

Антигенная изменчивость вакцинных полиовирусов в условиях формирования иммунного ответа

Представлены данные по экскреции вакцинных полиовирусов привитыми оральной полиомиелитной вакциной детьми и антигенной изменчивости полиовирусов в процессе их репликации. Выявлена высокая изменчивость антигенного сайта 3b у полиовируса типа 1: у 83,3% штаммов, изолированных позднее 25 дня после вакцинации, наблюдались признаки антигенного дрейфа. Изменений в области антигенного сайта 1 у полиовирусов типа 3 в течение 6 месяцев наблюдений выявлено не было. По-видимому, другие эпитопы полиовируса типа 3 испытывают селективное давление со стороны иммунной системы. Ключевые слова: вакцинация, полиовирусы, антигенные сайты

E.O. Samoilovich ANTIGENIC VARIABILITY OF VACCINE POLIOVIRUSES UNDER CONDITIONS OF IMMUNE RESPONSE FORMATION
The data on poliovirus excretion by children immunized with oral poliomyelitis vaccine and antigenic variability of polioviruses during their replication were presented. The high rate of antigenic variability of 3b antigenic site in poliovirus type 1 was observed: the markers of antigenic drift were revealed in 83,3% of strains, isolated later than the 25th day after vaccination. No changes in the antigenic site 1 in poliovirus type 3 during six month examination were detected. Probably, some other epitopes of poliovirus type 3 undergo the selective pressure of immune system.
Key words: vaccination, polioviruses, antigenic sites

Полиовирусы (ПВ), как и другие РНК-вирусы, отличается высокой скоростью эволюции. Молекулярная основа генетической нестабильности, свойственной РНК-вирусам, заключается в высокой частоте ошибок вирусных РНК-зависимых РНК-полимераз. Для ПВ она составляет 10^{-4} - 10^{-5} замен на геном в течение одного цикла репликации [3, 9]. Уровень изменчивости как диких, так и вакцинных ПВ составляет примерно 1-2% геномной РНК в год [6, 7]. При этом в различных областях генома ПВ мутации фиксируются с различной частотой, т.е. каждая область эволюционирует со своей относительно постоянной скоростью [4, 6].

Наиболее высокая изменчивость ПВ отмечена в области генома, кодирующей антигенные сайты. Замены аминокислот в антигенных сайтах, происходящие под влиянием позитивной селекции иммунной системы, могут приводить к возникновению новых антигенных вариантов ПВ, не нейтрализующихся моноклональными антителами (МкАт), т.е. способных ускользать от иммунного надзора. Следовательно, эволюция антигенных сайтов носит адаптивный характер.

В структуре ПВ идентифицированы четыре основных антигенных сайта. На основании взаимодействия с мышинными МкАт сайт 1 определен как иммунодоминантный для ПВ типа 2 (ПВ2) и ПВ типа 3 (ПВ3), в то время как для ПВ типа 1 (ПВ1) в качестве наиболее иммунодоминантного рассматривается антигенный сайт 3b [8].

Целью нашего исследования явилось изучение динамики антигенной изменчивости вакцинных ПВ в процессе их репликации в организме привитых оральной полиомиелитной вакциной (ОПВ) детей.

Материалы и методы

Под наблюдением находились 19 детей Могилевского дома ребенка в возрасте от 3 до 24 месяцев (медиана возраста ? 6 месяцев). Период наблюдения за каждым ребенком составлял не менее 6 месяцев, в течение которых ребенок получал 3 дозы ОПВ с интервалом в 2 месяца между дозами.

Сыворотка крови детей, собранная до иммунизации и через 45-55 дней после введения каждой дозы ОПВ, была исследована на наличие полиовируснейтрализующих антител. Постановку реакции нейтрализации осуществляли в культуре клеток Нер-2С согласно методу, рекомендованному ВОЗ [1].

Пробы стула собирали перед иммунизацией и с интервалом в 7-14 дней в течение двух месяцев после введения каждой дозы ОПВ. Всего была собрана и исследована 321 проба стула: после первой дозы вакцины ? 118 проб, после второй ? 105 проб и после третьей ? 98 проб.

Выделение ПВ и неполиомиелитных вирусов осуществляли в культурах клеток Нер2С, RD, L20В согласно методам, рекомендованным ВОЗ [1].

