



Vigilancia ambiental de cepas de *poliovirus* en municipios considerados con potencial de riesgo para reintroducción de estos virus en la comunidad

M. D. José Fernando Gómez Hincapié

Universidad del Quindío
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas
Armenia, Colombia
2018

Vigilancia ambiental de cepas de *poliovirus* en municipios considerados con potencial de riesgo para reintroducción de estos virus en la comunidad

M. D. José Fernando Gómez Hincapié

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias Biomédicas

Directora:

M. Sc. María Mercedes González de Schroeder

Codirector:

M. D. PhD John Carlos Castaño Osorio

Línea de Investigación:

Virología

Grupo de Investigación:

GYMOL (Grupo de Inmunología Molecular)

Universidad del Quindío

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Maestría en Ciencias Biomédicas

Armenia, Colombia

2018

“El cosmos es todo lo que es, todo lo que fue y todo lo que será. Nuestras más ligeras contemplaciones del cosmos nos hacen estremecer: sentimos cómo un cosquilleo nos llena los nervios, una voz muda, una ligera sensación como de un recuerdo lejano o como si cayéramos desde gran altura. Sabemos que nos aproximamos al más grande de los misterios”.

Carl Sagan

Agradecimientos

A mis tutores, María Mercedes González de Schroeder, John Carlos Castaño Osorio y Leonardo Padilla Sanabria, por haber compartido sus conocimientos y experiencias en el campo de la virología y epidemiología, además por enseñarme la importancia de la labor como científico, y el impacto que esta puede tener en las comunidades más vulnerables de nuestro territorio.

A mis compañeros de estudios y demás científicos del laboratorio de Ciencias Biomédicas de la Universidad del Quindío por brindar de forma incondicional su apoyo durante las arduas labores de trabajo, y estar dispuestos a compartir sus conocimientos en las diferentes áreas de trabajo, manteniendo un ambiente de respeto y amistad.

A mi familia y amigos por brindarme sosiego en los momentos más difíciles de mis jornadas académicas y laborales como médico, además de su paciencia y amor incondicional.

A los pacientes de mi consulta como médico general, que constantemente me hacen recordar el objetivo de mis esfuerzos como estudiante y como ser humano formado en las ciencias médicas

Resumen

El virus de la polio es un importante patógeno que se transmite por vía fecal-oral. La epidemiología de la infección está directamente relacionada con el acceso de la población al agua potable y con la infraestructura de alcantarillado, por lo tanto los programas de vigilancia epidemiológica permiten mantener altos estándares de seguridad en salud en de las poblaciones vulnerables. De esta forma se puede evaluar el impacto en salud pública producido por el paso de inmigrantes irregulares en las comunidades locales, además de generar el desarrollo de planes de contingencia, saneamiento y apoyo humanitario a las personas provenientes de países donde la poliomielitis continúa siendo de carácter endémico en tres municipios de Colombia: Cali, Turbo, Cúcuta, con alto riesgo de transmisión por flujo de migrantes irregulares. Se llevaron a cabo tres muestreos seriados de abril a noviembre del año 2017, tomados en el principal vertimiento de aguas residuales de cada municipio. Las muestras fueron transportadas al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío y se concentraron empleando el método de “dos fases”, recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Luego se procedió al aislamiento viral en líneas celulares RD y L20B, según el estándar de la OMS para laboratorios de referencia. A las muestras que presentaron efecto citopático (ECP) tanto en células RD como L20B se les hizo extracción de ARN, y posteriormente se procedió a la identificación de los aislamientos, por medio de una RT-PCR, usando tres juegos de iniciadores: EV, Pan PV, además de Sabin 1 y 3. Finalmente se verificó el producto de la RT-PCR, se observó en un gel de agarosa al 2 %, y se dejó registro fotográfico de los hallazgos. En los resultados se identificaron cuatro muestras de aguas residuales con la presencia de bandas con la talla esperada (114 pb) para enterovirus (EV) por RT-PCR; tanto las líneas celulares RD como L20B fueron capaces de aislar EV no polio (EVNP). Los procesos de concentración, aislamiento y, por último, de diferenciación intratípica se desarrollaron de forma satisfactoria, ya que se identificó la presencia de VOPb (Sabin 1 y 3) durante todos los procesos. La investigación permitió detectar la presencia de EVNP en las muestras de agua residual de los municipios en estudio. No se encontró presencia de *poliovirus* derivado de la vacuna o *poliovirus* salvaje. Como recomendación, se indica la importancia de que el sistema de vigilancia se encuentre activo y mantenga la sensibilidad y el elevado nivel de calidad exigido por la OMS, ante la posibilidad de la importación de *poliovirus* salvajes o derivados de la vacuna procedentes de países endémicos o con escaso control en sus programas de salud.

Palabras clave: *poliovirus*, aguas residuales, salud pública, genotipo, *Enterovirus* no polio, migrantes irregulares.

Abstract

The polio virus is an important pathogen that is transmitted through the fecal-oral route. The epidemiology of the infection is directly related to the access of the population to drinking water and to the sewage infrastructure, therefore epidemiological surveillance programs allow to maintain high standards of health safety in vulnerable populations. In this way, the impact on public health caused by the passage of irregular immigrants in local communities can be evaluated, as well as generating the development of contingency, sanitation and humanitarian support plans for people from countries where polio continues to be of a character endemic. In the present study, an environmental surveillance of poliovirus was carried out in three municipalities of Colombia: Cali, Turbo, Cúcuta, with high risk of transmission by flow of irregular migrants. Three serial samplings were carried out in the municipalities of Turbo, Cali and Cúcuta, from April to November of the year 2017, taken as the main discharge of wastewater from each municipality. The samples were transported to the Center for Biomedical Research of the University of Quindío and were concentrated using the "two phase" method, recommended by the World Health Organization (WHO). Then we proceeded to the viral isolation in RD and L20B cell lines, according to the WHO standard for reference laboratories. The samples that showed cytopathic effect (ECP) in both RD and L20B cells were extracted RNA, and then proceeded to the identification of the isolates, by means of an RT-PCR, using three sets of primers: EV, Pan PV, in addition to Sabin 1 and 3. Finally the product of the RT-PCR was verified, it was observed in a 2% agarose gel, and photographic record of the findings was left. In the results, four samples of wastewater were identified with the presence of bands with the expected size (114 bp) for enterovirus (EV) by RT-PCR; both the RD and L20B cell lines were able to isolate non-polio EV (EVNP). The processes of concentration, isolation and, finally, of intratypical differentiation were developed satisfactorily, since the presence of VOPb (Sabin 1 and 3) was identified during all the processes. The investigation allowed detecting the presence of EVNP in the residual water samples of the municipalities under study. No presence of poliovirus derived from the vaccine or wild poliovirus was found. As a recommendation, it is important that the surveillance system be active and maintain the sensitivity and high level of quality required by WHO, given the possibility of importing wild polioviruses or vaccine derivatives from endemic countries or with little control in their health programs.

Key words: poliovirus, wastewater, public health, genotype, non-polio enterovirus, irregular migrants.

Contenido

	pág.
Resumen.....	V
Lista de figuras.....	X
Lista de tablas.....	XI
Lista de símbolos y abreviaturas.....	XII
Introducción.....	1
Objetivos.....	1
Materiales y métodos.....	7
Sitios de muestreo.....	7
Recolección de muestras ambientales.....	9
Concentración de partículas virales.....	9
Determinación de la presencia de <i>poliovirus</i>	11
Aislamiento viral en cultivo celular.....	11
Extracción de ARN.....	13
Iniciadores.....	14
Reacción de amplificación.....	15
Chequeo del producto.....	16
Resultados.....	17
Aislamiento del virus en cultivo celular.....	17
Identificación de los aislamientos.....	17
Discusión.....	22
Conclusiones.....	25
Recomendaciones.....	25
Referencias.....	27

Lista de figuras

	pág.
Figura 1: Municipios incluidos en el estudio	8
Figura 2: Procedimiento para identificación y aislamiento de EV propuesto por la OMS	13
Figura 4: Gel de agarosa al 2 % en TBE al 1x.	18
Figura 5: Gel de agarosa al 2 % en TBE al 1x.	19
Figura 6: Gel de agarosa al 2 % en TBE al 1x.	19

Lista de tablas

	pág.
Tabla 1: Especies de rinovirus y EV	1
Tabla 2: Componentes de medio mínimo esencial de Eagle (MEM)	11
Tabla 3: Secuencia y ubicación en el genoma de los iniciadores.	15
Tabla 4: Casos de PFA notificados durante el período de estudio	20

Lista de símbolos y abreviaturas

ADN:	ácido desoxirribonucleico
ADNc:	ADN complementario
ARN:	ácido ribonucleico
CVA:	coxsackievirus A
CVB:	coxsackievirus B
dNTP:	desoxinucleótido trifosfato
E:	echovirus
ECP:	efecto citopático
EV:	Enterovirus
EVNP:	EV no polio
GPS:	sistema de posicionamiento global
HFMD:	enfermedad mano-pie-boca (<i>hand-foot-mouth disease</i>)
IRES:	sitio interno de entrada al ribosoma
LCR:	líquido cefalorraquídeo
MEM:	medio mínimo esencial (<i>Minimal Esencial Medium</i>)
min:	minuto
NT:	EV no tipificable
Pb:	pares de bases
PBS:	tampón fosfato salino
PCR:	reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFA:	parálisis flácida aguda
PV:	<i>poliovirus</i>
PM:	peso molecular
PETAR:	planta de tratamiento de aguas residuales.
cVDPV:	<i>poliovirus</i> circulante derivado de la vacuna
IPV:	vacuna <i>poliovirus</i> inactivada
iVDPV:	virus derivados de la vacuna relacionados con casos de inmunodeficiencia
OPVb:	vacuna oral de polio bivalente

