АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

СВЕРДЛОВСК · 1983

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

СВЕРДЛОВСК · 1983

УДК 576.85

Гетерогенность популяции микроорганизмов: [Сб. статей]. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Сборник посвящен изучению структуры бактериальной и вирусной популяций и закономерностей изменения их генетического состава в естественных условиях и в условиях эксперимента. Рассматриваются вопросы, касающиеся построения системы мониторинга природных бактериальных популяций, использования бактериальных тест-систем для контроля дисгенетических факторов окружающей среды, некоторые теоретические и прикладные аспекты изучения гетерогенности вирусных популяций, математическое моделирование динамики генетического состава и биометрический анализ взаимосвязи генетических маркеров отдельных клонов бактериальной и вирусной популяций. Использованы современные методы исследования: олигопептидное картирование, гель-хроматография, электронная микроскопия, математические методы.

Сборник предназначен для специалистов, изучающих вопросы популяционной генетики и экологии микроорганизмов.

Ответственные редакторы
В. Н. Большаков, Р. А. Пшеничнов, С. В. Колотвинов

© УНЦ АН СССР, 1983

Г $\frac{51003-1198}{055(02)7}$ 21—1983

БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПОПУЛЯЦИЯ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ • 1983

Ю. В. ПАШИН, Р. А. ПШЕНИЧНОВ

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ВЫБОРА МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ФАКТОРОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Успехи научно-технической революции в современном производстве и сельском хозяйстве нередко сопряжены с негативными моментами, в том числе с загрязнениями окружающей среды физическими, химическими и биологическими факторами, несвойственными естественной среде обитания микроорганизмов, растений, животных и человека. При этом выявлены потенциально-мутагенные вещества, способные проникать в клетки различных организмов и изменять молекулы ДНК, в связи с чем со всей остротой встали проблема роста гетерогенности популяций и значение атипичных форм организма в наследуемой патологии.

При известной схематизации различают три типа таких повреждений: 1) поражения, ограниченные индивидуальными генами (генные или точковые мутации); 2) более крупные повреждения, захватывающие определенные части или структуру хромосом (хромосомные мутации) и 3) изменения числа хромосом (геномные мутации). Между первым и вторым типами следует выделить малые делеции одного или нескольких генов, которые при использовании существующих методов трудно отличить от точковых мутаций. Практически все мутации у высших организмов и млекопитающих имеют отрицательные эффекты. С герминативными клетками они могут передаваться последующим поколениям. Если мутации возникают в соматических клетках, то возникает опасность индукции злокачественного роста, в эмбриогенезе они могут вести к нарушениям нормального роста, дифференцировки органов и тканей (тератогенезу).

Любая скрининговая программа, т. е. массовое исследование на мутагенную активность, в основном химических соединений, поскольку за радиационные источники в окружающей среде с самого начала их введения во всем мире принимались и принимаются определенные меры предосторожности и ограничения, преследует три основных задачи:

1) установить потенциальную генетическую активность (или неактивность) испытуемых соединений и, в случае позитивного ответа, выявить возможный объем популяций человека, а также животных, растений и микроорганизмов, которые могут подвергаться или подвергаются их воздействиям,— выявлению так называемых групп «повышенного риска»;

2) найти безопасное или менее мутагенное производное — ценное, но мутагенное вещество;

3) при отсутствии альтернативы необходимо выявить условия, при которых мутагенный потенциал испытуемого соединения уменьшается или исчезает (изменение pH среды, включение дополнительных радикалов и др.), а если и это невозможно, то определить ограничения использования.

Последнее лучше всего иллюстрируется на радиационных факторах, поскольку затормозить развитие ядерной энергетики, сопровождающееся накоплением жидких и газообразных радиоактивных отходов, невозможно, и наиболее реальным выходом является ограничение облучений и использование антимутагенов. Более подробно эти вопросы уже рассмотрены нами ранее [2].

В принципе современные скрининговые системы способны выявлять генные мутации, хромосомные повреждения и первичные повреждения ДНК, но число тестов в отдельности в настоящее время превышает 100, и выбор адекватных методик — часто нелегкая задача для исследователей.

Любое вновь синтезируемое или уже встречающееся в окружающей среде вещество должно быть испытано на ряде тестов, приведенных в таблице. Однако это требование, против которого теоретически никто не возражает, с точки зрения реально существующих условий пока не выполнимо, особенно в экспериментах на животных in vivo. Такое испытание только одного вещества, занимающее два — три года, стоит около 200 тыс. долларов США [9], что является своеобразным тормозом развития химической индустрии.

Минимальная программа скрининга на мутагенную активность должна включать, по крайней мере, несколько тестов, выявляющих как генные, так и хромосомные повреждения. По части индукции обратных мутаций на бактериях в условиях метаболической активации в нашей стране накоплен определенный опыт [5]. Имеются также данные и совершенствуются исследования по выявлению прямых генных мутаций в культивируемых клетках китайского хомячка, мышинной лимфомы in vitro [3, 10] и комплексного исследования на примере гексавалентного иона хрома в тестах in vitro по индукции генных мутаций у китайского хомячка, а также in vivo на индукцию доминантных леталей и хромосомных аберраций [4].

Следует отметить, что приоритетный метод метафазного анализа хромосом [1] пока остается трудоемким, требует высокой цитогенетической подготовки. Поэтому постоянно идет

Основные цели и возможности современных скрининговых исследований

Цель исследования и тип выявляемого повреждения	Тест или объект исследования
Выявление генных (точковых) мутаций (прямых, обратных или тех и др.)	Бактерии (*S. typhimurium*, *Escherichia coli*, *B. subtilis*) Грибки (*Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans*) Насекомые (чаще всего *D. melanogaster*, значительно реже *Habrobracon juglandia*, *Bombyx mori*) Клетки млекопитающих in vitro по локусам ГГФРТ, АФРТ и ТК
Хромосомные повреждения	Цитогенетические исследования in vitro и in vivo у человека и млекопитающих Микронуклеусный тест Индукция доминантных леталей у млекопитающих
Выявление первичных повреждений ДНК	Репарационные тесты у бактерий Репарация повреждений ДНК у млекопитающих Индукция сестринских хроматидных обменов

разработка и совершенствование автоматизированных методов хромосомного анализа, в частности, в клетках крови рабочих групп так называемого «повышенного риска».

В Институте общей генетики АН СССР получены первые результаты по использованию «микронуклеусного теста», предложенного Шмидом и Хэддлом [7, 11, 12]. Этот метод, хотя является непрямым тестом на индукцию хромосомных аберраций, менее трудоемок, дает результаты в большинстве случаев на 5-е сутки после обработки животного испытуемым соединением. Микронуклеусы формируются в цитоплазме или из ацентрических хроматид, хромосомных фрагментов или целых хромосом, потеря которых может быть результатом нарушения митотического деления вследствие обработки генетически активным веществом. По окончании телофазы микронуклеусы сохраняются в клетке в течение определенного времени и могут быть подсчитаны в интерфазе. Наиболее удобны для выявления индуцированных микронуклеусов молодые эритроциты костного мозга млекопитающих. Известно, что через несколько часов после завершения последнего митоза эритробласты выбрасывают свои ядра, однако при этом микронуклеусы сохраняются в цитоплазме, где их в энуклеированных клетках нетрудно обнаружить. Проведенная нами работа с гексавалентным ионом хрома позволила выявить наименьшую эффективную дозу для индукции микронуклеусов в костном мозге мыши по сравнению с работами других авторов [6], при этом она оказалась в 50 раз ниже и меньше пороговых доз, способных индуцировать доминантные летали и хромосомные аберрации у мыши in vivo.

По завершении испытаний на генетическую активность химических соединений с позитивным результатом возникает вопрос, какого типа первичное повреждение ДНК вызывает данное соединение или его метаболит. На этот вопрос в ряде случаев, к сожалению, не дают достаточно полный ответ результаты экспериментов на тестах, представленных в таблице (генные мутации у бактерий, репарационные тесты и индукция сестринских хроматидных обменов). Нам представляется перспективным прямой метод выявления модификаций ДНК путем фильтрации через нитроцеллюлозные фильтры [8]. В основе метода лежит инкубирование при различных условиях меченой H^3 двуцепочечной ковалентно связанной кольцевой ДНК фага PM2 с потенциально модифицирующим агентом-веществом, для которого в предварительных тестах была установлена мутагенная активность. Метод позволяет выявить повреждения: локальное денатурирование ДНК, межцепочечные сшивки, одно- или двухцепочечные разрывы; повреждения, способствующие увеличению скорости гидролиза фосфодиэфирных связей; повреждения, увеличивающие депуринизацию и др. Поиск и разработка подобных методов продолжается.

Таким образом, следует отметить, что хотя в настоящее время нет единой комплексной скрининговой тест-системы, но при испытании на мутагенную активность факторов окружающей среды необходимо использовать максимально возможное число тестов на индукцию как генных, так и хромосомных мутаций, и достоверные данные может дать только комплексное исследование.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бочков Н. П. Генетика человека. М.: ВИНИТИ, 1973, ч. I; 1975, ч. II.
2. Дубинин Н. П., Пашин Ю. В. Мутагенез и окружающая среда. М.: Наука, 1978. 128 с.
3. Пашин Ю. В., Бахитова Л. М. Индукция генных мутаций бенз(а)пиреном при метаболической активации.— Бюлл. экспериментальной биологии и медицины, 1981, № 9, с. 257—384.
4. Пашин Ю. В. Козаченко В. И., Зацепилова Т. А., Соболева Л. С. Комплексное испытание генетической активности 6-валентного иона хрома in vitro и in vivo.— Цитология и генетика, 1981, т. 15, № 5, с. 66—79.
5. Пшеничнов Р. А., Пашин Ю. В. Выявление и количественная оценка мутагенных факторов антропогенно меняющейся среды обитания на бактериальных тест-системах.— Экология, 1981, № 6, с. 72—81.
6. Fabry L. Relation entre l'induction de micronoyaux dans les cellules de la moelle par les sels de chrome et leur pouvoir cancerigène.— C. r. séances Soc. Biol., 1980, vol. 174, N 5, p. 889—892.
7. Heddle J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage.— Mutation Res., 1973, vol. 18, p. 187—190.
8. Kuhnlein U., Tsang S. S., Edwards J. Characterization of DNA damages by filtration through nitrocellulose filters: a simple probe for DNA-modifying agents.— Mutation Res., 1979, vol. 64, N 3, p. 167—182.

9. M a u g h T. H. Chemicals: How many are there?— Science, 1978, vol. 199, p. 162.
10. P a s c h i n Y. V. Mutagenicity of maleic acid hydrazide for the TK locus of mouse lymphoma cells.— Mutation Res., 1981, vol. 91, p. 359—362.
11. S c h m i d t W. Chemical mutagen testing on in vivo somatic mammalian cells.— Agents Actions, 1973, vol. 3, p. 77—85.
12. S c h m i d t W. The micronucleus test.— Mutation Res., 1975, vol. 31, p. 9—15.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ 1983

Ю. Н. МАСЛОВ, З. Л. ПАРАМОНОВА

ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ. СООБЩЕНИЕ I. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ОТКРЫТЫХ ЕСТЕСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ

Одно из самых серьезных последствий загрязнений окружающей среды — необратимые изменения в наследственной информации живых организмов, вызванные загрязнением биосферы мутагенами — веществами, поражающими наследственные структуры. «Мы вступили в эпоху индуцированного мутагенеза, действующего практически повсеместно на генетическую информацию почти всех видов, включая человека» [7, с. 18].

Отсюда вытекает важная задача — прогнозирование генетических последствий загрязнения окружающей среды. Одним из двух основных направлений в решении этой задачи является создание системы мониторинга генофонда популяций, т. е. слежение за темпами мутационного процесса и накоплением генетического груза в популяциях. В первую очередь необходим мониторинг генофонда человеческих популяций. Однако аналогичные процессы происходят и в популяциях других организмов, а выявить изменения в структуре их генофонда иногда легче, чем в популяциях человека. Так зародилась идея создания системы мониторинга генофонда природных бактериальных популяций. В качестве объекта изучения выбрана кишечная палочка *Escherichia coli*. Более подробно обоснование мониторинга бактериальных популяций и выбор объекта изучения описывались нами ранее [4].

Мониторинг генофонда природных популяций кишечной палочки предусматривает в первую очередь изучение исходной гетерогенности популяций, чтобы в дальнейшем можно было фиксировать отклонение от этой исходной, фоновой гетерогенности по каждому из изучаемых признаков. Поэтому целесообразно было начать работу с изучения гетерогенности популяции, находящейся в условиях минимального воздействия мутагенных факторов. Подходящим для этого объектом являлась, на наш взгляд, популяция кишечной палочки, обитающая в чистой речной воде.

В качестве источника для выделения клонов была выбрана р. Сылва (Кунгурский район Пермской обл.). Выделение клонов кишечной палочки проводилось методом мембранных фильтров по методике, описанной в ГОСТе 18963-73 «Вода питьевая». Видовая идентификация клонов кишечной палочки осуществлялась с применением оксидазной пробы, а также тестов, входящих в так называемую формулу ТИМАЦ [5]. Нами для изучения было отобрано 50 клонов.

Принципиальным являлся вопрос о выборе изучаемых маркеров генофонда. На наш взгляд, необходимо было изучить признаки, которые характеризовали бы способность бактерий утилизировать различные органические субстраты, быстроту накопления биомассы, устойчивость к действию различных бактерицидных факторов, способность угнетать рост других микроорганизмов и противостоять аналогичному воздействию с их стороны. Другими словами, целесообразным представлялось изучение признаков, играющих большую роль в экологической пластичности микроба, способствующих его выживанию и распространению в изменяющейся среде обитания.

Нами изучались биохимическая активность, чувствительность к антибиотикам, характер питательной зависимости, антагонистическая активность, чувствительность к ультрафиолетовому излучению, динамика роста на плотных и жидких питательных средах, чувствительность к активному хлору, резистентность к действию колицинов.

Биохимическая активность в отношении 11 углеводов (лактоза, глюкоза, мальтоза, сахароза, рамноза, ксилоза, арабиноза, маннит, сорбит, дульцит, инозит) изучалась путем посева на жидкие среды Гисса [1].

Чувствительность к антибиотикам изучалась методом диффузии в агар с использованием стандартных бумажных дисков [1] со следующими антибиотиками: пенициллином, новобиоцином, эритромицином, полимиксином М, тетрациклином, левомицетином, стрептомицином, канамицином, мономицином и неомицином.

Характер питательной зависимости клонов от отдельных аминокислот, витаминов и нуклеотидов устанавливали путем посева на среды Холидея [6].

Антагонистическую активность определяли методом поперечных штрихов [3] по отношению к семи штаммам патогенных микроорганизмов: *Shigella Sonnei* № 177б; *Shigella Flexneri* № 170; *Shigella Flexneri* № 337; *Proteus vulgaris*; *Proteus mirabilis*; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli* 0—26.

О чувствительности к ультрафиолетовому излучению судили по количеству клеток, выживших после облучения дозированных засевов на чашках Петри ультрафиолетовыми лучами с длиной волны 253,7 нм в дозах 75, 100 и 125 эрг/см^2.

При изучении динамики роста использовались полноценные

мясопептонные и минимальные глюкозо-солевые среды (как плотные, так и жидкие).

О скорости роста на плотных питательных средах судили по диаметру колоний после 72 ч инкубации при 37 °С.

Для изучения динамики роста на жидких питательных средах дозированный засев исследуемых клонов во флаконы с 200 мл среды инкубировали при 37 °С, производя ежечасный отбор проб для нефелометрии на ФЭК-56М при длине волны 630 нм [3]. Время одной генерации определяли с помощью соответствующих формул [2].

Чувствительность клонов к действию активного хлора определяли путем подсчета выживших клеток после 30-минутного контакта бактериальной культуры с различными дозами активного хлора в водной среде, чувствительность к колицинам — методом отсроченного антагонизма [1] с использованием стандартных колициногенных штаммов, продуцирующих колицины V, B, D, E+1, F, J, K.

Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали широкую внутрипопуляционную неоднородность клонов кишечной палочки по всем изучаемым признакам. Даже при изучении такого стабильного признака, играющего большую роль в таксономии бактерий, как сахаролитическая активность, выявлено восемь клонов, утративших способность утилизировать арабинозу или ксилозу. Однако присутствие в популяции определенной доли атипичных особей — обычное и закономерное явление, так как это повышает пластичность популяции.

При изучении питательной зависимости найден один ауксотрофный клон, нуждающийся в метионине.

Изучение чувствительности к антибиотикам показало, что каждому клону присущ свой особый спектр чувствительности к различным антибиотикам: четыре клона были чувствительны ко всем антибиотикам, и в то же время два клона резистентны к шести и семи антибиотикам соответственно. Если же анализировать чувствительность к каждому из антибиотиков (см. табл. 1, сообщение II), то можно сказать, что наиболее часто применяемые антибиотики характеризовались большим количеством резистентных к ним клонов и низким уровнем чувствительности (диаметр зоны угнетения роста в пределах 13—15 мм), в то время как для антибиотиков группы аминогликозидов (стрептомицин, мономицин, канамицин, неомицин) было типично малое количество резистентных клонов и самый большой диаметр зон угнетения роста.

Средний диаметр колоний на мясопептонном агаре составил 7,3±0,2 мм, а на агаризованной глюкозо-солевой среде М-9 — 4,6±0,2 мм.

При изучении динамики роста на жидкой полноценной среде были получены следующие средние результаты: время одной генерации 32,0±1,2 мин, время достижения стационарной фазы роста 13 ч, максимальная плотность культуры 0,65±0,089 ед. оптической плотности. На глюкозо-солевой среде М-9 эти средние показатели составили соответственно 58,0±0,7 мин, 7 ч, 1,49±0,06 ед. оптической плотности.

Половина клонов обладала умеренной антагонистической активностью, преимущественно по отношению к штаммам шигелл — природных спутников и конкурентов кишечной палочки. У остальных клонов антагонистическая активность не выявлялась.

Результаты, полученные при изучении устойчивости клонов к действию активного хлора и ультрафиолетового излучения, свидетельствовали о сравнительно широкой внутрипопуляционной гетерогенности по данным признакам (см. табл. 2, сообщение II).

Изучаемые клоны обладали умеренной чувствительностью к действию всех используемых стандартных колицинов.

Таким образом, проведенные исследования, показав наличие и структуру внутрипопуляционной гетерогенности клонов кишечной палочки, легли в основу последующих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина, 1978, с. 352—365.

2. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике/Перев. с англ. М.: Мир, 1976, с. 28—30.

3. Практикум по микробиологии/Под ред. Н. С. Егорова. М.: Изд-во МГУ, 1976, с. 267—270.

4. Пшеничнов Р. А., Маслов Ю. Н. Мониторинг природных бактериальных популяций как способ контроля дисгенетического воздействия загрязнений окружающей среды.— В сб.: Актуальные вопросы охраны атмосферного воздуха в районах химических и нефтехимических предприятий. Пермь, 1979, с. 88—92.

5. Санитарная микробиология/Под ред. Г. П. Калины, Г. Н. Чистовича. М.: Медицина, 1969.

6. Сборник методик по генетике микроорганизмов/Под ред. Р. Клауса, У. Хейса. М.: Медицина, 1970, с. 203, 238—240.

7. Хильчевская Р. И. Генетические проблемы загрязнения окружающей среды.— Ж. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1979, т. 24, № 1, с. 18—25.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ · 1983

Ю. Н. МАСЛОВ

ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ. СООБЩЕНИЕ II. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПРИРОДНОЙ ПОПУЛЯЦИИ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ, ВЫДЕЛЕННОЙ ИЗ ПРОМЫШЛЕННЫХ СТОКОВ С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ХИМИЧЕСКИХ МУТАГЕНОВ

Мониторингом принято называть систему повторных наблюдений одного или более элементов окружающей среды в пространстве и времени с определенными целями в соответствии с заранее подготовленной программой. Исходя из этого определения, уже на первом этапе биологического мониторинга, т. е. при изучении исходной гетерогенности природных популяций, необходимы наблюдения «в пространстве». Другими словами, исследованиями должны быть охвачены популяции, обитающие в различных условиях. Так как мониторинг предназначен для слежения за изменениями в состоянии биосферы под влиянием человеческой деятельности, то необходимо наряду с исследованием популяций, обитающих в естественных условиях, изучать популяции, существующие в экстремальных условиях (повышенный уровень радиации, высокое содержание химических мутагенов и др.), которые возникают вследствие деятельности человека.

Кроме того, изучение популяций, обитающих в экстремальных условиях, необходимо для проверки эффективности системы мониторинга генофонда бактериальных популяций как индикатора генетических последствий загрязнения окружающей среды. Можно предположить, что в популяции кишечной палочки, обитающей в среде с повышенным содержанием химических мутагенов, чаще, нежели в популяции, существующей в незагрязненной среде, должны встречаться клоны, имеющие различные генетические дефекты.

Поэтому было решено изучить популяцию кишечной палочки, обитающую в сточных водах производственного объединения «Пермнефтеоргсинтез», которые до очистки содержат значительное количество органических веществ, относящихся к различным рядам и группам соединений.

Выделение и идентификацию клонов кишечной палочки осу-

ществляли по описанным в предыдущем сообщении методикам. Для изучения было отобрано 50 идентифицированных клонов, у которых изучали те же признаки, что и у клонов, выделенных из речной воды с использованием указанных выше методик.

