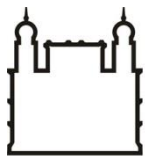


Monitoramento ambiental do poliovírus

Experiência do estado de São Paulo

Mikaela R. F. Barbosa
Laboratório de Virologia
Divisão de Microbiologia e Parasitologia

Café com Saúde “Erradicação Global da Poliomielite”
27 de abril de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



CENTRO DE VIGILÂNCIA
EPIDEMIOLÓGICA
“Prof. Alexandre Vranjac”



CETESB



GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO

Secretaria do Meio Ambiente

29/04/2016

Papel da CETESB na Vigilância ambiental do vírus da poliomielite

Programa de apoio às doenças de veiculação hídrica do estado de São Paulo

- Monitoramento sistemático

- ✓ 1974-1994

- ✓ Desde 1999

- Ação conjunta

- Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo (CVE/SES/SP)
 - Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz) – Laboratório Regional de Enteroviroses da América Latina da Organização Mundial da Saúde (OMS)

Por que monitorar os poliovírus no ambiente?

Plano Estratégico Final de Erradicação da Poliomielite 2013-2018

OBJETIVO 1

Detectar e interromper a transmissão dos poliovírus até o final de 2014; e de novos surtos de cPVDV em até 120 dias após a confirmação do primeiro caso

Vigilância Ambiental

Ação suplementar à vigilância de paralisias flácidas agudas (PFA)
Monitorar o progresso em direção à interrupção da transmissão de poliovírus selvagem e derivados vacinais

Por que monitorar os poliovírus no ambiente?

Plano Estratégico Final de Erradicação da Poliomielite 2013-2018

OBJETIVO 2

Intensificar os programas de imunização e cessar a vacinação oral até 2019, iniciando com o componente tipo 2 em 2016

Vigilância Ambiental

Deteção precoce de casos de PVDV2 após a retirada da VOP2.

Documentar a eliminação do poliovírus Sabin

Por que monitorar os poliovírus no ambiente?

Plano Estratégico Final de Erradicação da Poliomielite 2013-2018

OBJETIVO 3

Certificar a erradicação mundial da pólio e a contenção segura dos estoques de poliovírus até 2018

Vigilância Ambiental

Documentar a erradicação da polio
Monitorar a eficácia da contenção dos poliovírus pelas instituições acreditadas

Onde monitorar os poliovírus no ambiente?

Áreas habitadas por populações de alto risco
100.000 a 300.000 habitantes



Baixa sensibilidade ou ausência de vigilância de AFP
Baixa cobertura vacinal (presente ou passado)
Evidência de circulação recente de poliovírus selvagem ou derivado vacinal
Áreas sujeitas à reintrodução por importação



