

*И.Ф. Ухова<sup>1</sup>, Е.О. Самойлович<sup>1</sup>, М.А. Ермолович<sup>1</sup>, Е.Ю. Свирчевская<sup>1</sup>, М. Roivainen<sup>2</sup>, Т. Hovi<sup>2</sup>*

## **Экскреция рекомбинантных полиовирусов после иммунизации оральной полиомиелитной вакциной**

*НИИ эпидемиологии и микробиологии, Минск, Республика Беларусь<sup>1</sup>;  
National Public Health Institute, Helsinki, Finland<sup>2</sup>*

В статье представлены результаты молекулярного исследования вакцинных полиовирусов (ПВ), экскретируемых детьми в процессе вакцинации тремя дозами оральной полиовакцины. Установлена высокая частота (106/395, 26,8) встречаемости межтиповых рекомбинантных штаммов. Наиболее часто штаммы с рекомбинантным геномом обнаруживались среди ПВ3 (79/134; 59.0%), реже - среди ПВ2 (25/126; 19.8%) и крайне редко - среди ПВ1 (2/135; 1.5%). Рекомбинантные ПВ3 обладали селективным преимуществом перед нерекомбинантными вирусами и отличались наиболее продолжительным периодом экскреции - 9 недель и более после введения 3-ей дозы вакцины. Ключевые слова: полиовирус, оральная полиомиелитная вакцина, рекомбинантный штамм.

Применение живой оральной полиомиелитной вакцины (ОПВ) позволило добиться значительных успехов в борьбе с этой инфекцией. Аттенуированные полиовирусы (ПВ) трех серотипов, входящие в состав ОПВ, размножаются в кишечнике привитого в течение нескольких недель, выделяясь при этом в окружающую среду. Распространение вакцинных штаммов в популяции, приводящее к иммунизации неимунных детей и бустированию иммунного ответа у ранее привитых, считалось преимуществом этой вакцины. Однако на стадии глобального искоренения полиомиелита мировое сообщество столкнулось с рядом проблем. Одной из них является обнаружение так называемых вакцинно-родственных ПВ (ВРПВ), вирусов в значительной степени (на 1-15%) дивергировавших от их прародителей - вакцинных штаммов Себина [7]. Модифицированные посредством мутаций и/или рекомбинаций вакцинные ПВ способны восстанавливать свои нейровирулентные свойства и приводить к возникновению вспышек паралитических заболеваний на территориях с низким уровнем охвата вакцинацией [6,10,15]. ВРПВ, циркуляция которых не привела к возникновению паралитических заболеваний, были обнаружены и в некоторых странах с высоким уровнем иммунизации против полиомиелита [3, 14]. Быстрому изменению вирусного генома в большей степени, чем точечные мутации, способствуют рекомбинационные перестройки. Общеизвестной моделью рекомбинации у ПВ является смена матрицы (template switch) 3D-полимеразой вируса в процессе синтеза цепи-РНК. В подавляющем большинстве случаев рекомбинационные перестройки в геноме ПВ происходят в неструктурной области [4, 8, 13]. Существенную роль в определении вероятности рекомбинации играет гомология нуклеотидной последовательности вирусной РНК. Было показано, что внутритиповые рекомбинации происходят в 100 раз чаще, чем межтиповые [8]. В то же время, одновременное введение ребенку в составе ОПВ вакцинных ПВ всех трех серотипов значительно повышает вероятность межтиповых рекомбинаций. Совместное размножение ПВ

разных серотипов в клетках кишечника и, таким образом, тесное взаимодействие генетического материала создают идеальные условия для рекомбинационного события. Доля рекомбинантных штаммов ПВ, выделяемых реципиентами ОПВ, может достигать 36% [8]. В ряде случаев межтипковые рекомбинации в сочетании с точечными мутациями у вакцинных ПВ способствуют восстановлению нейровирулентного фенотипа, тем самым являясь источником опасности в первую очередь для лиц с иммунодефицитами. Таким образом, исследование циркулирующих ПВ и поиск ВРПВ являются несомненно важной частью эпидемиологического надзора за полиовирусной инфекцией.