V:	voltio
VAPP:	poliomielitis parálitica asociada con la vacuna
RD:	rabdomiosarcoma
RT-PCR:	retrotranscripción + PCR
s:	segundo
SFB:	suero fetal bovino
TBE:	tris-bórico-EDTA
TC:	cultivo tradicional
TCID ₅₀ :	dosis infectiva 50 % de un virus en cultivo celular (<i>Tissue Culture Infective Dose</i>)
UN:	unidad neutralizante
VHS:	virus herpes simplex
VP1:	proteína o región codificante para la proteína VP1 de la cápside
VOp:	muestra de control del proceso
WPV:	<i>poliovirus</i> salvaje
5'NTR:	región 5' no traducida o no codificante

Introducción

Los *poliovirus* pertenecen a la familia Picornaviridae, género EV. El genoma viral está compuesto por ARN monocatenario, de polaridad positiva, de unos 7,5 a 8,4 kb aproximadamente; codifica 11 o 12 proteínas según el género (cinco de ellas estructurales) (1). La partícula viral es de simetría icosaédrica, constituida por 60 subunidades o protómeros, cada uno de los cuales está compuesto por 4 proteínas (VP1 a VP4); las proteínas VP1, VP2 y VP3 se encuentran en la superficie del virión, y la VP4 se localiza en el interior, asociada al ARN viral y a la proteína VPg (del inglés *virion protein genoma*); además, no posee envoltura lipídica, lo que le confiere gran resistencia a pH ácidos aunque sensibles a altas temperaturas (inactivados a partir de 56 °C) (2).

Los EV humanos (EV) comprenden más de 100 serotipos, pertenecen al género EV, familia Picornaviridae. El género EV consta de 15 especies: EV A, EV B, EV C (los tres serotipos de *poliovirus* pertenecen a la especie EV C, por lo tanto la especie *Poliovirus* ya no existe) (3), EV D, EV E, EV F, EV G, EV H, EV I, EV J, EV K, EV L, *Rhinovirus A*, *Rhinovirus B* y *Rhinovirus C*.

Tabla 1: Especies de rinovirus y EV

Nombre actual de la especie ¹	Nombre anterior de la especie
<i>Enterovirus A</i>	<i>Enterovirus humano A</i>
<i>Enterovirus B</i>	<i>Enterovirus humano B</i>
<i>Enterovirus C</i>	<i>Enterovirus humano C</i>
<i>Enterovirus D</i>	<i>Enterovirus humano D</i>
<i>Enterovirus E</i>	<i>Enterovirus bovino (grupo A)</i>
<i>Enterovirus F</i>	<i>Enterovirus bovino (grupo B)</i>
<i>Enterovirus G</i>	<i>Enterovirus porcino B</i>
<i>Enterovirus H</i>	<i>Enterovirus simio A</i>
<i>Enterovirus I</i>	-
<i>Enterovirus J</i>	<i>Virus simios no clasificados</i>
<i>Enterovirus K</i>	-
<i>Enterovirus L</i>	-
<i>Rhinovirus A</i>	<i>Rinovirus humano A</i>
<i>Rhinovirus B</i>	<i>Rinovirus humano B</i>
<i>Rhinovirus C</i>	<i>Rinovirus humano C</i>

¹ Los nombres de las especies de rinovirus y EV han sido modificados para eliminar las referencias a los nombres de las especies hospedadoras.

Fuente: International Committee on Taxonomy of Viruses ICTV, feb 2013.

La especie EV C (anteriormente llamada EV humano C) consta de 23 (serotipos): *poliovirus* (PV) 1, PV-2, PV-3, coxsackievirus A1 (CV-A1), CV-A11, CV-A13, CV-A17, CV-A19, CV-A20, CV-A21, CV-A22, CV-A24, EV-C95, EV-C96, EV-C99, EV-C102, EV-C104, EV-C105, EV-C109, EV-C113, EV-C116, EV-C117 y EV-C118. El EV C es la especie tipo del género EV (3). Se asocia con una variedad de presentaciones clínicas, como parálisis flácida aguda (PFA), meningitis, encefalitis, enfermedad cardíaca, pleurodinia, conjuntivitis hemorrágica aguda, enfermedad de mano-pie-boca (HFMD), etc. (4).

El *poliovirus* se transmite de persona a persona, principalmente por vía fecal-oral y, con menos frecuencia, a través de un vehículo común, como el agua o los alimentos contaminados (4). En el ambiente, la partícula viral conserva su capacidad infecciosa durante periodos prolongados (5), lo cual facilita la dispersión del virus en fuentes de agua.

Según la OMS, una de cada 200 infecciones produce una parálisis irreversible (generalmente de las piernas), y entre 5 % y 10 % de estos casos fallecen por parálisis de los músculos respiratorios (6). La iniciativa mundial de erradicación de la polio fue lanzada en el año 1988, por la OMS. Desde entonces, la incidencia de transmisión de polio salvaje (WPV, por sus siglas en inglés) ha disminuido drásticamente: los casos de poliomiелitis han disminuido en más de un 99 %. De los 350.000 casos estimados en 1988, se pasó a los 9 notificados en países endémicos, en el 2018 (7). Se han evitado más de 16 millones de casos de parálisis, como resultado de los esfuerzos mundiales por erradicar la enfermedad.

La poliomiелitis (poliomiелitis anterior aguda y parálisis infantil) se caracteriza por presentarse en clínica como una PFA de inicio súbito. La enfermedad afecta principalmente a niños menores de cinco años y es causada por uno de los tres serotipos de *poliovirus* (PV1, PV2 y PV3) (7). Sin embargo, hasta la fecha los *poliovirus* salvajes siguen siendo endémicos en tres países: Afganistán, Pakistán y Nigeria. Hasta que se interrumpa la transmisión de *poliovirus* en estos países, todos los demás siguen en riesgo de importación de polio. De hecho, se han informado casos de reemergencia en países previamente libres de polio (7, 8).

La vacuna oral contra la poliomiелitis (OPV, por sus siglas en inglés) ha sido uno de los pilares fundamentales en el proceso de erradicación de esta enfermedad, tanto por su costo como por su

accesibilidad y facilidad de administración, lo que favorece altas tasas de cobertura y genera un fenómeno conocido como “vacunación de rebaño”, en poblaciones de escasos recursos donde se presenta una mayor diseminación de la vacuna (9).

Sin embargo, los fenotipos de PV atenuados presentes en la OPV, al ser genéticamente inestables, pueden sufrir mutaciones que dan lugar a casos raros de poliomielitis asociada a la vacuna. Esto puede ocurrir mediante dos mecanismos (10, 11):

1. Readquisición de la neurovirulencia: los virus vivos atenuados de la OPV pueden, a través de la replicación prolongada en un individuo con inmunodeficiencia o en una comunidad con baja cobertura de vacunación, readquirir la neurovirulencia y la transmisibilidad características de los WPV. Estos virus derivados de la vacuna pueden causar casos o brotes de poliomielitis parálitica.

Los *poliovirus* derivados de la vacuna se subdividen en tres categorías:

a. Virus derivados de la vacuna de circulación comunitaria (cVDPV, por sus siglas en inglés): se da cuando hay evidencia de transmisión de persona a persona en la comunidad. Fueron reconocidos por primera vez en el año 2000, durante un brote en la isla La Española (Haití y República Dominicana). La baja cobertura de vacunación es un importante factor de riesgo para los brotes provocados por cVDPV. Estos virus tienen la capacidad de convertirse en endémicos, como se observó en La Española, Nigeria y Egipto (12).

b. Virus derivados de la vacuna relacionados con casos de inmunodeficiencia (iVDPV, por sus siglas en inglés): ocurre principalmente en inmunodeficiencias de linfocitos B (13). La excreción del virus en personas con problemas del sistema inmunitario es prolongada, se ha informado de casos en que la excreción de virus persiste durante diez años o más.

c. Virus derivados de la vacuna ambiguos: aislamientos clínicos a partir de personas sin inmunodeficiencia conocida o aislamientos a partir de aguas residuales de origen desconocido.

2. Mutación hacia la neurovirulencia: este mecanismo es la causa de la poliomielitis parálitica asociada con la vacuna (VAPP, por sus siglas en inglés). Se trata de un evento poco frecuente, vinculado con la administración de la OPV y causado por virus que sufrieron una mutación que provocó el retorno de su neurovirulencia. En la región de las Américas, el riesgo estimado de VAPP en un receptor de la vacuna o en un contacto cercano es de 1/7,68 millones de dosis administradas.

Se estima que, en todo el mundo, hay de 250 a 500 casos de VAPP por año; de ellos, cerca de 40 % se deben al componente del tipo 2 de la vacuna oral trivalente (tOPV, por sus siglas en inglés) (12, 13, 14).

La vigilancia ambiental de *poliovirus* se ha utilizado como una herramienta complementaria en el control de la circulación de WPV y/o cVDPV en muestras ambientales posiblemente contaminadas por heces humanas, incluso en ausencia de casos reportados de PFA (14).

El último caso de *poliovirus* salvaje en las Américas fue detectado en septiembre de 1991, en Perú, y en 1994 la región fue certificada como libre de la enfermedad. Aunque Colombia ha mantenido altas tasas de cobertura de OPV (95-99 %) (16), la no aparición de poliomiелitis causada por WPV no es suficiente para rechazar el riesgo de reintroducción de *poliovirus* provenientes de población migrante de regiones endémicas.