Результаты и их обсуждение

Выделению и изучению клонов кишечной палочки из промышленных сточных вод предшествовало изучение мутагенной активности таких вод с использованием микробных тест-штаммов Эймса. Этот фрагмент исследований представлялся необходимым. Проведенные эксперименты показали, что концентраты сточных вод объединения «Пермнефтеоргсинтез» вызывают достоверное повышение частоты мутаций у индикаторных штаммов в три-четыре раза по сравнению со спонтанным фоном. Поэтому стало возможным говорить о том, что клоны кишечной палочки, выделенные из промышленных стоков, действительно обитали в среде, оказывающей на них мутагенное воздействие.

Под воздействием мутагенных факторов в первую очередь должны изменяться признаки, фенотипическое выражение которых зависит от функционирования сцепленных групп генов, так как вероятность повреждения генов мутагенами в данном случае выше по сравнению с признаками, детерминированными одним геном.

При изучении таких признаков, как биохимическая активность и питательная зависимость, не было выявлено существенных различий с клонами, выделенными из речной воды. Ауксотрофные клоны отсутствовали, имелось 10 дефектных по утилизации сахаров клонов.

В противоположность этому изучение динамики роста на питательных средах выявило существенное различие изучаемых клонов с изученными ранее клонами из речной воды. Средний диаметр колоний на плотных питательных средах у исследуемых клонов оказался ниже, чем у клонов из речной воды, и составлял на полноценном агаре 6,5±0,1, а на минимальном агаре 4,5±0,1 мм.

Изучение динамики роста на жидких питательных средах также показало, что исследуемые клоны имели меньшую скорость роста по сравнению с клонами из речной воды. Хотя они и имели несколько меньшее время одной генерации (28,0±±0,6 мин на полноценной и 35,2±0,8 мин на минимальной средах), но медленнее достигали стационарной фазы роста (к 20-му на полноценной среде и к 9-му — на минимальной среде М-9).

Исследование антибиотикочувствительности показало, что в этой популяции сохраняются закономерности, выявленные при изучении речной популяции (табл. 1). Наиболее часто встреча-

Таблица 1

Результаты изучения чувствительности клонов кишечной палочки к антибиотикам

Антибиотик	Клоны из речной воды		Клоны из промышленных сточных вод	
	Средний диаметр зоны угнетения роста, мм	Колич. резистентных клонов	Средний диаметр зоны угнетения роста, мм	Колич. резистентных клонов
Пенициллин	13,3±0,7	45	12,5±0,6	40
Новобиоцин	13,5±1,1	46	11,5±0,5	47
Эритромицин	13,6±0,6	20	13,1±0,3	10
Тетрациклин	22,0±0,5	10	20,8±0,4	10
Полимиксин М	15,3±0,4	5	14,6±0,4	2
Левомицетин	21,1±0,6	5	21,0±0,02	2
Стрептомицин	20,8±0,4	2	21,1±0,3	1
Канамицин	22,4±0,3	2	22,2±0,2	1
Мономицин	19,8±0,3	2	20,1±0,3	1
Неомицин	18,3±0,4	1	17,3±0,3	1

Таблица 2

Результаты изучения чувствительности клонов кишечной палочки к действию бактерицидных факторов (ультрафиолетового излучения и активного хлора)

Источник клонов	Процент выживших клеток	Дозы ультрафиолетового излучения, эрг/см²		
		75	100	125
Речная вода	Средний	4,72±0,67	2,16±0,37	0,95±0,19
	Максимальный	25,3	10,4	4,9
	Минимальный	0,03	0	0
Промышленные стоки	Средний	11,04±1,81	2,91±0,64	0,53±0,16
	Максимальный	49,5	18,4	7,3
	Минимальный	0,02	0	0

Источник клонов	Процент выживших клеток	Дозы активного хлора, мкг		
		43,31	8,66	1,73
Речная вода	Средний	0,49±0,15	72,30±4,94	85,54±2,87
	Максимальный	4,4	100	100
	Минимальный	0	0,7	24,1
Промышленные стоки	Средний	0,71±0,19	71,61±3,81	92,70±2,50
	Максимальный	5,4	100	100
	Минимальный	0	20,9	23,8

лась резистентность к пенициллину, новобиоцину, эритромицину, тетрациклину, однако количество резистентных клонов было ниже, чем в речной популяции. Средний уровень чувствительности к каждому из антибиотиков не отличался от такового для клонов из речной воды.

Антагонистической активностью не обладали 44 клона, а у остальных шести отмечалась лишь низкая антагонистическая активность в отношении шигелл.

Поскольку антагонистическая активность и резистентность к антибиотикам детерминируются внехромосомными факторами наследственности — плазмидами, то можно сделать вывод, что зараженность плазмидами популяции, обитающей в сточных водах, ниже, чем в популяции, обитающей в речной воде. Возможно, находящиеся в сточных водах органические вещества могут воздействовать на генетический аппарат бактерий двойным образом: помимо прямого мутагенного воздействия, вызывать элиминацию плазмидных факторов наследственности.

Изучение чувствительности к действию бактерицидных факторов (ультрафиолетового излучения и активного хлора) показало наличие широкой внутрипопуляционной неоднородности по этим признакам при отсутствии существенных различий с клонами из речной воды (табл. 2).

Чувствительность к колицинам оказалась существенно ниже, чем у клонов из речной воды: 11 клонов были резистентны ко всем испытываемым колицинам, 10 клонов были чувствительны лишь к одному колицину и только два клона — ко всем семи колицинам. Возможно, длительное воздействие органических соединений вызвало изменение структуры рецепторов на поверхности бактериальной клетки, в результате чего колицины потеряли возможность адсорбироваться на поверхности бактериальной клетки и угнетать ее рост.

Таким образом, наличие в среде обитания антропогенных химических мутагенов оказывает существенное влияние на различные генотипические свойства кишечной палочки, вызывая тем самым определенные сдвиги в структуре генофонда бактериальной популяции. Следовательно, наблюдения за структурой генофонда природных бактериальных популяций позволяют регистрировать мутационные процессы, происходящие в популяции под влиянием антропогенных факторов, и можно надеяться, что расширение и углубление этих исследований позволит создать эффективную систему слежения за генетическими последствиями загрязнения окружающей среды.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ 1983

Р. А. ПШЕНИЧНОВ, С. В. КОЛОТВИНОВ

ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПРИРОДНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ. СООБЩЕНИЕ III. БИОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОСВЯЗИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

«Пространственный» этап построения системы биологического мониторинга предполагает изучение исходной гетерогенности природных популяций, обитающих в природных условиях. Однако исследования, проводимые в этом направлении, имеют своей целью не только изучение генетических признаков, но и анализ структуры взаимосвязей внутри комплекса признаков, отделение существенных связей от несущественных. Использование различных методов анализа многофакторных связей позволяет провести такую работу при условии выбора метода, наиболее соответствующего специфике исследования.

Целью нашего исследования являлось испытание избранного метода анализа, определение различий в структуре взаимосвязей генетических признаков природных популяций кишечной палочки и использование полученных данных для выявления наиболее лабильных («индикаторных») признаков и связей, а в дальнейшем и для построения системы генетического мониторинга бактериальной популяции.

Материалы и методы

Проведено изучение некоторых генетических признаков на материале двух групп клонов кишечной палочки, выделенных из чистой проточной воды (I группа клонов) и из воды с высоким содержанием мутагенов (II группа клонов)[1]. Биометрический анализ полученных данных проводили, используя метод корреляционных плеяд [1—3], являющийся одним из методов анализа многофакторных связей и позволяющий определить структуру взаимосвязей внутри любого комплекса признаков.

Для анализа были взяты следующие признаки: 1 — количе-

[1] См. сообщения I и II в наст. сборнике.

ство антибиотиков, к которым выявлена резистентность; 2, 3, 4 — время одной генерации, максимальная плотность культуры, время достижения максимальной плотности при культивировании на полноценных питательных средах (МПА, МПБ); 5, 6, 7 — то же, что и 2, 3, 4, но при культивировании на минимальной среде (М-9); 8, 9 — диаметр колоний через 72 ч после посева на МПА и среду М-9; 10, 11, 12 — антагонистическая активность по отношению к шигеллам Зонне и Флекснера (тестерные штаммы № 170 и 337); 13, 14, 15 — чувствительность к ультрафиолетовому облучению (75, 100 и 125 эрг/см^2); 16, 17, 18 — чувствительность к активному хлору (три дозы); 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 — резистентность к пенициллину, новобиоцину, стрептомицину, канамицину, неомицину, левомицетину, тетрациклину, эритромицину, полимиксину М; 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 — величина колоний колициногенных штаммов; 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 — чувствительность к колицинам B, D, E+1, F, J, K, V.

Последовательность выделения плеяд заключалась в следующем. Вычисляли попарные коэффициенты корреляции между генетическими признаками внутри каждой группы клонов[2]. Число связей при этом было равно $N(N-1)/2$, где N — число признаков. Коэффициенты корреляции выводили на печать в виде матрицы взаимосвязей, в которой они располагались в соответствии с абсолютным значением (от +1,0 к —1,0). При выделении плеяд принимали во внимание лишь достоверные связи ($r : m_r \not< 2{,}0$). Коэффициенты корреляции, достоверность которых была доказана, принимали за варианты и сводили в вариационные ряды (I и II группы клонов соответственно), разбитые на классы по величине коэффициента корреляции. Затем строили кривые распределения частот модулей коэффициентов корреляции.

Следующим этапом биометрического анализа являлось определение структуры взаимосвязей между генетическими признаками исследуемых клонов и выделение групп признаков, связанных вместе на определенном корреляционном уровне, т. е. корреляционных плеяд. Для этого строили «корреляционное кольцо», располагая генетические признаки по окружности и соединяя их линиями (хордами), если между ними имеется связь. Разумеется, на нулевом уровне всегда будут связаны между собой практически все изучаемые признаки. Поэтому в соответствии со способом подвижного уровня [3] была введена третья координата, перпендикулярная плоскости корреляционного кольца и градуированная нарастающей снизу вверх абсолютной величиной коэффициента корреляции. Такой «корреляционный цилиндр» рассекался на разных уровнях (например,

---

[2] Расчеты выполнены на ЭВМ «Наири-К» с использованием стандартной программы.

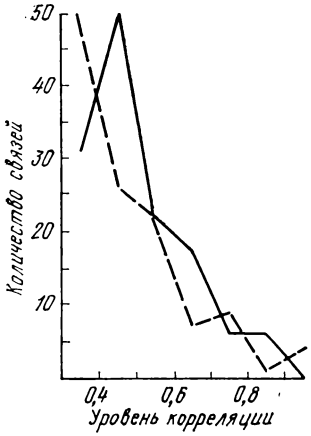


Рис. 1. Распределение коэффициентов корреляции.
Сплошная линия — I, *штриховая* — II группа клонов.

$r \geqslant 0{,}4$; $r \geqslant 0{,}5$ и т. д.) и каждое сечение представляло собой корреляционное кольцо.

Результаты и их обсуждение

Сравнение полученных кривых распределения частот модулей коэффициентов корреляции (рис. 1) позволяет сделать заключение о существовании определенных различий в корреляционных взаимоотношениях между признаками внутри каждой из исследуемых групп бактериальных клонов (о чем свидетельствует изломанность одной из кривых по отношению к другой) и, следовательно, о существовании различий в генетической структуре популяций *E. coli*, выделенных из чистой проточной воды и промышленных стоков.

Построение корреляционных колец начато с уровня $|r| \geqslant 0{,}4$, так как на более низких (и на более высоких — для обратных связей) уровнях располагалось огромное количество связей (больше 1000), которые в подавляющем количестве были статистически недостоверными. Уже на этом уровне определялись явные различия в генетической структуре I и II групп клонов, однако взаимосвязей было слишком много для того, чтобы легко ориентироваться в них (рис. 2 и 3). Поэтому выделение корреляционных плеяд проводили начиная с уровня $|r| \geqslant 0{,}5$, ориентируясь на соответствующее сечение корреляционного цилиндра (рис. 4 и 5). Каждая из выделенных плеяд была «развернута» на отдельном чертеже, избегая по возможности перекреста линий (рис. 6 и 7). При этом определяли внутреннюю структуру плеяд, давая материал для сравнительного анализа.

Сравнивая общую структуру взаимосвязей между генетическими признаками природных популяций кишечной палочки и структуру корреляционных плеяд внутри каждой изучаемой группы клонов, следует отметить, что наряду с общими чертами, присущими этим клонам в силу принадлежности к одному биологическому виду, определены и значительные различия, являющиеся показателем экобиотической дивергенции.

Так, на корреляционном уровне $|r| \geqslant 0{,}5$ наряду с существованием плеяд сходного состава (антагонистическая активность по отношению к некоторым шигеллам, резистентность к некоторым антибиотикам, чувствительность к колицинам и др.), сходных межплеядных связей (плеяда устойчивости к УФО — плеяда чувствительности к колицинам) между клонами, при-

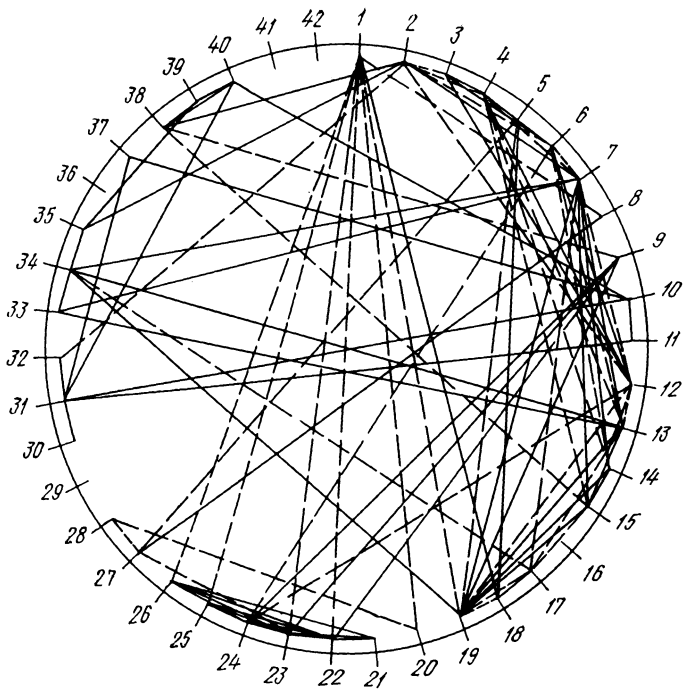


Рис. 2. I группа клонов. Корреляционное кольцо на уровне $r \geqslant 0{,}4$.

Сплошная линия — прямая связь; *штриховая* — обратная связь.

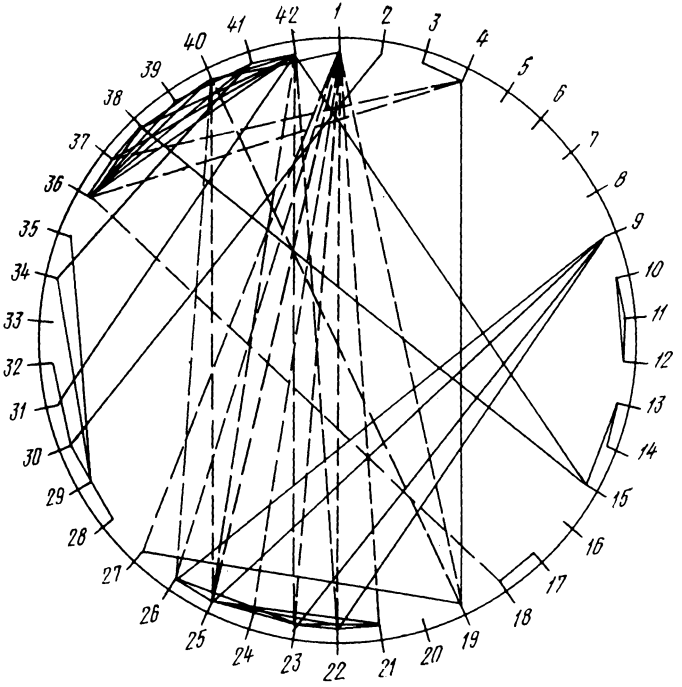


Рис. 3. II группа клонов. Корреляционное кольцо на уровне $r \geqslant 0{,}4$.

Обозначения те же, что на рис. 2.

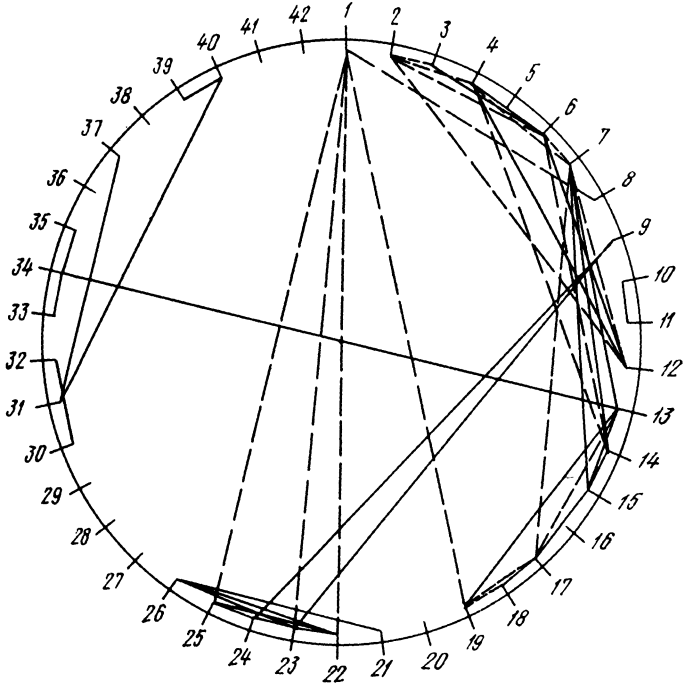


Рис. 4. I группа клонов. Корреляционное кольцо на уровне $r \geqslant 0{,}5$.

Обозначения те же, что на рис. 2.

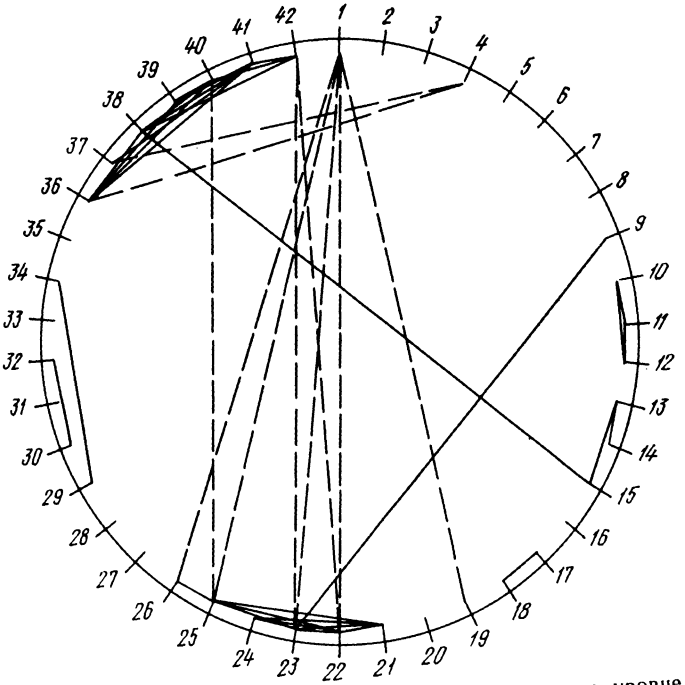
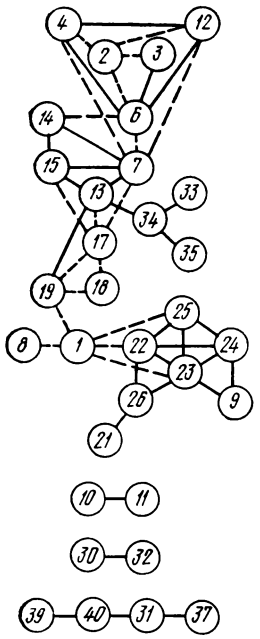


Рис. 5. II группа клонов. Корреляционное кольцо на уровне $r \geqslant 0{,}5$.

Обозначения те же, что на рис. 2.



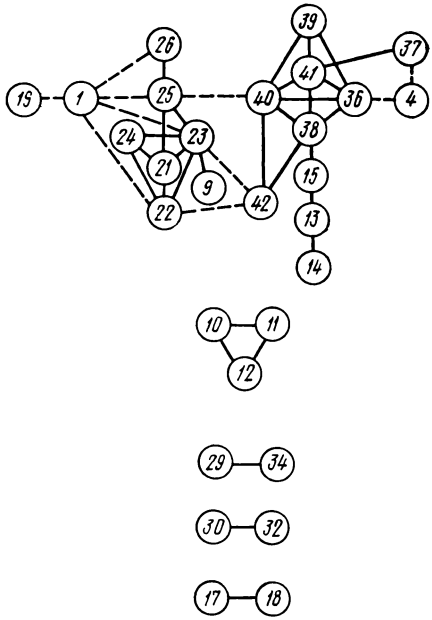


Рис. 6. I группа клонов. Структура корреляционных плеяд на уровне $r \geqslant 0{,}5$.