Entradas de estações de
Tratamento de Esgoto
Poços de Visita
Canais de esgoto

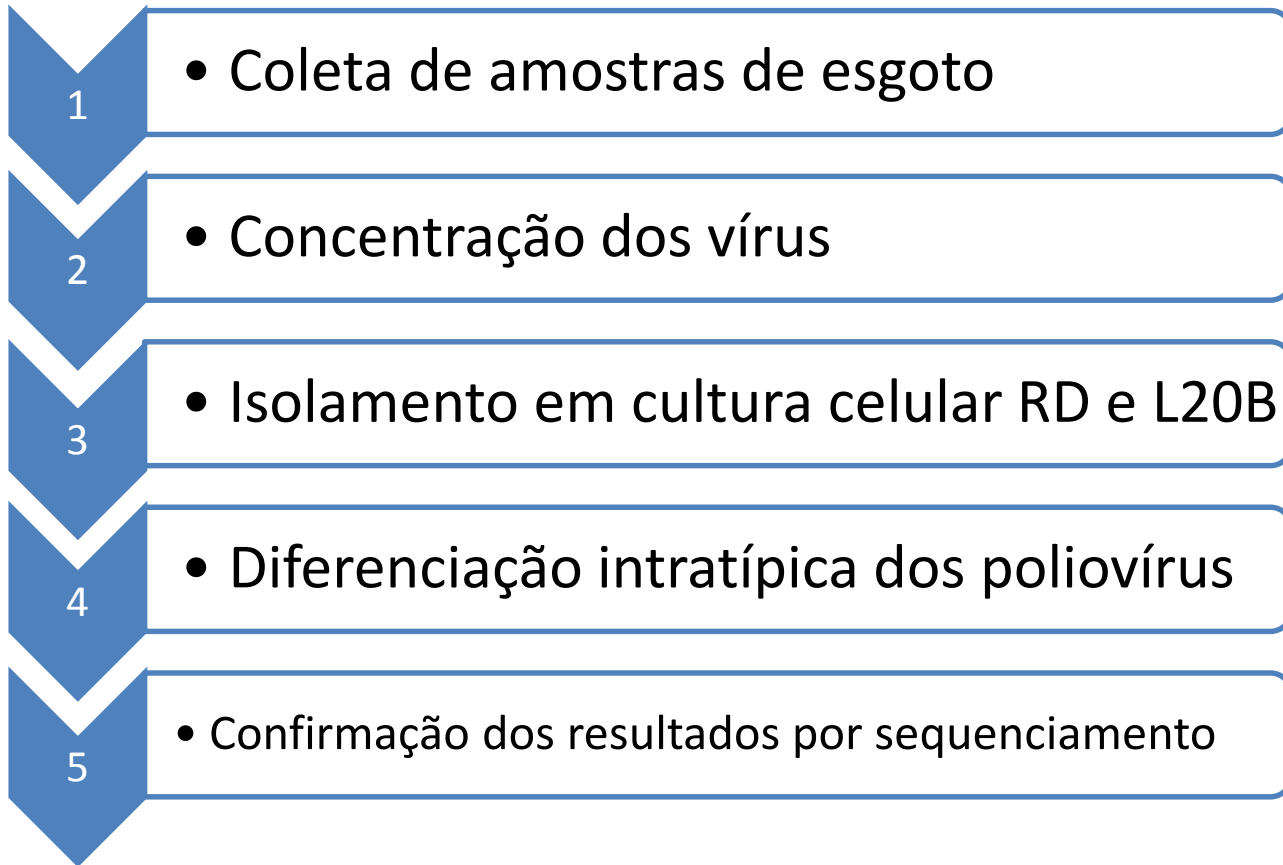
Onde monitorar os poliovírus no ambiente?

Entrada dos poliovírus no país



Portos
Aeroportos
Internacionais

Como monitorar os poliovírus no ambiente?