Поскольку практически все идентифицированные к настоящему времени ВРПВ наряду с содержанием не менее 10 нуклеотидных замен в области основного структурного белка VP1 являются рекомбинантами нескольких серотипов ПВ между собой либо ПВ с неидентифицированными энтеровирусами [7], поиск ВРПВ в первую очередь должен быть направлен на выявление рекомбинантных штаммов.

Наиболее доступным методом, позволяющим определить типовую принадлежность различных участков генома ПВ, является метод полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), предложенный Balanant J. et al. в 1991 году [2]. Данный метод позволяет за минимальный промежуток времени изучить большое количество штаммов в значимых областях генома и тем самым отобрать рекомбинантные штаммы для последующего более детального изучения [11].

Целью настоящего исследования явилось выявление рекомбинантных штаммов ПВ и изучение кинетики их экскреции здоровыми детьми после иммунизации их ОПВ.

Материалы и методы

Проведено молекулярно-генетическое исследование коллекции ПВ

Национального референс-центра по полиомиелиту Республики Беларусь (НИИ эпидемиологии и микробиологии), изолированных в 1999-2000 гг. из образцов стула здоровых детей, проживающих в Доме ребенка. Под наблюдением находились дети в возрасте от двух месяцев до двух лет, вакцинированные 1-ой, 2-ой и 3-ей дозами стандартной трехвалентной ОПВ производства Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова АМН, Россия.

Интервал между введением доз вакцины составлял два месяца, забор образцов стула проводился еженедельно. В течение периода наблюдения (13 месяцев) от тридцати двух детей были забраны 722 образца стула.

Вирусологическое исследование образцов осуществляли в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения [1]. Выделение и накопление вирусов проводили в культурах клеток RD, L20В и Нер2С. Типовую принадлежность вирусных изолятов определяли микрометодом в реакции нейтрализации в культуре клеток RD с использованием специфических гипериммунных сывороток к ПВ трех серотипов (Институт здоровья и окружающей среды, Билтховен, Нидерланды).

Всего, в том числе после разделения смесей, состоящих из ПВ нескольких серотипов, было получено 395 ПВ: 135 ПВ относились к серотипу 1 (ПВ1), 126 - к серотипу 2 (ПВ2) и 134 - к серотипу 3 (ПВ3).

С помощью RFLP анализа изучены две области генома ПВ: область генома длиной 480 н.п., кодирующая N-концевую часть структурного белка VP1 (RFLP-1) и область генома длиной 291 н.п., кодирующая фрагмент неструктурного белка вирусной 3D-полимеразы (RFLP-3D1). Рестрикцию амплифицированного фрагмента VP1 проводили с использованием эндонуклеаз HpaII, HaeIII и DdeI («Promega», USA), фрагмента вирусной 3D-полимеразы - с использованием эндонуклеаз RsaI, HaeIII и DdeI («Promega», USA). Полученные рестрикционные фрагменты генома идентифицировали в  $\lambda$ 3% агарозном геле в ультрафиолетовом излучении (использовали молекулярно-весовой маркер ДНК pBR322/HaeIII («Promega», USA) и эталонные вакцинные штаммы вирусов ПВ1/Sabin, ПВ2/Sabin, ПВ3/Sabin. Учет проводили по появлению специфической полосы на расстоянии, соответствующем пробегу рестрикционного фрагмента. Принадлежность исследуемых фрагментов ПВ к вакцинным штаммам соответствующего серотипа определяли путем сравнения его рестрикционного профиля с профилями рестрикции эталонных вакцинных ПВ каждого из трех серотипов.

Анализ полученных данных проводили в соответствии с общепринятыми статистическими методами обработки данных.