Рис. 7. II группа клонов. Структура корреляционных плеяд на уровне $r \geqslant 0{,}5$. Обозначения те же, что на рис. 2.

надлежащими к I и II группам, выявляется четкое основное различие: у клонов II группы отсутствуют связи между признаками, которые характеризуют репродукционные свойства (время одной генерации, максимальная плотность культуры, время достижения максимальной плотности). В I группе клонов эти признаки связаны как между собой, так и с рядом других плеяд. Следует также отметить наличие у II группы клонов связей между плеядами резистентности к антибиотикам и чувствительности к колицинам (на уровнях $|r| \geqslant 0{,}4$ и 0,5), при отсутствии таких связей у клонов I группы. Возможно, этот факт указывает на своеобразную «мобилизацию» факторов резистентности у клонов II группы, выделенных из промышленных стоков и вынужденных приспособиться к существованию в среде с высоким содержанием биологически активных веществ. Внутренняя структура плеяд, система взаимосвязей между признаками, составляющих плеяды, также существенно отличаются у клонов I и II групп.

На следующем уровне $|r| \geqslant 0{,}6$ (рис. 8—11) из-за выпадения части связей картина становится более простой, но в то же время сохраняются закономерности, выявленные на предыдущем уровне: у клонов I группы четко выявляется плеяда при-

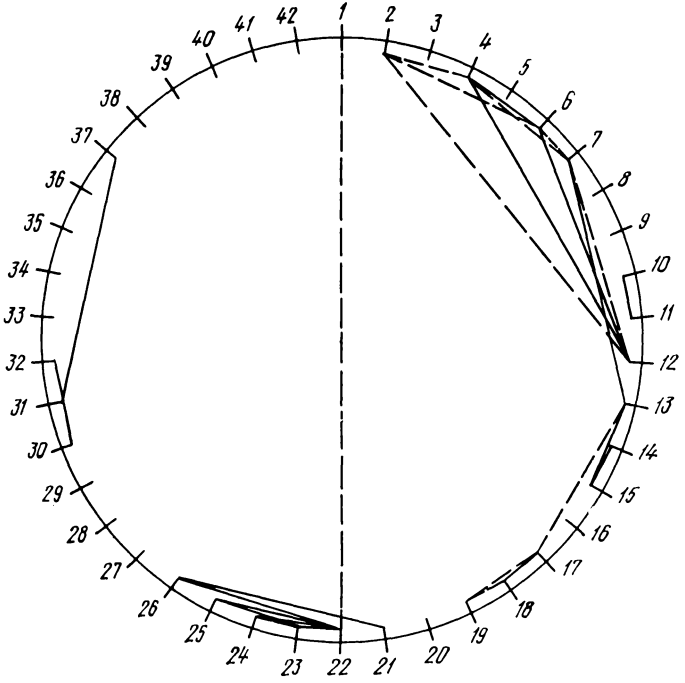


Рис. 8. I группа клонов. Корреляционное кольцо на уровне $r \geqslant 0{,}6$.

Обозначения те же, что на рис. 2.

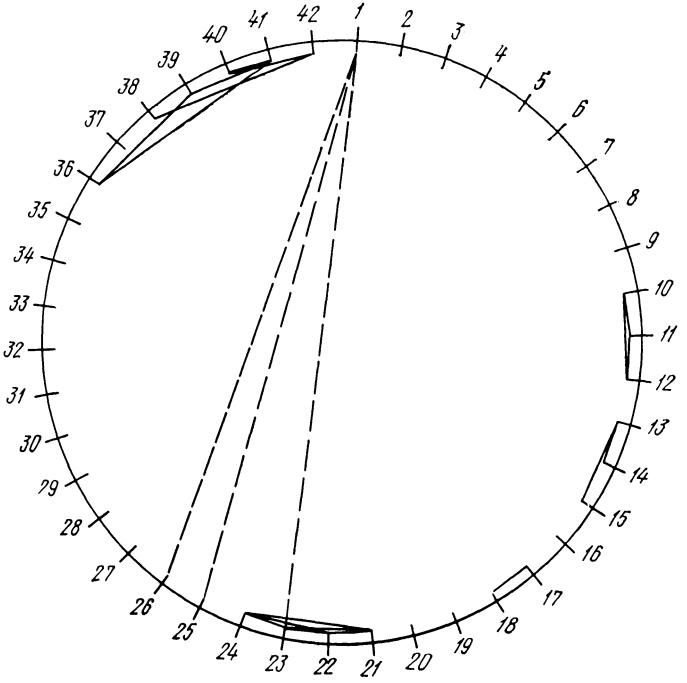
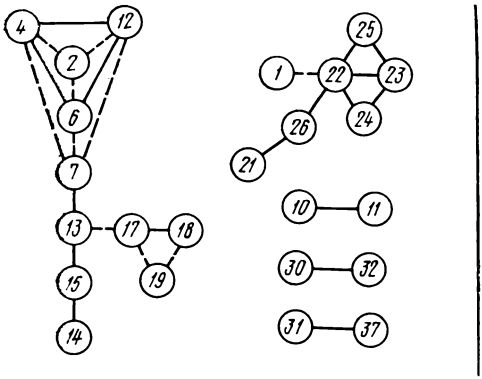


Рис. 9. II группа клонов. Корреляционное кольцо на уровне $r \geqslant 0{,}6$.

Обозначения те же, что на рис. 2.



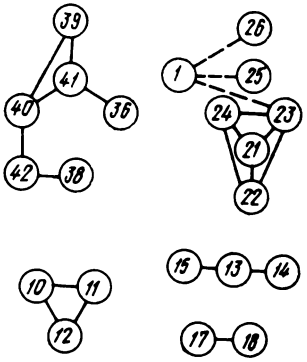


Рис. 10. I группа клонов. Структура корреляционных плеяд на уровне $r \geqslant 0{,}6$. Обозначения те же, что на рис. 2.

Рис. 11. II группа клонов. Структура корреляционных плеяд на уровне $r \geqslant 0{,}6$. Обозначения те же, что на рис. 2.

знаков, характеризующих репродукционные свойства (2—4—6—7), связанной с антагонистическими свойствами (12), с плеядой устойчивости к УФО (13—15—14), а через последнюю — с плеядой, характеризующей устойчивость к активному хлору (17—18). Во II группе клонов на данном уровне выявлены не связанные между собой плеяды, характеризующие устойчивость к УФО (14—13—15), антагонистическую активность (10—11—12), устойчивость к активному хлору (17—18), антибиотикорезистентность (21—22—23—24) и чувствительность к колицинам (36—41—39—40—42—38). Интересно, что и у I, и у II группы клонов плеяды, характеризующие антибиотикорезистентность, имеют одинаковое «ядро» из связанных между собой признаков, отражающих устойчивость к группе антибиотиков-аминогликозидов: мономицину (22), канамицину (23) и неомицину (24). Возможно, этот факт свидетельствует о том, что за продукцию фермента, обеспечивающего устойчивость бактерий к названной группе антибиотиков, отвечает одна и та же генетическая структура (плазмида). Интересно также и то, что признак устойчивости к пенициллину (19) у I группы клонов обнаруживает связь с устойчивостью к хлору, а на предыдущих уровнях — и с устойчивостью к УФО и с признаками, характеризующими репродукционные свойства (5, 7, 8, 9). Объяснить эту связь однозначно не представляется возможным (физическая интеграция плазмиды, отвечающей за синтез пенициллиназы, в геном клетки? функциональная интеграция с участками генома, контролирующими различные биохимические функции?).

Следующий уровень — $|r| \geqslant 0{,}7$. И опять у клонов II группы выявляются плеяды, характеризующие антагонистическую активность, устойчивость к УФО, антибиотикам, колицинам, при

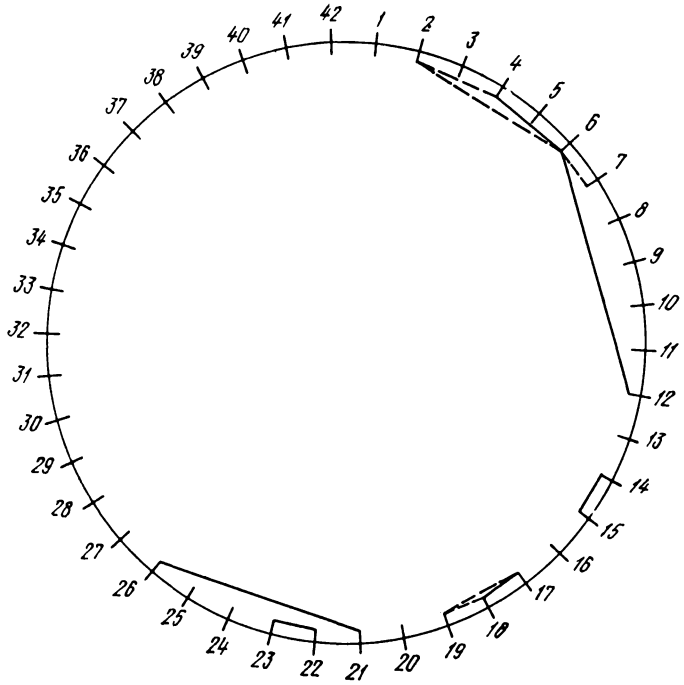


Рис. 12. I группа клонов. Корреляционное кольцо на уровне $r \geqslant 0{,}7$.

Обозначения те же, что на рис. 2.

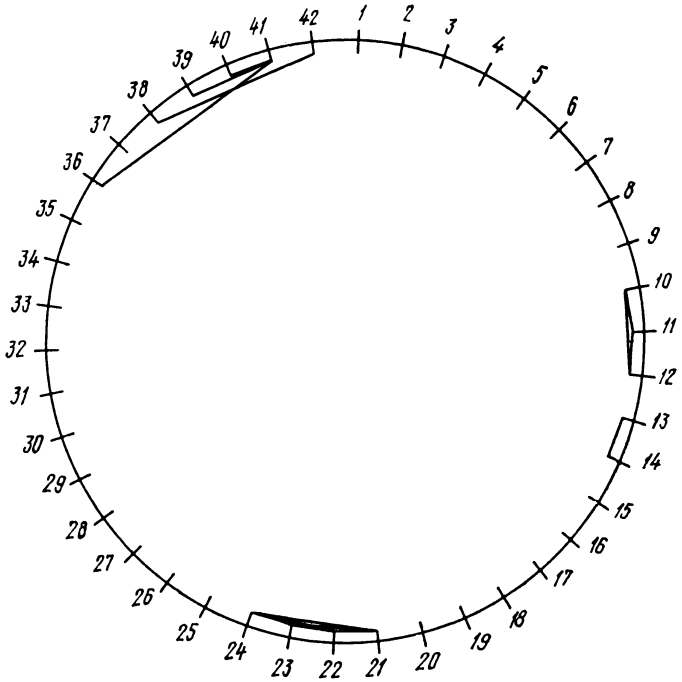
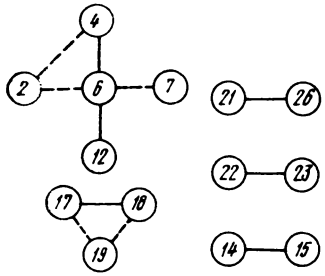


Рис. 13. II группа клонов. Корреляционное кольцо на уровне $r \geqslant 0{,}7$.

Обозначения те же, что на рис. 2.



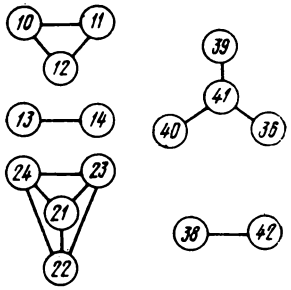


Рис. 14. I группа клонов. Структура корреляционных плеяд на уровне $r \geqslant 0{,}7$. Обозначения те же, что на рис. 2.

Рис. 15. II группа клонов. Структура корреляционных плеяд на уровне $r \geqslant 0{,}7$. Обозначения те же, что на рис. 2.

отсутствии взаимосвязей между признаками репродукционных свойств, которые выявляются у I группы. Структура плеяд, характеризующих резистентность к различным физическим и химическим факторам, у клонов I и II группы также различается (рис. 12—15).

В целом результаты биометрического анализа свидетельствуют о большей независимости отдельных комплексов генетических признаков (корреляционных плеяд) в популяции кишечной палочки, выделенной из промышленных стоков, по сравнению с популяцией, выделенной из чистой проточной воды. Этот факт указывает на выраженную функциональную интеграцию участков генома у клонов, выделенных из чистой проточной воды, и на повышение относительной роли внутренних факторов развития у группы клонов, выделенных из промышленных стоков, в результате чего эти клоны становятся менее зависимыми по отношению к действию факторов внешней среды.

Несмотря на определенные недостатки (трудность интерпретации внутренней структуры плеяд), применение метода корреляционных плеяд, несомненно, полезное при анализе различий в генетической структуре бактериальных популяций, может оказаться полезным и при определении признаков — «индикаторов» бактериальных тест-систем, используемых для контроля дисгенетических факторов окружающей среды. В качестве таких индикаторов могут служить признаки, связанные с репродукционными особенностями бактерий. При этом необходимо ориентироваться на признаки, контролируемые одним геном.

ЛИТЕРАТУРА

1. Терентьев П. В. Изменчивость раковины *Limnae stagnalis* L.— Русский гидробиол. ж., 1928, т. 7, № 3/4, с. 81—86.

2. Терентьев П. В. Метод корреляционных плеяд.— Вестн. ЛГУ. Сер. биол., 1959, вып. 2, № 9, с. 137—141.

3. Терентьев П. В. Дальнейшее развитие метода корреляционных плеяд.— В кн.: Применение математических методов в биологии. Л., 1960.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ • 1983

А. А. ЕРЕМИНА, Н. В. ГАЛЯСНАЯ, В. А. ДЕМАКОВ

ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА РАСТЕНИЙ

Бурное развитие химической промышленности, сельского хозяйства, фармацевтической, пищевой и других отраслей народного хозяйства привело к тому, что среда обитания человека постоянно пополняется различными химическими соединениями, что предопределяет расширяющийся контакт человека с полупродуктами и конечными продуктами синтеза и производства. В практической деятельности человека нашли широкое применение такие стимуляторы роста растений, как гиббереллин, кинетин, относящиеся к группе фитогормонов. Кинетин — представитель класса цитокининов, образующихся из дезоксиаденозина при определенных условиях деградации ДНК. Гиббереллин по характеру строения является продуктом тетрациклиновых карбоновых кислот класса дитерпенов [4]. В отличие от первых двух классов стимуляторов роста растительного происхождения, этиленхлоргидрин — искусственно синтезированный химический препарат [2, 3].

К настоящему времени имеются работы по физиологическому действию этих веществ на растения, микроорганизмы, низшие грибы и млекопитающие [5, 6]. Кинетин и гиббереллин участвуют в эндогенной регуляции роста и развития растений, а также влияют на наследственный аппарат растительной клетки. Стимулирующие дозы вещества на растения увеличивают количество лабильной ДНК, преимущественно в ядрах дифференцированных клеток. Высокие дозы вызывают кратковременное увеличение количества лабильной ДНК, затем аномальные митозы и амитозы, которые приводят к образованию крупных и фрагментированных ядер. В дальнейшем ядра активно делящихся клеток деградируют, ядра дифференцированных тканей сохраняются. Гиббереллин может действовать на любой период клеточного цикла, он частично синхронизирует деление, увеличивает митотическую активность, повышает количество двухъядерных клеток в меристемах [5]. По литературным данным известно мутагенное действие этиленхлоргидрина при 0,001 мг/л на клетках костного мозга мышей [7].

Поскольку данные вещества недостаточно исследованы с точки зрения наличия у них мутагенного действия, возникла необходимость изучения этого вопроса. Для экспериментального решения задачи использовался экспресс-метод на *Salmonella typhimurium* и культуре тканей млекопитающих.

Материал и методы исследований

Для оценки мутагенной активности данных химических соединений применяли индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium*, являющиеся гистидинзависимыми ауксотрофами. Мутагенный эффект регистрируется на штаммах *Salmonella typhimurium* TA 1535, TA 1538, TA 100, TA 98 путем учета обратных мутаций от ауксотрофности к прототрофности по гистидину в полуколичественном методе с внесением препарата в слой мягкого агара без метаболической активации. В эксперименте использовали полуобогащенную минимальную среду: 2 и 0,6 % агара «Difco» с добавками биотина и гистидина. Рабочую культуру в середине логарифмической фазы роста с концентрацией $2 \cdot 10^8$ клеток/мл вносили в мягкий агар в объеме 0,25 мл на чашку. Исследуемое вещество брали в стандартных концентрациях от 10^{-3} до 10^4 мкг/мл и вносили в объеме 0,1 мл на чашку. Чашки с культурой микроорганизмов и исследуемым веществом инкубировали 48 ч при 37 °С [8]. Результаты оценивали по следующей шкале эффектов мутагенной активности:

1. Мутагенная активность не выявлена, если количество колоний на опытных чашках не превышает спонтанный фон более чем в 2,5 раза (—).
2. Слабая мутагенная активность — число колоний в опыте в 2,5—10 раз больше, чем в контроле (+).
3. Средняя мутагенная активность — число колоний на опытных чашках в 10—100 раз больше, чем в контроле (++).
4. Сильная мутагенная активность — превышение более чем в 100 раз (+++).

Статистическую обработку данных проводили по методу Вилкоксона — Манна — Уитни.

На культуре лимфоцитов крови человека кинетин и гиббереллин изучали в стандартных дозах — от 10^{-4} до 10 мкг/мл. Лимфоциты получали из донорской гепаринизированной крови. Для культивирования клеток крови использовали среду 199 с добавками лошадиной сыворотки. Для стимуляции роста и деления лимфоцитов использовали отечественный фитогемагглютинин. Лимфоциты культивировали 54 ч при 37 °С. За 2 ч до фиксации в культуру вводили колхицин в дозе 0,1 мкг/мл. На 54-м часу роста культуры клетки фиксировали смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты 3 : 1 на холоде 20 ч. После фиксации делали препараты и окрашивали 1 %-ным ацетоорсеином. Учет аберраций вели под микроскопом при увеличении 1000 [1].

Регуляторы роста растений исследовали in vivo на клетках костного мозга мышей линии СВА, для этого вещество вводили животным внутрибрюшинно в дозах $3 \cdot 10^{-4}$; $5 \cdot 10^{-4}$; $0{,}6 \cdot 10^{-4}$; $3 \cdot 10^{-5}$ мг/кг для этиленхлоргидрина. Для исследования этиленхлоргидрина животные были разделены на три группы по экспозиции вещества в организме, т. е. 6, 12, 24 ч. Гиббереллин и кинетин исследовали в дозах от 10^{-3} до 10 мкг/мл. Время экспозиции 24 ч. За 2 ч до получения костного мозга вводили колхицин — 0,4 % по 0,2 мл. Костный мозг получали из берцовой кости мышей, фиксировали смесью этилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1) на холоде в течение 20 ч. Из фиксированных клеток делали препараты и окрашивали 1 %-ным ацетоорсеином. В обеих методиках изучали по 100 метафаз на каждую дозу. Учитывали все типы хромосомных и хроматидных аберраций.

Результаты и их обсуждение

Анализ проведенных исследований показал, что кинетин на микробных тест-системах в опытах без метаболической активации не обладает мутагенной активностью, т. е. количество колоний на опытных чашках не превышает спонтанный фон более чем в два раза. При изучении вещества на объектах более высокого уровня организации, клетках эукариотов, был установлен мутагенный эффект, так как увеличение метафаз с аберрациями над контролем в культуре лимфоцитов составило два-три раза, а в клетках костного мозга четыре-восемь раз (табл. 1). Аналогичная картина наблюдалась при оценке мутагенной активности гиббереллина.

При исследовании этиленхлоргидрина было обнаружено отсутствие активности на штаммах ТА 1535, ТА 1538, ТА 98; слабый мутагенный эффект выявлен на штамме ТА 100 и культуре клеток костного мозга (превышение уровня аберраций над спонтанным фоном соответственно до 2,7 и 2,5 раза; см. табл. 1 и 2).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что стимуляторы роста растений естественного происхождения не оказывают прямого действия на наследственный аппарат микроорганизмов. Положительный эффект зарегистрирован в экспериментах на клетках эукариотов, что позволяет сделать вывод о появлении активности в процессе метаболической реакции. По характеру аберраций исследованные препараты относятся к веществам, действующим на предсинтетический период интерфазы. Для искусственного стимулятора этиленхлоргидрина определена слабая активность при прямом контакте лишь на штамме ТА 100, обладающим повышенной чувствительностью. На культуре клеток костного мозга установлены дозы этиленхлоргидрина, вызывающие максимальный выход аберраций.