Идентификацию изолятов осуществляли в реакции нейтрализации в культуре клеток с использованием гипериммунных сывороток к ПВ и неполиомиелитным энтеровирусам производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, г. Москва, Россия или Национального института общественного здоровья и окружающей среды, Билтховен, Нидерланды.

Эпитопное картирование ПВ с помощью типоспецифических МкАт (Институт Пастера, Париж, Франция) осуществляли в культуре клеток Нер2С [2]. МкАт к ПВ1 были специфичны к антигенному сайту 3b, МкАт к ПВ2 и ПВ3 – к антигенному сайту 1. Индекс нейтрализации (ИН) рассчитывали как разность логарифмов инфекционного титра вируса в отсутствии и присутствии МкАт. ИН ? 2,0 lg ТЦД50 свидетельствовал о взаимодействии ПВ с МкАт.

Результаты и обсуждение

Перед введением первой дозы вакцины антитела к ПВ1, ПВ2 и ПВ3 были выявлены соответственно у 21,1%, 42,2% и 5,3% детей. По-видимому, у одних детей (в возрасте несколько месяцев) это были преимущественно материнские антитела, у других (более старшего возраста) антитела сформировались еще до получения вакцины в результате естественной иммунизации циркулирующими в коллективе вакцинными ПВ.

Введение каждой из трех доз ОПВ приводило к увеличению как уровня иммунитета (процент лиц с антителами в протективных титрах), так и его напряженности (значение титра вируснейтрализующих антител). Наиболее быстро и в наиболее высоких титрах вируснейтрализующие антитела накапливались к ПВ2. Все обследованные дети были иммунны к ПВ этого серотипа уже после второй прививки. Формирование протективного иммунитета к ПВ1 также шло достаточно эффективно: 84,2% детей были иммунны к ПВ1 после первой прививки, 88,2% ? после второй и 100% ? после третьей прививки. Наименее иммуногенным оказался ПВ3. Даже после трех прививок 23,5% детей не имели антител к ПВ этого серотипа.

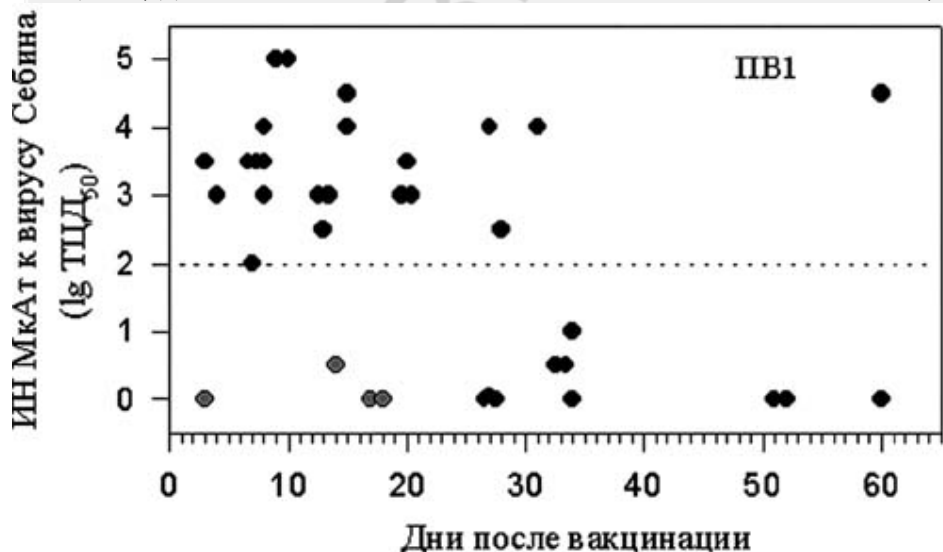
Исследование проб стула детей позволило изолировать 147 ПВ: 81 ? после первой прививки, 47 ? после второй и 19 ? после третьей (Табл. 1). Пик экскреции ПВ1 и ПВ2 наблюдался после первой прививки, в то время как большинство штаммов ПВ3 (31 из 49, 63,3%) были изолированы после введения второй дозы вакцины. После третьей прививки выделяемость всех трех типов ПВ снижалась, однако даже через 45-60 дней (период наблюдения) после введения третьей дозы вакцины 2 из 10 обследованных детей экскретировали вакцинный ПВ3 и один ребенок ? вакцинный ПВ1.

