

## La sorveglianza ambientale per poliovirus e non-polio enterovirus a Parma nell'ambito del "Global Polio Eradication Program" (GPEI)

Roberta Zoni<sup>1</sup>, Sandra Mezzetta<sup>1</sup>, Paola Affanni<sup>1</sup>, Maria Eugenia Colucci<sup>1</sup>, Stefano Fiore<sup>2</sup>, Stefano Fontana<sup>2</sup>, Mariateresa Bracchi<sup>1</sup>, Emanuela Capobianco<sup>1</sup>, Licia Veronesi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina e Chirurgia, Università di Parma; <sup>2</sup>Dipartimento di Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma

### POLIOVIRUS AND NON-POLIO-ENTEROVIRUS ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE IN PARMA WITHIN THE "GLOBAL POLIO ERADICATION PROGRAM" (GPEI)

**Summary.** *Background:* Environmental surveillance of poliovirus plays an essential role in GPEI both for the detection of WTP and VDPV circulation in endemic areas and for monitoring their absence in polio-free countries. *Methods:* Since 2005 to 2018, in Parma, 642 wastewater samples were collected from the two wastewater treatment plants and analyzed according to the WHO Guidelines. All isolates supposed being poliovirus were sent to ISS reference laboratory for molecular characterization while NPEV only refer to samples up to 2016. *Results:* Positivity was obtained in 68% of samples without significant difference between the two treatment plants. Six polioviruses (1.4%) were detected, all characterized as Sabin-like: 4 of them (66.7%) were type 3 and 2 (33.3%) type 1. Coxsackieviruses B mainly recurred among NPEV (85%) while residual 15% was Echoviruses. B4 was the most frequent Coxsackie serotype isolated (31%) while, among Echovirus, Echo 7 and Echo 11 prevail (both 23%). *Conclusion:* As OPV isn't used in Italy since 2002, recovery of Sabin-like polioviruses indicates the possibility of poliovirus reintroduction, considering also the important exposure to migratory flows. Finally, monitoring the environmental circulation of NPEV, could compensate for the lack of a surveillance system of the infections they cause. ([www.actabiomedica.it](http://www.actabiomedica.it))

**Key words:** poliovirus, enterovirus, environmental surveillance

**Riassunto.** *Introduzione:* La sorveglianza ambientale per poliovirus svolge un ruolo essenziale nell'ambito del GPEI sia per il rilevamento della circolazione WTP e VDPV in aree endemiche sia per il monitoraggio della loro assenza nei paesi "polio-free". *Metodi:* Dal 2005 al 2018, 642 campioni di acque reflue sono stati raccolti dai due impianti di trattamento di Parma, ed analizzati secondo le Linee Guida dell'OMS. Tutti i "sospetti poliovirus" isolati nel periodo sono stati caratterizzati presso il laboratorio di riferimento dell'ISS; invece la tipizzazione dei NPEV si riferisce solo al 2005-2016. *Risultati:* Il 68% dei campioni è risultato positivo senza differenze significative tra i due impianti. Sono stati rilevati 6 poliovirus (1,4%), tutti caratterizzati come Sabin-like: 4 polio 3 (66,7%) e 2 polio 1 (33,3%). L'85% dei NPEV sono risultati Coxsackievirus B di cui B4 il sierotipo più frequente (31%); tra gli Echovirus (15%) prevalgono Echo7 ed Echo11 (entrambi 23%). *Conclusione:* Poiché l'OPV non è utilizzato in Italia dal 2002, l'isolamento di poliovirus Sabin-like indica la possibilità di reintroduzione del poliovirus, considerando anche l'importante esposizione ai flussi migratori. Infine il monitoraggio della circolazione ambientale di NPEV potrebbe supplire alla mancanza di un sistema di sorveglianza delle infezioni da essi sostenute.

**Parole chiave:** poliovirus, enterovirus, sorveglianza ambientale

## Introduzione

Accanto alla sorveglianza dei casi di paralisi flaccida acuta (PFA), la sorveglianza ambientale (environmental surveillance ES) della circolazione di virus polio e non-polio rappresenta un utile strumento per misurare l'efficacia delle strategie adottate dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel programma globale di eradicazione della poliomielite (1,2).

Condotta su acque reflue provenienti da insediamenti civili, svolge un ruolo fondamentale sia in condizioni di attiva circolazione di virus che di assenza della medesima. Nel primo caso infatti consente di evidenziare una trasmissione in atto sia di poliovirus selvaggi (WPV) sia di ceppi vaccino-derivati (VDPV), anche in assenza di casi di malattia (3); inoltre supporta la sorveglianza PFA in aree endemiche o a rischio di introduzione di poliovirus, soprattutto là dove il livello di immunizzazione della popolazione non è ottimale o la sorveglianza PFA è assente o insufficiente (4,5).