Таблица 1

Мутагенное действие кинетина, гиббереллина, этиленхлоргидрина на тестерных штаммах в опытах без метаболической активации и на клетках эукариотов (количество ревертантов на чашке и процент аберраций)

Вещество	Тест-объект	Дозы веществ, мкг/мл									Контроль
		10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1	10	10^{2}	10^{3}	10^{4}	
Кинетин	ТА 1535	—	13,2±1,8	13,9±1,0	13,7±1,8	15,5±2	14,7±2	14,6±1	9,9±1	12,8±1,8	10,8±0,8
	ТА 1538	—	4,5±0,7	5,7±1,0	4,1±0,4	6,3±0,8	5,3±1	4,7±1	5,4±1	4,2±0,3	5,2±0,7
	ТА 98	—	20,5±0,5	20±2,0	17,5±2	17,5±2	16,2±2	14,5±2	17±2	16,3±2	12,4±1,5
	ТА 100	—	29±5	59±4,4	27,3±3	22,1±6	39,7±7	37,8±9	25,6±8	49,3±6	29,3±3
	Лимфоциты	5	9	9	8	11	6	—	—	—	3
	Клетки костного мозга	—	16	9	9	14	12	—	—	—	2
Гиббереллин	ТА 1535	—	21,4±3	18,9±2	19,6±3	18,4±3	23,4±5	26,9±5	25,4±3	21,9±3	12,1±1
	ТА 1538	—	4,1±0,5	6±1,6	6,3±1,6	6±0,5	5,3±1	5,1±1	5,2±1	4,1±0,5	5,3±0,8
	ТА 98	—	17,5±2	18,2±2	14,2±2	26,3±3	20,5±3	22,2±2	21,5±3	21,5±3	12,1±1,7
	ТА 100	—	26,1±3	36,0±6	46,5±7	39,1±5	52,5±8	43,1±6	51,4±5	30,9±7	22,7±2,6
	Лимфоциты	14	16	17	20	15	13	—	—	—	3
	Клетки костного мозга	—	4	7	10	16	5	—	—	—	2
Этиленхлоргидрин	ТА 1535	—	10,6±1	14,2±0,6	9,6±2	11,5±1	11,5±1	9,3±1	8,3±0	14,8±1,4	8±1,2
	ТА 1538	—	6,8±1,3	7,7±1,1	6,4±0,8	7,9±2	7±1,1	8±2,3	8±1	11±1	5,3±0,6
	ТА 98	—	14,3±1	17±1,9	17,5±1	13,3±1	15,5±1	16,4±1	16,5±11	12,7±1	9,4±1,4
	ТА 100	—	44±4,8	42,4±5	39,8±4	37,4±3	49,3±6	45,6±5	45,4±5	52±3,8	19,4±2,9

Таблица 2

Мутагенное действие этиленхлоргидрина на клетки костного мозга мышей линии СВА

Доза, мг/кг	Время экспозиции вещества в организме животных, ч								
	6			12			24		
	Колич. изученных метафаз	Колич. метафаз с аберрациями	Митотический индекс	Колич. изученных метафаз	Колич. метафаз с аберрациями	Митотический индекс	Колич. изученных метафаз	Колич. метафаз с аберрациями	Митотический индекс
$3 \cdot 10^{-4}$	100	15 (15) *	1,09	100	10 (10)	1,19	100	16 (16)	1,18
$1,5 \cdot 10^{-4}$	—	—	—	100	22 (22)	1,09	100	28 (28)	40,11
$0,6 \cdot 10^{-4}$	100	21 (21)	13,9	100	5 (5)	1,9	100	20 (20)	21,25
$3 \cdot 10^{-5}$	100	12 (12)	2,34	—	—	—	—	—	—
Контроль	100	8 (8)	0,7	—	—	—	—	—	—

* В скобках — количество метафаз с аберрациями, %

При шестичасовой экспозиции она равнялась $0,6 \cdot 10^{-4}$, при 12- и 24-часовой $1,5 \cdot 10^{-4}$ мг/кг. Наряду с этим наблюдалось увеличение митотического индекса. Отмечен высокий уровень выхода хроматидных делеций. Эти данные свидетельствуют о выраженном стимулирующем действии этиленхлоргидрина на клетки костного мозга и позволяют предположить, что препарат проявляет свою активность на предсинтетическом периоде интерфазы, либо на фазе синтеза ДНК.

Пороговая доза вещества при однократном введении ниже дозы $0,6 \cdot 10^{-4}$ мг/кг.

Результаты опытов указывают на необходимость дальнейшего углубленного изучения стимуляторов роста с привлечением других тест-систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинина Л. Д. Лейкоциты крови человека — тест-система для оценки мутагенов среды. М.: Наука, 1977. 250 с.
2. Калинина В. Ф. Регуляторы роста растений. М., 1965. 231 с.
3. Мельников Н. Н. Химия гербицидов и стимуляторов роста растений. М.: Госхимиздат, 1954. 198 с.
4. Муромцев Г. С. Регуляторы роста растений. М.: Колос, 1979. 236 с.
5. Полевой В. В. Регуляторы роста растений и нуклеиновый обмен. М.: Наука, 1969. 198 с.
6. Ракитина Ю. В. Регуляторы роста растений. Ташкент: Фан, 1978. 251 с.
7. Семенова В. Н. Изучение биологического действия этиленхлоргидрина как фактора загрязнения атмосферного воздуха.— Гигиена и санитария, 1980, № 1, с. 84—85.
8. Ames B. N., McCann Y., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test.— Mut. Res., 1975, vol. 31, p. 347.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ • 1983

В. М. КОЛОТОВ, В. Ф. ПЕТРОВ

ИЗГОТОВЛЕНИЕ И КОНТРОЛЬ ПРЕПАРАТОВ СУХОЙ МИКРОСОМАЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МУТАГЕНОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

В связи с бурным развитием технического прогресса в окружающую среду поступают все большие количества чужеродных соединений, многие из которых обладают выраженной биологической активностью. Это определяет широкие исследования влияния загрязнений на биологические системы, которые проводятся у нас в стране и за рубежом. Разработки ведутся в области токсикологии, гигиенического нормирования, химического анализа вредных веществ и в других направлениях [1]. Не менее важная, хотя и более сложная задача,— выявление, оценка дисгенетического воздействия этих веществ (как индивидуального, так и суммарного) на живые объекты.

В настоящее время установлено, что наряду с прямыми мутагенами, т. е. соединениями, мутагенность которых связана с действием самого исходного вещества, имеется группа так называемых потенциальных мутагенов, другими словами, веществ, вызывающих мутагенный эффект за счет образования в организме теплокровных активных промежуточных или конечных продуктов распада исходного вещества. Возможность такой мутагенной метаболической активации показана в отношении полициклических углеводородов, ароматических аминов и ряда других соединений [3, 6, 7]. Эксперименты по индикации этих веществ на млекопитающих дорогие и громоздкие. Гораздо более перспективны тесты, связанные с использованием микроорганизмов. Их характеризует короткий период проведения исследований и возможность учета генных мутаций различного типа. Существующие методики выявления активности потенциальных мутагенов на бактериальных тест-системах (метод Эймса) предусматривают индикацию этих соединений путем предварительной их обработки энзимами печени млекопитающих. Кратковременность биологической активности последних в нативном виде (не более двух суток с момента приготовления) и относительная сложность получения микросомальной

Результаты испытаний активности микросомальной фракции и различных сроков хранения (средние данные по четырем

Характеристика микросомальной фракции			Активированный гомогенатом				
			Доза 100 мкг/мл				
			$\overline{X}$	$\overline{x}$	$a \pm m$	t	p
Нативная до высушивания			137,2	7,0	20,6±1,31	—	—
Высушенная	Сразу после сушки		133,5	7,5	17,8±1,21	1,55	>0,05
	После хранения на протяжении:	3 мес.	199,6	6,5	18,4±1,24	1,22	>0,05
		6 мес.	121,8	6,0	20,3±1,30	0,16	>0,05
		12 мес.	113,8	6,5	17,5±1,20	1,72	>0,05

Примечание. $\overline{X}$ — количество индуцированных ревертантов, $\overline{x}$ — количество превышения $\overline{X}$ над $\overline{x}$, t — критерий Стьюдента, p — доверительная вероятность.

фракции явились предпосылками для усовершенствования данной методики. С целью упрощения определений и, таким образом, более широкого их практического внедрения предпринята попытка получения стабильного препарата микросомальной фракции печени грызунов. Результаты этой разработки и стали целью настоящей статьи.

Материал и методы исследований

Микробная тест-культура. Использована культура *Salmonella typhimurium*, штамм ТА 1538 [5]. Наличие мутагенного эффекта, происходящего по типу сдвига рамки считывания, регистрировали путем учета обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности.

Мутаген. В качестве эталонного вещества применяли 2-ацетиламинофлюорен, принадлежащий к группе «косвенных» мутагенов, действие которых активируется энзимами печени млекопитающих. Концентрации мутагена составляли 100 и 500 мкг/мл.

Подготовка животных. Использовали самцов крыс линии «Вистер» весом 150—200 г. Для стимулирования микросомальных ферментов животным в течение трех дней проводили инъекции фенобарбитала (внутрибрюшинно из расчета 80 мг/кг веса животного). За 24 ч до забоя прекращали подачу пищи.

Приготовление гомогената. Предварительно подготовленных крыс забивали декапитацией, стерильно забирали у них печень.

после лиофилизации
сериям препарата)

2-ацетиламинофлюорен				
Доза 500 мкг/мл				
$\overline{X}$	$\overline{x}$	$a \pm m$	t	p
393,4	7,0	56,2±2,16	—	—
373,5	7,5	49,8±2,04	2,06	>0,05
340,0	6,5	52,3±2,09	1,3	>0,05
327,0	6,0	54,4±2,13	0,6	>0,05
343,2	6,5	52,8±2,10	1,3	>0,05

спонтанных мутантов, $a \pm m$ — индекс кратности

После взвешивания печень промывали холодным 0,15 М KCl до полного удаления крови и посветления печеночной ткани. Отмытую печень измельчали стерильными ножницами, а затем гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с притертым пестиком из фторопласта в трехкратном объеме 0,15 М раствора KCl на холоде. Полученный гомогенат освобождали от балластных примесей центрифугированием при температуре +4 °С на центрифуге ЦВР-2 при 9000 g в течение 15 мин. Надосадочную жидкость (микросомальную фракцию) декантировали. Одна из приготовленных серий была затем подвергнута холодной стерилизации. С этой целью полученный супернатант фильтровали через калиброванные бактериальные фильтры марки «Синпор» с величиной пор 0,17 μ. Часть полученного гомогената хранили на холоде для использования в нативном виде.

Стабилизация микросомальной фракции. Большую часть приготовленных партий гомогената разливали на холоде в шестимиллилитровые ампулы по 2 мл в каждую. «Ампулированный» гомогенат стабилизировали сублимационным высушиванием на аппаратах КС-30. При этом использовали режим лиофилизации, предусматривающий: а) предварительное замораживание гомогената при —50 °С в течение 8—10 ч; б) постепенный подогрев продукта (до 0 °С) в течение 16—20 ч; в) глубину вакуума в процессе сушки от 70 до 20 мк; г) подогрев продукта на конечном этапе высушивания до +25 °С. Общая продолжительность сушки составляла 30—35 ч с последующим запаиванием ампул под вакуумом. Высушенная микросомальная фракция имела остаточную влажность (2,5—3 %) и представляла собой таблетки коричневого цвета равномерной по внешнему виду консистенции. При добавлении растворителя после энергичного встряхивания содержимое ампул ресуспендировалось в гомогенную взвесь в течение 1 мин.

Контроль полученных гомогенатов. Активность микросомальной фракции печени крыс проверяли сразу после приготовления, вслед за лиофилизацией, а затем через 3, 6 и 12 мес. после хранения в рефрижераторе при температуре +4 °С. Данные

испытаний лиофилизированных гомогенатов каждой партии сравнивали с активностью нативных (исходных) образцов перед высушиванием. Схема проверок соответствовала методике Эймса с метаболической активацией in vitro [4].

Результаты контроля статистически обработаны по методу Фишера — Стьюдента [2].

Результаты испытания четырех серий стабилизированного высушиванием гомогената печени крыс (см. таблицу) показали, что микросомальная фракция печени крыс сохраняет свою активность как после лиофилизации, так и при хранении ее в течение 12 мес. Сравнение ее показателей с нативным гомогенатом выявило недостоверность этих различий (во всех случаях $p > 0{,}05$), что свидетельствует о полном сохранении сухими препаратами биологической активности.

Выводы

1. Стабилизация микросомальной фракции печени крыс возможна путем ее сублимационного высушивания в ампулах.

2. Сухая микросомальная фракция полностью сохраняет свою биологическую активность в течение 12 мес. (срок наблюдения).

3. Использование лиофилизированного гомогената значительно упрощает индикацию потенциальных мутагенов на бактериальных тест-системах по методу Эймса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дубинин Н. П., Пашин Ю. В. Мутагенез и окружающая среда. М.: Наука, 1978. 127 с.

2. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. Минск: Вышэйшая школа, 1973. 318 с.

3. Фонштейн Л. М., Абилев С. К., Зехнов В. М., Шапиро А. А. Исследование эффекта мутагенной метаболической активации N-нитрозоморфолина на микроорганизмах.— Генетика, 1976, т. 12, № 5.

4. Ames B. N., Duraton W. E., Jomasaki E., Lee F. D. Carcinoges are mutagens a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection.— Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1973, vol. 70, p. 22.

5. Ames B. N., MoCann Y., Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella mammalian-microsome mutagenicity test.— Mut. Res., 1975, vol. 31, p. 347.

6. Malling H. V. Mutagenic activation of ADMN and DEN in host-mediated assay and the microsomal system.— Mut. Res., 1974, vol. 26, p. 465.

7. Propping P., Buselmaier W., Rohrborn G. Kritische Betrachtung über die intra-animale Kultur von Mikroorganismen, eine Methode zum Nachweis Chemisch induzierter Mutationen.— Arzneim-Forsch., 1973, Bd 23, S. 746.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ • 1983

А. Д. ШУСТОВ, Н. Я. КОВЯЗИН, С. Ю. СОЛОДНИКОВ,
В. Н. ЧЕНЦОВ, Н. П. ЧЕРНЫШЕВ, М. Р. ПШЕНИЧНОВ

ОЦЕНКА МУТАГЕННОЙ И АНТИМУТАГЕННОЙ АКТИВНОСТИ НЕКОТОРЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЙ (ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ СООБЩЕНИЕ)

В современных условиях контакт человека, животных, микроорганизмов с ксенобиотиками, в том числе обладающими дисгенетическим воздействием, постоянно возрастает и неуклонно ведет к увеличению гетерогенности популяций, а также наследственной патологии. Поэтому выявление, количественная оценка прямых и потенциальных мутагенов в окружающей среде, в продуктах питания, лекарственном сырье обязательны для выбора промышленных технологий, продуктов, лекарственных средств, в меньшей мере воздействующих на наследственный аппарат. Эффективность этих мероприятий в значительной мере возрастает при одновременном профилактическом введении антимутагенов, поиск и применение которых является одной из первоочередных задач. Это подтверждается как первыми успешными наблюдениями за введением в пищевой рацион людей некоторых витаминов (в том числе α-токоферола), так и позитивным испытанием на животных, микроорганизмах синтетических антимутагенов [1].

В 1980 г. по предложению профессора Р. А. Пшеничнова авторами сообщения впервые проведен поиск антимутагенов в растительном лекарственном сырье с одновременным испытанием антимикробных, мутагенных и антимутагенных свойств растений, применяемых в качестве противоопухолевых средств народной медициной.

Учитывая возможную лабильность соответствующих компонентов сока растений, их сбор и исследование проводили ex temporе в полевых условиях с использованием передвижной санбаклаборатории и на базе временной биостанции в Кунгурском районе Пермской области. Одновременно образцы растений стабилизировали и исследовали в условиях стационара.

Объекты исследования

Изучены представители семейств, рекомендуемых в основном в качестве антиканцерогенных средств [2—4]. Растения для исследований были взяты в фазе цветения. Изучали части расте-

Результаты исследования фильтра соков растений

Растение	Стерильность	Бактерицидность	Мутагенность	Антимутагенность
Буквица преувеличенная — *Betonika peraucta* Klok	2	98	0,5	Не опр.
Вербейник обыкновенный — *Lysimachia nummularia* L.	3	96	0,7	—»—
Вьюнок полевой — *Convolvulus arvensis* L.	3,5	82	1,5	+
Гвоздика-травянка — *Dianthus-deltoides* L.	15	95	5,0	Не опр.
Герань луговая — *Geranium pratense* L.	2,5	81	2,1	0
Горец почечуйный — *Polygonum persicaria* L.	2,5	106	3,6	0
Гравилат городской — *Geum urbanum* L.	4,5	93	2,6	0
Донник белый — *Melilotus albus* Desr.	3,5	77	3,9	0
Дягиль лекарственный — *Archangelica officinalis* Hoffm.	1,5	116	18,2	+
Желтушник левкойный — *Erysimum cheiranthoides* L.	6	72	1,3	Не опр.
Зверобой обыкновенный — *Hypericum perforatum* L.	5	92	3,0	+++
Ива белая — *Salix alba* L.	3,5	92	3,6	0
Истод сибирский — *Polygala sibirica* L.	3	58	1,2	Не опр.
Калина обыкновенная — *Viburnum opulus* L.	2,5	100	1,5	0
Копытень европейский — *Asarum europaeum* L.	3,5	16	2,0	+
Крапива двудомная — *Utrica dioica* L.	9	91	0,8	0
Лебеда раскидистая — *Atriplex patula* L.	3	100	1,2	+
Лопух паутинистый — *Arctium tomentosum* Mill. (корни)	3	100	1,2	Не опр.
Льнянка обыкновенная — *Linaria vulgaris* Mill.	3	60	1,3	+
Незабудка полевая — *Myosotis arvensis* Hill.	1	89	1,9	Не опр.
Паслен сладко-горький — *Solanum dulcamara* L.	19	95	1,6	+
Пижма обыкновенная — *Tanacetum vulgare* L.	2	107	1,0	+
Хатьма тюрингенская — *Lavatera thuringiaca* L.	3	106	3,2	0
Хрен обыкновенный — *Armoracia rusticana* Gaertn., Mey. et Scherb.	10	103	1,3	0
Сбор №				
1	0,5	90	0,7	++
2	5	110	3,8	0
3	0,5	57	1,4	0
4	4	88	21	0
5	1	105	3,9	0
6	7	100	1,5	0

Примечание. (+++) — активность высокая, (++) — средняя, (+) — слабая, 0 — активность не выявлена. У всех растений исследовалась трава, кроме *Arctium tomentosum* Mill.

ний, используемые как лекарственное сырье. Исследовали раздельно 24 вида растений (см. таблицу), остальные 30 в сборах (для охвата большего числа растений).

Перечень сборов

Состав сборов: сбор 1 — черноголовка обыкновенная *Prunella vulgaris* L., подорожник большой *Plantago major* L., дымянка лекарственная *Fumaria officinalis* L., мать-и-мачеха обыкновенная *Tussilago farfara* L., пастернак лесной *Pastinaca silvestris* Garsault; сбор 2 — ива белая *Salix alba* L., грушанка круглолистная *Pyrola rotundifolia* L., подмаренник цепкий *Galium aparine* L., гравилат городской *Geum urbanum* L., тысячелистник обыкновенный *Achillea millefolium* L.; сбор 3 — синюха голубая *Polemonium coeruleum* L., горечавка легочная *Gentiana pneumonanthe* L., ромашка пахучая *Matricaria matricarioides* Porter., манжетка городковатая *Alchemilla subcrenata* Buser., мята водяная *Mentha aquatica* L.; сбор 4 — фиалка полевая *Viola arvensis* Murr., колючник Биберштейна *Carlina biebersteinii* Bernh. ex Hornem., норичник шишковатый *Scrophularia nodosa* L., зверобой продырявленный *Hypericum perforatum* L., хатьма тюрингенская *Lavatera thuringiaca* L.; сбор 5 — Иван-чай узколистный *Chamaenerion angustifolium* Scop., малина обыкновенная *Rubus idaeus* L., чистотел большой *Chelidonium majus* L., девясил британский *Inula britannica* L., колокольчик болонский *Campanula bononiensis* L.; сбор 6 — дудник лесной *Angelica sylvestris* L., будра плющевидная *Glechoma hederacea* L., горец почечуйный *Polygonum persicaria* L., полынь горькая *Artemisia absinthium* L., воронец колосистый *Actaea spicata* L.

Пробы свежих растений измельчали. К мязге добавляли двойное по весу количество дистиллированной воды, после чего из нее выжимали сок. Для удаления из соков крупнодисперсных частиц последние осаждали на центрифуге ЦЛН-2 при 5000 об/мин в течение 30 мин. Затем супернатанты подвергали холодной стерилизации фильтрованием через калиброванные мембраны марки «Синпор» с величиной пор 0,17 μ.

Контроль стерильности фильтратов растений

Изучали высевами фильтратов (по 0,1 мл) на чашки Петри с МПА, экспозицией посевов 18—20 ч при температуре +37 °С и подсчетом выросших колоний.

Определение возможного бактерицидного действия

Исследовали на индикаторной бактериальной культуре *Salmonella typhimurium*. После 30-минутного контакта равных объемов бактериальной взвеси и фильтратов растений выемки

из смесей высевали на чашки Петри с МПА с последующей инкубацией их 18—20 ч при температуре +37 °С и подсчетом выросших колоний. Бактерицидность фильтратов выражали в процентах живых микроорганизмов по отношению к контрольным пробам после контакта с соками растений. В качестве последних использовали исходные бактериальные взвеси, аналогично обработанные в присутствии физического раствора.