Colombia, por su posición geográfica, es un paso obligado para todo aquel migrante que busca llegar hacia Centro o Norteamérica. Cerca de 34.000 migrantes irregulares fueron detectados en diferentes zonas del territorio nacional durante el año 2016, según el último informe presentado por Migración Colombia. Los extranjeros, provenientes en su gran mayoría de Haití (20.366), Cuba (8.167), India (874), Congo (570) y Nepal (553), fueron ubicados, principalmente, en los departamentos de Antioquia, Nariño y Valle del Cauca, estos departamentos son los más importantes corredores viales utilizados por las redes dedicadas al tráfico de migrantes. Se han identificado nuevas rutas para el tráfico de migrantes, las cuales utilizan como puntos de entrada los departamentos de Putumayo y Amazonas, y tienen como objetivo final el municipio de Turbo, en el departamento de Antioquia, de donde hacen el tránsito hacia Centroamérica (16).

El 18 de junio de 2014, el Centro Nacional de Enlace para el Reglamento Sanitario Internacional (CNE) de Brasil, notificó la detección de *poliovirus* salvaje tipo 1 (WPV1) en muestras de aguas residuales recogidas, en marzo de ese mismo año, en el Aeropuerto Internacional de Viracopos, situado en Campinas, Sao Paulo. El virus se detectó como parte de las actividades de vigilancia rutinaria que Brasil efectúa desde hace más de 20 años. Hasta la fecha, no se ha reportado ningún caso sospechoso o confirmado de poliomiелitis por *poliovirus* en el país (37).

En el 2018, en Venezuela, en el estado Delta Amacuro, en una comunidad perteneciente a la etnia indígena warao se reportó de manera no oficial, por parte del personal de salud local, la existencia

de al menos cuatro casos de PFA. Estos fueron investigados por Dirección de Epidemiología Regional, que fue notificada del caso y tomó diversas muestras para diagnóstico. Estas muestras fueron procesadas en el Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, con identificación de virus polio tipo 3. La comunidad indígena warao se encuentra en uno de los estados con las mayores brechas de coberturas vacunales de todos los tipos de inmunizaciones del Programa Nacional Ampliado de Venezuela. Esta población ha sido afectada, desde finales de 2016, por diferentes enfermedades reemergentes, entre ellas difteria y sarampión, con alta tasa de morbilidad y mortalidad, especialmente en niños. Hasta el momento el Ministerio de Salud venezolano no se ha pronunciado, tampoco ha declarado emergencia sanitaria ni anunciado algún plan de contingencia o notificación a la OPS (Organización Panamericana de la Salud) (17).

El Instituto Nacional de Salud (INS), atendiendo las funciones otorgadas por la Ley 1122 de 2007, el Decreto 3518 de 2006 y, recientemente, el Reglamento Sanitario Internacional (RSI), cumple, entre otras, las acciones de vigilancia en salud pública de las enfermedades inmunoprevenibles que se encuentran en erradicación, eliminación y control, como lo es la poliomielitis, mediante la vigilancia de la PFA en menores de 15 años (18). En Colombia, según los datos del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila), en el 2017 se notificaron casos probables de PFA en el 78 % de las entidades territoriales del país; en el 2016, en el 75,7 %, debido a que algunas de estas cuentan con menos de 100.000 personas menores de 15 años. En el 2018, en el *Boletín Epidemiológico* se han reportado treinta casos de PFA, presentados principalmente en Cundinamarca (Bogotá), Boyacá, Norte de Santander, Nariño, Valle del Cauca y Antioquia (19).

En nuestro país, a pesar de que la vigilancia del evento de PFA se hace de forma permanente, durante los últimos cuatro años no se ha logrado cumplir con algunos de los indicadores de vigilancia establecidos en el Plan de Erradicación, como la investigación oportuna de casos, lo cual demuestra la importancia de los planes de vigilancia epidemiológica en regiones vulnerables, que permitirán aplicar medidas de contingencia oportuna (19, 20).

Objetivos

Objetivos generales

Realizar una vigilancia ambiental de poliovirus en tres municipios de Colombia (Cali, Turbo, Cúcuta) con alto riesgo de transmisión por flujo de migrantes irregulares en Colombia.

Objetivos específicos

- Detectar la presencia de poliovirus en aguas residuales en municipios de los departamentos identificados.
- Realizar la diferenciación intratípica de los poliovirus circulantes en aguas residuales de dichos municipios.
- Caracterizar y determinar la variación mutacional de los poliovirus obtenidos en aguas residuales.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio exploratorio de corte transversal, mediante una encuesta de prevalencia de virus en aguas residuales en los municipios de Cali (Valle del Cauca), zona de tránsito de migrantes provenientes del sur del país; Cúcuta (Norte de Santander), zona de tránsito de la frontera con Venezuela, y Turbo (Antioquia), zona de tránsito del departamento del Chocó, con destino Panamá (Figura 1). Estas poblaciones cumplen con los criterios propuestos por la OMS en el número de habitantes (entre 100.000 y 300.000) que el protocolo de vigilancia epidemiológica sugiere como zonas de alto riesgo de transmisión del virus (20).

Sitios de muestreo

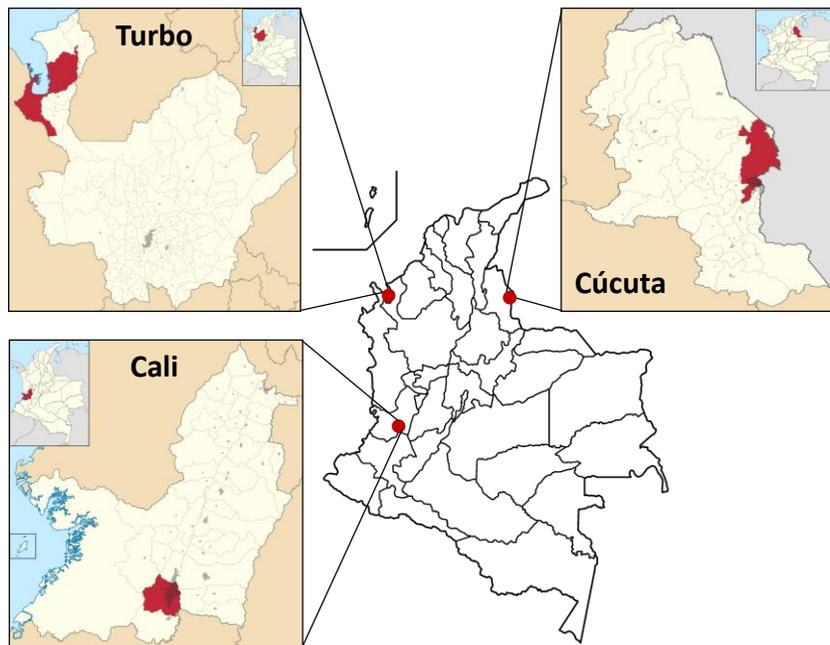
Turbo (Antioquia): cuenta con 163.000 habitantes, distribuidos en 18 corregimientos y 230 veredas, y con una extensión total de 3055 km², repartidos en un área urbana de 11,9 km², y una rural de 3043,1 km². Está a una altitud de 2 msnm, y su temperatura media es de 28 °C. Su acueducto y alcantarillado es administrado por la Empresa Aguas de Urabá, filial de las Empresas Públicas de Medellín (EPM); la zona central de Turbo presenta el menor cubrimiento de este servicio. El alcantarillado se encuentra como una obra en curso, con la que se espera una cobertura residencial del 55 %, equivalente a unos 4000 usuarios. Al momento, la cabecera municipal tiene el 45 % de cobertura, y el resto solo llega al 5,9 %. Se tomaron muestras tanto de las estaciones de bombeo como de los vertederos y lagunas de oxidación. En total fueron cuatro muestras recolectadas en este municipio, los días 20 de abril y 22 de junio del 2017.

Cali (Valle del cauca): la población de esta ciudad es de 2.400.653 habitantes, en 15 corregimientos, 22 comunas y 249 barrios, y la extensión total es de 564 km², a una altitud de 1018 msnm, y con una temperatura media de 26 °C. Su acueducto y alcantarillado es administrado por las Empresas Municipales de Cali (EMCALI), y de los tres municipios seleccionados es el

único que cuenta con una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR), la Cañaveralejo, ubicada entre las comunas 6 y 7, a orillas del río Cauca. Esta planta procesa cerca del 85 % de las aguas residuales del municipio. Las muestras en esta localización se tomaron de dos tanques colectores de aguas residuales de 24 horas, lo que permitió tener una muestra que concentró el total del circuito del alcantarillado de la ciudad. Durante el estudio se recolectaron seis muestras, los días 25 de abril, 26 de junio y 1 de noviembre del 2017.

Cúcuta (Norte de Santander): tiene 668.966 habitantes, en 10 corregimientos y 10 comunas, con una extensión total de 1172 km², a una altitud de 320 msnm, y con una temperatura media de 24 °C. Su servicio de alcantarillado se encuentra manejado por la empresa PAP – PDA Norte de Santander. Se recolectaron cuatro muestras, los días 1 de mayo y 3 de agosto del 2017.

