

Коциркуляция кишечных вирусов в закрытом детском коллективе после вакцинации живой оральной полиовакциной
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, г. Минск

При осуществлении первичной иммунизации детей закрытого детского коллектива тремя последовательными дозами оральной полиовакцины (ОПВ) выявлена коциркуляция вакцинных полиовирусов (ПВ) трех серотипов, Коксаки вируса А24, аденовируса. Введение вакцинных вирусов в составе ОПВ, сопровождающееся их размножением в кишечнике привитых, не прекращало размножение неполиомиелитных вирусов и не предотвращало инфицирование ими ранее не инфицированных детей. До введения 1-ой дозы вакцины неполиомиелитные вирусы обнаруживались в пробах стула 5% детей, через 2 месяца после введения 3-ей дозы – 50% детей. Экскретируемые ПВ в 26,84% являлись межтипными вакцинно/вакцинными рекомбинантами. Ни одного рекомбинантного штамма ПВ/Коксаки вируса А24 с использованием RFLP анализа не выявлено.

Ключевые слова: вакцинация, полиовирусы, неполиомиелитные вирусы
Созданная Альбертом Себиным в 50-е годы прошлого столетия оральная полиовакцина (ОПВ), состоящая из живых аттенуированных полиовирусов серотипов 1, 2 и 3 (ПВ1, ПВ2 и ПВ3, соответственно), сыграла и продолжает играть чрезвычайно важную роль в ликвидации полиомиелита. Однако, серьезным недостатком ОПВ является способность вызывать редкие случаи вакциноассоциированного полиомиелита, что диктует необходимость перехода на комбинированную схему вакцинации, основанную на последовательном введении инактивированной полиовакцины (ИПВ) и ОПВ, либо исключительно на вакцинацию с использованием ИПВ. В Республике Беларусь переход на комбинированную схему вакцинации осуществлен в начале 2000-х годов, в настоящее время схема включает использование трех доз ИПВ (в возрасте 3-х, 4-х, 5-ти месяцев) и трех доз ОПВ (в 18, 24 месяца и 7 лет).

Некоторыми исследователями высказываются опасения, что уменьшение числа доз ОПВ в календаре прививок или отказ от использования ОПВ может привести к тому, что в отсутствие своего естественного интерферирующего «ограничителя», вакцинных ПВ, активизируется циркуляция неполиомиелитных энтеровирусов [3]. В качестве примера положительного влияния ОПВ на циркуляцию энтеровирусов приводится факт использования ОПВ в качестве интерферирующего агента для прерывания эпидемических вспышек серозного менингита в России [2].

Известно, что при размножении введенных в составе ОПВ в организм ребенка вакцинных ПВ трех серотипов, они вступают в рекомбинации друг с другом, обмениваясь участками своих геномов [4, 6, 7]. В последние годы также стало известно, что ПВ могут вступать в рекомбинации и с неполиомиелитными энтеровирусами, относящимися к кластеру С, поскольку между этими вирусами существует достаточно высокая степень эволюционного родства [9, 11]. Именно

такие рекомбинантные штаммы вакцинных ПВ, имеющих значительный уровень мутаций в VP1 области генома, и неполиомиелитных энтеровирусов и стали причиной вспышек паралитического полиомиелита в некоторых странах с недостаточно высоким уровнем иммунизации [8].

Несомненно, в условиях применения ОПВ вакцинные ПВ могут циркулировать совместно с неполиомиелитными энтеровирусами и вероятность их одновременного размножения в организме человека достаточно высока. Однако к настоящему времени неизвестно, насколько часто происходят рекомбинации между ПВ и энтеровирусами кластера С и могут ли такие рекомбинантные штаммы представлять серьезную угрозу программе глобальной эрадикации полиомиелита.