1. Coleta de amostras: Mecha de Moore



Frequência: quinzenal

Meio de transporte: 3% extrato de carne dessecado

2. Concentração dos vírus por floculação orgânica



↓
Separação dos sólidos



↓
Separação da fase líquida



Floculação orgânica
pela redução de pH



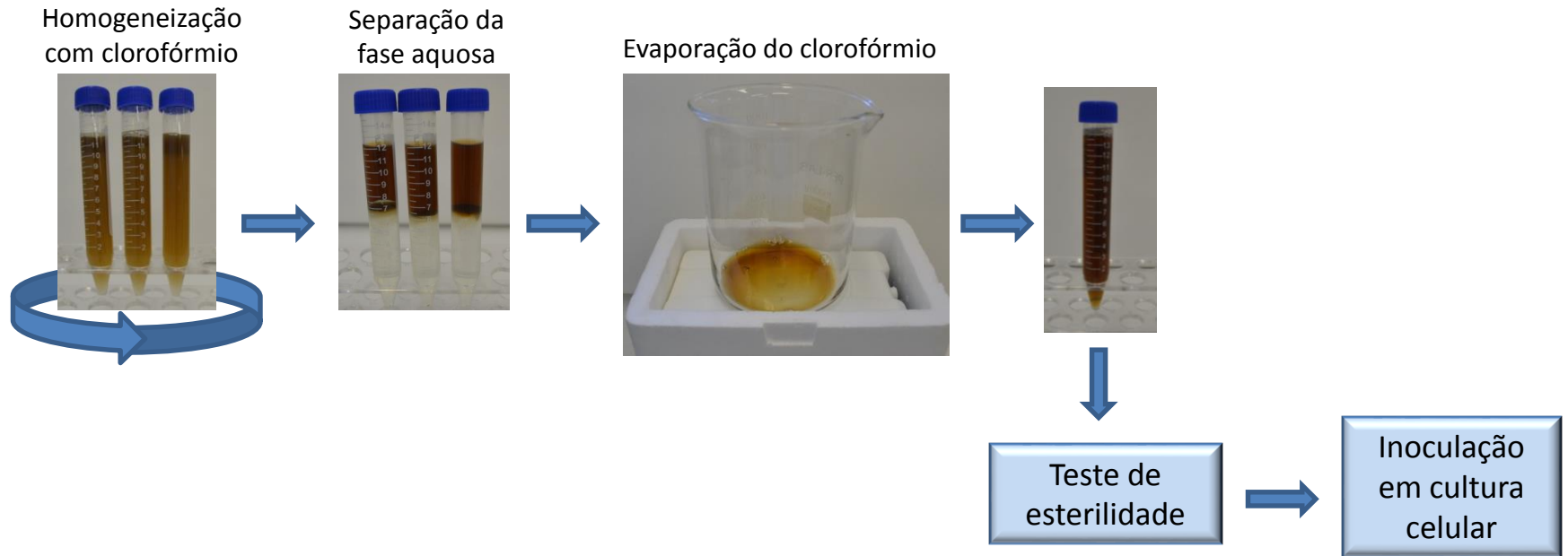
Concentração
dos flocos



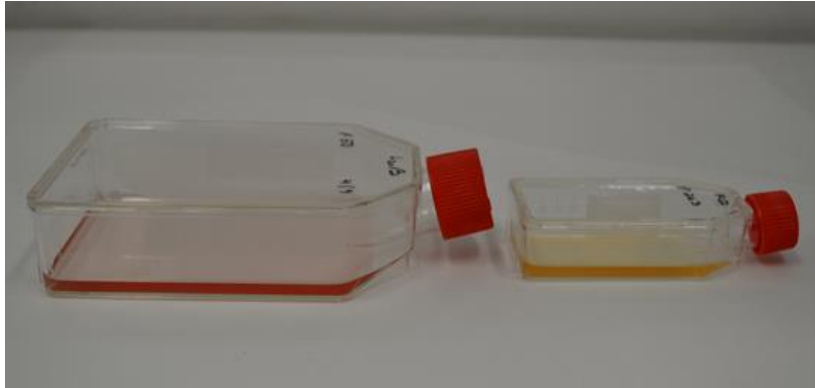
Eluição
dos flocos



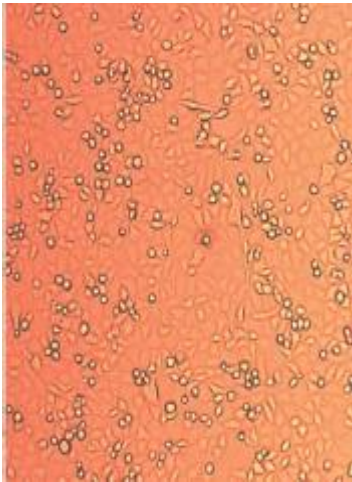
2.1 Descontaminação da amostra



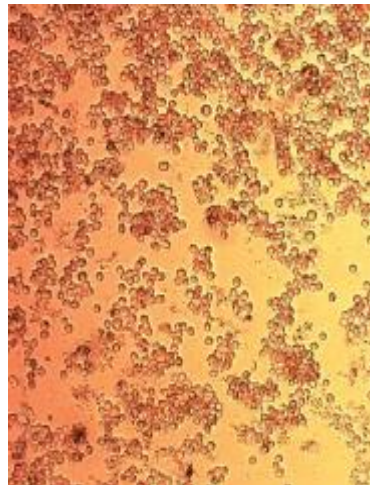
3. Isolamento de poliovírus em culturas celulares RD e L20B



