

脊髓灰质炎病毒疫苗株感染与免疫策略

李杰 庄辉

自 1988 年世界卫生组织提出于 2000 年实现在全球范围内消灭脊髓灰质炎目标后,世界各国大力开展口服脊髓灰质炎减毒活疫苗(OPV)的计划免疫工作,脊髓灰质炎发病率明显下降。1994 年美洲地区正式宣布该地区已消灭本土脊髓灰质炎。2000 年 10 月 29 日西太平洋地区宣布该地区无本土脊髓灰质炎野病毒传播。至今欧洲已有 2 年无脊髓灰质炎病例,预计于 2002 年该地区将宣布无本土脊髓灰质炎。但目前世界上仍有 3 个地区 20 个国家有脊髓灰质炎流行。因此,世界卫生组织将在全球范围内消灭脊髓灰质炎的目标推迟至 2005 年。

1. 脊髓灰质炎病毒疫苗株:在全球消灭脊髓灰质炎过程中,OPV 起着决定性作用,但也出现了脊髓灰质炎病毒疫苗株感染的问题。由于 OPV 是活病毒,因此,口服后可在服苗者肠道内复制,并可排出体外感染易感的接触者,该疫苗病毒在服苗者和接触者肠道内复制时,可发生病毒突变、各型疫苗株间病毒重组、疫苗株与脊髓灰质炎野病毒重组,以及疫苗株与非脊髓灰质炎肠道病毒重组等,从而形成各种不同的疫苗变异株或重组株。在文献中,对这类病毒株有不同命名,如脊髓灰质炎病毒疫苗相关株(vaccine-related poliovirus)、疫苗变异株(vaccine-variant strain)、疫苗漂移株(vaccine-drift strain)、类 Sabin 株(Sabin-like strain)、回复突变株(revertant strain)、OPV 衍生脊髓灰质炎病毒(OPV-derived poliovirus)及疫苗衍生脊髓灰质炎病毒(vaccine derived poliovirus, VDPV)等。但根据病毒的序列及其人群感染的特点,此类疫苗变异株或重组脊髓灰质炎病毒株主要可分为以下两大类。

(1) 疫苗相关脊髓灰质炎病毒(vaccine associated poliovirus, VAPV)感染主要发生在服 OPV 人群及其易感的接触者中,在流行病学上与服 OPV 疫苗有关,其中少数感染者可出现急性迟缓性麻痹(AFP),多为短暂的;从病人大便中分离的脊髓灰质炎病毒,用酶联免疫试验(ELISA)和限制性片段长度多态性分析(RFLP)与 Sabin 株无差异,其核苷酸序列与 Sabin 株的差异小于 1%。由 VAPV 引起的 AFP 病人称为疫苗相关麻痹(vaccine associated polio paralysis, VAPP),病人一般于服苗后 4~30 d 内出现麻痹,其临床特征与脊髓灰质炎野毒株感染相似^[1]。在第一次服 OPV 的正常人群中,VAPP 发生率约为 1/50 万,但免疫缺陷病人 VAPP 发生率较正常人群约高 1 000 倍。免疫正常人群

VAPP 多与 II 型及 III 型 OPV 相关,而免疫缺陷者的 VAPP 则多与 I 型及 II 型 OPV 相关。II 型疫苗株更易传播给接触者,且易引起 VAPP^[2]。此外,OPV 还可引起其他神经系统症状,如脑膜炎、脑炎、痉挛、横断脊髓炎及格林巴利综合征等,从这些患者中也可分离到 VAPV。