В целях ответа на эти вопросы нами была изучена с использованием молекулярных методов лабораторная коллекция кишечных вирусов, изолированных от детей закрытого коллектива в динамике их первичной иммунизации с использованием трех доз ОПВ.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 32 ребенка, проживающих в закрытом детском коллективе с постоянным пребыванием детей. Наблюдение продолжалось 13 месяцев (1999-2000 гг.), в течение которых каждый ребенок был вакцинирован тремя последовательными дозами ОПВ с интервалом в два месяца между дозами. Еженедельно у детей собирали образцы стула и исследовали их с использованием трех перевиваемых культур клеток (RD, Нер2С и L20В) в соответствии с рекомендациями ВОЗ [1].

Для идентификации ПВ и их серотипирования использовали реакцию нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ трех серотипов (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, г. Москва, Россия). Молекулярное исследование ПВ, позволяющее идентифицировать рекомбинантные штаммы, осуществляли методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов генома (с англ. restriction fragment length polymorphism assay, RFLP). С использованием RFLP исследовали две дистальные области генома ПВ – область капсидного белка VP1 и область вирусной 3D полимеразы (Рис. 1) [5].

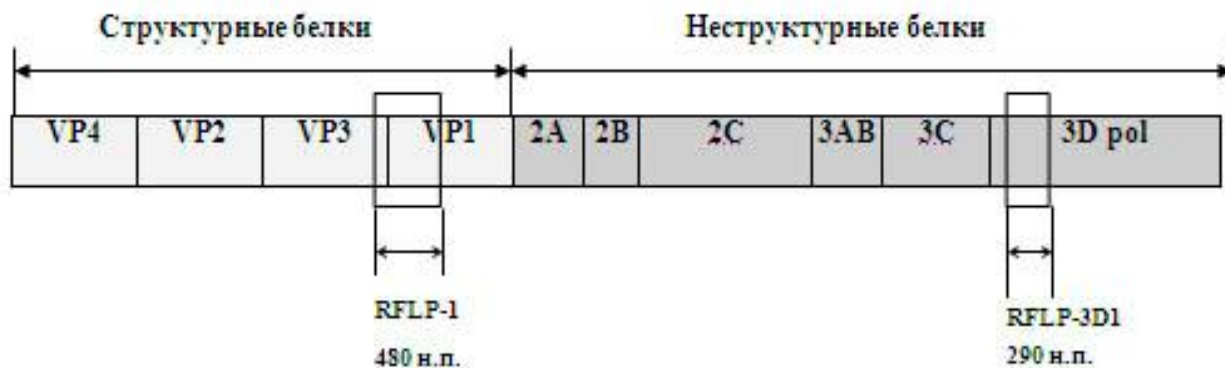


Рисунок 1 – Локализация и размер областей генома, изученных методом RFLP

Для идентификации неполиомиелитных вирусов использовали данные избирательного размножения вирусов в культурах клеток, реакцию нейтрализации с гипериммунными сыворотками к энтеровирусам (Национальный институт общественного здоровья и окружающей среды, Билтховен, Нидерланды), тест латекс-агглютинации аденовируса (“Diarlex Adeno”, “Orion Diagnostica”, Финляндия), ПЦР с праймерами к аденовирусу («Амплисенс», Россия), секвенирование VP1 области генома энтеровирусов. Выделение вирусной РНК проводили с использованием «TRI-reagent» (“SigmaAldrich”, США) или набора “QIAamp Viral RNA Mini Kit” (“Qiagen”, Нидерланды) согласно инструкции производителей. Секвенирование нуклеотидных последовательностей проводили с использованием набора “Big Dye Terminator v.3.1 cycle sequencing kit” на капиллярном секвенаторе Avant 3100 (“Applied Biosystems”, Нидерланды).

Результаты и обсуждение

При еженедельном обследовании 32 детей закрытого коллектива в течение 13 месяцев с использованием трех культур клеток (L20B, RD, HEp2C) было выявлено 652 вирусных изолята, которые в зависимости от способности реплицироваться в культуре клеток делились на три группы: с цитопатическим эффектом (ЦПЭ) во всех трех культурах клеток; с ЦПЭ в культуре клеток RD и отсутствием видимого ЦПЭ в культурах клеток L20B и HEp2C; с нетипичным для энтеровирусов ЦПЭ (круглоклеточная дегенерация) в культурах клеток L20B, HEp2C и отсутствием ЦПЭ в клетках RD.