Figura 1: Municipios incluidos en el estudio (Turbo, Antioquia, Cali, Valle del Cauca, Cúcuta, Norte de Santander)



Fuente: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/11/Colombia>

Recolección de muestras ambientales

Durante el procedimiento de recolección se contó con el apoyo del personal técnico de las empresas de acueducto locales. Por cada zona de la región seleccionada, se tomaron dos puntos de colección de los sitios finales de las descargas de alcantarillado y de vertederos de aguas residuales circundantes, las muestras se registraron de forma seriada cada dos meses, comenzando en el mes de abril y finalizando en el mes de noviembre de 2017, con el fin de encontrar mayores posibilidades de concentración viral en las aguas circulantes. Se estima que para detectar excreción de virus (16) las aguas residuales son cien veces más sensibles que las heces, por lo que proporcionan una fuente de información sobre la circulación de estos virus en la comunidad.

Las muestras fueron obtenidas directamente de los puntos de colección, con recipientes plásticos limpios y nuevos de 500 ml, rotulados con el código de las muestras, usando marcador permanente, y sellando para transporte en cadena de frío a 4 °C, hasta el laboratorio del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad del Quindío, donde se hizo la recuperación y concentración de los virus. Una vez recibidas las muestras en el laboratorio, fueron procesadas dentro de las primeras 48 horas de colección. Las que no se alcanzaron a emplear en este tiempo se almacenaron en congelador a -20 °C hasta su uso. Para garantizar la implementación adecuada del procedimiento, se consideraron las condiciones de pluviosidad a lo largo del periodo de recolección, ya que esta variable puede influir en la calidad de la muestra recolectada. Durante el trabajo de campo, se obtuvo información de la infraestructura de las plantas de aguas residuales, además de la georreferenciación tanto por nomenclatura tradicional y GPS (sistema de posicionamiento global).

Como parte del proceso de control de calidad de la técnica, se usó una muestra preparada con agua libre de cloro, material orgánico obtenido de una fuente externa y una dosis de VOPb proporcionada por el programa de vacunación de una entidad prestadora de servicios en salud del departamento del Quindío.

Concentración de partículas virales

El método utilizado para el procesamiento de aguas residuales se denomina "método de separación de dos fases", recomendado por la OMS, que se basa en el empleo de un volumen de 500 ml colectado a partir de un litro de aguas residuales.

Se centrifugaron 500 ml de la muestra de agua residual, por 10 min, a 1000 g (3500 rpm); se eliminaron los residuos flotantes con un aplicador desechable estéril, para evitar interferencia con la separación en fases. El resto de la muestra que no se centrifugó (500 ml) se almacenó a -20 °C, como reserva, hasta la finalización de la inoculación en cultivos de células e interpretación de los resultados del estudio. Se colectó todo el sobrenadante en un beaker o vaso de precipitado de 1 L, de manera que quedara el menor volumen posible de líquido sobrenadante cubriendo el pellet (el pellet se almacenó a 4 °C), y se midió el pH, ajustando con 1N de NaOH o 1N de HCl a pH neutral (7.0-7.4), según la muestra, respectivamente. Se tomaron 500 ml del sobrenadante del vaso de precipitado, y se transfirieron a un matraz de Erlenmeyer estéril de 2 L. Se adicionó al matraz el volumen de sobrenadante producto de la centrifugación, y los reactivos dextran, al 22 % (39,5 ml); PEG 6000, al 29 % (287 ml), y NaCl 5N (35 ml), se agitó vigorosamente a 4 °C por una hora, usando un agitador magnético (a fin de garantizar una mezcla homogénea).

Por cada muestra, se preparó un embudo estéril de separación redondo de cristal de borosilicato, de 2 L, ubicando el embudo en un soporte con anillo. Se preparó la válvula del embudo con lubricante neutro evitando la obstrucción de la salida. Se colocó un tubo estéril de 50 ml, sin tapa, en la parte inferior del embudo, para recoger el posible goteo. Se adicionó al embudo la mezcla del paso anterior, y se dejó toda la noche a 4 °C, para generar la separación de los polímeros y la formación de dos capas o fases.

Al día siguiente se colectaron lentamente (gota a gota) la fase inferior y la interfase en un tubo estéril de 50 ml. Posteriormente se adicionó hipoclorito al 10 % a la fase superior contenida dentro del embudo, y esta se dejó entre 30 min y una hora, con el objetivo de inactivar material potencialmente contagioso, y luego desechar el contenido.

Se resuspendió el precipitado almacenado a 4 °C (del primer paso), con el material colectado del embudo. Luego se mezcló la suspensión obtenida, con un volumen de 20 % de cloroformo. Después de la adición del cloroformo, se agitó vigorosamente por 1 min, y se obtuvo una emulsión que fue centrifugada a 1500 g (4100 rpm) por 20 min, a 4 °C. Se colectó después la fase superior repartiéndola en crioviales de 2 ml rotulados con el código asignado para cada muestra. Se adicionó a cada criovial una mezcla de antibióticos (penicilina 100 IU/ml y estreptomina 100 mg/ml). Se almacenaron las muestras a -20 °C en gradillas rotuladas con la fecha y sitio de recolección, para su posterior uso en aislamiento viral (35, 36).

Determinación de la presencia de *poliovirus*

Aislamiento viral en cultivo celular

En cabina de flujo laminar tipo II, se prepararon tanto los reactivos como los materiales de trabajo necesarios para el cultivo celular. El medio de cultivo, conformado por un medio mínimo esencial de Eagle (MEM, por sus siglas en inglés) sin bicarbonato ni yodo, como constituyente base, se complementó con suero y sales balanceadas (Earle's o Hank's), y se agregaron los agentes tamponadores bicarbonato de sodio y HEPES al 1x, además de antibiótico/antimicótico. El medio de crecimiento incluye un 10 % de suero fetal bovino (SFB) como fuente de nutrientes para el metabolismo y la división celular. La proporción de SFB se redujo al 2 % en medios de mantenimiento, para el sustento mientras se limita la división celular. Los requisitos de medios específicos de las líneas celulares distintas de L20B y RD se confirmaron para optimizar el crecimiento tanto de la línea celular como del virus (22, 23, 24).

Tabla 2: Componentes de medio mínimo esencial de Eagle (MEM)²

Componentes	Medio de crecimiento	Medio de mantenimiento
MEM, con rojo fénol y sin yodo	83,5 ml	90,5 ml
SFB Inactivado a 60 °C	10,0 ml	2,0 ml
Bicarbonato de sodio, 7,5 % ssn	3,5 ml	4,5 ml
HEPES 1 M	1,0 ml	1,0 ml
Penicilina (1x10 ⁴ U/ml) /Estreptomicina (10mg/ml) ssn	1,0 ml	1,0 ml
Volumen total	100 ml	100 ml

Las líneas celulares empleadas corresponden a las recomendadas por la OMS en laboratorios de referencia para el diagnóstico de EV – *poliovirus*. La línea celular de rhabdomyosarcoma humano (RD) se ha utilizado para el crecimiento de una amplia variedad de EV. Las células RD son particularmente útiles para el aislamiento de virus Coxsackie tipo A y ecovirus. El sufijo "-A" en RD-A denota que la línea celular proviene de un miembro de la red del Laboratorio Mundial de Referencia de Polio de la OMS (22, 23). La línea L20B corresponde a células L de fibroblastos de ratón modificadas genéticamente para expresar en la superficie celular el receptor humano (CD155) específico para *poliovirus* (21). Esta línea celular facilita el aislamiento del *poliovirus* en lugar de los EVNP, aunque algunas cepas del virus Coxsackie A (CV-A), en particular CV-A8 y CV-A10,

² Para cultivo de EV en presencia de CO₂ (sistema abierto).

pueden crecer en esta línea celular y generar un ECP característico de EV (22, 23). Los adenovirus y los retrovirus también pueden infectar a las células L20B, con un ECP diferenciable de los EV al microscopio.

Se recuperaron las células que se encontraban almacenadas en nitrógeno líquido a -170°C . Se prepararon los materiales en cabina de flujo laminar tipo II, las células se trasladaron y se descongelaron rápidamente para evitar la formación de cristales de hielo intracelulares, que conducen a la muerte celular. En un frasco de cultivo celular de 25 ml, etiquetado con el tipo de células, fechas y número de pase, se agregó lentamente un medio de crecimiento a las células, para facilitar la dilución de estas y evitar el choque osmótico provocado por el DMSO.

Los frascos de 25 ml fueron llevados a una incubadora con una atmósfera de CO_2 a 36°C . Se evaluó al microscopio la morfología y la confluencia de la monocapa celular en frascos, dentro de las primeras 24 horas, intentando identificar contaminación por microorganismos o toxicidad del medio. Durante los siguientes tres días se examinó la confluencia de la monocapa, que debe ser inferior al 90 %, de modo que las células se encuentren dentro de la fase de crecimiento exponencial y no crezcan demasiado antes del próximo pase.