Мутагенная активность фильтратов

Исследовали количественным методом учета генных мутаций по способу Эймса [5]. При этом использовали культуру *Salmonella typhimurium*, штамм ТА 1535. Наличие мутагенного эффекта, происходящего по типу замены пар оснований в геноме индикаторных бактерий, регистрировали путем учета обратных мутаций от ауксотрофности по гистидину к прототрофности. Количественное обозначение мутагенной активности выражали с учетом выживших микроорганизмов через индекс кратности превышения ее над спонтанным фоном.

Антимутагенный эффект фильтратов растений

Исследовали на примере эталонного (для использованного индикаторного штамма) мутагена — N-нитрозометилмочевины. Концентрация мутагена 0,5 мгр/мл. Опытные пробы включали в себя индикаторную культуру, мутаген и исследуемый фильтрат. В контрольных смесях вместо фильтратов использовали физический раствор. Все пробы после 30-минутного контакта при температуре +37° высевали на соответствующие голодные среды с последующим подсчетом после 48-часовой инкубации выросших ревертантов [5]. Основные результаты суммированы в таблице.

Из таблицы следует, что исходные препараты (сок растений) содержали банальную микрофлору, которая почти полностью устранялась фильтрацией. Бактерицидные свойства у исследованных видов были выражены слабо. Часть из них обладала слабо выраженным мутагенным эффектом и лишь два вида обусловили индукцию мутантов, по числу в 5—18,2 раза превышающих спонтанный уровень.

Среди раздельно изученных видов растений большой антимутагенной активностью обладал зверобой обыкновенный *Hypericum perforatum* L. (семейство Guttiferae). Намного ниже антимутагенная активность обнаружена у дягиля лекарственного *Archangelica officinalis* Hoffm. (семейство Umbelliferae), паслена сладко-горького *Solanum dulcamara* L. (семейство Solanaceae), льнянки обыкновенной *Linaria vulgaris Mill.* (семейство Scrophulariaceae), копытеня европейского *Asarum europaeum* L. (семейство Aristolochiaceae), вьюнка полевого *Convol-*

vulus arvensis L. (семейство Convolvulaceae) и лебеды раскидистой *Atriplex patula* L. (семейство Chenopodiaceae). У остальных растений (14 видов) антимутагенная активность не проявилась.

Учитывая малый срок сезонных работ и ограниченное число исследованных видов, какие-либо окончательные суждения считаем преждевременными. Однако проведенные исследования убедительно свидетельствуют о возможности выявления и количественной оценки в полевых условиях мутагенных, антимутагенных свойств и перспективности дальнейшего поиска природных антимутагенов растительного происхождения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Алиев А. А., Кульгавин А. Э., Сарина Т. Н. и др. Генетические проблемы загрязнения окружающей среды на территории Молд. ССР.— В сб.: Заседание секции генетич. аспектов проблемы «Человек и биосфера». [Тезисы докладов.] Кишинев, 1980, с. 91—93.

2. Атлас лекарственных растений СССР. М.: Медгиз, 1962.

3. Балицкий Е. П., Воронцова А. Л., Карпухина А. М. Лекарственные растения в терапии злокачественных опухолей. Киев: Здоров'я, 1966.

4. Ковалева И. Г. Лечение растениями. М.: Медицина, 1971.

5. Тест-система оценки мутагенной активности загрязнителей среды на *Salmonella*. (Методическое указание.)/Л. М. Фонштейн, Л. М. Калинина, Г. Н. Полухина и др. М., 1977. 52 с.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ · 1983

В. П. ШЕХОВЦОВ

ИЗУЧЕНИЕ РОСТА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КОЛОНИЙ ПРИ ПОМОЩИ НОВОГО ТЕРМОСТАТИРОВАННОГО МИКРОКУЛЬТИВАТОРА

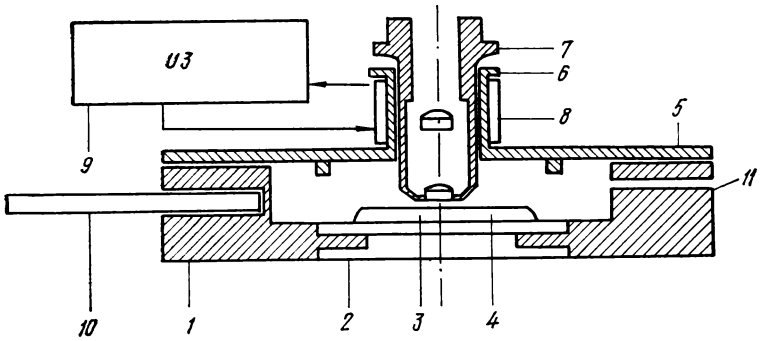
При изучении структурной организации микробных популяций, растущих на плотных питательных средах, применяются методы от описательного до электронномикроскопического. Предложенные ранее для прижизненного изучения колоний приборы, устройства и приспособления [4] встречают ряд технических трудностей, основными из которых являются невозможность киносъемки с единичной микробной клетки до зрелой колонии, сохранение при этом стерильности, создание стабильного теплового режима, предохранение сред от высыхания, обеспечение оптимальной аэрации и необходимое количество питательных веществ.

В настоящей статье описывается новый прибор, позволяющий решить поставленные задачи в оптимальном варианте, что достигается оригинальным решением его электрической и механической конструкций.

Материал и методы исследования

Устройство микрокультиватора представлено на рисунке. В дно чашки (*1*) камеры, на месте высверленного сквозного отверстия, вклеены нижнее (*2*) и верхнее (*3*) предметные стекла. На верхнее стекло наливается расплавленный и остуженный до 45 °С агар (*4*). Съемная крышка (*5*) имеет объективную муфту (*6*) для объектива (*7*) микроскопа. На муфте объектива смонтирован нагреватель (*8*). На верхней плоскости крышки выполнена втулка для контактного термометра. Контактный термометр и нагреватель подключаются к термостатирующему устройству (*9*). В боковую стенку камеры вмонтирован контрольный термометр (*10*). Для смены газовой среды в камере в ее боковой стенке выполнены соосные отверстия (*11*). При настройке микрокультиватора к работе используется С-образное полукольцо. Чашка и крышка микрокультиватора изготовляются из металла.

Сборку и засев микрокультиватора производили в стериль-



Микрокультиватор для изучения процесса формирования и строения бактериальных микроколоний.
Усл. обозначения см. в тексте.

ном боксе. На верхнее стекло чашки камеры наливали 5 мл просветленного расплавленного 1,5 %-ного агара, который равномерно распределяли по его поверхности. Толщина агара не превышала 1,5 м. Подсушенный на воздухе в течение 5 мин агар засевали 18-часовой культурой. Для лучшей герметизации все соприкасающиеся поверхности механических деталей и оправу объектива смазывали тонким слоем стерильного вазелинового масла. На верхнюю плоскость муфты накладывали С-образную шайбу, после чего в объективную муфту вводили объектив микроскопа. Производили совмещение верхней и нижней частей микрокультиватора. В собранном виде прибор переносили на предметный столик микроскопа. Объектив ввинчивали в револьвер микроскопа, после чего включали нагревательный элемент прибора. При достижении 37 °С (по шкале контрольного термометра) термостатирование камеры переводили на автоматический режим.

Оптическую систему микроскопа настраивали на поверхность агара. С помощью винтов столика микроскопа отыскивали изолированную бактериальную особь, являющуюся исходной в формировании колонии. Процесс образования колонии регистрировали с помощью покадровой фотосъемки и цейтраферной киносъемки.

Испытание нового микрокультиватора проводили на штаммах следующих микроорганизмов: *Caryophanon latum* Peshkoff, *C. tehue* Peshkoff, *Bac. brevis* var. G.— B, R, S, P^+ и P^--вариантов.

Питательной средой для *Caryophanon* служил творожно-навозный агар [3], для *Bac. brevis* — дрожжевая среда [21]. Наблюдение за ростом колоний осуществляли при 37 °С в течение 14 ч.

Новый микрокультиватор, разработанный В. П. Шеховцо-

вым (Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова АН СССР) и В. В. Андросовым (2-й Медицинский институт им. Н. И. Пирогова), защищен авторским свидетельством [1].

Результаты и их обсуждение

Анализ роста различных видов микроорганизмов, изученных в оригинальном микрокультиваторе, позволил детально проследить динамику процесса формирования и структуру микроколоний в стабильных условиях. Установлены определенные различия в морфологии культур в типе обособления особей, процессе формирования микроколоний и их структуре. Наблюдения позволили выявить некоторые общие черты, характеризующие бактериальную микроколонию.

Таким образом, предлагаемый микрокультиватор может быть использован в фундаментальных исследованиях микроорганизмов, а также целого ряда других биологических микрообъектов (регистрация медленно протекающих процессов, таких как размножение одноклеточных организмов, деление клетки и ее органелл, рост тканей растений и животных), а также в прикладных исследованиях в микробиологии для изучения влияния на растущие микроорганизмы различных химических, физических, биологических агентов как в жидкой, так и газообразной фазах.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. с. (СССР). № 809024. Микрокультиватор/В. П. Шеховцов, В. В. Андросов. Опубл. в Б. И. 1981, № 8, НКИ СО2-В.

2. Жарикова Г. Г., Савченко Г. В., Митронова Т. Н. Формы диссоциации *Bac. brevis* var G.— B.— Микробиология, 1964, т. 33, вып. 4, с. 605—609.

3. Пешков М. А. Сравнительная цитология сине-зеленых водорослей, бактерий и актиномицетов. М.: Наука, 1966. 246 с.

4. Фихте Б. А., Печников Н. В., Будницкий А. А., Корн М. Я. Кинематографические методы исследования микроорганизмов. М.: Наука, 1975, с. 89—94.

ВИРУСНАЯ ПОПУЛЯЦИЯ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ • 1983

Я. Я. ЦИЛИНСКИЙ

К ВОПРОСУ О СКОРОСТИ И НАПРАВЛЕНИИ ЭВОЛЮЦИИ ВИРУСОВ

Вирусы представляют собой часть биосферы. Поэтому проблему эволюции вирусов, несмотря на всю специфику объекта, следует рассматривать на основе общей эволюционной теории. В настоящем сообщении делается такая попытка.

Эволюцию вирусов характеризуют два противоположных явления: чрезвычайно высокая скорость и выраженный эволюционный застой. Высокая скорость проявляется в быстром приспособлении вирусов к изменяющимся внешним условиям и возникновении в природных вирусных популяциях вариантов возбудителя с повышенными эпидемическими потенциями. Недавно, например, новые штаммы вируса Рифт Валли, обладающие высокой вирулентностью для человека, вызвали в Египте опустошительную эпидемию, которая охватила более 1 млн. чел. и унесла 2 тыс. жизней [5]. Эволюционный застой выражается в сохранении основных видовых свойств вируса на протяжении значительного числа поколений. За всю историю вирусологии не известно ни одного случая потери видовых характеристик при длительном культивировании вирусов в лаборатории или при попытках изменить наследственность путем тех или иных экспериментальных воздействий. Еще более поразительные примеры постоянства приносят ретроспективные наблюдения. Известно, например, что паралитический полиомиелит имел распространение в одной из самых первых человеческих цивилизаций — в Древнем Египте. Его возбудитель, полиовирус, вызывает в наше время заболевание с такой же клинической картиной и остаточными явлениями, как и 40 веков назад.

Вирусы являются агентами предельной биологической простоты. Тем не менее содержание и механизм эволюции вирусов, как и эволюции на более высоких ступенях организации жизни, заключается в преобразовании генетической структуры популяции. Вирусы гаплоидны и лишены полового процесса. Поэтому вирусные популяции имеют примитивное строение. Они представляют смесь отдельных клонов, которые не связаны между собой репродуктивно. У вирусов на основе рекомбинаци-

онного процесса между родословными отдельных клонов может происходить генетический обмен. В зависимости от интенсивности последнего выделяются несколько типов вирусных популяций [2]. Однако способ генетического преобразования генетической структуры вирусной популяции любого типа остается неизменным. Генетическое преобразование вирусной популяции достигается за счет изменения соотношения между составляющими эту популяцию клонами и вытеснения одних клонов другими. В таких условиях тот или иной мутантный клон или клон, появившийся в результате рекомбинаций, благодаря своим селективным преимуществам или при своем выщеплении из популяции в результате случайных процессов (генетический дрейф), может получить огромное распространение. Вероятно, появление «новых» вирусов и эпидемических штаммов (азиатский и гонконгский вирусы гриппа, возбудители геморрагической лихорадки денге и геморрагического конъюнктивита, вирус о'ньон-ньонг и т. д.) обусловлено этими процессами.

Эволюция всех организмов протекает в определенной среде. Среда не является движущей силой эволюции, но и не служит пассивной ареной, на которой происходит ее действие. Она направляет ход эволюции. При постоянстве среды действует стабилизирующий отбор, устраняющий генетические новшества и поддерживающий стабильность популяции и вида в целом. При изменении условий существования вступает в действие направленный отбор, который подхватывает селективно ценные мутации и обеспечивает эволюционные сдвиги.

Рассматривая среду, в которой существуют вирусы, можно выделить клеточный уровень и уровень организма. Клетки позвоночных и членистоногих хозяев вирусов чрезвычайно консервативны. Есть основания думать, что они не претерпели каких-либо существенных структурных и биохимических изменений на протяжении последних 100 тыс. лет. В силу этого на уровне клетки вирусы занимают определенную экологическую нишу и сохраняют постоянство по таким характеристикам, как размер и организация генома и способ репродукции. Достигнутый баланс между паразитом и клеткой поддерживается стабилизирующим отбором, генетические новшества устраняются из популяции, эволюции не происходит. Увеличение или уменьшение генома полиовируса, например, не может закрепиться эволюционно. Увеличенная по размерам вирионная РНК не сможет прикрепиться к рибосомам, а уменьшенный геном будет не способен кодировать белки, необходимые для осуществления вирусного инфекционного цикла и построения вириона. Известно также, что уменьшение размера вирусного генома при утрате большого участка генетической последовательности или делеции в жизненно важной области дает летальный эффект. Делеционные мутанты (Ди-частицы) различных вирусов, как правило, не способны к самостоятельной репликации.

Консерватизм клетки не служит препятствием для изменчивости вирусов по ряду признаков, проявляющихся при взаимодействии вируса с клеткой, в том числе для изменения спектра хозяев, уровня вирулентности и способности к репродукции при повышенной температуре. Однако изменение этих характеристик не нарушает способ реализации генетической информации, свойственный тому или иному вирусу. *Ts*-мутации тогавирусов могут повреждать функцию генов, направляющих синтез РНК, созревание вирусных белков и сборку вириона, но не влияют на «стратегию» вирусного генома. «Стратегия» вирусного генома, под которой понимается способ реализации генетической информации и способ репродукции, не изменяется и при колебании вирулентности.

На уровне организма и при переходе от хозяина к хозяину условия среды постоянно изменяются, что приводит к эволюции вирусов по ряду «несущественных» признаков. Вирус гриппа, например, под давлением коллективного иммунитета изменяет антигенную структуру. Это создает иллюзию быстрой эволюции. Наступающие изменения, однако, затрагивают лишь некоторые гены и кодируемые ими признаки, не касаясь ни организации генома, ни способа репродукции. Изменение этих характеристик вируса может следовать лишь за эволюцией клетки. Эволюция последней происходит медленно, что определяет глубину эволюционного застоя и направление эволюции вирусов.

Итогом этой эволюции являются существующие в настоящее время вирусы. Большинство родов и семейств в царстве Vira представлены многочисленными видами, отличающимися по спектру хозяев, антигенной структуре и патогенным потенциям. Аденовирусы, например, специализированы к человеку, приматам, низшим млекопитающим и птицам. Аденовирусы человека различаются по антигенным свойствам и онкогенной активности. Эти многочисленные виды, однако, чрезвычайно близки по размеру и организации генома и идентичны по способу реализации генетической информации. Методом молекулярной гибридизации нуклеиновых кислот («вирусная археология») показано, что многие виды адено-, пикорна-, покс-, герпес- и ортомиксовирусов произошли от своих предков путем дивергенции и перестройки генов, определяющих тканевой тропизм, спектр хозяев, антигенные свойства и уровень вирулентности. Размер генома и способ репродукции не изменились. Эволюция по такому пути не вступала в противоречие с консерватизмом клетки. Именно на этом пути находятся существующие в настоящее время вирусы, доказательством чего служат процессы и явления, которые можно наблюдать в природе и в эксперименте.

Выражение совершающейся эволюции — насыщенность вирусных популяций мутациями. До последнего времени о данном явлении в основном судили по фенотипическим проявле-

ниям. Использование современных молекулярно-биологических методик позволило получить данные о неоднородности вирусных популяций на уровне гена. Рестрикционный анализ вирусной ДНК привел к открытию обширного класса жизнеспособных мутантов, обнаруженных в популяциях практически всех исследованных в этом отношении ДНК-геномных вирусов. Недавно жизнеспособные делеционные мутанты выявлены у РКН-геномных вирусов [4]. О широком спектре естественной изменчивости говорят также результаты изучения вирусного генома методом олигонуклеотидного картирования и данные о продуктах генов — белках, полученные при анализе олигопептидных карт.

В природных вирусных популяциях не только накапливается запас генетической изменчивости, но и происходят формообразовательные процессы. Об этом свидетельствуют генетические различия между штаммами одного и того же вируса, циркуляция антигенно различающихся вариантов и явление географической изменчивости. У вируса венесуэльского энцефаломиелита географическая изменчивость известна не только на уровне фенотипа (антигенная изменчивость, колебания вирулентности и различия в спектре хозяев), но и на уровне первичной структуры РНК [6].

При рассмотрении эволюции вирусов, помимо факта существования многочисленных видов, представляющих определенные роды и семейства, следует объяснить и происхождение этих крупных систематических категорий. Роды и семейства в царстве Vira существенно различаются по фундаментальным свойствам. Согласно [3], РНК-содержащие вирусы по особенностям организации генома и способу его транскрипции разделяются на четыре типа. Геном вирусов первого типа (характерный представитель — реовирус человека) представлен двухцепочечной фрагментированной РНК. Эта молекула служит матрицей для асимметричного синтеза вирусспецифических мРНК. Геном вирусов второго типа (полиовирус) содержит нефрагментированную «плюс»-нить РНК, которая функционирует в зараженной клетке в качестве мРНК. Вирусы третьего типа имеют нефрагментированный (вирус везикулярного стоматита) или фрагментированный (вирус гриппа) геном, который представлен «минус»-нитью РНК. Таким образом, однонитчатая вирионная РНК служит матрицей для синтеза мРНК, а не матрицей для синтеза белков. При транскрипции генома вирусов четвертого типа (вирус саркомы Рауса) происходит образование не РНК, а ДНК, которая выполняет роль матрицы при последующем синтезе мРНК. Образование ДНК на матрице РНК обеспечивается вирионной обратной транскриптазой. ДНК-транскрипт вирусного генома может интегрироваться в геном клетки.

Возможность существования столь различающихся форм

объяснима. Она заключается в чрезвычайном разнообразии и сложности биохимических и генетических систем и функционально-морфологических структур клетки. Происхождение этих форм неизвестно. Глубокие различия и специализация, проявляющаяся в уникальных способах реализации генетической информации, позволяют думать, что вирусы различных систематических групп (особенно РНК-содержащие вирусы) не связаны между собой эволюционно. Какие-либо связи между ними в большинстве случаев не прослеживаются. Переходные формы и мутации, ведущие к появлению промежуточных вариантов, неизвестны. По-видимому, подобные мутации относятся к числу «запрещенных». Вероятно, вирусы развились из многих источников, т. е. полифилетично. Различающиеся прародительские формы дали начало крупным систематическим категориям.

Существование в постоянной среде дает еще один эволюционный эффект — вырождение, или катаморфоз. Причиной катаморфоза является действие при отборе случайной выборки и отсутствие выборки систематической, а следствием — упрощение организации и повышение плодовитости [1]. С таким итогом эволюции можно встретиться при рассмотрении мелких РНК-геномных вирусов, для которых характерен короткий жизненный цикл и высокая урожайность. Наступающий при этом структурный и функциональный регресс не означает биологического регресса. Пикорнавирусы, которые, вероятно, прошли данный эволюционный путь, представляют собой многочисленную и процветающую группу, закрепившуюся в популяциях многих позвоночных хозяев.

Эволюция вирусов привела к образованию многочисленных широко адаптированных видов, получивших значительное распространение и стоящих на пути дальнейшего эволюционного развития. Борьба с этими вирусами, ввиду их эволюционной пластичности и способности противостоять изменению внешних условий, затруднена. К примеру, препятствием в борьбе с гриппом служит как изменение антигенной структуры возбудителя, так и его способность к резервации во внечеловеческих резервуарах. Наряду с этим существуют вирусы, которые в результате узкой специализации или катаморфоза зашли в эволюционный тупик и не смогли приспособиться к резкому изменению среды. Вирулентный полиовирус как высокоспециализированный паразит (один хозяин, строгий тканевой тропизм) при условии систематического глобального применения живой вакцины обречен на вымирание. В настоящее время вакцинация привела к ограничению инфекции во многих регионах. Вирус натуральной оспы уничтожен в естественных условиях как биологический вид. Предпосылкой успеха, помимо стабильности антигенной структуры возбудителя, послужила его глубокая специализация. Вирус натуральной оспы поражал только одного хозяина, человека, не вызывал хронических форм инфек-

ции, сопровождающихся длительным сохранением возбудителя в организме хозяина, и не переходил во внечеловеческие резервуары.