L20B: célula de camundongo modificada geneticamente

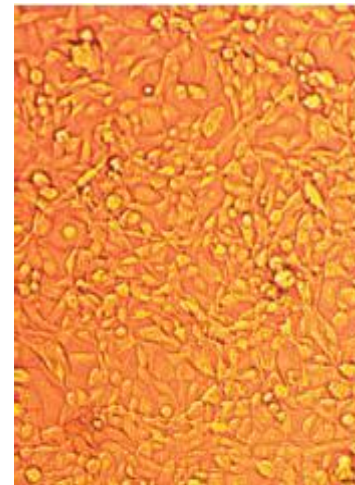


Negativo



CPE = 4 +

RD: célula de rabdomiosarcoma humano



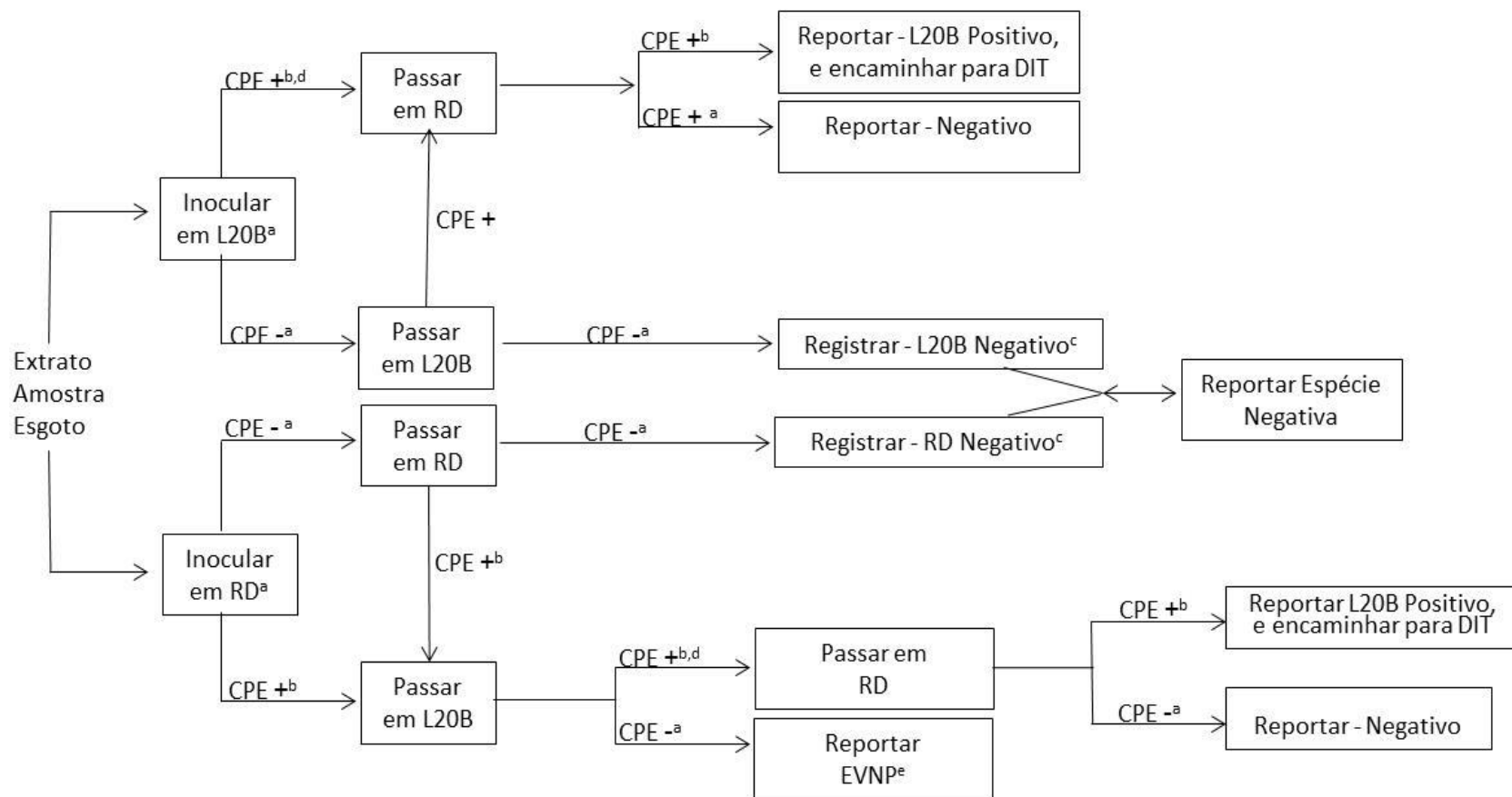
Negativo



CPE = 4 +

A partir de 2009

ISOLAMENTO DE POLIOVIRUS – NOVO ALGORÍTMO



- Observar no mínimo por 5 dias.
- Observar até obter ECP $\geq 3+$ CPE (usualmente 1-2 dias, 5 dias no mínimo; re-inocular quanto for observado toxicidade ou contaminação).
- Tempo total mínimo de observação de 10 dias (2x5 dias).
- Fazer um pool dos tubos positivos (se ambos os tubos mostrarem ECP $> 3+$ CPE no mesmo dia) antes da passagem final em RD.
- Os isolados podem ser sorotipados pelos laboratórios para diagnóstico dos EVNP ou para confirmar a proficiência.