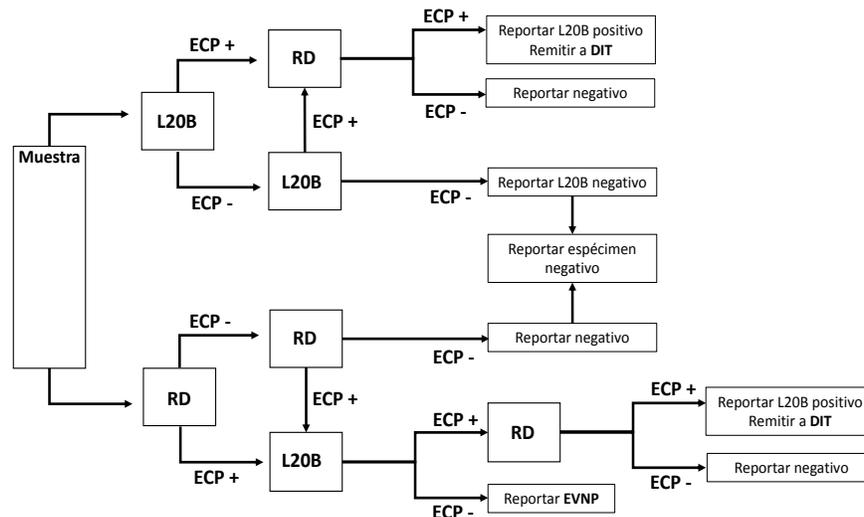
Se tomaron placas de 24 pozos estériles, que fueron rotuladas con los códigos de las muestras, incluyendo los pozos para un control negativo, un control positivo (VOPb) y una muestra de control del proceso de concentración (VOp). Se evaluó al microscopio el crecimiento celular en los pozos asegurando que la monocapa tuviera la apariencia de una morfología normal y, aproximadamente, un 75-90 % de confluencia. Posteriormente se desechó el medio de crecimiento y se reemplazó con 1 ml de medios de mantenimiento.

La inoculación de las células se efectuó en cabina de flujo laminar tipo II, tomando un criovial de 2 ml de las muestras almacenadas a -20°C , para descongelarlo de forma progresiva. Luego se inocularon 200 μl de cada muestra por pozo, y se registró el evento en un formato de seguimiento en el cual se consignó la evolución de los cultivos celulares inoculados. Para la evaluación del ECP se empleó el procedimiento para identificación y aislamiento de EV propuesto por la OMS (Figura 2), en el que se hace el cultivo de forma paralela en las dos líneas celulares (L20B y RD), y se descartan por medio de pases sucesivos los cultivos con ECP positivo o negativo (24). Las placas de 24 pozos se observaron diariamente durante cinco días, en un microscopio invertido, en busca de ECP característico de EV (células redondeadas, refringentes, desprendimiento celular y

alcalinización del medio), se descartaron las muestras que presentaron ECP menor de 72 horas, ya que se relaciona con citotoxicidad del medio; estas muestras se siembran nuevamente en otra placa con células y medio de cultivo fresco.

Las muestras que fueron positivas para ECP durante todo el proceso tanto para células RD como para células L20B se sometieron a identificación por RT-PCR (23, 24, 25).

Figura 2: Procedimiento para identificación y aislamiento de EV propuesto por la OMS



Fuente: http://apps.who.int/immunization_monitoring/Supplement_polio_lab_manual.pdf.

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN a partir de los aislamientos virales, se utilizó el kit de extracción (Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit) siguiendo las consideraciones generales recomendadas para la preparación de todos los componentes. Una vez preparados los componentes del kit, se adicionaron 200 µl de muestra a 600 µl de tampón buffer de lisis, se agregaron 20 µl de proteinasa K y de ARN transportador, y se incubó luego por 10 min a 65 °C, en agitación continua. Posteriormente se agregaron 400 µl de solución de unión. Luego en una columna se colocaron 650 µl de la muestra, y se centrifugó durante 1 min a 5900 g. Se reemplazó el tubo de colección, y se adicionaron nuevamente 650 µl, repitiendo el paso anterior. Después se agregaron 600 µl de buffer de lavado 1, y se centrifugó a 5900 g por 1 min. Se descartó nuevamente el sobrenadante y se colocó la columna en el mismo tubo de colección. Luego se adicionaron 600 µl de buffer de lavado

2, se centrifugó a 5900 g por 1 min y se descartó el sobrenadante (este paso se repite nuevamente). En un tubo de centrifuga estéril libre de ARNsas se le adicionaron 50 µl de buffer de elución (precalentado a 65 °C) directamente sobre la membrana, y se incubó por 3 min a temperatura ambiente, para rehidratar el ARN. Luego se centrifugó a 5900 g por 1 min. Se desechó el filtro y se almacenó de forma inmediata y a baja temperatura el ARN eluido.

Se cuantificó la cantidad de ARN extraído con el kit (Invisorb® Spin Virus RNA Mini Kit), usando un espectrofotómetro (Epoch®), y se determinó por duplicado la cantidad de ARN presente en la muestra, con una concentración de 2,415 ng/µl, lo cual nos permite deducir que se logró extraer ARN. Se encontró una pureza de 1,944, lo que indica una relación 260/280 nm, que está dentro del rango para ácidos nucleicos: entre 1,8 y 2,2 (26).

Iniciadores

Se emplearon cuatro juegos de iniciadores:

- A.** Iniciadores genéricos (EV) que hibridan con sitios altamente conservados dentro de la región 5' no codificante del genoma de los EV, lo que permitió la amplificación de una secuencia de 114 pb (pares de bases) común para todos los EV (27).
- B.** Iniciadores específicos del grupo de los *poliovirus* (Pan PV) que permiten la amplificación de una secuencia de 79 pb común a los tres serotipos de *poliovirus* (28).
- C.** Iniciadores específicos de serotipo (PV) que permiten la amplificación de una secuencia de 70, 79 y 140 pb de las cepas tanto vacunales como salvajes de los serotipos de *poliovirus* 1, 2 y 3, respectivamente (29).
- D.** Iniciadores específicos de las cepas vacunales (Sabin) que permiten la amplificación de una secuencia de 97, 71, y 44 pb de la cepa vacunal Sabin 1, Sabin 2 y Sabin 3, respectivamente, y excluyen la amplificación cruzada con genotipos de WPV (30) (Tabla 3).

Tabla 3: Secuencia y ubicación en el genoma de los iniciadores.

Región VPI (serotipo del virus)	ID Código posición secuencia
A - Iniciadores genéricos EV (<i>enterovirus</i>)	A EV/RCP-1 (539-565) 5' ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC 3'
	A EV/RCP-2 (452-476) 5' TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC 3'
B - Iniciadores general PAN PV (PV -1, PV -2, PV -3)	B PV/RCP-1 (2935-2954) 5' TTIAIIGCRTGICCRTRTT 3'
	B PV/RCP-2 (2875-2894) 5' CITAITCIMGITYGAYATG 3'
C - Iniciadores específicos PV (PV -1), (PV -2), (PV -3)	C PV1/ RCP-1 (2528-2509) 5' TCGGIGAYACIACICAYAT 3'
	C PV 1/ RCP-2 (2459-2477) 5' ATCATICTYTCIARCATYTG 3'
	C PV2/ RCP-1 (2537-2518) 5'-TCCGGIGAYACIACICAYAT 3'
	C PV2/ RCP-2 (2459-2477) 5' AYICCYTCIACIRCICCYTC 3'
	C PV3/ RCP-1 (3176-3157) 5' AAYCCITCIRTITTYTAYAC 3'
	C PV3/ RCP-2 (3037-3056) 5' CCIAIYTGITCRTTIGYRTC 3'
D - Iniciadores específicos PV-SABIN (S -1), (S -2), (S -3)	D Sabin 1/RCP-1 (2584-2601) 5' TCCACTGGCTTCAGTGT 3'
	D Sabin 1/RCP-2 (2505-2523) 5' AGGTCAGATGCTTGAAAGC 3'
	D Sabin 2/RCP-1 (2580-2595) 5' CGGCTTGTGTCCAGGC 3'
	D Sabin 2/RCP-2 (2525-2544) 5' CCGTTGAAGGGATTACTAAA 3'
	D Sabin 3/RCP-1 (2562-2580) 5' TAAGCTATCCTGTTGCTTC 3'
	D Sabin 3/RCP-2 (2537-2553) 5' AGGGCGCCCTAACTTG 3'

Reacción de amplificación

La reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se llevó a cabo siguiendo los principios generales del método aplicado por Sarmiento y colaboradores, en 1998 (31, 32). La reacción se hizo con un volumen final de 25 µl. Para la amplificación del ADNc se utilizaron los iniciadores EV/RCP-1(539-565)5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC-3'y EV/RCP-2(452-476) 5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC-3' empleando el kit de RT-PCR (SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit, Thermo Fisher Scientific). La síntesis de ADN complementario se hizo a 55 °C durante 20 min, y la reacción se inactivó a 95 °C durante 2 min. Luego se llevó a cabo la desnaturalización inicial a 95 °C durante 45 s, por 30 ciclos; la hibridación, a 65 °C durante 45 s, por 30 ciclos; luego, la extensión a 72 °C durante 45 s, nuevamente por 30 ciclos, y una extensión final a 72 °C durante 7 min. (Figura 3).

Las muestras positivas para la detección de Enterovirus (EV) se sometieron a una segunda RT-PCR usando nuevamente los principios generales del método aplicado por Sarmiento y colaboradores (30). Esta vez empleando los iniciadores generales PAN PV B PV/RCP-1 (2935-2954) 5' TTIAIIGCRTGICCRTRTT 3'yB PV/RCP-2 (2875-2894)

5' CITAITCIMGITTYGAYATG 3' en las mismas condiciones descritas previamente para la RT-PCR empleada en la detección (Figura 4).