Рассмотренные закономерности эволюции вирусов имеют практическое значение. Очевидно, что вероятность внезапного появления новых вирусов, характеризующихся увеличенным размером генома и необычайным способом реализации генетической информации, крайне низка. Эволюция в этом направлении сдерживается консерватизмом клетки. Вместе с тем условия среды благоприятствуют эволюции уже существующих вирусов. Эта эволюция может протекать в неблагоприятном направлении. Ее возможным результатом может стать появление вирулентных вариантов возбудителя с повышенным эпидемическим потенциалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Серебровский А. С. Некоторые проблемы органической эволюции. М.: Наука, 1973.

2. Цилинский Я. Я. Генетика вирусов.— В кн.: Руководство по вирусологии/Под. ред. В. М. Жданова, С. Я. Гайдамович. М.: Медицина, 1981, т. 1.

3. Baltimore D. Expression of animal virus genomes.— Bacteriol. Rev., 1971, vol. 35, p. 235—241.

4. Leon A., Colantioni V., Pontarelli G., Cancedda R. Defective mutant of sindbis virus with a smaller-molecular weight form of the E_1 glycoprotein.— J. Virol., 1980, vol. 34, N 3, p. 599—603.

5. Mèrieux Ch., Moreau V., Roumiantzeff M. La Flévre de la Vallée du Rift.— Bull. Acad. Nat. Méd., 1980, vol. 194, N 5, p. 458—463.

6. Trent D. W., Clewley J. P., France J. K., Bishop D. H. L. Immunochemical and Oligonucleotide Fingerprint Analyses of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Complex Viruses.— J. Gen. Virol., 1979, vol. 43, p. 365—381.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ · 1983

Г. И. КАРПУХИН, С. С. ГАЛИТАРОВ, Д. Б. ГОЛУБЕВ

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСА ГРИППА В ЕСТЕСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ И В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В настоящее время в науке о гриппе резко противостоят друг другу две альтернативные гипотезы о природе пандемических и эпидемических штаммов вируса гриппа.

Согласно одной из них, грипп представляет собой зооантропоноз с природной очаговостью. Пандемические и эпидемические штаммы возникают за счет непрерывного обмена генами, кодирующими поверхностные антигены, между вирусами гриппа человека и животных в процессе генетической рекомбинации [4, 6].

Согласно другой гипотезе, грипп человека является строгим антропонозом, в генезе которого вирусы гриппа животных (или гены этих вирусов) никакой роли не играют [1—3, 13—16].

По сути дела, в основе обеих концепций лежит разное отношение к проблеме гетерогенности популяции вирусов гриппа А человека. Сторонники зооантропонозной концепции полагают, что серьезные генетические преобразования этой популяции (т. е. появление шифтовых вариантов) невозможны без «генетической помощи» [5] со стороны других популяций (вирусов гриппа А птиц, вирусов гриппа А млекопитающих и т. д.). Иными словами: собственный генофонд популяции вирусов гриппа А человека не может обеспечить указанных изменений. Его фактическая или потенциальная гетерогенность в расчет не принимается.

Сторонники антропонозной концепции — вольно или невольно (специально не аргументируя) исходят из того, что шифтовые изменения могут происходить и происходят за счет внутренних генетических резервов популяции вирусов гриппа А человека, связанных с ее фактической гетерогенностью по многим параметрам, в том числе и по антигенной структуре.

В свете двух этих альтернативных концепций различному толкованию подвергается и природа так называемых антигенных анахронизмов. Например, сторонники зооантропонозной природы гриппа людей полагают, что «в природных биоценозах района, из которого обычно приходят новые эпидемические

вирусы гриппа, **продолжается циркуляция вирусов, исчезнувших из человеческой популяции 10—20 лет назад** (*подчеркнуто нами*). Весьма вероятно, что в результате сложных экологических процессов, включая рекомбинации, некоторая часть штаммов из огромного разнообразия вирусов гриппа может быть вновь адаптирована к организму людей» [7, с. 156].

С другой стороны, Гиллеман (цит. по [19, с. 6]), обсуждая природу вируса А/Хабаровск/ 74/77 (H1N1), отметил, что «этот вирус... выходит за рамки своего времени... и, исключая какой-то человеческий резервуар, трудно указать, где же он прятался», т. е. для проявления антигенных анахронизмов не нужна ни рекомбинация между представителями разных популяций, ни переадаптация вирусов одной популяции на других хозяев.

В свете сказанного очевидно, что природа каждого нового антигенного анахронизма представляет значительный интерес и требует специального рассмотрения.

В настоящей работе описываются два новых антигенных анахронизма — H2N2 в Ленинграде и H0N1 в Киеве — и делается попытка обсудить их природу в свете упомянутых выше концепций.

Результаты и их обсуждение

С сентября 1979 г. по май 1980 г. в Ленинградском доме ребенка зарегистрировано три вспышки гриппа: первая — в сентябре — октябре 1979 г.; вторая — в январе — марте 1980 г.; третья — апреле — мае 1980 г.

Во время первой вспышки вирусы гриппа от детей выделены не были. По данным серологического анализа, эта вспышка была полиэтиологичной (сероконверсия у переболевших выявлена к ГА вирусов А/Хабаровск/92/77 (H1N1): А/Техас/1/77 (H3N2) и В/Гонконг/72.

Во время второй вспышки от четырех детей были выделены четыре штамма вируса гриппа, подобные вирусу А/Техас/1/77 (H3N2).

Третья вспышка началась 15.IV 1980 г. и продолжалась до 27.V 1980 г. Всего за этот период переболело 50 из 68 наблюдаемых детей (73,5 %) в возрасте от 3 мес. до 2 лет. Вспышки острых респираторных заболеваний имели место в четырех из пяти групп. Вирусологическому обследованию были подвергнуты пять детей: четверо больных и один здоровый. От трех больных и одного здорового удалось выделить пять штаммов вируса гриппа А (три — однократно, а два — при двукратном обследовании девочки в возрасте 2 года 5 мес.).

Перед началом третьей вспышки случаев заболевания ОРЗ у персонала не зарегистрировано. Лишь в конце вспышки в коллективе у двух медсестер были отмечены отчетливые признаки ОРЗ (без потери трудоспособности).

Таблица 1

Результаты исследования в РТГА парных сывороток крови 11 детей с синдромом ОРЗ из Дома ребенка в г. Ленинграде в феврале — июне 1980 г.

№ регистрации	Фамилия, имя	Возраст	Проба крови	Дата взятия крови	Титры антител к вирусам гриппа А (обратные величины			
					H0N1	H1N1	H2N2	H3N2
2	Смирнова Лена	3 года 11 мес.	I	12.II	0	0	0	0
			II	09.IV	0	0	20	0
124	Кучумова Галя	3 года	I	12.II	0	0	10	0
			II	09.IV	0	0	40	0
129	Черменский Юра	2 года 11 мес.	I	12.II	0	0	0	0
			II	31.III	0	0	20	0
163	Широков Слава	2 года	I	09.IV	0	20	0	0
			II	13.V	20	80	20	0
164	Золотухина Карина	1 год 9 мес.	I	09.IV	0	40	10	0
			II	13.V	0	160	40	0
166	Нуцкова Юля	2 года 5 мес.	I	13.V	0	0	<20	10
			II	01.VI	0	0	40	320
172	Кириллов Миша	2 года 3 мес.	I	07.II	0	40	10	10
			II	12.II	0	160	80	80
175	Ворожейкин Сережа	2 года	I	09.IV	0	0	<20	0
			II	13.V	0	0	40	0
188	Беляев Женя	3 года	I	21.II	0	0	<20	0
			II	09.IV	0	0	80	0
189	Беляев Сережа	2 года 3 мес.	I	09.IV	0	80	20	20
			II	13.V	20	320	80	80
260	Нестерова Ира	2 года	I	24.III	0	0	80	0
			II	13.V	0	0	320	0

Параллельно проводилось обследование подростков 15—17 лет — учащихся одного из наблюдаемого коллектива интернатного типа. В этом коллективе 2.V 1980 г. началась локальная вспышка ОРЗ в двух группах, каждая из которых насчитывала по 25 человек. Всего с 2.V 1980 г. по 27.V 1980 г. в этих группах из 50 человек переболело 13, семь из которых были подвергнуты вирусологическому обследованию. При этом от одного из них выделен вирус гриппа В, идентичный штамму В/Сингапур/222/79, от второго — вирус А/Ленинград/553/80, относящийся к сероподтипу А. Этот последний выделен 21.V 1980 г.

Одновременно обследована больная ОРЗ 24 лет из квартирного очага (спорадический случай). На третий день от начала заболевания выделен штамм вируса гриппа (А/Ленинград/617/80). Других случаев заболеваний ОРЗ в семье не было. Возможных контактов между тремя случаями выделения вирусов гриппа А, а также случаев заноса инфекции в очаги установить не удалось. Серологический анализ показал, что на протяжении февраля — мая у 11 детей (из общего числа наблю-

даемых в доме ребенка 68 детей) были отмечены четырехкратные (и более) приросты антигемагглютининов к вирусу А/Сингапур/1/57 (табл. 1). У шести детей (№ регистрации 2, 124, 129, 175, 188, 260) имела место изолированная сероконверсия к вирусу А (H2N2), причем у одного из них (№ 175) 12.V 1980 г., т. е. до второго забора крови, был выделен вирус А с антигенной структурой (H2N2).

У четырех детей (№ регистрации 163, 164, 172, 189) обнаружены сочетанные сероконверсии: к ГА вирусов А/H2N2 и А/H1N1 (№ 164), к ГА вирусов А/H2N2, А/H1N1 и А/H3N2 (№ 172), к ГА вирусов А/H2N2, А/H1N1 и H0N1 (№ 163), к ГА вирусов А/H2N2, А/H0N1, А/H1N1, и А/H3N2 (№ 189).

Особый интерес представляла девочка (сыворотка № 166), у которой были выявлены приросты титра антител к ГА вирусов А/H2N2 и А/H3N2. У нее 14.IV 1980 г. на седьмой день заболевания выделен вирус А/Техас/1/77 (H3N2), а 19 и 22.V 1980 г. во время повторного заболевания, протекавшего с повышением температуры тела до 39°, были выделены два вируса с антигенной структурой А/H2N2. Два таких же вируса выделены от детей без сероконверсии.

У подростка Б., 16 лет, от которого в другом очаге 21.V 1980 г. на шестой день заболевания был выделен вирус А/H2N2, прироста титра антигемагглютининов к H2 не обнаружено, в то время как к ГА вируса А/Техас/1/77 (H3N2) титр антител возрос за время болезни в четыре раза.

Результаты серологического обследования больной Т. Е., 24 лет, от которой на третий день заболевания был выделен вирус А/Ленинград/617/80 (H2N2), свидетельствуют о том, что у этой больной имела место изолированная сероконверсия к ГА H2, не выявлявшаяся после обработки сывороток меркамином.

Помимо трех указанных очагов, сведения о циркуляции вирусов А/H2N2 в г. Ленинграде получены при серологическом обследовании 599 детей и 534 взрослых, госпитализированных в мае — ноябре 1980 г. в клинике ВНИИ гриппа Минздрава СССР по поводу ОРЗ. В первом случае значимая сероконверсия к ГА H2 была выявлена у 5,5 %, а во втором у 8,8 % всех обследованных. В 2,0 % случаев у детей и в 4,3 % случаев у взрослых эти сероконверсии сопровождались нарастанием титров антител к гемагглютининам других сероподтипов — H3 и H1, что позволяет думать о возможности анамнестических реакций. Вместе с тем у 3,5 % детей и 4,5 % взрослых диагностически значимый прирост титров антигемагглютининов наблюдали только с антигеном H2.

Особенно показательны в этом отношении изолированные сероконверсии в ГА H2 вируса А/Сингапур/1/57, выявленные у трех новорожденных, больных ОРЗ в раннем неонатальном периоде.

Выборочные исследования семи парных сывороток с четы-

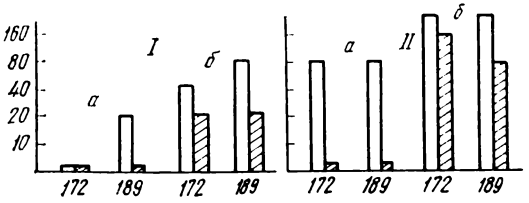


Рис. 1. Дифференциация иммуноглобулинов *M* и *G* в парных сыворотках людей, переболевших в мае 1980 г.

Образцы сывороток — обработанные меркамином *(заштрихованное)* и не обработанные *(незаштрихованное)*. *I, II* — сыворотки.

рехкратным (и более) приростом титра антител к H2 в отношении антител разного класса в двух случаях выявили свежее инфицирование вирусом А/Сингапур/1/57 (у ребенка 9 лет — сыворотка № 172 и у взрослого 48 лет — сыворотка № 189; рис. 1).

Как уже отмечалось, всего в трех очагах, находящихся в разных районах города, с 15.IV по 27.V 1980 г. было выделено семь вирусов гриппа серотипа А. Вирусы выделялись при первичном внутриамниотическом заражении 10-дневных куриных эмбрионов с высокими гемагглютинирующими титрами (1 : 512—1 : 1024).

Результаты постановки РТГА с четырьмя из них и диагностическими гипериммунными антисыворотками к вирусам H_{sw}1N1, H0N1, H1N1, H2N2 и H3N2 приведены в табл. 2. Из нее видно, что все указанные штаммы четко идентифицируются как вирусы, содержащие гемагглютинин второго серотипа, аналогичный гемагглютинину вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2).

При идентификации нейраминидазного (НА) компонента выделенных вирусов было установлено следующее. По соотношению ГА-активности к НА-активности вирусы А/Ленинград/80 оказались весьма близки к эталону А/Сингапур/-/57 (H2N2). $ТИН_{50}$ этих штаммов был аналогичен данному показателю у вируса А/Сингапур/1/57 (H2N2), а также у вирусов А/Хабаровск/1/77 (H1N1 (табл. 3).

Из результатов постановки РПНА с четырьмя выделенными вирусами А/Ленинград/553/80, А/Ленинград/527/80, А/Ленинград/549/80, А/Ленинград/566/80 и гипериммунными кроличьими антисыворотками к рекомбинантным штаммам вируса гриппа (табл. 4) следует, что все ленинградские штаммы содержат нейраминидазный компонент, четко идентифицированный — в пределах сероподтипов — как N2 (like А/Сингапур/1/57).

Сравнительный анализ полипептидного состава электрофоретической подвижности фрагментов РНК, а также молекулярная гибридизация РНК — РНК с регистрацией подвижности дуплексов в Уф-свете после окраски бромистым этидием не выявили различий между вирусами А/Ленинград/80 (H2N2) и эталоном А/Сингапур/1/57 (H2N2). Сходство одного из изолятов — вируса А/Ленинград/549/80 — с эталонными вирусами А(H2N2) 1957—1960 гг. выделения было выявлено также при

Результаты РТГА с крысиными антисыворотками к в г. Ленинграде в мае — июне 1980 г. сравнительно с эталоном

Вирус	Сыворотка *					
	A /Swine/ 1976/31 (H_{sw}1N1)	A /WSN/ 33 (H0N1)	A /PR/ 8/34 (H0N1)	A /FM/ 1/47 (H1N1)	A /Нидерланды/ 36/56 (H1N1)	A/ Сингапур/ 1/57 (H2N2)
A /Ленинград/ 557/80	<20	<20	<20	<20	<20	320
A /Ленинград/ 549/80	<20	<20	<20	<20	<20	320
A /Ленинград/ 553/80	<20	<20	<20	<20	<20	320
A /Ленинград/ 566/80	<20	<20	<20	<20	<20	320
A /Сингапур/ 1/57	<20	<20	<20	<20	<20	640

* Гомологичный титр сыворотки 1:320 — 1:640.

олигонуклеотидном картировании этих штаммов, проведенном Нэнси Кокс (Центр по контролю за инфекционными заболеваниями, Атланта, США) (рис. 2, *а — в*).

Ранее сообщалось, что из систем персистентной гриппозной инфекции в клеточных культурах выделяются вирусы, отличные по своей антигенной структуре от вирусов, взятых для моделирования персистенций. В частности, из системы ДКЛЧ — вирус А/Виктория/35/72 (H3N2) — выделено несколько агентов с антигенной формулой А(H2N2) [8, 9]. Один из этих агентов, выделенный М. Н. Медведевой во ВНИИ гриппа в 1975 г. на трехклеточном пассаже из персистентной системы ДКЛЧ — вирус А/Виктория/35/72, был использован для сравнительного анализа с вирусами А(H2N2) 1957—1980 гг. выделения.

В табл. 5 приведены результаты перекрестной РТГА с вирусом А/Перс./75 (H2N2), эталоном А/Сингапур/1/57 (H2N2), вирусами А/Ленинград/80 (H2N2) и гипериммунными антисыворотками к ним. Эти результаты были подвергнуты обработке по модифицированным критериям родства и симметрии вирусов с определением суммы (Σ) и разности (Δ) нормализованных титров (НТ) [13] (рис. 3). Как видно из рис. 3, оба штамма 1980 г. выделения оказались практически идентичными эталону А/Сингапур/1/57 (H2N2), так как и ΣНТ и ΔНТ равнялись 0,3. Персистентный вирус 1975 г. выделения оказался близкородственным эталону А/Сингапур/1/57 (H2N2) (ΣНТ-0,91), но асимметричным и младшим по отношению к нему антигенным мутантом (ΔНТ-0,91). Антисыворотка к этому вирусу тормози-

Таблица 2

вирусам, выделенным А /Сингапур/ 1/57 (H2N2)

А /Гонконг/ 1/68 (H3N2)	А /Виктория/ 35/72 (H3N2)	А /Техас/ 1/77 (H3N2)	А /Ленинград/ 549/80 (H 2N2)
<20	<20	<20	640
<20	<20	<20	640
<20	<20	<20	320
<20	<20	<20	320
<20	<20	<20	640

ла гемагглютинирующую активность других вирусов H2N2 лишь до 1/8—1/16 их гомологичного титра, в то время как при обратной постановке эта величина достигала единицы или превосходила ее.

При анализе полипептидного состава вирусиндуцированных белков нами установлено, что персистентный вирус 1975 г. выделения отличается от вирусов H2N2 1957 и 1980 гг. выделения подвижностью полипептида NS-белка. Мутация в гене, кодирующем NS-белок, была обнаружена также в персистентном вирусе А/Перс./ 75 (H2N2) Ю. З. Гендоном и А. И. Климовым при постановке РНК—РНК гибридизации по методу Хэй и др. [19]. Эти же исследователи нашли, что персистентный вирус H2N2/75, отличаясь лишь по восьмому гену от эталона А/Сингапур/ 1/75 (H2N2), отличается по всем восьми генам от вируса /Виктория/ 35/72 (H3N2), взятым для конструирования персистетной модели, из которой вирус H2N2/75 был выделен.

В 1979 г. Хиллеман [2] суммировал информацию о так называемых анахронизмах выделения вирусов гриппа А/H_{sw}1H1, А(H0N1), А(H1N1). Согласно этой сводке, вирусы H_{sw}1N1 выделялись как анахронизмы в 1976 г. в США; вирусы H0N1 — в 1949 г. среди эскимосов, а также у французских детей, в 1950 г.— у канадских детей; вирусы H1N1 — в 1936—1941 гг. (три изолята), а также с 1977 г.— повсеместно.

Указанная сводка не исчерпывает всех случаев выделения антигенных анахронизмов. Так, с октября 1964 г. по январь 1965 г. в г. Алма-Ате было выделено 19 штаммов вируса гриппа А(H0N1) [10]. Аналогичное явление наблюдалось в 1976 г. в г. Киеве [16, 17]. В 1974 г. вирусы с антигенной структурой H1N1 были выделены в Болгарии [11]. В 1979 г. в Австралии от ребенка, больного ОРЗ, выделили вирус А(H3N2) подобный, но не идентичный штамму А/Aichi/1/68 [21].

В настоящем сообщении приводятся данные о новом анахронизме (H2N2) в 1980 г. в г. Ленинграде. Аутентичен (истинен) ли он?

Можно назвать два объективных критерия такой истинности, позволяющих исключить внутрилабораторную контамина-

Таблица 3

Сравнительная характеристика НА-компонентов вирусов гриппа А, выделенных в г. Ленинграде в мае 1980 г. и эталонов 1957—1977 гг. выделения

Тест	Вирус				
	А/Хабаровск/74/77 (H1N1)	А/Сингапур/1/57 (H2N2)	А/Гонконг/1/68 (H3N2)	А/Техас/1/77 (H3N2)	А/Ленинград/80*
Соотношение ГА/НА активности	1,5	5,0	3,5	2,3	4,6
$ТИН_{50}$ (t, °С)	55,0	55,5	53,0	47,0	55,0
ТИТР в РПНА, % к гомологичному титру с вирусом Х-7 (H0N2)	1	100	15	1	95

* Семь штаммов.

Таблица 4

РПНА с вирусами гриппа А, выделенными в г. Ленинграде в апреле — мае 1980 г.