Исследование всех изолятов в реакции нейтрализации с гипериммунными сыворотками к ПВ трех серотипов (реакция выполнялась в той же культуре клеток, в которой изолят был получен) позволило идентифицировать 395 ПВ (ПВ1 – 135 штаммов, ПВ2 – 126, ПВ3 – 134) и 257 неполиомиелитных вируса. Все ПВ давали ЦПЭ на всех трех линиях клеток. Предпринятые далее попытки идентифицировать изоляты, относящиеся к неполиомиелитным вирусам, с использованием стандартного пула (A-G) гипериммунных сывороток для серотипирования энтеровирусов к успеху не привели. Проведенные

исследования с расширенным пулом (A-R) сывороток также закончились безуспешно – ни один изолят не нейтрализовался ни одним из пулов сывороток. Изоляты, реплицирующиеся в культурах клеток HEp2C и L20B и имеющие нетипичный для энтеровирусов круглоклеточный тип ЦПЭ, были исследованы в тесте латекс-агглютинации аденовирусов. Восемь из 19 исследованных в тесте изолятов были идентифицированы как аденовирусы. Для негативных по результатам латекс-агглютинации 11 изолятов была проведена ПЦР с праймерами к аденовирусам, что позволило идентифицировать еще 7 изолятов как аденовирусы.

Поскольку без применения молекулярных методов исследования идентифицировать неполиомиелитные вирусы не всегда представлялось возможным, для 7 изолятов, реплицирующихся в культуре клеток RD и не реплицирующихся в клетках HEp2C и L20B, было выполнено секвенирование VP1 области генома. Результаты секвенирования показали 85-86% гомологии этих изолятов с Коксаки вирусом A24. Уровень дивергенции их между собой составлял 3-4%, что свидетельствует о достаточно продолжительной циркуляции вирусов в детском коллективе, в котором проводилось это наблюдение.

Поскольку согласно результатам секвенирования все 7 выборочно отобранных изолятов относились к Коксаки вирусу A24, было логично предположить, что этот вирус получил широкое распространение в детском коллективе. Было проведено исследование в реакции нейтрализации с сывороткой к Коксаки вирусу A24 (Национальный институт общественного здоровья и окружающей среды, Билтховен, Нидерланды) еще 15 изолятов, которые давали ЦПЭ только в культуре клеток RD. Все 15 изолятов нейтрализовались сывороткой к Коксаки A24. Следует отметить, что никогда ранее Коксаки вирус A24 в Республике Беларусь выделить не удавалось.

Таким образом, нами была выявлена достаточно продолжительная циркуляция различных кишечных вирусов в закрытом детском коллективе: вакцинных ПВ трех серотипов, Коксаки вируса A24 и аденовируса. При этом, после каждого введения новой дозы ОПВ вероятность выделения ПВ возрастала, а неполиомиелитных вирусов на короткое время снижалась (исключительно за счет присутствия ПВ в существенно более высокой концентрации), однако в целом на протяжении всего периода наблюдения циркуляция неполиомиелитных вирусов не только сохранялась, но и нарастала (Рис. 2.). Если до введения 1-ой дозы ОПВ неполиомиелитные вирусы были изолированы от 5% детей, то через два месяца после введения 3-ей дозы их экскретировали более 50% детей.