Результаты и обсуждение

Частота встречаемости рекомбинантных ПВ после иммунизации детей ОПВ Поскольку вероятность обнаружения рекомбинационных перестроек наиболее высока в области неструктурных белков [4, 8, 13], молекулярно-генетический скрининг рекомбинантных ПВ представлялось целесообразным начать с исследования фрагмента генома, кодирующего часть вирусной 3D-полимеразы. Все ПВ первоначально были изучены методом RFLP-3D1. Если типовая принадлежность вирусной полимеразы не совпадала с типовой принадлежностью вируса по результатам его серотипирования, такой ПВ относили к рекомбинантным штаммам. Для того, чтобы подтвердить типовую принадлежность выявленных рекомбинантов, для всех ПВ с гетеротипичными геномами был проведен рестрикционный анализ фрагмента, кодирующего структурный белок VP1 (RFLP-1).

Согласно результатам RFLP-3D1 и RFLP-1, среди 395 изученных штаммов ПВ 106 ( $26,84 \pm 2,23\%$ ) являлись межтипными вакцинно-вакцинными рекомбинантными штаммами.

Среди 135 штаммов ПВ1 только два ПВ ( $1,48 \pm 1,04\%$ ) имели рекомбинантный геном, который в обоих случаях в области 3D-полимеразы был представлен фрагментом ПВ2 (геном ПВ1хПВ2). Данные о крайне редкой встречаемости рекомбинантных штаммов среди ПВ1 были получены и другими исследователями [5].

Изучение 126 штаммов ПВ2 позволило установить, что 25 ( $19,84 \pm 3,57\%$ ) из них являлись вакцинно-вакцинными рекомбинантами. При этом большинство ( $22; 88,0 \pm 6,63\%$ ) гетеротипичных ПВ2 в 3D1-области имели фрагмент генома ПВ1 (геном ПВ2хПВ1). Только три ( $12,0 \pm 6,63\%$ ) штамма содержали полимеразу, принадлежащую ПВ3 (геном ПВ2хПВ3).

Наиболее часто рекомбинантные штаммы выявлялись среди ПВ3. Из 134 изолятов этого серотипа 79 ( $58,96 \pm 4,27\%$ ) имели рекомбинантный геном. Как и

ПВ2, наиболее часто ПВ3 вступали в рекомбинацию с ПВ1: 62 ( $78,48 \pm 4,65\%$ ) рекомбинантных штамма имели геном ПВ3хПВ1. Еще 13 ( $16,46 \pm 4,20\%$ ) штаммов являлись рекомбинантами ПВ3хПВ2. Четыре ( $5,06 \pm 2,48\%$ ) штамма ПВ3 были представлены смесью двух различных рекомбинантных геномов: ПВ3хПВ1+ПВ3хПВ2.

Таким образом, как в случае ПВ2, так и в случае ПВ3, гетеротипичная вирусная полимераза у рекомбинантных штаммов в основном принадлежала ПВ1. Среди 104 рекомбинантных штаммов этих двух серотипов 84 ( $80,77 \pm 3,88\%$ ) в 3D1 области генома содержали участок ПВ1.

Кинетика экскреции межтиповых рекомбинантных штаммов ПВ трех серотипов. Интенсивность и длительность экскреции рекомбинантных штаммов ПВ после вакцинации тремя дозами ОПВ существенно различалась для ПВ каждого их трех серотипов (рис.1).