Вирус	Антисыворотки к вирусам		
	Х—7 (H0N2) *	Р—7 (Heq N1) **	Р—9 (Heq N2) ***
А/Ленинград/553/80	1200	<20	<20
А/Ленинград/527/80	1280	<20	<20
А/Ленинград/549/80	1280	<20	<20
А/Ленинград/566/80	1100	<20	<20
А/Сингапур/1/57 (H2N2)	1280	<20	<20
А/Хабаровск/72/77 (H1N1)	<20	800	<20
А/Техас/1/77 (H3N2)	<20	<20	2560

* H0 (A/WSN/33) N2 (А/Сингапур/1/57) — получен доктором Е. Килбурном.
** Heq/Прага N1 (А/Хабаровск/72/77) — получен доктором Н. Е. Горевым.
*** Heq/Прага N2 (А/Техас/1/77) — получен доктором Н. Е. Горевым.

Таблица 5

Результаты перекрестных РТГА разных вирусов H2N2 с антисыворотками к ним

Вирусы	Сыворотка			
	А/Сингапур/1/57 (H2N2)	А/Перс./75 1/57 (H2N2)	А/Ленинград/549/80 (H2N2)	А/Ленинград/553/80 (H2N2)
А/Сингапур/1/57 (H2N2)	**640**	80	320	320
А/Перс./75 (H2N2)	2560	**640**	640	640
А/Ленинград/549/80 (H2N2)	640	80	**640**	320
А/Ленинград/553/80 (H2N2)	320	40	80	**320**

цию и другие артифициальные причины: 1) наличие достоверных иммунологических показателей, свидетельствующих об этиологической роли выделенного вируса в генезе данных инфекций; 2) сведения о неидентичности лабораторным эталонам.

Первый критерий был использован при расшифровке природы острых респираторных заболеваний в 1976 г. в США, когда от людей выделялись вирусы с антигенной структурой $H_{sw}1N1$, второй — при лабораторном изучении вируса A(H3N2), выделенного от ребенка в Австралии в 1979 г. [21]. В последнем случае при неясной серологии было установлено, что выделенный агент не идентичен эталону A/Aichi/1/68 (H3N2) и, следовательно, его выделение не является итогом лабораторной контаминации.

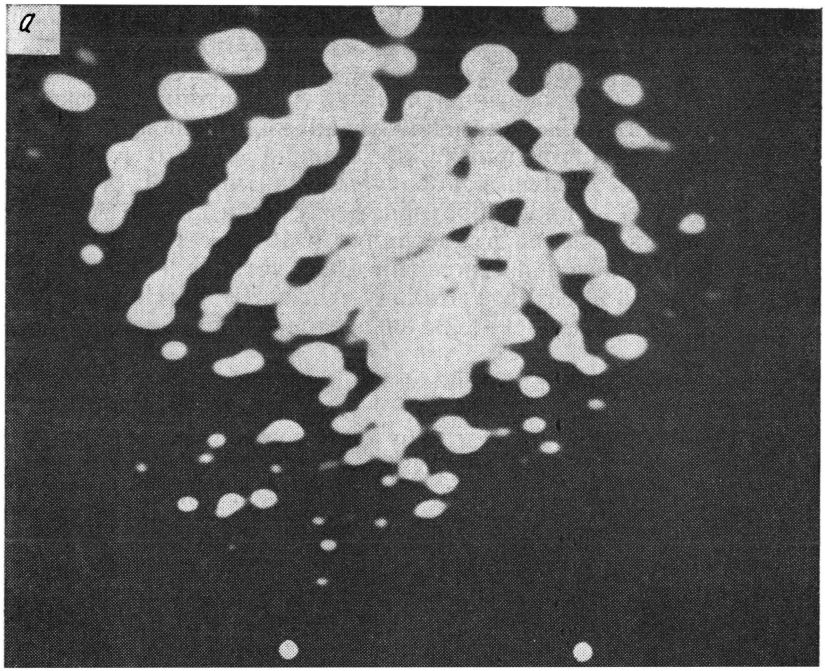
Применительно к описанным в настоящем сообщении материалам необходимо отметить следующее.

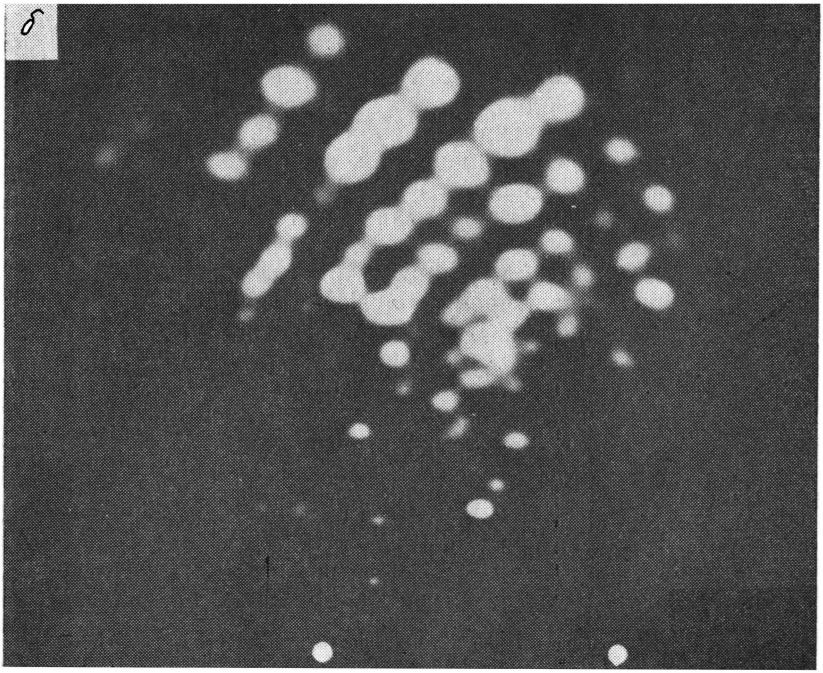
Результаты лабораторного изучения вирусов A/Ленинград/80 (H2N2) свидетельствуют об их бесспорной близости к эталонным вирусам A(H2N2) 1957—1960 гг. выделения. В этих условиях решающее значение для правильной интерпретации всех данных в целом имеют итоги серологических исследований.

Как видно из представленных выше материалов, в г. Ленинграде в 1980 г. имели место достоверные сероконверсии к ГА вирусов A(H2N2), позволяющие считать, что выделенные вирусы были этиологическими факторами заболеваний в данное время. Так, у 11 детей в Доме ребенка были документированы четырехкратные (и более) приросты титра антигемагглютининов к H2, в том числе в шести случаях — изолированная сероконверсия только к одному этому антигену. У одного ребенка это сочеталось с выделением вируса H2N2. Весьма достоверны также сведения об изолированной сероконверсии к антигену H2 у 3,5 % (из обследованных) детей и у 4,5 % (из обследованных) взрослых, госпитализированных в мае — ноябре 1981 г. по поводу ОРЗ.

Также аутентичным (истинным) оказалось выделение вирусов с антигенной структурой A(H0N1) в г. Киеве в 1981 г. Два штамма — A/Киев/271/81 и A/Киев/277/81, изолированные от больных ОРЗ в Киевском научно-исследовательском институте инфекционных болезней, были сопоставлены во ВНИИ гриппа Минздрава СССР со всеми эталонными штаммами сероподтипа H0N1 1933—1946 гг. выделения по антигенному профилю ГА и НА (табл. 6 и 7), полипептидному составу и гетерогенности РНК. При этом установлено, что по всем перечисленным параметрам указанные штаммы атипичны, не походят ни на один из исследованных эталонов и, следовательно, не могут рассматриваться как лабораторные контаминанты.

Таким образом, оба описанных в настоящей статье антигенных анахронизма должны быть причислены к категории истинных, и ими необходимо дополнить перечень анахронизмов, из-


а


б

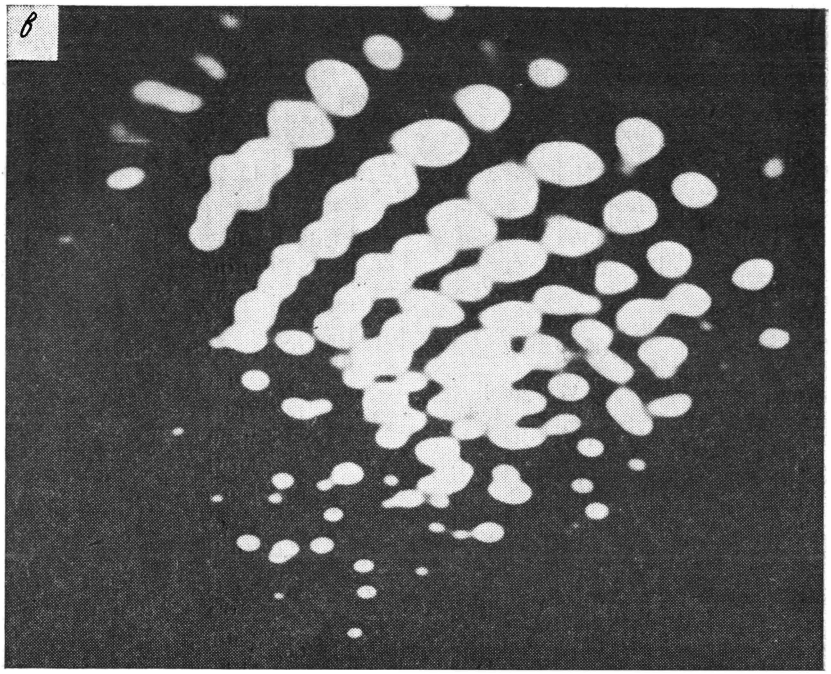


Рис. 2. Олигонуклеотидное картирование вирусов А /Ленинград/ 549/80 (*а*), А/Сингапур/ 1/57 (*б*), А/Ann Arbor/ 6/60 (*в*) (доктор Кокс, Атланта, США).

вестных ранее [20]. Что касается персистентного вируса А/H2N2/75, то его выявление в культуре ткани нельзя объяснить контаминацией клеток эталонными вирусами в силу мутантности (по *NS*-гену) этого агента. Его появление в системе должно быть отнесено за счет генетических преобразований генофонда популяции вируса гриппа при его персистировании.

Каково же истинное происхождение вирусов H2N2/80 и H0N1/81?

В 1978 г. в [23] указали на три возможности генетической и антигенной консервации вирусов, лежащих в основе антигенных анахронизмов: 1) сохранение вирусов в замороженном состоянии; 2) генетическое сохранение вирусов в неизвестном животном резервуаре; 3) сохранение вирусов в латентной и еще невыясненной форме у людей.

Нам представляется, что к происхождению описанных нами анахронизмов имеет отношение третье положение. Об этом же говорится и в [22], где предполагается, что одним из возможных механизмов антигенной изменчивости вируса гриппа является его «персистенция в измененной форме у людей, перебо-

Таблица 6

РТГА с вирусами гриппа А, выделенными в 1981 г. в г. Киеве, и набором крысиных антисывороток

Вирус	Сыворотка													
	А/Киев/271/81	А/Киев/277/81	А/WSN/33	А/PR/8/34	А/Mell/35	А/Bell/42	А/Weiss/42	А/Ленинград/— 19/46	А/Шклявер/— 1/48	А/Хабаровск/— 74/77	А/Бразилия/— 11/78	А/Ленинград/— 879/56	А/Сингапур/— 1/56	А/Гонконг/— 1/68
А/Киев/271/81	**2560**	2560	640	320	160	*	80	40	320					
А/Киев/277/81	2560	**2560**	640	640	80		80	40	320					
А/WSN/33	160	320	**2560**	160	640				2560					
А/PR/8/34	320	640	80	**1280**	20	40	20	160	40					
А/Mell/35	320	160	640	160	**1280**		20		80					
А/Bell/42	20	20		40		**1280**	160							
А/Weiss/43	320	160	160	160	160	640	**640**							
А/Ленинград/ 9/46	1280	640	80	1280	320	40	20	**320**	40					
А/Шклявер/ 1/48	320	320	2560	160	1280			20	**2560**					
А/Хабаровск/ 74/77										**1280**				
А/Бразилия/ 11/78											**1280**			
А/Сингапур/ 1/57													**2560**	
А/Гонконг/ 1/58														**1280**

* Титр реакции <1 : 20.

Таблица 7

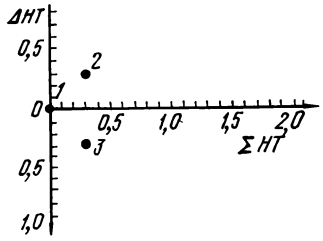
РПНА с вирусами, выделенными в г. Киеве весной 1981 г. (рекомбинаты получены доктором Н. Е. Горевым)

Вирус	Сыворотки к вирусам		
	X—1223* (H3N1)	P—7** (HeqN1)	P—9*** (HeqN1)
А /Киев/ 271/81	400	<20	<20
А /Киев/ 277/81	310	<20	<20
А /Ленинград/ 9/46	**320**	<20	<20
А /Хабаровск/ 72/77 (H1N1)	<20	**1280**	<20
А /Техас/ 1/77 (H3N2)	<20	<20	**360**

* H3 (А/ГК/1/68) N1 (А /Ленинград/ 9/46).
** Heq /Прага N1 (А /Хабаровск/ 72/77).
*** Heq /Прага N2 (А /Техас/ 1/77)

Рис. 3. Иерархические взаимоотношения ГА-антигенов вирусов гриппа А/Ленинград/80 (H2N2), А/Перс./ 75 (H2N2) и А/Сингапур/ 1/57 (H2N2).

ΣНТ — сумма нормализованных титров, ΔНТ — разность нормализованных титров. *1* — вирус А /Сингапур/ 1/57, *2* — вирус *А* /Ленинград/ 549/80, *3* — вирус А /Ленинград/ 553/80, *4* — вирус А /Перс./ 75.



левших острой формой заболевания». Мы полагаем, что появление антигенных анахронизмов у людей — клинико-эпидемическое проявление гетерогенности популяции вирусов гриппа А людей, а выделение измененных по антигенной структуре вирусов из системы персистентной гриппозной инфекции в культуре ткани [8, 9] — лабораторное проявление того же феномена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беляков В. Д. К вопросу о миграции генов вируса гриппа в биосфере (по поводу гипотезы, выдвинутой В. М. Ждановым, Д. К. Львовым и Л. Я. Закстельской).— ЖМЭИ, 1979, № 2, с. 113—116.

2. Голубев Д. Б. Некоторые актуальные аспекты учения об антигенной изменчивости вируса гриппа.— Вопр. вирусол., 1975, № 1, с. 117—121.

3. Голубев Д. Б. К вопросу о путях и механизмах антигенной изменчивости вируса гриппа.— ЖМЭИ, 1980, № 11, с. 107—113.

4. Жданов В. М., Львов Д. К., Закстельская Л. Я. Миграция вирусов гриппа в биосфере (гипотеза и ее обоснование).— ЖМЭИ, 1978, № 7, с. 17—21.

5. Закстельская Л. Я. Итоги научной дискуссии о происхождении вирусов гриппа.— Вопр. вирусол., 1980, № 4, с. 499—506.

6. Львов Д. К., Жданов В. М., Сазонов А. А. и др. Антигенные связи штаммов эпидемического вируса H1N1, выделенных в ноябре — декабре 1977 года в СССР с вирусами гриппа человеческого и животного происхождения.— Вопр. вирусол., 1978, № 2, с. 151—156.

7. Львов Д. К., Подчерняева Р. Я., Вебетер Р. и др. Получение рекомбинантов, антигенно идентичных циркулирующим в природе штаммам вируса гриппа.— Вопр. вирусол., 1979, № 5, с. 493—498.

8. Медведева М. Н. Моделирование и изучение хронической гриппозной инфекции в клеточных культурах.— В кн.: Проблемы гриппа и острых респираторных заболеваний. Л., 1975, № 12, с. 23—27.

9. Медведева М. Н., Голубев Д. Б. Персистенция вируса гриппа в клеточных культурах и антигенная структура выделяемых вирусов (факты и гипотезы).— Вестн. АМН СССР, 1977, № 7, с. 27—39.

10. Михайлов Г. Г., Жуматов Х. Ж., Черетенко Н. Л. Новая встреча со старым вирусом гриппа типа А.— Здравоохранение Казахстана, 1965, № 4, с. 30—37.

11. Николова З., Коцева Р. Сравнительный антигенный анализ гемагглютининов штаммов вируса гриппа А(H1N1) 1946—1977 гг. выделения.— В кн.: Проблемы гриппа и ОРЗ. Л., 1979, с. 23—28.

12. Парамонова М. С., Беляева Т. А., Голубев Д. Б. К вопросу о математических методах таксономии вирусов гриппа типа А.— В кн.: Проблемы гриппа и ОРЗ. Л., 1978, с. 14—19.

13. Смородинцев А. А. Гипотезы и факты о происхождении пандемических штаммов вируса гриппа.— Вопр. вирусол., 1975, № 1, с. 105—113.

14. Смородинцев А. А., Лузянина Т. Я. Прогноз антигенной изменчивости вируса гриппа А на ближайшие годы.— Вестн. АМН СССР, 1978, № 9, с. 61—69.

15. Смородинцев А. А., Лузянина Т. Я., Александрова Г. И., Тарос Л. Ю. Обоснование антропозной природы пандемических вирусов гриппа А людей.—Вопр. вирусол., 1981, № 2, с. 250—254.

16. Смородинцев А. А., Лузянина Т. Я., Иванова Н. А. Возвращение вируса гриппа А-прим и проблема происхождения пандемических штаммов.— Вопр. вирусол., 1979, № 1, с. 87—90.

17. Фролов А. Ф., Щербинская А. М., Рыбалко С. Л. Явление длительной циркуляции вируса гриппа АО в организме.— Микробиол. ж., 1978, № 1, с. 102—104.

18. Фролов А. Ф., Щербинская А. М., Рыбалко С. Т. и др. Персистенция вируса гриппа АО в организме.— Докл. АН УССР. Сер. Б, 1978, № 2, с. 174—175.

19. Hay A. J., Skehel I. J., Webster R. G. Differentiation of the hamogglutinin genes of variant influenza viruses by RNA — RNA hybridization.— J. Gen. Virol., 1979, vol. 45, p. 245—248.

20. Hilleman M. R. Комментарии о гриппе A(HlNl) 1977—1978 гг.— В кн.: Молекулярная биология вируса гриппа. М., 1979, с. 6—8.

21. Moore B. W., Webster R. G., Bean W. I. et al. Reappearence in 1979 of a 1968 Hong-Kong-Like influenza virus.— Virology, 1980, vol. 109, N 1, p. 219—222.

22. Stuart-Harris Ch. The epidemiology and prevention of influenza.— Amer. Sci., 1981, vol. 69, N 2, p. 166—172.

23. Webster R. G., Schild G. C. From the John E. Fogarty International Center for Advaneed studi in the Health Sciences.— J. Infections Disease, 1978, vol. 138, N 1, p. 110—113.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ • 1983

Т. И. ДЖИВАНЯН

РАЗЛИЧИЯ ВИРУСОВ КОМПЛЕКСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ПО ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИХ ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ К ДЕЙСТВИЮ ДЕТЕРГЕНТОВ И ПО ОЛИГОПЕПТИДНЫМ КАРТАМ ГЕМАГГЛЮТИНИНОВ

Задача разработки генетических признаков вируса клещевого энцефалита (КЭ) и изучения механизмов их проявления тесно связана с теоретическими проблемами генетики, с вопросами происхождения и эволюции арбовирусов, классификации этих вирусов, а также с решением ряда прикладных задач идентификации вирусов, разработке критериев оценки аттенуированных штаммов вируса КЭ.

В настоящее время в литературе имеется много сведений о существовании различных штаммов и клонов вируса КЭ по разнообразным фенотипическим эффектам. Многие из фенотипических признаков отнесены к категории генетических маркеров на основании того, что они характеризуют отдельные чистые линии вирусов и наследуются на протяжении многочисленных пассажей. В зависимости от характера проявления описанные генетические признаки вируса КЭ подразделяются на признаки, проявляющиеся при размножении вирусов в культуре клеток: бляшкообразование, термочувствительность цикла репродукции, цитопатическая активность, интерфероногенность и интерфероночувствительность [8—10, 12, 19, 21, 36—38]; патогенетические маркеры, характеризующие степень патогенности вируса для различных хозяев, патогенетические особенности вируса [22, 23, 25—27, 36, 40], антигенные маркеры [15, 20], маркеры, основанные на физико-химических свойствах вируса: хроматографическое поведение вируса [16, 42,], термочувствительность [38], плавучая плотность вирионов [14], чувствительность к денатурирующему воздействию мочевины [41]. Особенно важным представляется изучение комплекса признаков, связанных с особенностями вирусоспецифических белков и нуклеиновых кислот, поскольку они отражают биохимическую основу изменчивости и позволяют вскрыть механизм функциональных дефектов вариантов вируса КЭ. Ценными с практической точки зрения являются исследования по изучению корреляций различных фе-

нотипических эффектов вируса КЭ с его патогенностью [9, 11, 24], а также с экологическими характеристиками вирусов [3, 28—30, 32, 44].

В данной работе описываются результаты сравнительного изучения штаммов вируса КЭ, различающихся по нейровирулентности и экологическим характеристикам, методами, позволяющими определить некоторые физико-химические свойства вируса (чувствительность гемагглютининов к действию детергенов, олигопептидное картирование вирионного белка V_3 (Е).