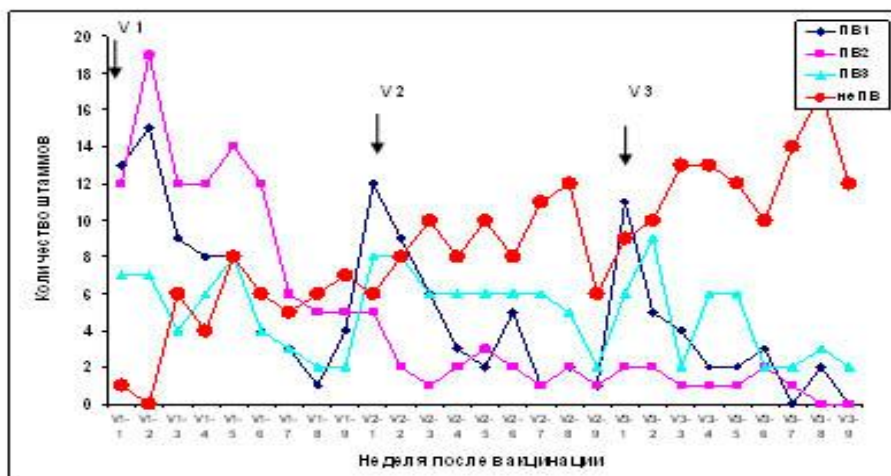


Рисунок 2 – Кинетика экскреции ПВ1, ПВ2 и ПВ3 и неполномиелитных кишечных вирусов после иммунизации детей ОПВ

Результаты идентификации неполномиелитных вирусов свидетельствуют о том, что циркуляция Коксаки вируса А24 продолжалась в детском коллективе в течение всех 13 месяцев наблюдения. При этом проведение в течение этого времени вакцинации детей с использованием ОПВ не предотвращало их инфицирования Коксаки вирусом А24. Дети получали ОПВ не одновременно (соответственно и вовлекались в исследование постепенно), а по достижении ими соответствующего возраста (3, 5 и 7 месяцев). Первый Коксаки вирус А24 был выделен нами в первый день наблюдения, когда из 7 обследованных перед вакцинацией детей один ребенок выделял этот вирус. В последний месяц наблюдения Коксаки вирус А24 экскретировали 8 из 8 детей, находившихся под наблюдением.

В отличие от Коксаки А24 циркуляция аденовируса была не столь выраженной и не столь продолжительной. Этот вирус удалось выделить от 9 детей. Период, в течение которого отмечалось выделение аденовируса, составил 5 месяцев (с 3-го по 5-ый месяц наблюдения).

Наличие коллекции кишечных вирусов, изолированных в динамике их экскреции, предоставляло возможности для проведения поиска рекомбинантных штаммов. Наиболее простым и доступным методом, позволяющим определить типовую принадлежность различных участков генома ПВ, является RFLP анализ [5]. Результаты исследования вакцинных ПВ, экскретируемых детьми в процессе вакцинации тремя дозами ОПВ, показали, что каждый из трех серотипов ПВ, характеризуется не только своим профилем экскреции, но и имеет характерную только для него кинетику формирования рекомбинантных штаммов [4, 10].

Установлена высокая частота (106, 26,84±2,23% из 395) встречаемости межтиповых рекомбинантных вакцинно-вакцинных штаммов. Наиболее часто рекомбинанты обнаруживались среди ПВ3 (79, 58,96±4,27% из 134), реже –

среди ПВ2 (25, 19,84±3,57% из 126) и крайне редко – среди ПВ1 (2, 1,48±1,04% из 135).

Вакцинный штамм ПВ3 отличался как наиболее высокой частотой образования рекомбинантных штаммов, так и наиболее продолжительным периодом их экскреции – 9 недель и более после введения 3-ей дозы вакцины. После каждой из трех последовательно введенных доз ОПВ формирующиеся в кишечнике привитого ребенка рекомбинантные ПВ постепенно вытесняли вирусы с гомотипичным геномом и через 8-9 недель после вакцинации экскретируемые вирусы были в основном представлены рекомбинантами.