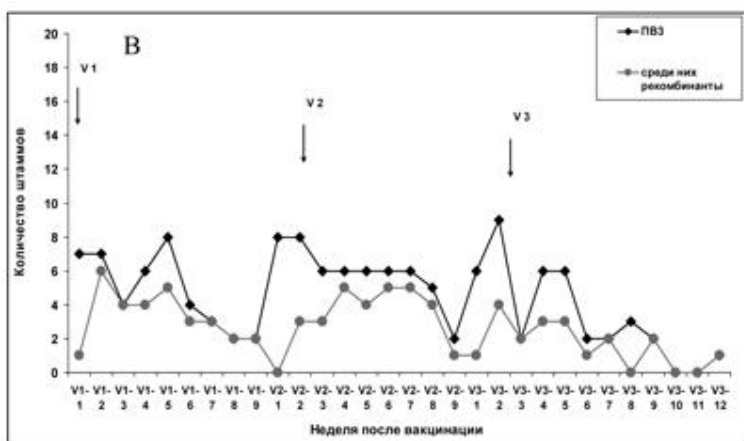
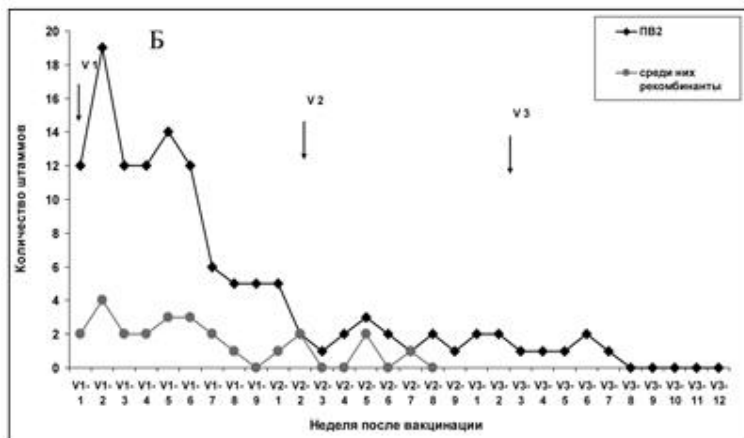
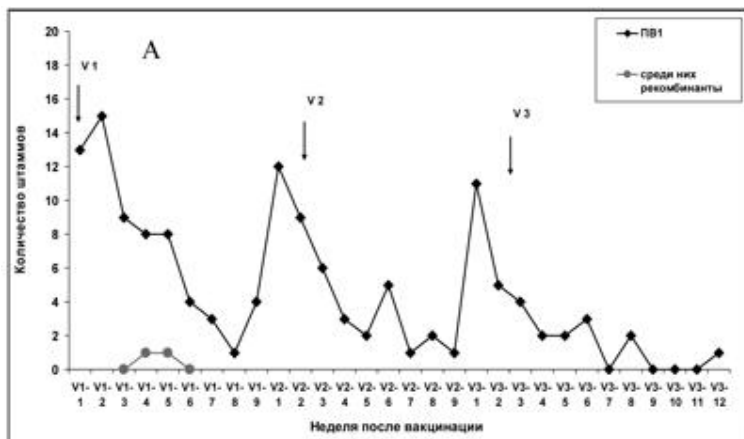


Рис.1 Кинетика экскреции ПВ1, ПВ2 и ПВ3 и рекомбинантных штаммов соответствующего типа: А - ПВ 1; Б - ПВ 2; В - ПВ 3

#### Кинетика экскреции рекомбинантных штаммов ПВ1

Оба рекомбинантных штамма ПВ1 экскретировались детьми, получившими 1-ую дозу ОПВ, т.е. еще не имеющими достаточно выраженного кишечного иммунитета к полиомиелиту. В таких условиях размножение ПВ всех трех серотипов происходит наиболее интенсивно, при этом отмечается возникновение различных перестроек в геномной РНК, в том числе и формирование рекомбинантных геномов. В нашем исследовании по одному рекомбинантному ПВ1 было изолировано от двух детей на 4 и 5 неделе после 1-ой вакцинации и позднее они уже не выявлялись, хотя активное размножение вакцинных штаммов ПВ1 продолжало происходить и после введения 2-ой и даже 3-ей доз

ОПВ (рис.1А). Важно отметить, что рекомбинантные ПВ1 были изолированы не от одного ребенка, а от разных детей. Учитывая уникальность такого события, как формирование рекомбинантных ПВ1, можно предположить, что такой штамм образовался в кишечнике одного из детей, а второй ребенок получил его контактным путем. Однако в организме как первого, так и второго ребенка дальнейшего размножения рекомбинантных ПВ1 не произошло.

Кинетика экскреции рекомбинантных ПВ2.

