

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL PEDRO KOURÍ

Aportes al conocimiento acerca de la permanencia y circulación del poliovirus vacunal en el ambiente

Dra. Patricia Jiménez,¹ Dr. Pedro J. Más,² Lic. Luis R. Sarmiento,³ Lic. Marité Bello,⁴ Téc. Rosa E. Palomera⁵ y Dr. Julio Barrios⁶

RESUMEN

La erradicación de la poliomielitis mundialmente es una meta cercana y presupone la adopción de estrategias efectivas y seguras. Conocer cuánto tiempo pueden circular y permanecer en el ambiente las cepas de poliovirus derivadas de la vacuna oral de virus atenuado, resultó esencial en la definición de las medidas a asumir y fue el objetivo del presente trabajo. Se analizaron muestras de heces fecales y aguas albañales, obtenidas semanalmente al finalizar la Campaña Nacional de Vacunación Antipolio del año 1998 en Cuba. Los virus se aislaron e identificaron mediante cultivo y pruebas de neutralización para la identificación de poliovirus, en el caso particular de las aguas albañales se empleó además el método de la reacción en cadena de la polimerasa. Se trazaron las curvas de eliminación en ambos medios y se concluyó que la permanencia de los virus en el ambiente no sobrepasa las 12 semanas posteriores a la inmunización con la vacuna oral de virus atenuado.

DeCS: POLIOMIELITIS/prevenición & control; CAMPAÑAS DE VACUNACIÓN; AMBIENTE.

La poliomielitis es una enfermedad a erradicar en los primeros años del nuevo milenio. Las Organizaciones Mundial y Panamericana de la Salud (OMS/OPS) se hallan enfrascadas en tal propósito.¹ La disponibilidad de vacunas efectivas para ser aplicadas a escala mundial, hace posible la materialización de este sueño, que es el final ideal para todas las enfermedades infecciosas que azotan a la humanidad.

El virus de la polio es un miembro de la familia Picornaviridae, género *Enterovirus*, e incluye 3 serotipos definibles clásicamente por pruebas de neutralización como poliovirus 1, 2 y 3.

La transmisión del virus sigue la vía digestiva y en este sistema ocurre la mayor multiplicación viral, que garantiza la propagación de los virus desde

este punto y por vía axonal al sistema nervioso central y células motoras del asta anterior del cordón espinal, así como la excreción de nuevas partículas infecciosas por las heces fecales. Afortunadamente, se presentan más de 1 000 casos de enfermedad inaparente por cada caso que desarrolla parálisis. Por otra parte, la obtención, producción y aplicación de vacunas virales inactivadas (VIP) y vivas atenuadas ha causado reducción marcada de la incidencia de la poliomielitis en todo el mundo.² Hoy día en muchos países (casi todos desarrollados) solo las cepas vacunales con su consiguiente carácter atenuado parecen circular, por lo que han reemplazado al poliovirus salvaje. No obstante, este virus sigue produciendo parálisis aguda en 1 de cada 1 000 niños que nacen en países subdesarrollados.

¹ Especialista de I Grado en Microbiología.

² Especialista de II Grado en Microbiología. Profesor Titular.

³ Máster en Ciencias. Licenciado en Bioquímica.

⁴ Máster en Ciencias. Licenciada en Microbiología.

⁵ Técnica en Microbiología.

⁶ Especialista de I Grado en Microbiología.

En Cuba se inició la vacunación antipolio por vía oral (VOP) en forma de campañas anuales en 1962, de modo que hasta el presente suman ya 39 campañas. La población cubana menor de 50 años posee una cobertura vacunal mayor que 90 % y no ha sido reportado ningún caso de parálisis infantil por poliovirus salvaje desde que se aplica la vacunación. Esta ha ido acompañada siempre de un sólido programa de vigilancia con soporte de laboratorio (Teja J, Ramírez A, Córdova L, Santín M, Galindo M, Más P. Informe preliminar del MINSAP para optar por el certificado de erradicación de la poliomiélitis en el continente americano. MINSAP, Cuba, 1994.).