(2) VDPV 感染主要发生在未免疫的人群中,与是否服 OPV 无关,可发生人与人之间的持续传播而出现成群病例(clusters),常为永久性麻痹,与脊髓灰质炎野病毒引起的病例难以区别;从病人大便中分离的脊髓灰质炎病毒,用 ELISA 和 RFLP 分析与 Sabin 株有差异,其核苷酸序列与 Sabin 株的差异大于 1%,其神经毒力已回复。因此,世界卫生组织消灭脊髓灰质炎证实委员会认为,对 VDPV 病例应与脊髓灰质炎野病毒引起的病例一样对待,消灭脊髓灰质炎不仅要消灭脊髓灰质炎野病毒,还要消灭 VDPV 引起的脊髓灰质炎。VAPV 和 VDPV 感染主要发生在 OPV 覆盖率低的地区。

2. 发生 VAPV 和 VDPV 的原因:

(1) 病毒变异:OPV 疫苗株在人体内增殖后可发生基因变异,如神经毒力回复突变,可引起 VAPP^[3]。现已证实,从这些 VAPP 患者的大便、咽拭子、血液及脑脊液中分离的疫苗株存在基因突变,如减毒活性决定位点的回复突变、抑制突变、抗原位点突变等^[2-5]。这些突变可能是由温度、宿主细胞、中和抗体或其他未知因素等的选择压力诱发的^[2,6,7]。应用分子生物学方法比较 3 种型别疫苗株与野毒亲本株及神经毒力回复突变株,已确定一些关键性核苷酸位点与疫苗株减毒表型相关。

I 型疫苗株具有更多的与减毒活性相关的突变位点,其安全性较 II 型和 III 型疫苗株更高。从 VAPP 患者粪便和中枢神经系统分离的 I 型疫苗相关株中,检测到与神经毒力回升相关的位点突变。480-G 和 525-U 两个位点的突变对 I 型疫苗株的神经毒力回复起关键作用,几乎从 VAPP 患者中分离的所有 I 型疫苗相关株均检测到该 2 个位点的突变^[3,5,8,9]。有人认为,nt189(5'-NCR),935(VP4),2438(VP3),2749(VP1),2795(VP1),6203(3Dpol)和 441(3'-NCR)等位点突变可能与神经毒力升高也相关^[4]。此外,从 VAPP 患者中分离的 I 型 OPV 疫苗相关株,还检测到一些新的突变位点,其与神经毒力的关系尚未确定。从健康服苗者大便中分离的 I 型 OPV 疫苗株,也检测到 480-G 和 525-U 位点突变。

位于 5'-NCR nt481 位点(VP1 外壳蛋白 143 位氨基酸密码子)突变对 II 型疫苗株的神经毒力回复起关键作用^[2,10],几乎从 VAPP 患者中分离的所有 II 型 OPV 疫苗株均检测到

该位点的突变,并 从非 VAPP 的 AFP 患者大便中分离的 II 型疫苗株,也检测到该位点突变。从 VAPP 患者中分离的 II 型疫苗株,常可检测到 5'-NCR nt398 及其他的位点突变。从健康服苗者的大便中曾分离到有 nt481 和 aa143(VP1)位点突变的 II 型疫苗株。此外,从 VAPP 患者中曾分离到具有衣壳蛋白抗原位点突变的 II 型疫苗株,该突变可导致免疫逃逸现象^[2,7]。

位于 5'-NCR nt472 位点突变对 III 型疫苗株的神经毒力回复起关键作用,几乎从 VAPP 患者中分离的所有 III 型疫苗株均检测到该位点突变^[1]。衣壳蛋白 VP3 第 91 位密码子突变或抑制突变,对 III 型疫苗株的神经毒力回复起关键作用。从 VAPP 患者分离的几株 III 型疫苗株中,还检测到 5'-NCR nt143 及其他位点突变。从健康服苗者大便中分离的 III 型疫苗株,曾检测到 nt472 和 aa91(VP3)位点突变或抑制突变。

(2) 病毒基因重组:各型疫苗株之间可发生基因重组,主要与同时应用 OPV 三价减毒活疫苗有关。OPV 病毒株在人肠道内复制时,3 型疫苗株病毒有可能同时感染一个细胞,并在病毒复制时发生基因重组^[8]。关键性核苷酸位点突变及基因重组,二者单独或共同作用,可能是引起疫苗株神经毒力回复突变的原因^[2,4,12]。