Se finaliza con la comprobación de la muestra control de VOPb a la que se le realizó todo el proceso descrito (concentración, aislamiento y extracción de ARN), y una RT-PCR en un solo paso, empleando los iniciadores específicos PV-Sabin (S1 y S3) (30): D Sabin 1/RCP-1 (2584-2601) 5' TCCACTGGCTTCAGTGTT 3'yD Sabin 1/RCP-2 (2505-2523) 5' AGGTCAGATGCTTGAAAGC 3',yD Sabin 3/RCP-1 (2562-2580) 5' TAAGCTATCCTGTTGCT TC 3' y D Sabin 3/RCP-2 (2537-2553) 5' AGGGCGCCCTAACTTTG 3', con la RT a 55 °C durante 20 min. Después la mezcla se sometió a 95 °C por 2 min (inactivación de la transcriptasa reversa y desnaturalización de ADN complementario) y 30 ciclos de 95 °C, 45 s (desnaturalización); 65 °C, 45 s (hibridación) y 72 °C, 45 s (extensión). Después del último ciclo, la reacción se mantuvo a 72 °C durante 7 min (última extensión). Terminada la RT-RCP, el producto se conservó a -20 °C hasta su análisis (Figura 5).

Chequeo del producto

El producto de la RT-PCR en el que se emplearon los iniciadores genéricos para EV se observó en gel de agarosa al 2 %, teñido con SYBR-Safe 5 µl; con 4 µl de muestra + 1 µl buffer de corrido y 3 µl MPM 50 pb. Se empleó TBE 1x a 100 V durante 60 min. Se utilizaron 15 muestras (concentradas por el método de dos fases OMS), 14 de ellas correspondientes a las salidas de campo en los tres municipios estudiados, y una al control del proceso (preparado con agua estancada “no clorada” más una dosis de VOPb que contiene Sabin 1 10^6 TciD₅₀ y Sabin 3 $10^{5,8}$ TciD₅₀). Posteriormente se observa en cámara Uv. El peso molecular esperado de cada una de las bandas amplificadas se determinó por la interpolación con un marcador de peso molecular conocido (HyperLadder™ 50 pb), con una talla esperada para las bandas de EV (114 pb).

Resultados

Aislamiento del virus en cultivo celular

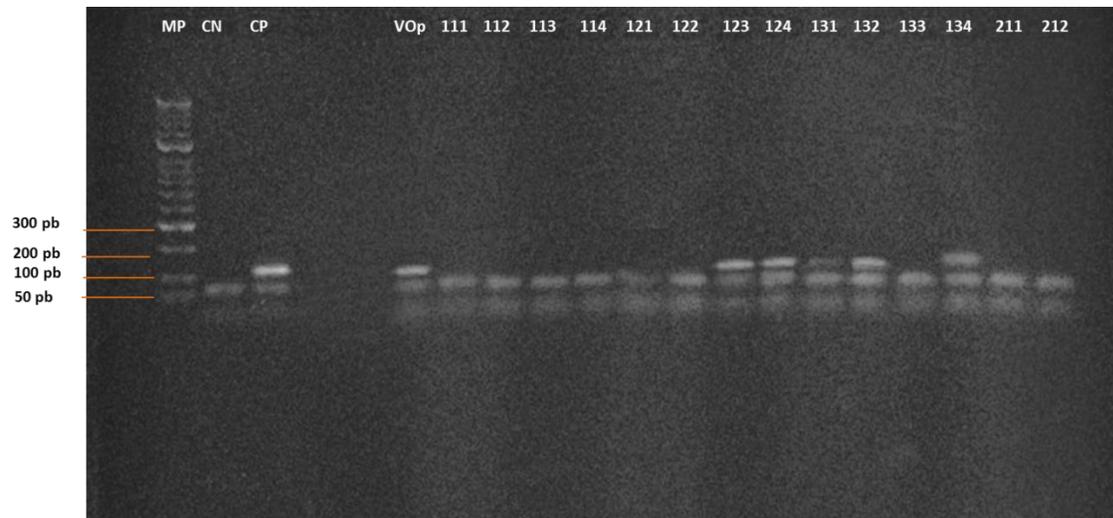
El aislamiento viral en las líneas celulares RD y L20B se produjo en 11/15 muestras, distribuidas de la siguiente manera: 5 muestras presentaron ECP en cultivos de RD y L20B de forma simultánea, 10 muestras mostraron ECP característicos de EV en células RD; solo una muestra presentó ECP en células L20B. Únicamente se identificaron cuatro bandas con el PM esperado (114 pb) para EV por RT-PCR; tanto las líneas celulares RD como L20B fueron capaces de aislar EVNP.

Identificación de los aislamientos

Al ARN aislado de cada una de las muestras de aguas residuales se le efectuó RT-PCR, inicialmente para los iniciadores genéricos de EV, de los cuales se obtuvieron productos de ADNc de 4 muestras iguales a la talla esperada para EV (114 pb). Posteriormente se hizo una nueva RT-PCR de las muestras positivas para EV, con los iniciadores generales para *poliovirus* (PAN PV) en los que solo se observaron las bandas correspondientes al control positivo de la prueba y al control del proceso de concentración, cultivo y extracción de ARN.

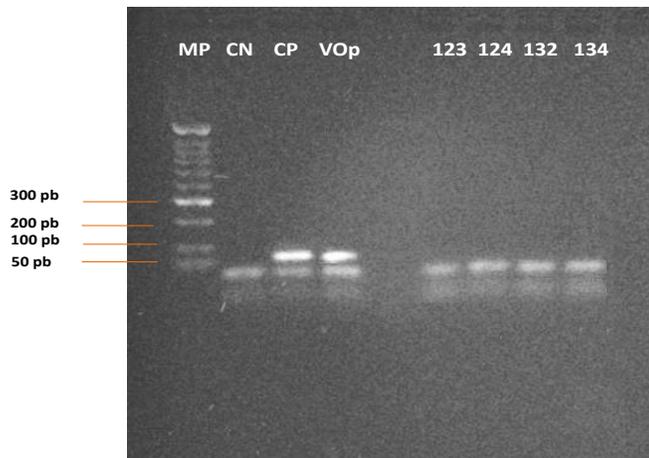
Luego, como parte del proceso de verificación de los procedimientos, se hace una última RT-PCR con los iniciadores específicos PV-Sabin correspondientes, S-1 y S-3, cuyas tallas esperadas son 97 y 44 pb para cada serotipo, respectivamente, y se obtuvieron bandas tenues pero legibles. También se observó la generación de bandas inespecíficas, quizás por la elevada concentración de los iniciadores; estas no influyeron en la correcta interpretación de los resultados, pues poseían pesos moleculares inferiores a los 50 PM.

Figura 3: Gel de agarosa al 2 % en TBE al 1x. RT-PCR con iniciadores genéricos para EV; se emplea la OPVb como control positivo, las muestras de aguas residuales (111, 112, 113, 114, 211 y 212 Turbo), (121, 122, 123, 124 Cali), (131, 132, 133, 134 Cúcuta).



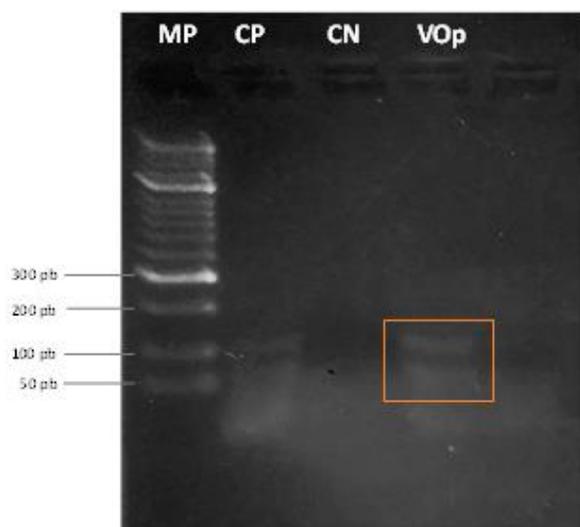
Se obtuvieron bandas cerca del PM esperado para EV (114 pb), en muestras correspondientes a los pozos de control positivo (CP), control del proceso (VOp) y las muestras 123, 124, 132 y 134. Además se observa una banda tenue en el pozo de la muestra 131, a la cual se le realizó una nueva RT-PCR dando resultado negativo, de esta forma se descartó contaminación del pozo con las muestras aledañas. Las bandas observadas por debajo del 50 pb pueden corresponder a dímeros de los iniciadores empleados (Figura 4).

Figura 4: Gel de agarosa al 2 % en TBE al 1x. RT-PCR con los iniciadores generales PAN PV; se emplea la OPVb como control positivo, las muestras 123 a 134 corresponden a las muestras positivas en la RT-PCR para EV.



Se obtuvieron 2 bandas en los pozos correspondientes al control positivo y a la muestras de control del proceso VOp (las cuales contienen OPVb); estas bandas se encuentran cerca al PM esperado para PAN PV (97 pb). No se observaron bandas para las muestras 123, 124, 132, 134 las cuales fueron positivas para enterovirus inicialmente (Figura 5).

Figura 5: Gel de agarosa al 2 % en TBE al 1x.se realiza una última RT_PCR con los iniciadores específicos PV-Sabin correspondientes, S-1 y S-3l la muestra VOp corresponde a la muestra de control del proceso preparada con OPVb del proceso de concentración, aislamiento e identificación.



Se logran observar 2 bandas correspondientes al peso molecular esperado para la muestra de control del proceso (VOp) la cual se realizó de la POVb que contiene los serotipos de los virus atenuados S1 y S3 con pesos moleculares (97 y 44 pb respectivamente),(Figura 6).

Se consultaron los boletines epidemiológicos de los departamentos en los que se encuentran los municipios incluidos en el estudio, teniendo en cuenta las fechas de recolección de las muestras y las semanas epidemiológicas. Los reportes se encuentran consignados en la Tabla 4. No se encontraron para estos periodos notificaciones en los municipios de interés.