Dada toda esta serie de logros y teniendo en cuenta que la vacunación con VOP en Cuba se lleva a cabo en un único período del año, de modo que no se justifica la circulación de virus en otra época a menos que ocurra excreción permanente y persistencia ambiental, se decidió fuera Cuba el modelo de estudio del tiempo de permanencia y circulación del poliovirus vacunal en el ambiente, por parte del Comité de Expertos de OMS/OPS:

Suspender la administración de VOP globalmente después de la inmunización a la población infantil de todo el mundo por campañas masivas, implica la acumulación de susceptibles que se pueden poner en contacto con los virus derivados de la vacuna (excretados por los vacunados) presentes en el ambiente. Si a esto se añade que las cepas de poliovirus vacunal al replicarse en el tracto gastrointestinal y circular entre la población tienden a revertir al estado salvaje de las cepas que las originaron,³ cabe preguntarse: ¿qué tiempo pueden permanecer entre la población y en el medio ambiente las cepas de poliovirus vacunal a partir de que se interrumpe la vacunación? Dar respuesta a esa interrogante es el objetivo principal de esta investigación.

MÉTODOS

UNIVERSO DE ESTUDIO

Estuvo conformado, de un lado, por los niños menores de 3 años de 2 áreas de salud de Ciudad de La Habana, seleccionados por análisis estadístico según su población infantil, la condición

de estar servidas estas áreas por un sistema de alcantarillado único y accesible y la carencia relativa de contaminantes ambientales. Por otra parte, se incluyeron las aguas albañales de 2 puntos de recogida por cada área de salud seleccionada.

DISEÑO

A partir de una semana después de concluida la segunda vuelta de la Campaña Nacional Antipolio de 1998, y durante 5 semanas, se obtuvieron muestras de heces fecales de los niños seleccionados. Este proceso se repitió 15 d más tarde y durante una semana y 1 mes después durante otra, para un total de 673 muestras. Coincidiendo con los períodos de recolección de las heces fecales, se tomaron un total de 56 muestras de aguas albañales, a razón de 1 L por cada punto de recogida, 2 veces por semana, lo que representó 8 L semanales de aguas negras.

Las muestras de heces fecales fueron procesadas mediante una suspensión a 10 % (peso/volumen) en medio esencial mínimo con antibiótico. Se homogeneizaron y centrifugaron a 13 000 rpm durante 10 min. Se mezclaron 900 µL del sobrenadante con 100 µL de cloroformo y tras una nueva centrifugación se extrajo el sobrenadante listo para inocular en los cultivos celulares.

En las aguas albañales se realizaron la recuperación y concentración de virus según los principios generales del método descrito por *Sobsey* y otros en 1987,⁴ de tal forma que se obtuvo un volumen final de 6 mL por cada litro de agua.

Las muestras procesadas se inocularon en los sistemas celulares para aislamiento: células de línea de rhabdomiosarcoma embrionario humano (RD) altamente sensibles al crecimiento de *Enterovirus*,⁵ y células de línea transfectada a partir de la línea L de ratón con el clon ADN (20B) del gen que codifica para el receptor humano para poliovirus (L20b), sistema selectivamente permisivo para el crecimiento de los poliovirus.⁶ En cada caso se inocularon por duplicado las muestras en ambos sistemas celulares, se incubaron los tubos a 37 °C y se observaron durante 10 d en busca de la aparición de efecto citopático (ECP).

Las muestras que causaron ECP en RD fueron pasadas a L20b y todas las que mostraron ECP en

L20b se sometieron a prueba de neutralización para la identificación del poliovirus, previa titulación viral por micrométodo. En el caso específico de las muestras de aguas negras, se aplicó RCP tanto a las positivas por cultivo celular como a la totalidad de las muestras directamente, para esto se hizo extracción del ARN por el método del TRIZOL. Los cebadores usados para la RCP fueron cebadores degenerados, diseñados por *Kilpatrick* y otros en 1998 e hibridan con sitios altamente conservados dentro de la región VP1 de los poliovirus, lo que permite la amplificación de una secuencia de 79 pb.⁷

RESULTADOS

La tabla indica el número de muestras de heces fecales y aguas albañales recogidas cada semana, los aislamientos de poliovirus encontrados y el porcentaje que estos representaron respecto del número total de muestras.