疫苗株之间的基因重组现象 II 型疫苗株更易发生,即疫苗分离株在 VP1 区的基因型与 Sabin 2 一致,而在 3D 聚合酶编码区的基因型为非 Sabin 2 型基因,其中 Sabin 2(VP1)和 Sabin 3(3D)型基因重组株较其他类型重组株更为多见。从未服苗儿童中也可分离到该基因重组株^[8]。从 VAPP 的健康接触者大便中分离的 II 型疫苗株,可检测到 nt481 和 nt398 位点突变及基因重组现象。

疫苗株与非疫苗株病毒也可发生基因重组^[4,9],如在未消灭脊髓灰质炎野病毒的地区,疫苗株与脊髓灰质炎野病毒可发生基因重组。1994 年曾从广西和福建分离到 2 株 I 型 OPV 疫苗株为基因重组变异株,其 3D 聚合酶编码区为野毒株基因型^[4]。

此外,疫苗株还可与非脊髓灰质炎肠道病毒发生基因重组。从 VAPP 患者及健康服苗者中分离的 III 型疫苗株也发现基因重组现象,甚至出现 III 型疫苗株(VP1)与非疫苗株(3D)重组病毒^[3,9]。

(3) 宿主因素:虽然疫苗相关株的基因变异与神经毒力相关,但同样的基因变异不仅存在于 VAPP 患者的分离株,也存在于健康接触者及健康服苗者的分离株,提示宿主因素与疫苗相关株的致病性有关。Yoshida 等^[7]报道,由于人体内的温度高于疫苗制备时的温度,因此,疫苗株病毒在人体内复制时易发生有害的基因变异。

免疫缺陷可能是导致疫苗株致病的又一因素。免疫缺陷者服苗后可能发生麻痹。现已证明,遗传性免疫缺陷、蛋白代谢失调导致的免疫缺陷和/或维生素 A 缺乏、药物治疗引起的免疫抑制及人类免疫缺陷病毒(HIV)感染等均可导致 VAPP 的发生。

3. VDPV 流行情况:1988~1993 年,在埃及 8 个州发现 32 例由 II 型 VDPV 引起的脊髓灰质炎病例,其 VDPV 的抗原特性为非疫苗株特性,核苷酸序列(VP1 区 nt903)与 II 型 Sabin 株的同源性为 93%~96%,且与埃及本土流行的 II 型野毒株序列同源性 <81%。该 32 株 II 型 VDPV 的流行病学及遗传学数据表明,在 1988~1993 年间,II 型 VDPV 在埃及曾广泛地流行。

2000 年 7 月至 2001 年 9 月多米尼加和海地共报告了 21 例脊髓灰质炎病例,其中 2 例死亡。多米尼加共报告 168 例 AFP,其中 13 例被证实为脊髓灰质炎病例,从患者及其健康接触者中分离出 I 型 VDPV。患者平均年龄为 3 岁(9 个月~14 岁),最近 1 例麻痹发生于 2001 年 1 月 25 日,所有患者均未得到合适的免疫。海地共报告了 40 例 AFP,其中 8 例被证实为脊髓灰质炎病例,从患者及其健康接触者中分离出 I 型 VDPV。患者平均年龄为 7 岁(2~14 岁),该 I 型 VDPV 经证实为从 OPV 衍生而来,与 Sabin 1 的核苷酸序列同源性为 97%,其神经毒力及传染性与野毒株相似。核苷酸序列的差异显示,病毒已经在免疫缺陷患者体内复制了很长时间,或者已经在免疫覆盖率低的地区循环了 2 年之久,它是由原始 Sabin 株基因不断变异而返祖产生的^[7]。