Два штамма ПВ2 с рекомбинантным геномом были обнаружены уже через неделю после введения 1-ой дозы ОПВ (рис.1Б). Это подтверждает, что для ПВ2 вступление в рекомбинацию с ПВ других серотипов является гораздо более легким процессом в сравнении с ПВ1. Наибольшее количество рекомбинантных ПВ2 (четыре штамма) было выявлено через две недели после 1-ой прививки ОПВ. В последующие полтора месяца, несмотря на снижение общего количества экскретируемых детьми ПВ2, еженедельно обнаруживались 1-3 рекомбинантных вируса. Однако через 9 недель после прививки ни одного рекомбинантного штамма обнаружено не было.

Введение второй дозы вакцины не привело к существенному повышению экскреции вакцинных ПВ2, что свидетельствует о достаточно активном формировании местного кишечного иммунитета уже на введение первой дозы вакцины. Однако в течение двух последующих месяцев наблюдения выделение детьми рекомбинантных штаммов продолжалось, хотя обнаруживались они нерегулярно (на 3, 4 и 6 неделях после 2-ой прививки ни одного рекомбинантного ПВ2 изолировать не удалось).

В целом, после введения 2-ой дозы ОПВ доля рекомбинантных штаммов в общем количестве экскретируемых ПВ2 была существенно выше, чем после начала вакцинации. Однако начиная с 8 недели после 2-ой прививки ни одного рекомбинантного ПВ2 изолировать не удалось.

После введения детям 3-ей дозы ОПВ повышения уровня экскреции вакцинных ПВ2 не происходило. Хотя единичные ПВ2 продолжали выделяться еженедельно вплоть до 8 недели после 3-ей прививки, ни одного рекомбинантного штамма среди них обнаружено не было.

Кинетика экскреции рекомбинантных ПВ3

Уровень и длительность экскреции рекомбинантных ПВ3 существенно отличались от аналогичных показателей для ПВ2 и ПВ1 (рис.1В).

Как и в случае ПВ2, рекомбинантные ПВ3 обнаруживались уже через неделю после начала вакцинации. Начиная со второй недели после вакцинации рекомбинантные штаммы составляли основную часть экскретируемых ПВ3, а на 7, 8 и 9 неделях все выделенные штаммы имели рекомбинантный геном.

Введение 2-ой дозы ОПВ привело к существенному повышению уровня экскреции ПВ3. При этом в течение первой недели после вакцинации все штаммы имели гомотипичный геном, т.е. соответствовали оригинальному вакцинному вирусу Себина серотипа 3. В течение последующих недель доля рекомбинантных штаммов среди экскретируемых детьми вирусов нарастала, и практически все ПВ3, выделяемые на 4-9 неделях после прививки, уже имели гетеротипичный геном.

В отличие от ПВ1 и ПВ2, формирование рекомбинантных ПВ3 продолжалось на

протяжении всего периода наблюдения и после введения детям 3-ей дозы вакцины. На фоне постепенного формирования местного иммунитета и общего снижения экскреции ПВЗ, рекомбинантные штаммы продолжали составлять практически половину изолятов данного серотипа. Через 2 месяца после 3-ей вакцинации от трех детей было изолировано по одному штамму ПВЗ, все из которых имели рекомбинантный геном.

Результаты динамического наблюдения показывают, что в конце каждого постиммунизационного периода (через 1,5-2,5 месяцев после прививки) практически все экскретируемые детьми ПВЗ являлись межтипными рекомбинантами (рис.2). Это позволяет предположить существование селективного преимущества в размножении ПВЗ с рекомбинантным геномом в сравнении с оригинальными вакцинными ПВЗ, полученными детьми при вакцинации ОПВ.