Diferenciação Intratípica: RT-PCR

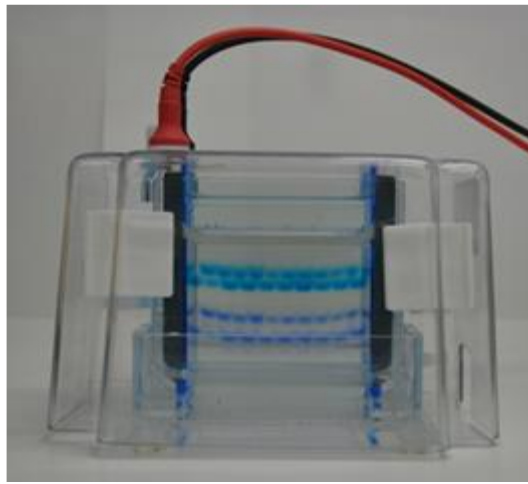
Primer Specificity	Primer sequences	Amplicon size
PanEV	5'-ACACGGACACCCAAAGTAGTCGGTTCC-3' 5'-TCCGGCCCCTGAATGCGGCTAATCC-3'	114 base pairs
PanPV*	5'-TTIAIIGCRTGICCRTRTT-3' 5'-CITAITCIMGITTYGAYATG-3'	79 base pairs
PV-Serotype 1*	5'-ATCATICTYTCIARCATYTG-3' 5'-TGCGIGAYACIACICAYAT-3'	70 base pairs
PV-Serotype 2*	5'-AYICCYTCIACIRCICCYTC-3' 5'-TGCGIGAYACIACICAYAT-3'	79 base pairs
PV-Serotype 3*	5'-CCIAIYTGITCRTTIGYRTC-3' 5'-AAYCCITCIRTITTTYTAYAC-3'	140 base pairs
Sabin 1	5'-TCCACTGGCTTCAGTGTT-3' 5'-AGGTCAGATGCTTGAAAGC-3'	97 base pairs
Sabin 2	5'-CGGCTTTGTGTCAGGC-3' 5'-CCGTTGAAGGGATTACTAAA-3'	71 base pairs
Sabin 3	5'-AGTATCAGGTAAGCTATCC-3' 5'-AGGGCGCCCTAACTTTG-3'	53 base pairs

*Degenerate primers: M = A and C; R = A and G; Y = C and T; I = Inosin
Method: WHO/IVB/04.10 – Polio Laboratory Manual

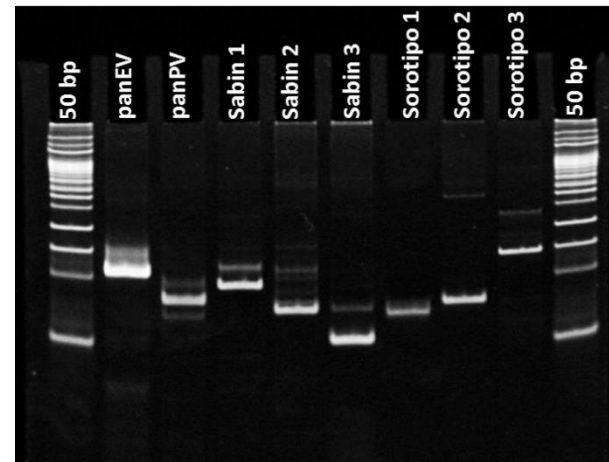
Diferenciação Intratípica RT-PCR



Reação de RT-PCR



Eletroforese em gel de poliacrilamida



Resultado do PCR das Amostras

Identificação

Todos os primers (-)

Não enterovirus (NEV)

PanEV (+), todos os outros (-)

Não polio enterovirus (NPEV)

PanEV (+), PanPV (+), todos Sabins (-), 1 ou mais sorotipos (+)

PV selvagem do sorotipo(s) indicativo(s)

PanEV (+), PanPV(+), 1 ou mais Sabins (+), sorotipos correspondentes (+)