2001 年 3~7 月,菲律宾报告 3 例与 VDPV 流行相关的 AFP(2 例麻痹、1 例脑膜炎)。从这些患者体内分离到的病毒为 I 型 VDPV,与 Sabin 1 的核苷酸序列同源性为 97%,而 3 株 VDPV 间的核苷酸序列同源性 >99%,均在基因组非结构区的相同位点与非脊髓灰质炎肠道病毒发生基因重组^[8]。

此外,日本从污水和河水中分离到 29 株 III 型 VDPV,其中 16 株在 5'-NCR472 位点发生突变(U→C),推测其神经毒力已经回复突变。3 株从河水中分离的毒株神经毒力已返祖。

自 1994 年起,我国国家脊髓灰质炎参考实验室开始对 AFP 病例中分离的疫苗株进行基因变异的检测,发现普遍存在基因变异现象,即关键位点的核苷酸突变和/或基因重组。对其中部分分离株在 PVR-Tg21 转基因小鼠中进行神经毒力测试,发现这些分离株的神经毒力已发生回复突变,并有证据表明,未服苗者或服苗次数少于 3 次者,或有免疫缺陷者感染该毒株后可导致麻痹。最近,我国报道,在江苏省发现曾有 I 型 VDPV 在自然界循环^[13]。此外,古巴、匈牙利、罗马、玻利维亚、巴西、哥伦比亚、墨西哥等国家和地区报道,在每次大规模 OPV 免疫后 3 个月内,在外环境及人群中可分离到 VDPV,但无证据表明,该 VDPV 是否能长期存在^[14,15]。

4. 疫苗免疫策略及其存在的问题:目前,全球消灭脊髓灰质炎主要是用 OPV 免疫,服苗者均有可能将活的疫苗株病毒排至外环境中。因此,即使在无脊髓灰质炎地区的污水和土壤中,也会存在大量疫苗株病毒,并在人群中传播。由于疫苗株易发生突变,因此具有潜在的致病性。严格地讲,消灭脊髓灰质炎不仅应消灭人群中脊髓灰质炎病毒,还应消灭环境中脊髓灰质炎病毒和 VDPV。但现行的脊髓灰质炎疫苗

预防策略不可能达到这一目标。因此,2000年世界卫生组织在日内瓦召开了关于在消灭脊髓灰质炎后期疫苗免疫策略研讨会,专家们提出:①应在消灭脊髓灰质炎后期的某一时间停止使用OPV;②在单一血清型脊髓灰质炎爆发时,应使用单价OPV,因单价OPV可产生快速的型特异性免疫,并可避免不必要的疫苗株病毒植入人群;③虽然目前全球已进入消灭脊髓灰质炎最后阶段,但仍需考虑研制新疫苗的问题,因现行OPV和脊髓灰质炎灭活疫苗(IPV)均来自野毒株,不符合生物安全性要求;OPV免疫后可产生疫苗衍生株,尤其是II型疫苗衍生株,并在人群中持续循环。因此,应该采用新的疫苗株取代现行的Sabin 2株^[16]。

为了真正实现全球消灭脊髓灰质炎,还应注意如下问题:①虽然世界卫生组织要求全球相关实验室妥善封存脊髓灰质炎病毒野毒株,但是神经毒力升高的VDPV仍能经常分离到,在一些医院和研究所保存的儿童大便标本中也可能含有脊髓灰质炎病毒,可能引起感染,因此,必须加强预防。②脊髓灰质炎病毒的存活力相对较强,在OPV疫苗免疫停止后,仍可在外环境中存活数周至数月。此后出生的婴儿有可能从环境中接触疫苗株病毒而发生感染。接种OPV的免疫缺陷患者可持续排出病毒^[1]。随着HIV感染率的升高,免疫缺陷患者人数增加,一旦他们不慎接种OPV疫苗,有可能持续排出有潜在致病性的脊髓灰质炎病毒达数十年之久。因此,当停止疫苗免疫后,在未服苗人群中有可能发生VAPP流行,值得引起注意。③脊髓灰质炎病毒的基因组结构已研究清楚。在全球消灭脊髓灰质炎后,即使销毁所有储存的脊髓灰质炎病毒株,根据现有的技术水平,仍可人工合成新的脊髓灰质炎病毒。恐怖主义者有可能用其作为生物武器,危害人类健康,对此必须保持高度警惕^[17]。

