.* 195(1):199-208
12. Geen auteurs. 2003. Introduction of inactivated poliovirus vaccine into oral poliovirus vaccine using countries. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 78(28):241-250
13. Georgescu MM, Delpeyroux F, *et al.* 1995. Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/nonvaccine recombinant poliovirus. *J. Gen. Virol.* 76:2343:2348
14. Gromeier M, Bossert B, *et al.* 1999. Dual stem loops within the poliovirus internal ribosome entry site controls neurovirulence. *J. Virol.* 73:958-964
15. Haller AA, Stewart SR, *et al.* 1996. Attenuation stem-loop lesions in the 5'noncoding region of poliovirus RNA: neuronal Cell-specific translation defects. *J. Virol.* 70:1467-1472
16. He Y, Bowman VD, *et al.* 2000. Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(1):79-84
17. Holland J, Spindler K, *et al.* 1982. Rapid evolution of RNA genomes. *Science.* 215:1577-1585
18. Hugle JM. 2006. Poliovirus Cell Entry: Common structural themes in viral entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:677-702
19. Jarvis TC & Kirkegaard K. 1992. Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO J.* 11(8):3135-3145
20. Jegouic S, Joffret ML, *et al.* 2009. Recombination between polioviruses and co-circulation coxsackie A Viruses: Role in the emergence of pathogenic vaccine-derived polioviruses. *PLoS. Pathog.* 5(5):e1000412
21. Jenkins HE, Aylward RB, *et al.* 2010. Implications of a circulation vaccine-derived poliovirus in Nigeria. *N. Engl. J. Med.* 362:2360-2369
22. Jesus de N.H. 2007. Review: Epidemics to eradication: the modern history of poliomyelitis. *Virol. J.* 4:70

23. Jiang P, Faase AJ, *et al.* 2007. Evidence for emergence of diverse polioviruses from C-cluster coxsackie A viruses and implications for global poliovirus eradication. *PNAS*. 104(22):9457-9462
24. Kaufmann JR & Feldbaum H. 2009. Diplomacy and the polio immunization boycott in northern Nigeria. *Health Aff.* 28(4):1091-1101
25. Kawamura N, Kohara M, *et al.* 1989. Determinants in the 5'noncoding region of poliovirus Sabin 1 RNA that influence the attenuation phenotype. *J. Virol.* 62:1302-1309
26. Kew OM, Morris-Glasgow V, *et al.* 2002. Outbreak of Poliomyelitis in Hispaniola associated with circulation type 1 Vaccine-Derived Poliovirus. *Science*. 296:356-359
27. Kew OM, Mulders MN, *et al.* 1995. Molecular epidemiology of polioviruses. *Semin. Virol.* 6:401-414
28. Kew OM, Sutter RW, *et al.* 1998. Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J. Clin. Microbiol.* 36(10):2893-2899
29. Kew OM, Sutter RW, *et al.* 2005. Vaccine- derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication. *Annu. Rev. Microbiol.* 59:587-635
30. Khetsuriani N, Prevots DR, *et al.* 2003. Persistence of vaccine-derived poliovirus among immunodeficient persons with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Infect. Dis.* 188(12):1845-1852
31. Kim-Farley R, Bart K, *et al.* 1984. The epidemiology of poliomyelitis in the United States: virtual elimination of disease caused by wild virus. *Lancet*. 2:315-1
32. Knowles NJ. Polioviruses are members of HEV-C. <http://talk.ictvonline.org/media/p/233.aspx>. 2008
33. Kohler KA, Banerjee K, *et al.* 2002. Vaccine-associated paralytic poliomyelitis in India during 1999: decreased risk despite massive use of oral polio vaccine. *Bull. World Health Organ.* 80:210-216
34. Liang X, Zhang Y, *et al.* 2006. An outbreak of poliomyelitis caused by type 1 vaccine-derived poliovirus in China. *J. Infect. Dis.* 194(5):545-551
35. Macadam AJ, Arnold C, *et al.* 1989. Reversion of the attenuated and temperature-sensitive phenotypes of the Sabin type 3 strain of poliovirus in vaccinees. *Virol.* 172:408-414
36. Macadam AJ, Pollard SR, *et al.* 1993. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 2 vaccine strain of poliovirus in primates. *Virol.* 192:18-26
37. Maclennan C, Dunn G, *et al.* 2004. Failure to clear persistent vaccine-derived neurovirulent poliovirus infection in an immunodeficient man. *Lancet*. 363:1509-1513
38. Martin J, Samoilovich E, *et al.* 2002 Isolation of an intertypic poliovirus capsid recombinant from a child with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J. Virol.* 76:10921-10928
39. Minor P. 2009. Review: Vaccine-derived poliovirus (VDPV): Impact on poliomyelitis eradication. *J Vaccin.* 27(20):2649-2652
40. Modlin JF. 2010. The bumpy road to polio eradication. *N. Engl. J. Med.* 362:2346-2346
41. Murray PR, Rosenthal KS & Pfaller MA. *Medical Microbiology sixth edition.* Mosby Elsevier. Hoofdstuk 56 Picorna virusses p553-560
42. Nathanson N & Martin JR. 1979. The epidemiology of poliomyelitis: enigmas surrounding its appearance, epidemicity, and disappearance. *Am. J. Epidemiol.* 110(6):672-92
43. Nathanson N. 2011. Eradication of poliovirus: Fighting fire with fire. *J. Infect. Dis.* 203(7):889-890
44. Ochs K, Zeller A, *et al.* 2003. Impaired binding of standard initiation factors mediates poliovirus translation attenuation. *J. Virol.* 77(1):115-122
45. Oker-Blom N, Penttinen K, *et al.* 1984. Inactivated poliovirus vaccine in Finland. *Rev. Infect. Dis.* 6(Suppl. 2):S461-6