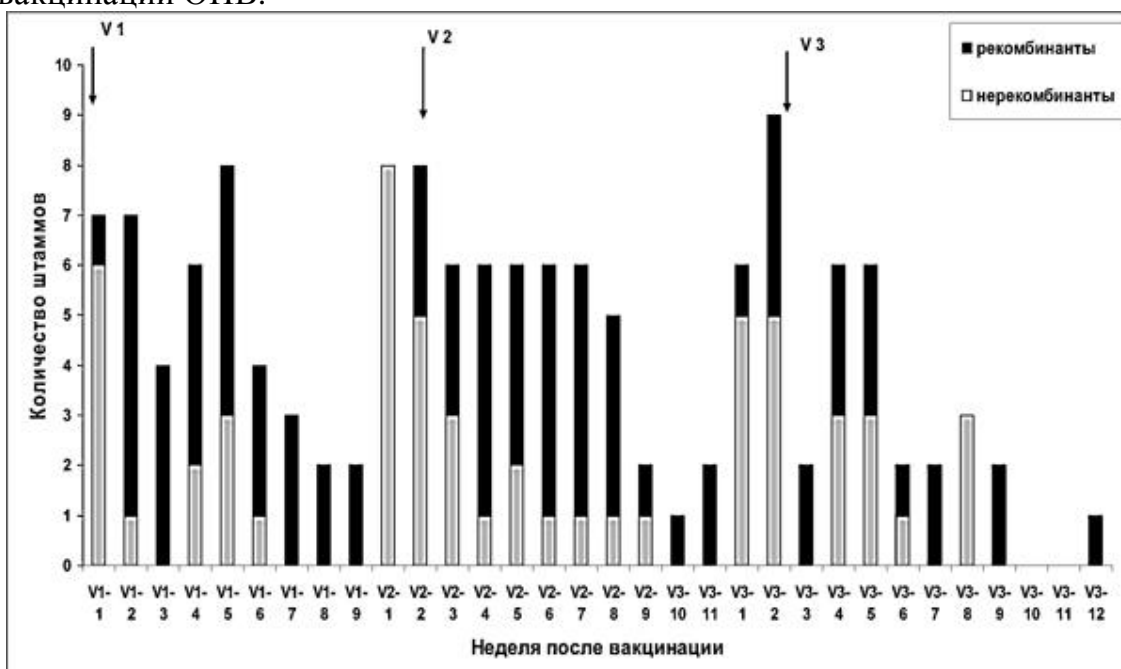


Рис.2. Экскреция рекомбинантных штаммов ПВЗ в процессе вакцинации детей тремя дозами ОПВ

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о том, что каждый из трех серотипов ПВ, выделяемых детьми после вакцинации ОПВ, характеризуется не только своим профилем экскреции (что было описано ранее [12]), но и имеет характерную только для него кинетику экскреции рекомбинантных ПВ. ПВЗ отличается как наиболее высокой частотой образования рекомбинантных штаммов, так и наиболее продолжительной их экскрецией. После каждой из трех последовательно введенных доз ОПВ при дальнейшем размножении вакцинных вирусов в кишечнике привитого ребенка рекомбинантные вирусы постепенно вытесняли вирусы с гомотипичным геномом и через 8-9 недель после вакцинации экскретируемые вирусы были в основном представлены рекомбинантными штаммами.

Скрининг ПВ с использованием RFLP анализа позволяет выявлять рекомбинантные штаммы и является важным этапом отбора вирусов для последующего секвенирования, направленного на выявление ВРПВ.

Обнаружение ВРПВ среди выявленных в данном исследовании рекомбинантных вакцинных ПВ представляется маловероятным. Как правило, такие вирусы появляются в процессе длительной (более одного года) циркуляции среди восприимчивого населения [9]. Все находившиеся под наблюдением дети сформировали специфический гуморальный иммунитет уже в ответ на 2-ую дозу вакцины [12].

Полученная нами лабораторная коллекция межтипových вакцинно-вакцинных рекомбинантных ПВ представляет интерес для дальнейшего изучения с целью определения механизма рекомбинаций, определения наиболее подверженных рекомбинационному перекресту областей генома для разных серотипов ПВ, изучения фитнеса рекомбинантных штаммов в сравнении с фитнесом их прародителей - вирусов с гомотипичным геномом. Эти данные представляются чрезвычайно важными для программы глобальной ликвидации полиомиелита, поскольку основные закономерности, выявленные при изучении вакцинно-вакцинных рекомбинантов, могут распространяться и на рекомбинации между вакцинными и дикими ПВ, а также между ПВ и неполиомиелитными энтеровирусами.