参 考 文 献

- 1 Strelbel PM, Sutter RW, Cochi SL, et al. Epidemiology of poliomyelitis in the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clin Infect Dis*, 1992, 14:568-579.
- 2 Friedrich F. Genomic modifications in Sabin vaccine strains isolated from vaccination-associated cases, healthy contacts and healthy vaccinees. *Acta Virol*, 1996, 40:157-170.
- 3 李杰, 米山彻夫, 张礼璧, 等. 中国脊髓灰质炎病毒疫苗株基因特征及其神经毒力的初步观察. *病毒学报*, 1997, 13:208-214.
- 4 Li J, Zhang LB, Yoneyama T, et al. Genetic basis of the neurovirulence of type 1 polioviruses isolated from vaccine-associated paralytic patients.

- Arch Virol, 1996, 141:1047-1054.
- 5 李杰, 张礼璧, 米山彻夫, 等. 中国脊髓灰质炎病毒疫苗株基因变异的分析. *病毒学报*, 1996, 12:291-298.
- 6 Shulman LM, Manor Y, Handsheer R, et al. Molecular and antigenic characterization of a highly evolved derivative of the type 2 oral poliovaccine strain isolated from sewage in Israel. *J Clin Microbiol*, 2000, 38:3729-3734.
- 7 Yoshida H, Horie H, Matsuura K, et al. Characterization of vaccine-derived polioviruses isolated from sewage and river water in Japan. *Lancet*, 2000, 356:1461-1463.
- 8 Rezapkin GV, Douthitt M, Dragunsky E, et al. Reevaluation of nucleotide sequences of wild-type and attenuated polioviruses of type 3. *Virus Res*, 1999, 65:111-119.
- 9 张礼璧, 李杰, 侯晓辉, 等. 我国急性弛缓性麻痹病例中脊髓灰质炎病毒的性状与分析. *中国计划免疫杂志*, 1999, 4:247-254.
- 10 Rezapkin GV, Fan L, Asher DM, et al. Mutations in Sabin 2 strain of poliovirus and stability of attenuation phenotype. *Virology*, 1999, 258:152-160.
- 11 Dorsant V, Weimer T, Schmeel A, et al. Increased safety level of serotype 3 Sabin oral poliomyelitis vaccine lots by improved seed virus, and tissue culture and virus infection conditions. *Vaccine*, 2000, 18:2435-2443.
- 12 Guillot S, Caro V, Cuervo N, et al. Natural genetic exchanges between vaccine and wild poliovirus strains in humans. *J Virol*, 2000, 74:8434-8443.
- 13 侯晓辉, 张礼璧, 冷红英, 等. 江苏省曾有I型脊髓灰质炎病毒在自然界中循环. *中国计划免疫杂志* 2001, 7:311-314.
- 14 Wood DJ, Sutter RW, Dowdle WR. Stopping poliovirus vaccination after eradication: issues and challenges. *Bull World Health Organ*, 2000, 78:347-357.
- 15 Lago PM, Caceres VM, Galindo MA, et al. Persistence of vaccine-derived poliovirus following a mass vaccination campaign in Cuba: implications for stopping polio vaccination after global eradication. *Int J Epidemiol* 2001, 30:1029-1034.
- 16 Rezapkin GV, Alexander W, Dragunsky E, et al. Genetic stability of Sabin 1 strain of poliovirus: implications for quality control of oral poliovirus vaccine. *Virology*, 1998, 245:183-187.
- 17 Levenbook I, Nomura T. Development of a neurovirulent testing system for oral poliovirus vaccine with transgenic mice. *Lab Anim Sci*, 1997, 47:118-120.

(收稿日期:2001-10-20)

(本文编辑:尹廉)