46. Omata T, Kohara M, *et al.* 1986. Genetic analysis of the attenuation phenotype of poliovirus type 1. *J. Virol.* 58:348-358
47. Paul AV, Mugavero J, *et al.* 2000. Studies on the attenuation phenotype of polio vaccines: poliovirus RNA polymerase derived from Sabin type 1 sequence is temperature sensitive in the uridylylation of VPg. *Virol.* 272:72–84
48. Pelletier J, Kaplan G, *et al.* 1988. Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol. Cell. Biol.* 8:1103-1112
49. Racaniello V. 2006. One hundred years of poliovirus pathogenesis. *Virology* 344(1):9-16
50. Rakoto-Andrianarivelo M, Guillot S, *et al.* 2007. Co-circulation and evolution of polioviruses and species C-enteroviruses in a district of Madagascar. *PLoS. Pathog.* 3(12):e191
51. Ren R, Moss EG, *et al.* 1991. Identification of two determinants that attenuate vaccine-related type 2 poliovirus. *J. Virol.* 65:1377-1382
52. Riquet FB, Blanchard C, *et al.* 2008. Impact of exogenous sequences on the characteristics of an epidemic type 2 recombinant vaccine-derived poliovirus. *J. Virol.* 82(17):8927-8932
53. Ruitenbergh EJ & Heinsbroek E. 2010. Review: The global introduction of inactivated polio vaccine can circumvent the oral polio vaccine paradox. *Vaccin.* 28:3778-3783
54. Sabin AB & Boulger LR. 1973. History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J. Biol. Stand.* 1:115-118
55. Sabin AB 1985. Oral poliovirus vaccine: History of its development and use and current challenge to eliminate poliomyelitis from the world. *J. Infect. Dis.* 151(3):420-436
56. Salk JE, Krech U, *et al.* 1954. Formaldehyde treatment and safety testing of experimental poliomyelitis vaccines. *Am. J. Public. Health.* 44(5):563-570
57. Savolainen-Kopra C, Samoilovich E, *et al.* 2009. Comparison of poliovirus recombinants: accumulation of point mutations provides further advantages. *J. Gen. Virol.* 90(8):1859-1868
58. Savolainen-Kopra C & Blomqvist S. 2010. Review: Mechanisms of genetic variation in polioviruses. *Rev. Med. Virol.* 20(6):358-371
59. Shimizu H, Thorley B, *et al.* 2004. Circulation of type 1 vaccine-derived poliovirus in the Philippines in 2001. *J. Virol.* 78(24):13512-13521.
60. Shimojo H. 1984. Poliomyelitis control in Japan. *Rev. Infect. Dis.* 6(Suppl. 2):S427–S30
61. Stanway G, Hughes PJ, *et al.* 1984. Comparison of the complete nucleotide sequences of the genomes of the neurovirulent poliovirus P3/Leon/37 and its attenuated Sabin vaccine derivative P3/Leon 12a1b. *Proc. Natl. Acad. Sci. UAS* 81:1539-1543
62. Stephen G, Pilipenko E, *et al.* 2004. Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *Am. Soc. Microbiol.* 78(20):11097-11107
63. Terry LL. 1962. The association of cases of poliomyelitis with the use of type III oral poliomyelitis vaccines. U.S. department of health, education and wild fare.
64. Varughese PV, Carter AO, *et al.* 1989. Eradication of indigenous poliomyelitis in Canada: impact of immunization strategies. *Can. J. Public. Health.* 80:363–68
65. Wassilak S, Pate MA, *et al.* 2011. Outbreak of type 2 vaccine-derived poliovirus in Nigeria: emergence and widespread circulation in an under immunized population. *J. Infect. Dis.* 203(3):898-909
66. Westrop GD, Wareham KA, *et al.* 1989. Genetic basis of attenuation of the Sabin type 3 oral poliovirus vaccine. *J. Virol.* 63:1338-1344
67. Wezel van AL, Steenis van G, *et al.* 1984. Inactivated poliovirus vaccine: current production methods and new developments. *Rev. Infect. Dis. Suppl* 2:S335-40

68. World Health Assembly. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000: Resolution of the 41st World Health Assembly. Resolution WHA 41.28. World Health Organization: Geneva, 1988
69. World Health Organization. Polio: The beginning of the end. World Health Organization: Geneva, 1997
70. World Health Organization. 2010. Polio eradication initiative: Strategic Plan 2010-2012
71. Yang C, Naguib T, *et al.* 2003. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J. Virol.* 77(15):8366-8377
72. Zuest S, Pilipenko E, Sharma K, Chumakov K, Roos RP. 2004. Molecular mechanisms of attenuation of the Sabin strain of poliovirus type 3. *J. Virol.* 78:11097–107