Высокая степень гомологии между ПВ и неполиомиелитными энтеровирусами кластера С (к которому относится и Коксаки вирусу А24) объясняет теоретическую возможность перетасовывания их геномных участков с возникновением различного рода рекомбинаций, как *in vitro*, так и *in vivo* [9]. Представляло интерес определить, имело ли место при столь интенсивной коциркуляции ПВ и Коксаки вируса А24 образование рекомбинантных штаммов. Известно, что рекомбинации происходят в основном в области неструктурных белков и вероятность их обнаружения возрастает при исследовании наиболее удаленной области неструктурных белков, а именно области 3D полимеразы. Проведенное RFLP-исследование 3D1 области генома 395 вакцинных ПВ во всех случаях обнаружило профиль рестрикции, характерный для одного из трех серотипов эталонных вакцинных штаммов, что свидетельствует об отсутствии среди них рекомбинантов с неполиовирусами. Предпринятые попытки амплифицировать 3D1 область генома 22 изолятов Коксаки вируса А24 с праймерами к ПВ ни в одном случае к успеху не привели. Полученные данные позволяют предположить, что среди изученных нами вирусов рекомбинантов полио/неполиомиелитных энтеровирусов представлено не было. По-видимому, вероятность образования таких рекомбинантов значительно ниже вероятности образования межтипных рекомбинантов ПВ. Нельзя также исключить, что для обнаружения таких рекомбинантов энтеровирусов недостаточно использования только RFLP анализа.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что уровень бессимптомного носительства неполиомиелитных энтеровирусов, в частности Коксаки вируса А24, у детей может быть достаточно высоким. При проведении иммунизации детей против полиомиелита с использованием живой ОПВ вакцинные вирусы могут размножаться в кишечнике ребенка одновременно с неполиомиелитными вирусами. В частности, в данном исследовании нами была выявлена коциркуляция вакцинных ПВ трех серотипов, Коксаки вируса А24, аденовируса в детском коллективе закрытого типа. Введение вакцинных вирусов в составе ОПВ, сопровождающееся их размножением в кишечнике привитых, не прекращало размножение неполиомиелитных вирусов и не предотвращало инфицирование ими ранее не инфицированных детей, что не подтверждает идею о том, что вакцинные ПВ являются ограничителем распространения неполиомиелитных вирусов. Экскретируемые ПВ в 26,84% случаев являлись межтипными рекомбинантами. Ни одного рекомбинантного штамма ПВ/Коксаки А24 с использованием RFLP анализа не было выявлено.

Литература

1. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. Женева: ВОЗ, 2005. 112 с.
2. Сейбиль, В. Б. Две проблемы, возникающие на завершающем этапе ликвидации полиомиелита / В. Б. Сейбиль // Вопросы вирусологии. 2000. № 5. С. 45–47.
3. Сейбиль, В. Б. Всемирная организация здравоохранения и проблема ликвидации инфекционных заболеваний в мире / В. Б. Сейбиль, Л. П. Малышкина // Вопросы вирусологии. 2005. № 3. С. 60–64.
4. Ухова, И. Ф. Экскреция рекомбинантных полиовирусов после иммунизации оральной полиомиелитной вакциной / И. Ф. Ухова [и др.] // Медицинский журнал. 2008. № 4. С. 77–79.
5. Balanant, J. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay / J. Balanant [et al.] // Virology. 1991. Vol. 184. P. 645–654.
6. Caro, V. Molecular strategy for “serotyping” of human enteroviruses / V. Caro // J. Gen. Virol. 2001. Vol. 82. P. 79–91.
7. Cuervo, N. S. Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus strains excreted by primary vaccines / N. S. Cuervo [et al.] // J. Virol. 2001. Vol. 75, № 13. P. 5740–5751.
8. Kew, O. M. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global polio eradication / O. M. Kew [et al.] // Annu. Rev. Microbiol. 2005. Vol. 59 P. 587–635.
9. Lukashev, A. N. Recombination in Circulating Enteroviruses / A. N. Lukashev [et al.] // J. Virol. 2003. Vol. 77, № 19. P. 10423–10431.
10. Samoilovich, E. O. Serotype-Specific Mucosal Immune Response and Subsequent Poliovirus Replication in Vaccinated Children / E. O. Samoilovich [et al.] // Journal of Medical Virology. 2003. № 71. P. 274–280.
11. Santti, J. Evidence of recombination among Enteroviruses / J. Santti [et al.] // J. Virol. 1999. Vol. 73, № 10. P. 8741–8749.