TABLA. Muestras de heces fecales y aguas negras analizadas cada semana, cantidad y porcentaje de aislamientos positivos y poliovirus

Semanas	Heces fecales		Aguas albañales	
	No. muestras	Positivas %	No. muestras	Positivas %
1	100	26(26)	8	8(100)
2	92	22(23,9)	8	8(100)
3	100	30(30)	8	5(62,5)
4	93	25(26,9)	8	3(37,5)
5	91	12(13,2)	8	3(37,5)
8	104	0	8	1(12,5)
12	93	0	8	0
Total	673	115(17,1)	56	28(50)

La expresión gráfica de estos resultados permite plantear las curvas de eliminación en ambos medios, según se muestra en la figura. Se evidencia una tendencia descendente de los niveles de detección desde la semana primera hasta la quinta, y la interrupción de las identificaciones en heces fecales y aguas albañales a partir de las semanas 8 y 12 respectivamente.

Puede apreciarse, y fue comprobado mediante la prueba de diferencia de proporciones aplicada a los datos, que existe una marcada diferencia

(estadísticamente significativa para $p < 0,01$) entre los porcentajes de positividad calculados para las muestras de heces fecales y las de aguas negras.

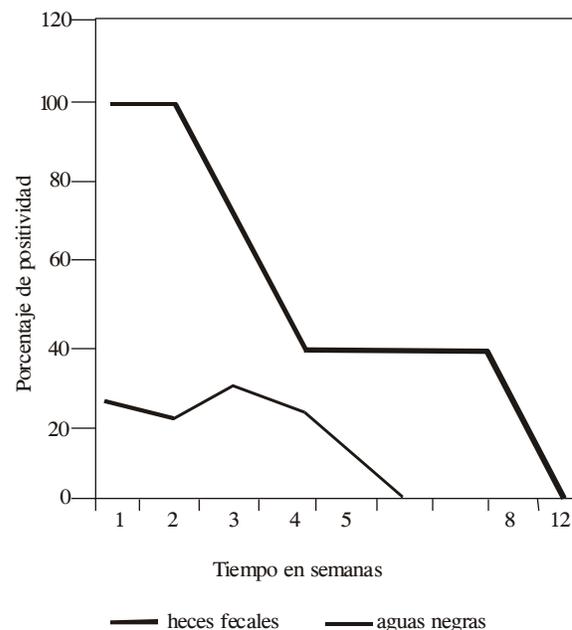


Fig. Curvas de eliminación de poliovirus vacunal en heces fecales y aguas albañales, después de concluida la inmunización con la vacuna oral de virus atenuado.

DISCUSIÓN

Las curvas trazadas según los porcentajes semanales de positividad describen una brusca caída, lo que concuerda con los reportes de otros investigadores como *Sabin* y otros en 1960,⁸ *Más* y otros en 1975⁹ y 1991-1992¹⁰ y *Poyri* y otros en 1988,¹¹ aunque los diseños de sus investigaciones no se concibieron con la finalidad de demostrar, por medio de una muestra representativa, el tiempo de permanencia y circulación de las cepas de poliovirus derivadas de la vacuna en el ambiente y entre una población con alta cobertura vacunal.

La muestra en la curva correspondiente a las muestras de heces fecales por la diferencia entre los porcentajes de aislamientos positivos en las semanas 2 y 3, pudiera deberse a la excreción intermitente que se produce después de administrar la VOP.