Poliovirus(es) vacinal do(s) sorotipo(s) indicativo(s)

PanEV (+), PanPV(+), 1 ou mais Sabins (+), mais sorotipos (+) além dos Sabins

Mistura de poliovirus selvagem e vacinal de diferentes sorotipos

Resultados – 1999 a 2013

- Foram detectados somente isolados de poliovírus Sabin



Resultados – ano de 2013

5 pontos de coleta

118 amostras analisadas

20 (17%) amostras positivas para 1 ou mais sorotipos de Poliovírus Sabin

48 (41%) amostras positivas para EVNP – Enterovírus não poliovírus

Pontos de coleta - 2013	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez
ETE Barueri		*	*				1/2	2	1/2	2/3		3
ETE Parque Novo Mundo				*	1	*	1	2/3	3	*	3	*
Aeroporto de Guarulhos							1		*	*	2	2
Porto São Sebastião - Pier Norte							1/3	2	2	1/2		
Porto de Santos					*		1/3	2/3		1/2		

Isolados:

9 PV1 Sabin

12 PV2 Sabin

8 PV3 Sabin

**↑
Campanha de vacinação**

1/2/3	Poliovírus Sabin 1, 2 ou 3
	Enterovírus não-Poliovírus
	Negativo para Enterovírus
NR	Não realizado
*	Mecha perdida

Resultados – 1º semestre de 2014

Pontos de coleta - 2014	jan		fev		mar			abr		mai		jun		
ETE Barueri		2						3		3	2	NR	2	NR
ETE Parque Novo Mundo	2/3	2	2									NR	3	NR
Aeroporto de Guarulhos				2		2		2/3				NR		NR
Aeroporto de Viracopos -montante da ETE			2		1			2/3				NR		
Porto São Sebastião - Pier Norte		2						2/3				NR		NR
Porto de Santos				*		2						NR		NR
Aeroporto de Viracopos - córrego	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Aeroporto de Viracopos -cloaca	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Rua Barão de Ladário Brás	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	3	3	1/3
Brás - Liga da Juventude Islâmica	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	1/2	1	1/3

1/2/3	Poliovírus Sabin 1, 2 ou 3
1	Poliovírus 1 selvagem
2	Poliovírus derivado vacinal 2

	Enterovírus não-Poliovírus
	Negativo para Enterovírus
NR	Não realizado
*	Mecha perdida

Resultados – 2º semestre de 2014

Pontos de coleta - 2014	jul				ago				set				out				nov				dez												
ETE Barueri	NR	*	NR		NR				1/3	NR		NR	3	NR	1	NR		NR	2	NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR	
ETE Parque Novo Mundo	NR		NR		NR				2/3	NR		NR	1/3	NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR			
Aeroporto de Guarulhos	NR	1	NR		NR				2/3	NR		NR		NR	*	NR	2/3	NR		NR	1	NR		NR		NR		NR		NR			
Aeroporto de Viracopos -montante da ETE								*				*																					
Porto São Sebastião - Pier Norte	NR		NR		NR					NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR			
Porto de Santos	NR		NR		NR					NR		NR		NR		NR		NR	*	NR	*	NR		NR		NR		NR		NR			
Aeroporto de Viracopos - córrego		1	NR		1																												
Aeroporto de Viracopos -cloaca	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR		3																						
Rua Barão de Ladário Brás					1							NR		NR		NR		NR		NR	*	NR		NR		NR		NR		NR			
Brás - Liga da Juventude Islâmica		1						3	3			NR		NR		NR	3	NR		NR		NR		NR		NR		NR		NR			



Campanha de vacinação

10 pontos de coleta

256 amostras analisadas

43 (17%) amostras positivas para 1 ou mais sorotipos de Poliovírus Sabin

136 (53%) amostras positivas para EVNP – Enterovírus não poliovírus

1/2/3	Poliovírus Sabin 1, 2 ou 3
1	Poliovírus 1 selvagem
2	Poliovírus derivado vacinal 2

	Enterovírus não-Poliovírus
	Negativo para Enterovírus
NR	Não realizado
*	Mecha perdida

Detecção de Poliovírus derivado vacinal 2

- Caracterização molecular do gene VP1
 - 8,6% de divergência em relação ao PV2 Sabin (78/903)
 - Tempo de replicação estimado: 8,5 anos
 - Possível transmissão pessoa-pessoa
 - Não foi associado a nenhum outro isolado
 - Possivelmente trata-se de um isolado importado

Detecção Poliovírus selvagem 1

- Análise da sequência nucleotídica do gene VP1 (~900bp) pelo CDC constatou que o vírus pertence a um genótipo de **poliovírus selvagem tipo 1**
- 99,6% de identidade com PV1 selvagem isolado na **Guiné Equatorial** em 2014.