Tabla 4: Casos de PFA notificados durante el período de estudio³

Departamento	Número de casos de parálisis flácida aguda (PFA) reportados en el Sivigila
	Semana epidemiológica 01 a 52 de 2017
Antioquia	8
Valle del Cauca	5
Norte de Santander	6

Fuente: Informe de evento parálisis flácida aguda, Colombia, 2017 INS

³ Se cuenta con el número de casos de PFA total reportado por cada departamento, de la semana epidemiológica 01 a 52 de 2017.

Discusión

En Colombia y en otros países latinoamericanos existe escasa información acerca de la circulación de los EVNP y su relación con diversas enfermedades asociadas. En este trabajo se analizaron muestras de aguas residuales de tres municipios que cumplen con las características determinadas por las OMS, estas son: contar con una población mayor a los 100.000 habitantes y encontrarse en zonas de influencia fronteriza donde constantemente hay tránsito de migrantes irregulares provenientes de países que presentan dificultades en los programas de vigilancia epidemiológica y de vacunación. Este estudio proporciona información valiosa que puede servir como base para posteriores investigaciones.

Para la vigilancia del medio ambiente, la investigación de aguas residuales es la estrategia de apoyo de la Iniciativa de Erradicación Mundial de la Poliomieltis (GPEI) (21). Esta vigilancia se constituye en una herramienta valiosa para proporcionar información temprana de presencia del virus en áreas consideradas libres de polio. La vigilancia del medio ambiente proporciona pruebas para la certificación de los países como territorios libres de PV, además de documentación sobre la desaparición del cVDPV, durante el período de transición de la OPVb hacia la IPV, de acuerdo con el Plan de Erradicación de la Poliomieltis 2013 a 2018. Se tiene del 2019 al 2020 como fecha límite para detener el uso global de todas las OPV.

Se ha establecido una red europea de vigilancia de EVNP, conformada por un equipo multidisciplinario de expertos de más de 20 países, encargada de garantizar un diagnóstico rápido y adecuado de los casos de PFA reportados dentro del territorio. Después de analizar las muestras respiratorias y de heces, además del líquido cefalorraquídeo (LCR) y las muestras de sangre de pacientes con PFA u otra sintomatología neurológica, recomiendan el uso de la RT-PCR para el diagnóstico de EV, debido a su sensibilidad, especificidad y corto tiempo de respuesta. Los diagnósticos de laboratorio efectivo y estandarizado y la caracterización de las cepas de virus circulantes son el primer paso hacia actividades de vigilancia eficaz y continua, que a su vez se utilizarán para proporcionar una mejor estimación de la carga de la enfermedad EV (37).

En el año 2016, en la ciudad de Rio de Janeiro, Brasil, se desarrolló un estudio que tuvo como objetivo establecer un protocolo de vigilancia ambiental de EV, además de aislar y caracterizar PV circulantes de aguas residuales. Estas muestras fueron recolectadas en una planta de tratamiento de aguas residuales que atiende aproximadamente a 1,5 millones de habitantes de la ciudad. En dicho

estudio, la tasa de aislamiento de EVNP en líneas celulares L20B y RD fue de 87 % (35), y en un estudio hecho en el año 2004 por Vinje' et al (36), se informó una tasa de aislamiento de 85 %.

Un estudio realizado en las ciudades chinas de Jinan y Linyi, en el año 2016, sobre los EV humanos en aguas residuales y los factores que afectan la absorción, demostró que los sólidos y sedimentos presentes en las muestras pueden ser un gran determinante a la hora de aislar EV, pues estos virus se encontraron en mayor proporción en muestras con abundante materia orgánica que en las que se encontraban diluidas. Esto nos permite pensar que las épocas ideales para la toma de muestras son los periodos de verano (32).

La detección de partículas virales en las muestras de aguas residuales depende en gran medida de factores ambientales y de la eficiencia de la técnica utilizada para establecer la concentración de las partículas virales. En el caso de las aguas residuales, las fuertes lluvias diluyen la materia orgánica presente en los sistemas de recolección. Esto se relaciona con el tipo de alcantarillado combinado de aguas residuales y aguas lluvias presentes en los municipios de Turbo y Cúcuta, a diferencia del municipio de Cali, que cuenta con una PTAR. En época seca la materia orgánica y los contaminantes tienden a concentrarse en los sistemas de alcantarillado porque no ocurre la dilución por aguas lluvias. De manera que estos momentos son los ideales para la recolección de muestras.

Estos efectos se pudieron evidenciar durante los muestreos, especialmente en el municipio de Turbo, cuya ubicación geográfica y características climatológicas lo hacen propenso a presentar fuertes lluvias durante la mayor parte del año. En este caso, cuando había llovido antes de la fecha de la toma de muestras, estas se notaban diluidas con respecto a las tomadas en los otros municipios, lo cual se vio reflejado en el rendimiento de la técnica de concentración y posteriormente en el aislamiento viral y análisis de RT-PCR. Sin embargo, en el momento no es posible determinar cómo estas variables pueden afectar la detección del genoma de EV en este tipo de muestras.

Con respecto al indicador “casos con investigación de campo oportuna”, la cual según lineamientos internacionales se debe llevar a cabo en un periodo no superior a 48 horas después de la notificación del caso y debe hacerse oportunamente en el 80 % o más del total de casos notificados, se observa que el cumplimiento en el país, hasta la semana epidemiológica 52 de 2017, fue de 66 %. Entre las entidades territoriales que no alcanzan el 80 % de cumplimiento se encuentran Antioquia, Norte de Santander y Valle del Cauca, lo que deriva en la posible evidencia de un subregistro de los casos de

PFA e impide realizar un adecuado seguimiento de los casos (19). Esto lleva a que se fortalezca la idea de aplicar una vigilancia epidemiológica de forma continua en estos municipios, ya que por las condiciones socioeconómicas y por encontrarse en regiones fronterizas son más vulnerables a la introducción de EV.

Por lo tanto de las muestras identificadas en cultivo celular evaluando el ECP, solo fueron detectadas 4 de estas como EVNP, mediante la técnica de RT-PCR. Cuando se investigó la presencia de *poliovirus* por medio de RT-PCR con los iniciadores PAN PV, no se logró la identificación de ninguna muestra como *poliovirus*.

Si bien los ensayos de detección molecular pueden ser útiles para determinar la presencia de EV en aguas residuales, no distinguen entre la presencia de una secuencia específica de ácido nucleico y de partículas virales completas, viables e infecciosas. Por lo tanto, los ensayos de aislamiento viral basados en la presencia de ECP inducido por EV en el cultivo de células RD y L20B son importantes para determinar el riesgo al que se exponen las poblaciones donde circulan estos EV (32).

En nuestro estudio se encontró que 5 muestras de 14 presentaron ECP en cultivos de RD y L20B de forma simultánea, lo que equivale a una tasa de aislamiento de 35,7 %. La detección de EV distintos de la poliomielitis en las muestras es una indicación de que la vigilancia ambiental es una estrategia efectiva, ya que se espera encontrar al menos 30 % de EV distintos de la poliomielitis en las muestras procesadas con el método Grab (34). En consecuencia, los *poliovirus* relacionados con Sabin también deberían encontrarse en poblaciones vacunadas con OPV, especialmente durante y después de las campañas nacionales de inmunización (20).

Según datos del Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia y su Oficina de Migración, se registraron en el año 2017 casi seis millones de entradas y salidas de extranjeros, considerada una cifra récord en el país. Gran parte de los movimientos migratorios se encuentran relacionados con venezolanos que, a raíz de la crítica situación económica, política y social de su país, están buscando oportunidades de mejorar sus condiciones de vida en Colombia o están de paso hacia otros países. Cabe resaltar a Cúcuta como municipio incluido en este estudio, y su importancia dentro del análisis de los resultados obtenidos. Además, se registró durante el periodo de toma de muestras el ingreso de migrantes provenientes de los países considerados endémicos para WPV, como Pakistán (213 migrantes), Afganistán (16 migrantes) y Nigeria (165 migrantes). Estos fueron

registrados de forma regular por la Oficina de Migraciones en los respectivos puntos fronterizos del país. Es relevante anotar que no se tienen datos específicos sobre la concentración o paso de estos migrantes en los municipios de influencia de este estudio (33).

Además se ha evidenciado que las cepas de *poliovirus* derivadas del virus vacunal (cVDPV) son capaces de producir brotes en comunidades con baja cobertura de inmunizaciones, o de persistir en individuos inmunocomprometidos (11). En consecuencia, su detección y caracterización es de crucial importancia en las etapas finales del proyecto de erradicación mundial

Conclusiones

Los resultados expuestos en este trabajo son de gran interés para las autoridades sanitarias y ambientales locales, puesto que permiten complementar la información disponible y contribuir al diseño de estrategias y políticas en salud pública relacionadas con el registro y asistencia de migrantes irregulares y el manejo de desechos y educación ambiental en las comunidades.

La metodología empleada puede aplicarse en los laboratorios de salud pública del país, y contribuir así a la generación de nueva información sobre la circulación de los EV en muestras ambientales, lo cual es de gran utilidad para la comunidad científica nacional e internacional. Deben realizarse estudios adicionales en puntos de gran afluencia de migrantes, que permitan mejorar las estrategias de vigilancia epidemiológica tanto en circulación de EV como de *poliovirus* de origen vacunal o salvaje.

Recomendaciones

En este momento nos enfrentamos a la vigilancia de una enfermedad de la cual no sospechan los clínicos en la actualidad, además de estar frente al reto de una posible introducción de casos importados de polio producido por WPV o cVDPV.