D'altro canto, confermando l'assenza di circolazione virale, contribuisce alle certificazioni "polio-free" e consente di verificare l'efficacia del processo di contenimento previsto dall'OMS e in atto già dal 2015.

Inoltre l'ES rileva la diffusione ambientale degli enterovirus non polio (NPEV) responsabili di diverse forme patologiche, anche gravi, nella popolazione.

L'Unità di Sanità Pubblica dell'Università di Parma dal 2005 è inclusa nella rete di laboratori sub-nazionali di riferimento coinvolti nell'ES e si inserisce nel contesto nazionale coordinato dall'ISS e, a livello mondiale, dall'OMS (6-9).

## Materiali e metodi

Nel periodo 2005-2018, dai due impianti di trattamento dei reflui di Parma (est e ovest) sono stati prelevati due campioni/mese da 1 litro di reflui in ingresso (medio delle 24 ore). I campioni raccolti e concentrati sono stati sottoposti ad indagine virologica colturale secondo il protocollo e l'algoritmo previsti dall'OMS (10). Gli isolati ottenuti, distinti in "sospetti poliovirus" e NPEV, sono stati inviati al Laboratorio di Riferimento Nazionale presso l'ISS per la caratterizzazione biomolecolare. In particolare i campioni sospetti polio vengono inviati immediatamente dopo l'isolamento per l'identificazione

ne, la differenziazione intratipica e il saggio di identificazione di VDPV (10). L'invio degli isolati NPEV invece avviene periodicamente. Per questo, i dati relativi agli isolamenti di poliovirus sono costantemente aggiornati mentre quelli riguardanti i NPEV sono confermati e caratterizzati solo relativamente al periodo 2005-2016.

## Risultati

Dei 642 campioni analizzati il 68% è risultato positivo, senza differenze significative fra i due depuratori, anche se la percentuale di positività è leggermente maggiore nell'impianto Parma ovest (70% contro il 66% dell'est).

Dal 2005 fino ad oggi sono stati isolati 6 virus polio (1.4%), di cui 4 (66.7%) di tipo 3 e 2 (33.3%) di tipo 1, tutti Sabin-like. In tabella 1 sono riportati gli anni di isolamento: interessante la presenza di poliovirus 3 in due campionamenti consecutivi del 2015 che sembrerebbe indicare un protrarsi, se pur per tempi contenuti, della circolazione del virus.

La circolazione di NPEV ha evidenziato, in generale, una netta prevalenza di Coxsackievirus tutti di tipo B (85%), mentre gli isolati caratterizzati come Echovirus sono stati mediamente il 15% con andamento molto variabile e un aumento di isolamenti soprattutto negli ultimi due anni di indagine (2015-16); in particolare, quando presenti, sono passati da un minimo del 2.4% nel 2013 ad un massimo del 72% nel 2016, anno in cui si è osservata un'inversione di frequenza rispetto ai Coxsackievirus.

I sierotipi di Coxsackievirus più frequenti sono risultati il B4 (31.1%) e il B5 (23%), il primo con una presenza praticamente costante ad eccezione di un solo anno (2014). Fra gli Echovirus prevalgono i sierotipi Echo 7 ed Echo 11 (23.1% per entrambi) e gli Echo 6 (21.2%).

**Tabella 1.** Isolamenti di poliovirus dalle acque reflue di Parma 2005-2018

Data	Poliovirus	ITD/VDPV
giu-05	poliovirus 3	SL
ago-11	poliovirus 1	SL
apr-15	poliovirus 3	SL
mag-15	poliovirus 3	SL
feb-16	poliovirus 1	SL
ott-17	poliovirus 3	SL

## Discussione

Nel periodo considerato e fino ad oggi, gli isolamenti di poliovirus a Parma sono stati sporadici, in accordo con quanto riscontrato anche a livello nazionale (8). In particolare, tutti gli isolati polio sono risultati essere Sabin-like e quindi privi di mutazioni responsabili della comparsa di VDPV; ciò indica una circolazione nella popolazione estremamente contenuta nel tempo. L'assenza di ceppi selvaggi a Parma, come nel resto dell'Italia, conferma il mantenimento della condizione di "polio-free" nel Paese (11).

Tuttavia anche se saltuari, questi rilievi rappresentano dei significativi indicatori di una possibile reintroduzione di poliovirus nel nostro territorio giustificata anche dell'importante esposizione ai flussi migratori visto che l'Italia non utilizza più il vaccino orale di Sabin (OPV) dal 2002.