Следует отметить, что размножение вакцинных ПВ в кишечнике привитых наблюдалось на фоне высокого уровня бессимптомного носительства неполиомиелитных кишечных вирусов. Частота выделения неполиомиелитных вирусов возрастала по мере снижения выделяемости ПВ и составила после первой прививки ? 11,9%, после второй ? 21,9%, после третьей ? 28,6% (табл.). Среди неполиомиелитных вирусов были идентифицированы вирусы Экхо 4 и Коксаки В5.

Таблица
Частота выявления ПВ и неполиомиелитных вирусов в пробах стула детей в процессе иммунизации тремя дозами ОПВ

Вирусы	После первой дозы ОПВ n=118	После второй дозы ОПВ n=105	После третьей дозы ОПВ n=98	Всего n=321
ПВ (любого серотипа)	81 (68,6%)	47 (44,8%)	19 (19,4%)	147 (45,8%)
ПВ1	37 (31,4%)	8 (7,6%)	9 (9,2%)	54 (16,8%)
ПВ2	33 (28,0%)	8 (7,6%)	3 (3,1%)	44 (13,7%)
ПВ3	11 (9,3%)	31 (29,5%)	7 (7,1%)	49 (15,3%)
Неполиовирусы	14 (11,9%)	23 (21,9%)	28 (28,5%)	65 (20,2%)

Эпитопное картирование выделенных ПВ в реакции нейтрализации МкАт позволило установить, что продолжительная репликация ПВ1 в кишечнике привитых сопровождалась выраженной изменчивостью антигенного сайта 3b. Частота выявления ПВ1 с антигенным дрейфом существенно возрастала на поздних этапах экскреции (рис. 1). Среди ПВ1, выделенных позднее 25-го дня от введения вакцины, доля антигенно измененных изолятов составила 83,3%.