La diferencia en altura de las curvas obedece a que los promedios respectivos de los porcentajes de positividad para heces fecales y aguas negras son de 17,1 y 50 %. Esto es atribuible a que el

agua albañal es 100 veces más sensible que las heces fecales para detectar magnitud de niños excretadores de virus (lo que significa matemáticamente que con 0,01 de individuo excretando virus ya será positiva una muestra de aguas negras).¹²

En cuanto al tiempo, relativamente mayor, de eliminación de virus de las aguas negras con respecto a las heces fecales, debe considerarse que en las primeras convergerán los virus eliminados por toda la población y su permanencia en ese medio no estará limitada por los mecanismos aclaradores de virus que actúan al nivel de individuo como respuesta de su sistema inmunitario, sino por condiciones ambientales específicas de salinidad, temperatura, acidez y contenido de sustancias orgánicas e inorgánicas.

SUMMARY

The eradication of poliomyelitis in the world is a goal that requires the adoption of effective and safe strategies for its attainment. Knowing how long the strains of poliovirus derived from the oral attenuated virus vaccine may circulate and remain in the environment was essential to define the measures to be taken and was also the objective of our paper. Specimens of stools and sewage water, which were weekly obtained at the end of the National Polio Vaccination Campaign, in 1998, were analyzed. Viruses were isolated and identified by culture and neutralization tests for the identification of poliovirus. In the particular case of the sewage water, it was also used the polymerase chain reaction. The curves of elimination in both media were drawn and it was concluded that the permanence of viruses in the environment did not exceed the 12 weeks after the immunization with the oral attenuated virus vaccine.

Subject headings: POLIOMYELITIS/prevention & control; MASS VACCINATION; ENVIRONMENT.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO. Global eradication of poliomyelitis by the year 2000. Resolution of the 41st World Health Assembly 1998: Resolution 41.28.
2. Melnick J. Enterovirus, Poliovirus, coxsackievirus, echovirus, and newer enteroviruses. En: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology* 3ed. VolIIUSA: Raven Press, 1996:549-645.
3. Chezzi C, Dommann CJ, Blackburn NK, Maselesele E. Genetic stability of oral polio vaccine prepared on primary monkey kidney cells or Vero cells-effects of passage in cell culture and the human gastrointestinal tract. *Vaccine* 1998;16:2031-8.
4. Sobsey M. Methods for recovering viruses from shellfish, seawater and sediments. En: *Methods for recovering viruses in the environments*. Boca de Ratón, FL: CRC Press, 1987:77-108.
5. Hay R, Caputo J, Chen TR, Macy M, Mc Clintoch P. American type culture collection cataloge of cell lines and hibridomas. 7 ed. 1996:48.
6. Mendelson C, Johnson B, Leonetti K, Nobis P, Wimmer E, Racaniello R. Transformation of a human poliovirus receptor gen into mouse cells. *Proct Natl Acad Sci* 1986:7845-9.
7. Kilpatrick D, Nottay B, Yang S, Da Silva E, Peñaranda S, Pallanch M, *et al.* Serotype-specific identification of polioviruses by PCR using primers containing mixed-base or Deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. *J Clin* 1998;36(2):352-7.
8. Sabin A, Ramos-Álvarez M, Álvares-Almequita J. Live orally given poliovirus vaccine: Effects of rapid mass immunization on population under conditions of massive enteric infection with other viruses. *J Am Med Ass* 1960;173:1521-6.
9. Más P, Louzara C, Beltrán J, Jacobo M, Palomera R. Circulación de poliovirus en la población infantil de Cuba. *Boletín Ofic Sanit Panam* 1979;87(5):443-9.
10. Más P, Bravo R, Andrus J. Lessons from Cuba: mass administration of trivalent oral poliovirus vaccine and seroprevalence of poliovirus neutralizing antibodies. *Bulletin WHO* 1994;71(2):221-5.
11. Poyri T, Stenvik M, Hovi T. Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Applied Environment Microbiol* 1998;54:371-4.
12. Bottiger M, Herrstrom E. Isolation of polioviruses from sewage and their characteristics: experience over two decades in Sweden. *Scand JID*, 1992;24:151-5.

Recibido: 27 de diciembre del 2000. Aprobado: 23 de enero del 2001.

Dra. *Patricia Jiménez*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourf". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba
Correo electrónico: ciipk@ipk.sld.cu