Resultados – ano de 2015

Pontos de coleta - 2015	jan	fev	mar	abr	mai	jun	jul	ago	set	out	nov	dez										
ETE Barueri	3					2	2/3	2/3	1	1/2/3	1/2	1/2	1/3	2	1/3			3				
ETE Parque Novo Mundo	1				*	3	3	1	1/3	1/2	1/2/3	1	3	3	1/3	*		2	3			
Aeroporto de Guarulhos							2		1/3	3	*	1			2							
Aeroporto de Viracopos -montante da ETE						1		1	1	1	3											
Elevatória Santiago - São Sebastião					3			*	1/3	2	1	1/2/3	1/3	3	3	1/3	3		3			
Porto de Santos	*																					
Aeroporto de Viracopos - córrego					NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Aeroporto de Viracopos -cloaca									NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Porto de São Sebastião - Porto Seco									NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Porto São Sebastião - Pier Norte									NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Rua Barão de Ladário Brás	1/3		*		2	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Brás - Liga da Juventude Islâmica	1/3																					

↑
Campanha de vacinação

12 pontos de coleta

213 amostras analisadas

50 (23%) amostras positivas para 1 ou mais sorotipos de Poliovírus Sabin

122 (57%) amostras positivas para EVNP – Enterovírus não poliovírus

1/2/3	Poliovírus Sabin 1, 2 ou 3
	Enterovírus não-Poliovírus
	Negativo para Enterovírus
NR	Não realizado
*	Mecha perdida

Importância dos resultados

- Vigilância ambiental dos poliovírus é uma ferramenta sensível na detecção de poliovírus selvagem e derivados vacinais, mesmo na ausência de casos clínicos.
- A entrada de poliovírus selvagem e derivado vacinal indica a importância em se manter as ações de vacinação e dos programas de Vigilância das Paralisias Flácidas (PFA).
- Necessidade de ampliar a vigilância ambiental para detecção precoce de casos importados de poliovírus e PVDV autóctones emergentes.

Estratégias futuras da Cetesb para o monitoramento ambiental do poliovírus no Brasil

1. Ampliar o número de pontos de coleta

– Priorizando populações de alto risco

- Com baixa cobertura vacinal
 - Seleção dos pontos críticos – análise conjunta com a Sabesp e Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo
 - » Periferia da cidade de São Paulo
 - » Cidades com baixa cobertura vacinal
 - » Alteração do ponto de coleta de Santos
- Áreas com predomínio de imigrantes e grande circulação de pessoas – centro de São Paulo

Estratégias futuras da Cetesb para o monitoramento ambiental do poliovírus no Brasil

2. Aprimorar os métodos de detecção dos poliovírus

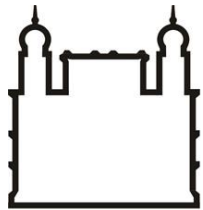
- Implementar estudo de comparação de técnicas de coleta e concentração
 - Mecha Moore + Técnica de concentração por floculação orgânica em extrato de carne (empregada atualmente)
 - Coleta pontual (amostra líquida)
 - + Técnicas de concentração por:
 - precipitação com PEG e Dextran (recomendada pela OMS);
 - adsorção com celite ou
 - floculação orgânica em extrato de carne

Futuras estratégias da Cetesb para o monitoramento ambiental do poliovírus no Brasil

2. Aprimorar os métodos de detecção dos poliovírus

- Implementar a técnica de PCR em Tempo Real para identificação de poliovírus vacinal, selvagem e derivado
 - Resultados em menor tempo
 - Resultados mais confiáveis
 - técnica de qRT-PCR apresenta maior especificidade que a técnica de RT-PCR

Agradecimentos



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Edson E. da Silva, Dra. Fernanda M. Burlandy, Dra. Eliane V. da Costa



MUITO OBRIGADA!