Es muy importante que el sistema de vigilancia se encuentre activo y manteniendo la sensibilidad y el elevado nivel de calidad exigido por la OMS, ante la posibilidad de la importación de *poliovirus* salvajes o derivados de la vacuna procedentes de países endémicos o con escaso control en sus programas de salud. De igual manera, debemos continuar con las actividades que recomienda la OMS para llevarnos a un mundo libre de polio.

Mientras que la poliomielitis no se haya erradicado del mundo, todos los países tienen riesgo de importación de *poliovirus* (19). Por ello hay que poner en marcha políticas dirigidas a minimizar el riesgo y las consecuencias de la difusión internacional de *poliovirus*: a) mantener las actividades de los planes nacionales de erradicación (vigilancia epidemiológica, diagnóstico de laboratorio y altas coberturas en todos los grupos de población); b) las personas que viajen a áreas endémicas deben estar correctamente vacunadas, y c) mantener actualizados los planes de acción ante la detección ambiental o de casos de PFA y la posterior identificación de un *poliovirus* de origen vacunal o salvaje.

Referencias

1. Knipe D, Howley P. Fields Virology. Sixth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 551-81.
2. Tapani H. Surveillance for *polioviruses*. Biologicals 34 (2006) 123e126
3. Knowles, N. J. et al. Picornaviridae. In Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (eds. King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. & Lefkowitz, E. J.) 855–880 (Elsevier, San Diego, 2011).
4. Pallansch, M. A., Oberste, M. S. & Whitton, J. L. EVes: *polioviruses*, coxsackieviruses, echoviruses, and newer EVes. In Fields virology, 6th edn, Vol. 1 (eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M.) 490–530 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013).
5. Mandel G, Bennet J, Dolin R. Enfermedades infecciosas. Principios y práctica. 5ta edición. 2000, Buenos Aires. Argentina. Vol2.
6. Tellez JF. Poliomieltis y síndrome post poliomieltis. En: <https://conruedasyaloloco.files.wordpress.com/2009/10/la-polio-y-el-spp-por-el-dr1-jorge-federico.pdf>. Fecha de consulta 16 de febrero de 2018.
7. The gpei history project En: <http://polioeradication.org/who-we-are/partners/the-gpei-history-project/>. Fecha de consulta 16 de Enero de 2018.
8. C.-H. Chen, B.-M. Hsu² and M.-T. Wan. Molecular detection and prevalence of EV within environmental water in Taiwan. Journal of Applied Microbiology ISSN 1364-5072
9. V.R. Racaniello. Picornaviridae: the viruses and their replication. P. Howley, D. Knipe (Eds.), Fields virology, vol. 1, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2001), pp. 685-722. 2 Vol.
10. Falleiros-Carvalho LH, Weckx LY. Universal use of inactivated polio vaccine. J Pediatr (Rio J). 2006;82(3 Suppl):S75-82.
11. Vaccine-derived *polioviruses* and the endgame strategy for global polio eradication Olen M. Kew, Roland W. Sutter, Esther M. de Gourville, Walter R. Dowdle, and Mark A. Pallansch Annual Review of Microbiology 2005 59:1, 587-635.

12. Diop OM, Burns CC, Sutter RW, Wassilak SG, et al. Update on Vaccine-Derived *Polioviruses* - Worldwide, January 2014-March 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2015;64(23):640-6. American Academy of Pediatrics. Infecciones por el virus de la Polio.
13. Kew OM, Wright PF, Agol VI, Delpeyroux F, et al. Circulating vaccine-derived *polioviruses*: current state of knowledge. Bull World Health Organ 2004;82(1):16-23..
14. WHO (2004). Polio laboratory manual, 4th ed. Retrieved March 10, 2015, from http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68762/WHO_IVB_04.10.pdf;jsessionid=6449E8B072C89B6743DB68FA531AB65D?sequence=1
15. MIGRACION. Ministerio de Relaciones Exteriores consultado en: <http://www.migracioncolombia.gov.co/index.php/es/prensa/comunicados/comunicados-2017/enero-2017/3837-cerca-de-34-mil-migrantes-irregulares-fueron-detectados-por-migracion-colombia-en-2016>. Fecha de consulta 10 de abril de 2018
16. Sociedad Venezolana de Salud Pública Red Defendamos la Epidemiología Nacional. Reporte de casos de parálisis flácida aguda con identificación de virus de polio en niños del estado Delta Amacuro, Venezuela. 5 de junio de 2018 (Informe Preliminar). Consultado en: http://www.sochinf.cl/portal/templates/sochinf2008/documentos/2018/SVSP_reporte_casos_paralisis_flacida_Delta_Amacuro.pdf
17. Informe de evento parálisis flácida aguda, colombia, 2017 proceso vigilancia y analisis del riesgo en salud pública. Consultado en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/PAR%C3%81LISIS%20FL%C3%81CIDA%20AGUDA%202017.pdf>
18. Organización Mundial de la Salud. Poliomieliis. Nota descriptiva N. °114. Fecha de consulta: 1 de marzo de 2018. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs114/es/index.html>
19. Declaración de la OMS sobre la séptima reunión del Comité de Emergencias del Reglamento Sanitario Internacional (RSI) para examinar la propagación internacional de *poliovirus*. Consultado en: <http://www.who.int/es/news-room/detail/26-11-2015-statement-on-the-seventh-ihf-emergency-committee-meeting-regarding-the-international-spread-of-poliovirus>
20. Geraghty RJ, Capes-Davis A, Davis JM et al (2014) Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. Br J Cancer 111:1021–1046
21. Pipkin PA, Wood DJ, Racaniello VR et al (1993) Characterisation of L cells expressing the human *poliovirus* receptor for the specific detection of *polioviruses* in vitro . J Virol Methods 41:333–340
22. Wood DJ, Hull B (1999) L20B cells simplify culture of *polioviruses* from clinical samples. J Med Virol 58:188–192

23. World Health Organization (2004) Polio laboratory manual WHO/IVB/04.10, 4th edn. WHO Department of Immunization, Vaccines and Biologicals, Geneva
24. Lodish, H y Darnell, J. 2004. Biología celular y molecular. 4 ta edición. Editorial Médica Panamericana.
25. American Type Culture Collection. Catalogue of cell lines and hybridomas. 7ma ed. Rockville: American Type Culture Collection; 1992.p.48.
26. Tapani H, Stevik M. Selective isolation of *Poliovirus* in recombinant murine cell line expressing the human *Poliovirus* receptor gene. Journal of clinical Microbiology 1994;32: 1366-68
27. Halonen P, Rocha E, Hierholzer J. Detection of EVes and rhinoviruses in clinical specimens by PCR and liquid-phase hybridization. J Clin Microbiol 1995;33:648-53.
28. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang CF, Yang SJ, Mulders M, Holloway B, et al. Group-specific identification of *polioviruses* by PCR using primers containing mixed-base or deoxyinosine residues at positions of codon degeneracy. J Clin Microbiol 1996;34:2990-6.
29. Kilpatrick DR, Nottay B, Yang SJ, Da Silva E, Peñaranda S, Pallansch 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 Microbiol 1998;36:352-7.
30. Ávalos Redón, Ivonne, Más Lago, Pedro José, Sarmiento Pérez, Luis Raymond, Palomera Puente, Rosa, Muné Jiménez, Mayra, Bello Corredor, Marité, & Pérez Santos, Lissette. (1998). Caracterización intratípica de *Poliovirus* por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. Revista Cubana de Medicina Tropical, 50(2), 100-104.
31. JOUR Tao, Zexin Wang, Zhongtang Lin, Xiaojuan Wang, Suting Wang, Haiyan Yoshida, Hiromu Xu, Aiqiang. Song, Yanyan One-year Survey of human EVes from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids Scientific Reports 2016/08/11/online 631474.The Author(s).
32. SIVIGILA (Sistema de Vigilancia Epidemiológica) fecha de consulta 1 de marzo de 2018 En: <https://www.datos.gov.co/Salud-y-Proteccion-Social/SIVIGILA-Sistema-de-Vigilancia-Epidemiologica-/pf3v-uy2i/data>.
33. Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples. G D Lewis, T G Metcalf Appl Environ Microbiol. 1988 Aug; 54(8): 1983–1988. PMID: PMC202790.
34. Joseane Simone de Oliveira PereiraLidiane Rodrigues da SilvaAmanda de Meireles NunesSilas de Souza OliveiraEliane Veiga da CostaEdson Elias da Silva; Environmental Surveillance of *Polioviruses* in Rio de Janeiro, Brazil, in Support to the Activities of Global Polio Eradication Initiative; Food Environ Virol (2016) 8: 27.

35. Jan Vinjé, Nicole Gregoricus, Javier Martin, Howard E. Gary, Victor M. Cáceres, Linda Vencze, Andrew Macadam, James G. Dobbins, Cara Burns, Douglas Wait, Gwangpyo Ko, Mauricio Landaverde, Olen Kew, Mark D. Sobsey; Isolation and Characterization of Circulating Type 1 Vaccine-Derived *Poliovirus* from Sewage and Stream Waters in Hispaniola, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 189, Issue 7, 1 April 2004, Pages 1168–1175,
36. Identificação de amostra de poliovírus em vigilância de esgoto sanitário no aeroporto de Viracopos. Ministerio de Salud de Brasil. Disponible en: <http://portalms.saude.gov.br/noticias/svs/13501-identificacao-de-amostra-de-poliovirus-em-vigilancia-de-esgoto-sanitario-no-aeroporto-de-viracopos>