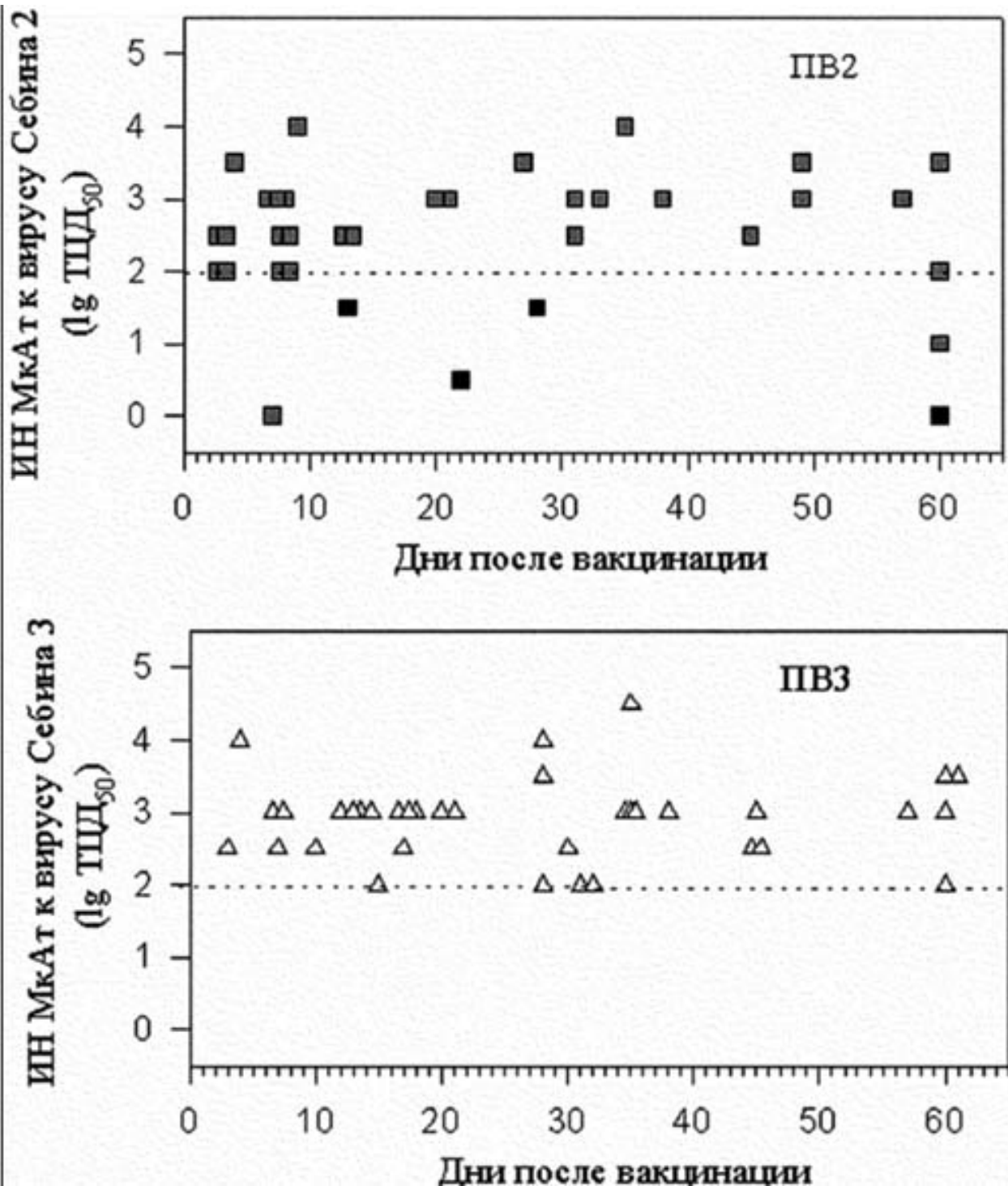


Рис.1. Динамика антигенной variability ПВ, экскретируемых детьми после вакцинации ОПВ

ИН <2 lg ТЦД₅₀ указывает на отсутствие взаимодействия с МкАт (черным цветом обозначены изоляты, полученные после первой дозы ОПВ, серым цветом – полученные после второй и третьей доз ОПВ).

Так, от ребенка Р.Э. на 8-й и 20-й дни после первой дозы ОПВ были изолированы ПВ1, иммунодоминантный антигенный сайт (сайт 3b) которых был идентичен вирусу Себина типа 1. С 27 по 52 день ребенок экскретировал антигенно измененный ПВ. Причем вирус, изолированный на 52 день, не только не нейтрализовался МкАт к вакцинному ПВ, но нейтрализовался МкАт к дикому ПВ,

т.е. приобрел антигенный фенотип дикого ПВ1. Секвенирование области генома, кодирующей антигенный сайта 3b, трех выделенных от этого ребенка антигенно модифицированных ПВ, выявило наличие мутаций в анализируемой области (Рис. 2). У изолятов, выделенных на 27 и 34 дни, присутствовала одна нуклеотидная замена, приводящая к замене 60-й аминокислоты (Lys>Thr) белка VP3. У вируса, изолированного на 51 день, присутствовали две нуклеотидные замены, что повлекло за собой замену двух аминокислот белка VP3: 50-й (Ala>Val) и 60-й (Lys>Gln). Кроме того, у всех трех вирусов были выявлены еще по две нуклеотидные замены, не входящие в состав антигенного сайта, но локализованные в непосредственной близости от него. Эти мутации также были несинонимичными и привели к замене 55-й (Phe>Leu) и 56-й (Asp>Asn) аминокислот.

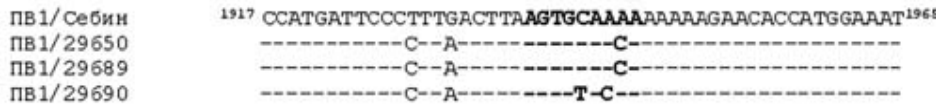


Рис.2. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей, кодирующих фрагмент белка VP3, вируса Себина типа 1 и антигенно измененных ПВ1, изолированных от привитого ОПВ ребенка

ПВ1/Себин – вирус Себина типа 1; ПВ1/29650, ПВ1/29689, ПВ1/29690 – вирусы, изолированные от ребенка Р.Э. на 27, 34 и 51 дни после первой дозы ОПВ; жирным шрифтом выделена область, кодирующая антигенный сайт 3b

У другого ребенка (А.З.) также наблюдалась высокая гетерогенность вирусной популяции, которая проявлялась в чередовании выделения типичных вакцинных и модифицированных ПВ. Антигенно модифицированный ПВ1 был впервые выделен на 60 день после введения первой дозы ОПВ. Этот вариант ПВ1, по-видимому, обладал селективным преимуществом перед обычным вакцинным вирусом Себина типа 1. Несмотря на введение *per oss* второй дозы ОПВ, на 3 день после вакцинации повторно был выделен антигенно измененный вариант ПВ1, на 13 день выделился обычный вакцинный ПВ1, на 17 день ? антигенно измененный. При дальнейшем обследовании ребенка ПВ1 выделены не были.