Fra i NPEV, i Coxsackievirus B4 sono i più rappresentati (26%) diversamente da quanto riportato a livello nazionale dove risultano più frequenti i B5. In linea invece la maggiore frequenza degli Echo7 (11).

Dal momento che in Italia manca un sistema di sorveglianza per le patologie sostenute da NPEV (sia a livello ospedaliero che di comunità), anche il monitoraggio della circolazione di altri enterovirus nell'ambiente rappresenta un utile strumento epidemiologico, alla luce dell'aumentato numero di episodi epidemici sostenuti da questi virus e rilevati a livello mondiale (12-15).

**Conflict of interest:** Each author declares that he or she has no commercial associations (e.g. consultancies, stock ownership, equity interest, patent/licensing arrangement etc.) that might pose a conflict of interest in connection with the submitted article

## Bibliografia

1. GPEI Global Polio Surveillance Action Plan, 2018-2020 <http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/GPEI-global-polio-surveillance-action-plan-2018-2020.pdf>
2. Hovi T, Shulman LM, Van Der Avoort H, Deshpande J, Rovainen M and De Gourville EM. Role of environmental poliovirus surveillance in global polio eradication and beyond. *Epidemiol Infect* 2012;140:1-13
3. Shulman LM, Gavrillan E, Jorba J et al. Molecular epidemiology of silent introduction and sustained transmission of wild poliovirus type 1, Israel, 2013. *Euro Surveill* 2014;19(7):20709.
4. WHO Polio: Statement of the twenty-first IHR emergency Committee. Regarding the International Spread of Poliovirus 29 May 2019 |Statement |Geneva <http://www.who.int/news-room/detail/29-05-2019-statement-of-the-twenty-first-ih-er-emergency-committee>
5. Asghar H, Diop OM, Weldegebriel G et al. Environmental Surveillance for Polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. *J Infect Dis* 2014;210(S1):S294-303
6. Zoni R, Battistone A, Fiore S et al. Sorveglianza ambientale di poliovirus ed altri enterovirus nei reflui di Parma (2011/2013) Atti del 47° congresso Nazionale SItI 1-4 ottobre 2014 Riccione pg 149-50.
7. Tanzi ML, Cesari C, Affanni P. Sorveglianza ambientale di poliovirus e altri enterovirus in Emilia Romagna In: Sorveglianza delle paralisi flaccide acute e della circolazione ambientale di poliovirus e altri enterovirus in Italia. A cura di Lucia Fiore, Gabriele Buttinelli e Stefano Fiore. 2013, ii, 101 p. Rapporti ISTISAN 13/44
8. Cesari C, Colucci ME, Veronesi L et al. Detection of enteroviruses from urban sewage in Parma *Acta biomed* 2010;81:40-6.
9. Battistone A, Buttinelli G, Fiore S et al. Sporadic isolation of Sabin-like polioviruses and high detection of non-polio enteroviruses during sewage surveillance in seven Italian cities, after several years of inactivated polio vaccination. *Appl Environ Microbiol* 2014;80(15):4491-501.
10. GPEI Guidelines for detection of poliovirus. [http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/GPLN/Guidelines\\_April2015.pdf](http://polioeradication.org/wp-content/uploads/2016/07/GPLN/Guidelines_April2015.pdf)
11. Delogu R, Battistone A, Buttinelli G et al. Poliovirus and other enterovirus from environmental surveillance in Italy, 2009-2015. *Food Environ Virol* 2018;10:333-42
12. Khetsuriani N, Lamonte A., Oberste M S. & Pallansch, M. (2006). Neonatal enterovirus infections reported to the national enterovirus surveillance system in the United States, 1983-2003. *The Pediatr Infect Dis J* 2006; 25(10):889-93
13. Molet, L, Saloum K, Marque-Juillet S. et al. Enterovirus infections in hospitals of Ile de France region over 2013. *J of Clin Virol* 2016; The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology 2016;74:37-42
14. Richter J, Koptides D, Tryfonos C, & Christodoulou C. Molecular typing of enteroviruses associated with viral meningitis in Cyprus, 2000-2002. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 8):1035-41.
15. Wikswo M E, Khetsuriani N, Fowlkes A L et al. (2009). Increased activity of Coxsackievirus B1 strains associated with severe disease among young infants in the United States, 2007-2008. *Clin Infect Dis* 2009;49(5):44-51.

Received: 15 June 2019

Accepted: 18 July 2019

Correspondence:

Roberta Zoni

Dipartimento di Medicina e Chirurgia – Università di Parma  
Via Volturno 39, 43125 Parma (Italy)

E-mail: roberta.zoni@unipr.it