#### Литература

1. Руководство по лабораторным исследованиям полиомиелита. 112 с.—Женева: ВОЗ, 2005. —
2. Balanant J., Guillot S., Candrea A., Delpeyroux F. and Crainic R. The natural genomic variability of poliovirus analyzed by a restriction fragment length polymorphism assay // *Virology*. - 654.—1991. - Vol.184. - P. 645
3. Blomqvist S., Savolainen C., Laine P. Hirttio P., Lamminsalo E., Penttila E., Joks S., Roivainen M. and Hovi T. Characterization of a highly evolved vaccine-derived poliovirus type 3 isolated 4883.—from sewage in Estonia // *J. Virol.* - 2004. - Vol.78, №9 - P. 4876
4. Caro V., Gillot S., Delpeyroux F., Crainic R. Molecular strategy for "serotyping" of human enteroviruses // *J. Gen. Virol.* - 2001. - Vol.82. - 91.—P.79
5. Cuervo N.S., Guillot S., Romanenkova N.I. et al. Genomic features of intertypic recombinant Sabin poliovirus strains excreted by primary vaccines // *J. Virol.* - 2001. - Vol.75, №13.- P. 5740-5751.
6. Kew O.M., Morris-Glasgow V., Landaverde M. et al. Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus // *Science*. - 2002. - Vol.296, №5566 - P. 356-359.
7. Kew O.M., Sutter R.W., de Gourville E.M. et al. Vaccine-derived polioviruses and the endgame strategy for global 635.—polio eradication // *Annu. Rev. Microbiol.* - 2005. - Vol.59. - P. 587
8. Lukashev A.N., Lashkevich V.A., Ivanova O.E., Koroleva G.A., Hinkkanen A.E. and Ponen J. Recombination in Circulating Enteroviruses // *J. Virol.* - 2003. - 10431.—Vol.77, №19. - P. 10423
9. Martin J., Odoom K., Grainne T., Dunn G., Hopewell N., Cooper G., Fitzharris C., Butler K., Hall W.W. and Minor P.D. Long-term excretion of vaccine-derived poliovirus by a healthy child // *J. Virol.* - 2004. - Vol.78, №24. - P. 13839-13847.
10. Rakoto-Andrianarivelo M., Gumede N., Jegouic S., Balanant J., Andriamamonjy S.N., Rabemanantsoa S., Birmingham M., Randriamanalina B., Nkolomoni L., Venter



- M., Schoub B.D., Delpeyroux F. and Reynes J.M. Reemergence of recombinant vaccine-derived poliovirus outbreak in Madagascar. // *J.Infect.Dis.* - 2008. - Vol.197, №10. - P. 1427-1435.
11. Romanenkova N.I., Guillot S., Rozaeva N.R., Crainic R., Bichurina M.A. and Delpeyroux F. Use of a multiple restriction fragment length polymorphism method for detecting vaccine-derived polioviruses in clinical samples // *J. Clinic. Microbiol.* - 2006. - Vol.44, №11. - P. 4077-4084.
  12. Samoilovich E.O., Roivainen M., Titov L.P., Hovi T. Serotype-specific mucosal immune response and subsequent poliovirus replication in vaccinated children // *J.Med.Virol.* - 2003. - Vol.71. - P. 274
  13. Santti J., Hyypiä T., Kinnunen L. and Salminen M. Evidence of recombination among Enteroviruses // *J.Virol.* - 1999. - Vol.73, №10. - P. 8741-8749.
  14. Shulman L.M., Manor Y., Handsch R. et al. Molecular and antigenic characterization of a highly evolved derivative of type 2 oral poliovaccine strain isolated from sewage in Israel // *J.Clin.Microbiol.* - 2000. - Vol.38, №10. - P. 3729-3734.
  15. Yang C.-F., Naguib T., Yang S.-J. et al. Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993 // *J.Virol.* - 2003. - Vol.77, №15. -P. 8366-8377.