Антигенные свойства изолятов ПВ2 и ПВ3 изучены с МкАт, специфичными к антигенному сайту 1. Среди 35 исследованных ПВ2 было выявлено 6 (17,4%) антигенно модифицированных штаммов. Ни одного антигенно модифицированного ПВ3 выделить не удалось (рис. 1).

Как среди ПВ1, так и среди ПВ2 большинство изолятов с признаками антигенного дрейфа были выделены после первой дозы ОПВ. Возникновение таких ПВ ? это попытка вируса "ускользнуть" от надзора иммунной системы и продолжить репликацию в кишечнике уже в виде нового антигенно измененного варианта. Тот факт, что антигенно измененные варианты ПВ3 при длительной репликации в кишечнике серопозитивных лиц отсутствовали, по-видимому, свидетельствует о том, что какие-то другие эпитопы испытывали наибольшее селективное давление со стороны иммунной системы. Данные других исследователей так же свидетельствуют о высоком содержании антител, специфичных не только к антигенному сайту 1, но и к сайту 3 у лиц, вакцинированных ПВ3 либо переболевших полиомиелитом, вызванным ПВ этого типа [5].

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что иммунизация детей тремя дозами ОПВ приводит к высокому уровню сероконверсии в отношении

ПВ1 и ПВ2 и несколько более низкому – в отношении ПВ3. Воздействие специфического иммунитета по установлению контроля за вирусной репродукцией приводит к формированию и селекции антигенно модифицированных вариантов ПВ. У ПВ1 происходит быстрая замена нуклеотидов на участке генома, кодирующем антигенный сайт 3b, что подтверждает иммунодоминантность этого антигенного сайта для ПВ1. Отсутствие изменений в области антигенного сайта 1 у ПВ3 позволяет предположить, что в организме человека иммунный ответ направлен на другие антигенные детерминанты ПВ этого серотипа.

Литература

1. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита / ВОЗ. – Женева, 1998.
2. Crainic R., Blondel B., Horaud F. Antigenic variation of poliovirus studied by means of monoclonal antibodies // *Rev Infect Dis.*- 1984.-Vo. 6.- P.535– 539.
3. Drake J.W., Holland J.J. Mutation rates among RNA viruses // *Proc Natl Acad Sci USA.*- 1999.- Vol. 96.- P.13910-13913.
4. Gavrilin G.V., Cherkasova E.A., Lipskaya G.Y., Kew O.M, Agol V.I. Evolution of Circulating Wild Poliovirus and of Vaccine-Derived Poliovirus In an Immunodeficient Patient: a Unifying Model // *J Virol*- 2000.- Vol. 74, N 16.- P. 7381-7390.
5. Herremans T., Reinmerink J.K.J., Kimman H.G.A. et al. Antibody responses to antigenic sites 1 and 3 of serotype 3 poliovirus after vaccination with oral live attenuated or inactivated poliovirus vaccine and after natural exposure // *J Clin Diagn Lab Immun.*- 2000.- Vol. 7.- P. 40-44.
6. Kew OM, Mulders MN, Lipskaya GYu, da Silva EE, Pallansch MA. Molecular epidemiology of polioviruses // *Sem Virol.*- 1995.- Vol. 6. - P. 401-414.
7. Kinnunen L, Poyry T, Hovi T. Genetic diversity and rapid evolution of poliovirus in human hosts // *Curr Top Microbiol Immunol.*- 1992.- Vol. 176.- P.49-61.
8. Minor P.D., Ferguson M., Evans D.M.A. et al. Antigenic structure of polioviruses of serotypes 1,2 and 3 // *J Gen Virol.*- 1986.- Vol. 67.- P. 1283-1291.
9. Ward CD, Stokes MA, Flanagan JB. Direct measurement of the poliovirus RNA polymerase error frequency in vitro // *J Virol.*- 1988.- Vol. 6.- P.558-562.