Материал и методы исследований

Вирус. Использовано девять штаммов вируса КЭ: Софьин, Хипр, Хабаровский-9, № 204, Скалица, № 256, ЭК-328, Хабаровский-17 и штамм ТП-21 вируса Лангат. Подробная история выделения и пассажей взятых в работу штаммов приведена в работах [5, 6].

Выращивание вируса, получение антигенов, очистка вирусов, электрофорез вирионных белков в полиакриламидном геле производили по методам, описанным ранее [2, 4, 32, 34, 44].

Олигопептидное картирование гликопротеида V_3 сравниваемых штаммов проводили по методу, описанному В. М. Ждановым и др. [7].

Обработка детергентами. К каждому образцу вирусного белка добавляли детергент до конечной концентрации 0,1 %. Параллельно ставили контроль вирусного антигена и контроль детергента. Время контакта равнялось 20 мин при комнатной температуре. После окончания контакта пробы титровали в РГА, которую осуществляли с помощью макро- и микрометодов согласно [31].

Результаты и их обсуждение

Как видно из таблицы, штаммы вируса КЭ различаются по чувствительности их гемагглютининов к детергентам. Гемагглютинирующая активность (ГА) частично очищенных вирионов штамма Скалица вируса КЭ и штамма ТП-21 вируса Лангат понижалась до нуля после обработки всеми использованными в работе детергентами. ГА-активность антигенов европейских штаммов Хипр, № 204, Еж-13 была полностью устойчива к действию гиамина 10-Х, а у дальневосточных штаммов Софьи, Хабаровский-9, Хабаровский-17 — частично чувствительна к действию этого детергента. ГА-активность частично очищенных вирионов всех изученных штаммов в разной степени подавлялась детергентами тритоном-Х-100 и дезоксихолатом натрия (ДХ). Характеристики различной чувствительности штаммов к детергентам были стабильны при пассажах вируса на мышах, и, сле-

Влияние детергентов на ГА-активность штаммов вируса КЭ

Детергент	Штамм вируса КЭ						
	Софьин	Хаб-17	Хипр	Еж-13	204	Скалица	ТП-21 Лангат
Контроль	128*	128	128	128	128	128	32
Гиамин 10-Х	64	32	256	128	128	0	0
Тритон Х-100	32	32	16	32	16	0	0
ДХ	32	16	32	64	32	0	0

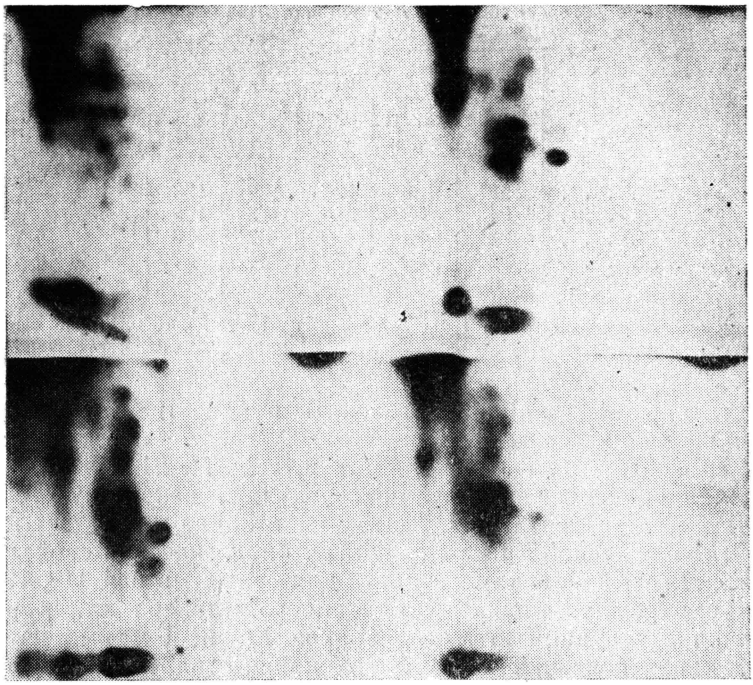
* Обратная величина титра гемагглютинина культурального частично очищенного вируса при pH 6,4.

довательно, их можно использовать в качестве маркеров при группировании штаммов.

Европейский штамм Скалица и штамм ТП-21 вируса Лангат выделялись среди изученных штаммов повышенной чувствительностью к детергентам. Эти штаммы отличаются от эталонных штаммов вируса КЭ по ряду других биологических свойств, и в частности по нейровирулентности для белых мышей [18, 19, 33]. Для определения ценности описанного маркера как критерия степени аттенуации штаммов вируса КЭ необходимо изучение этой характеристики у большего количества штаммов вируса КЭ с пониженной нейровирулентностью, изучения сохранения признака чувствительности ГА-активности антигенов к детергентам при реверсии вирусных мутанов по признаку нейровирулентности. Самостоятельное значение имело бы изучение связи характеристики чувствительности к детергентам с экологическими характеристиками вирусов на большем количестве штаммов, свежевыделенных из различных очагов вируса КЭ.

На рисунке представлены данные по сравнительному изучению штаммов вируса КЭ, выделенных на Западе и Востоке Евразии из различных источников, методом олигопептидного картирования вирионного белка V_3 (Е). Этот раздел работы был выполнен совместо с академиком В. М. Ждановым. Расположение пятен, их интенсивность весьма сходны у двух дальневосточных штаммов (Софьин и Хабаровский-9) и штамма Эк-328 выделенного из клещей *Ixodes persulcatus* в Эстонской ССР. Расположение ряда пятен штамма 256, выделенного из клещей *Ixodes ricinus* в Белоруссии, отличается от расположения пятен трех указанных штаммов при наличии общего каркаса олигопептидов у всех изученных штаммов.

В течение многих лет ведется дискуссия о существовании географических вариантов вируса КЭ [1]. С помощью антигенного маркера вирус клещевого энцефалита был разделен на два антигенных подтипа — восточный и западный [13]. При изучении большого количества штаммов (более 65) различного геогра-



Олигопептидные карты кликопротеидов V_3 штаммов вируса КЭ.

фического происхождения, выделенных из различных источников, эти штаммы впервые удалось сгруппировать в зависимости от двух основных видов клещей-переносчиков вируса КЭ — *Ixodes persulcatus* и *Ixodes ricinus* [3]. Применение маркера позволило получить первые экспериментальные факты в пользу гипотезы существования экологических субтипов вируса клещевого энцефалита и существенной роли природных хозяев и клещей (в первую очередь) в формировании этих субтипов, в эволюции вируса КЭ.

Использование метода олигопептидного картирования подтвердило существование различной между штаммами вируса КЭ, коррелирующих с такими экологическими характеристиками, как происхождение штаммов из очагов, отличающихся по виду клеща-переносчика. Было установлено, что эти штаммы имеют отличие в структуре вирионного белка V_3.

Для решения проблем современной «молекулярной» эпидемиологии и экологии вируса КЭ, касающихся вопросов родства и различий штаммов и вирусов комплекса КЭ, механизма изменчивости штаммов в условиях сложившихся природных очагов клещевого энцефалита, роли природных хозяев в изменчивости штаммов, вопросов природы и размеров изменений, вовлекае-

мых в процесс аттенуации вируса, вопросов стабильности вакцинных вариантов, необходимо привлечение новых точных, чувствительных и информативных методов. Перспективны методы олигопептидного картирования невирионных вирусоспецифических белков, олигонуклеотидного картирования вирусных РНК, использования для антигенного анализа моноклональных антител.

ЛИТЕРАТУРА

1. Вотяков В. И., Протас И. И., Жданов В. М. Западный клещевой энцефалит. Минск: Беларусь, 1978. 265 с.

2. Дживанян Т. И., Каштанова Г. М. О возможности дифференциации рицинусовых и персулькатусовых типов вируса клещевого энцефалита в РСК с очищенными антигенами.— В сб.: Арбовирусы. Свердловск, 1977, с. 128—133.

3. Дживанян Т. И., Лашкевич В. А., Чупринская М. В. и др. Дальнейшее изучение связи ДС-признака у вирусов комплекса клещевого энцефалита с видом переносчика.— В сб.: Медицинская вирусология. М., 1974, т. 22, вып. 2, с. 79—86.

4. Дживанян Т. И., Рейнгольд В. Н., Каштанова Г. М. и др. Оценка методов очистки вируса клещевого энцефалита и некоторые характеристики вирионов.— В сб.: Библиографический указатель ВИНИТИ, 1979, август, б/052. Рукопись деп. в ВИНИТИ.

5. Дживанян Т. И., Батикова М., Грешикова М., Чунихин С. П. Различия штаммов вируса клещевого энцефалита по чувствительности их гемагглютининов к действию детергентов.— Вопр, вирусол., 1981, № 2, с. 237—239.

6. Жданов В. М., Лашкевич В. А., Дживанян Т. И. Олигопептидное картирование вирусов комплекса клещевого энцефалита.— Вопр. вирусол., 1981, № 1, с. 20—23.

7. Жданов В. М., Элдер Дж. Х., Лернер Р. и др. Сравнительная характеристика пептидных карт мажорных белков вирусов гриппа рода А.— Вопр. вирусол., 1979, № 2, с. 109—112.

8. Засухина Г. Д., Погодина В. В. Изучение взаимосвязи генетических признаков нейровирулентности и размера бляшек у вирусов комплекса клещевого энцефалита (КЭ).— Генетика, 1966, № 3, с. 156—159.

9. Засухина Г. Д., Брагина Т. М., Чекова В. В., Дживанян Т. И. К механизму развития признака размера бляшек у клонов вируса комплекса клещевого энцефалита, индуцированных *N*-нитрозоэтилмочевиной, и его взаимосвязи с некоторыми другими генетическими признаками.— Там же, № 8, с. 119—125.

10. Карпович Л. Г. Изучение биологических особенностей антигенно родственных вирусов группы клещевого энцефалита в тканевых культурах.— В сб.: Вопросы общей вирусологии: [Тезисы докладов XII научной сессии Ин-та вирусологии АМН СССР]. М., 1959, с. 10.

11. Карпович Л. Г., Левкович Е. Н., Овчинникова Э. А. и др. Генетические признаки и их корреляция у некоторых вирусов комплекса клещевого энцефалита и селекционированных из них вариантов.— В сб.: Материалы XIII научной сессии Ин-та полиомиелита и вирусных энцефалитов АМН СССР. М., 1967, с. 238—239.

12. Карпович Л. Г., Овчинникова Э. А., Вильнер Л. М., Левкович Е. Н. Изучение интерфероногенных свойств и чувствительности к экзогенному интерферону вариантов вирусов комплекса клещевого энцефалита, различающихся по нейровирулентности.— В сб.: Общая вирусология. М., 1967, с. 175—177.

13. Кларк Д. Дальнейшие исследования антигенных связей между арбовирусами группы Б.— Бюлл. Всемирной организации здравоохранения, 1964, т. 31, № 1, с. 50—66.

14. Кокорев В. С., Подоплекин В. Д., Переверзев В. Д., Федотова Т. Т. Исследование плавучей плотности некоторых тогавирусов в градиенте сахарозы и способность различных фракций их гемагглютининов к связыванию с антителами.— Acta virol., 1976, т. 20, № 5, с 353—360.

15. Колотвинов С. В. Авидность как фактор экологической пластичности вирусных популяций.— В сб.: Арбовирусы. Свердловск, 1977, с. 7—16.

16. Красильников И. В., Корешкова Г. В., Эльберт Л. Б., Погодина В. В. Сравнение физико-химических характеристик штаммов вируса клещевого энцефалита.— В сб.: Вирусы и вирусные инфекции человека. М., 1981, с. 126.

17. Левкович Е. Н., Карпович Л. Г., Засухина Г. Д. и др. Экспериментальное изучение селекции аттенуированных штаммов вирусов комплекса клещевого энцефалита (ККЭ) и их генетических свойств.— В сб.: Актуальные проблемы вирусных инфекций. М., 1965, с. 167—169.

18. Левкович Е. Н., Карпович Л. Г., Логинова Н. В. Анализ нейровирулентных и иммуногенных свойств клонов, выделенных из популяции вируса Лангат (штамм ТР-21).— Вопр. вирусол., 1966, № 2, с. 183—188.

19. Левкович Е. Н., Карпович Л. Г., Логинова Н. В., Овчинникова Э. А. Изучение генетической неоднородности популяции штамма ТР-21 вируса Лангат и селекция аттенуированных клонов.— В сб.: Материалы XIII научной сессии ИПВЭ АМН СССР. М., 1967, с. 134—135.

20. Левкович Е. Н., Погодина В. В., Ржахова О. Е. Дифференциация вирусов группы клещевого энцефалита на основе сравнительного изучения биологических и антигенных свойств.— В сб.: Съвременни енцефалити (Encephalites Actualles). София, 1964, с. 57—65.

21. Логинова Н. В., Карпович Л. Г., Левкович Е. Н., Овчинникова Э. А. Изучение репродукции некоторых арбовирусов при повышенной температуре как генетический маркер.— Бюлл. эксперимент. биологии и медицины, 1967, т. 9, с. 101—103.

22. Погодина В. В. Сравнительное изучение вирусов клещевого энцефалита по признаку вирусемии.— Acta virol., 1964, т. 8, № 2, с. 113—122.

23. Погодина В. В. Анализ нейровирулентности на модели вируса клещевого энцефалита и его вариантов.— Труды Национального Конгресса по медицинской микробиологии. Бухарест, 1965, с. 158—159.

24. Погодина В. В., Засухина Г. Д. Некоторые итоги изучения генетических признаков и их взаимосвязей у вирусов комплекса клещевого энцефалита.— В сб.: Актуальные проблемы вирусных инфекций. М., 1965, с. 178—180.

25. Погодина В. В., Левкович Е. Н., Карпович Л. Г. Различия в патогенной активности у разных штаммов вируса клещевого энцефалита.— В сб.: Тезисы и авторефераты докладов VI научной сессии ИПВЭ АМН СССР. М., 1961, с. 231—233.

26. Погодина В. В., Левкович Е. Н., Родин И. М., Карпович Л. Г. Изучение вариаций патогенности вирусов группы клещевого энцефалита в опытах на разных видах животных, II. Оценка признака нейровирулентности штаммов в опытах на ягнятах и поросятах.— Acta virol., 1964, т. 8, № 6, с. 521—531.

27. Хозинский В. В., Семенов Б. Ф., Чунихин С. П., Куренков В. Б. Соотношение патогенетических особенностей экспериментального клещевого энцефалита с экологическими характеристиками вируса.— В сб.: Вирусы и вирусные инфекции человека. М., 1981, с. 74.

28. Чумаков М. П., Рубин С. Г., Линев М. Б. Три антигенных типа вируса клещевого энцефалита, их зависимость от основных видов клещей-переносчиков и географическое распространение.— В сб.: Вопросы медицинской вирусологии. М., 1975, с. 371—372.

29. Чунихин С. П., Дживанян Т. И. Экологические маркеры арбовирусов DS-маркер вируса клещевого энцефалита.— Вест. АМН СССР, 1977, № 5, с. 17—21.

30. Чунихин С. П., Куренков В. Б. Вирусемия у рыжей полевки *Clethrionomys glareolus* — новый экологический маркер вируса клещевого энцефалита.— Acta virol., 1979, vol., 23, № 3, p. 257—258.

31. Clarke D. H., Casals J. Thechnique of hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borue viruses.— Amer. J. trop. Hyg., 1958, vol. 7, N 5, p. 561—573.

32. Dzhivanyan T. I., Lashkevich V. A., Bannova G. G. et al. On the possible association of the DS marker of tick-borne encephalitis virus strains with species of tick vectors.— Arch. Ges. Virysforsch., 1974, vol. 45, N 3, p. 209—214.

33. Gresikova M., Sekeyova M. Some aspects of biological and antigenic properties of freshly isolated tick-borne encephalitis virus strains.— In: Tick-borne encephalitis. Baden/Vienna: Facultas-verlag Wien, 1981, p. 150—161.

34. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins the assembly of the head of bacteriophage T4.— Nature, 1970, vol. 15, NT-33, 88850, p. 680—685.

35. Mayer V. Two variants of tick-borne encephalitis virus sho wing different plaque morphology.— Virology, 1963, vol. 20, N 2, p. 372—390.

36. Mayer V. Изучение вирулентности клещевого энцефалита, II. Патогенетические свойства двух вариантов одного вирусного штамма.— Acta virol., 1964, vol. 8, № 1, p. 14—21.

37. Mayer V. Изучение вирулентности вируса клещевого энцефалита, III. Биологическая оценка вариантов вирусов комплекса клещевого энцефалита, образующих мелкие и крупные бляшки.— Acta virol., 1964, vol. 8, N 6, p. 507—520.

38. Mayer V. Изучение вирулентности вирусов комплекса клещевого энцефалита, IV. Термочувствительность вирионов и их отношение к другим генетическим маркерам.— Acta virol., 1965, vol. 9, N 5, p. 397—407.

39. Mayer V., Sabó A. Изучение вирулентности вируса клещевого энцефалита, V. Действие мочевины на термолабильные и термостабильные вирусные варианты.— Acta virol., 1966, vol. 10, N 6, p. 486—495.

40. Mayer V., Ernek E., Blaskovic D. et al. Исследование вирулентности вируса клещевого энцефалита, VII. Иммуногенность ослабленного вируса (клон Ну-НК-28«2») для коз, скота и овец.— Acta virol., 1967, vol. 11, N 4, p. 334—345.

41. Mayer V., Rajcani J. Изучение вирулентности вируса клещевого энцефалита, VI. Интрацеребральное заражение обезьян клонами экспериментально-ослабленного вируса.— Acta virol., 1967, vol. 11, N 4, p. 321—333.

42. Mayer V., Slavik I. Chromatography of tick-borne encephalitis virus variants on hydroxylapatite.— Virology, 1965, vol. 26, N 2, p. 368—369.

43. Rubin S. G., Chumakov M. P. New data on the antigenic types of tick-borne encephalitis (TBE) virus.— Zbl. Bakteriol. Suppl., 1980, N 9, p. 231—236.

44. Studier F. W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAS and proteins on slab gels.— J. Mol. Biol., 1973, vol. 79, N 2, p. 237—248.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР · УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ · 1983

С. В. КОЛОТВИНОВ, Л. С. СУББОТИНА

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВАРИАНТОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА, ОБЛАДАЮЩИХ РАЗЛИЧНОЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ В СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ТЕСТАХ

В немногочисленных работах, специально посвященных изучению функциональной активности антигенов арбовирусов в серологических реакциях, оцениваемой по критериям авидитета[1], приводится характеристика отдельных вариантов вирусов не более чем по двум-трем признакам [10—12]. Мы полагали необходимым изучить комплекс генетических маркеров, проявление которых связано с особенностями размножения вируса в организме подопытных животных и особенностями белковой оболочки вирионов, так как анализ механизмов проявления каждого из маркеров, их взаимосвязи между собой позволяют получить некоторые сведения о строении суперкапсидной оболочки вирионов, определяющей характер взаимодействия с антителами, а также сведения, касающиеся связи основного направления в изменчивости вирусов — изменений в степени патогенности — с изменениями в степени авидности антигенов. Эти сведения могли послужить основой для истолкования причин, ведущих к формированию отличий в степени авидности у отдельных штаммов вируса клещевого энцефалита (КЭ), и для выявления генетических маркеров, позволяющих проводить дополнительную дифференциацию вариантов вируса КЭ, обладающих различной функциональной активностью в серологических тестах.

Материалы и методы

Использовали шесть клонов вируса КЭ (3745Р, 4072Р, 54*b*1Р, 1627/6Р, 1627/26Р и 80/2*f*7Р) на уровне 3—4 пассажа через мозг белых мышей и эталонный штамм «Софьин». Клоны были получены методом бляшек (трехкратное клонирование) из штаммов, выделенных в различных районах Среднего Урала в 1966—1969 гг.

[1] Скорость, полнота образования нейтрального комплекса антиген — антитело и его прочность [8].

Инфекционную активность вируса определяли титрованием на белых мышах весом 5—6 г путем внутримозгового (0,03 мл) и подкожного (0,2 мл) заражения; титры рассчитывали по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина [1] и выражали в $\lg LD_{50}$. Кроме того, титр вируса определяли по цитопатическому действию в культуре перевиваемых клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ-44) или методом бляшек в той же культуре клеток. В этом случае титры выражали в $\lg$ ТЦД $_{50/0,2\ мл}$ и $\lg$ БОЕ/мл.

Гемагглютинирующие антигены готовили из мозга инфицированных мышей, применяя боратно-солевую экстракцию с последующей обработкой протаминсульфатом [22, 23].

Функциональную активность антигенов (F) определяли в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) и в кинетической реакции торможения гемагглютинации (КРТГА) с сывороткой доноров, содержащей антитела к вирусу КЭ, используя постоянную рабочую дозу антигена (8 АЕ). Постановку реакции проводили при 4 °С; результаты учитывали через 18 ч (РТГА) и через 0,5; 1; 2; 4; 6; 18 ч (КРТГА) от момента соединения ингредиентов. Индекс функциональной активности рассчитывали по разработанному нами методу [14].

Генетические маркеры

1. Нейровирулентность при внутримозговом ($mNic$) и подкожном ($mNsc$) заражении мышей определяли, титруя вирус, как было указанно выше; $mNic^+$ и $mNsc^+$ обозначали клоны с активностью не менее 6,0 $\lg LD_{50}$; $mNsc^{\pm}$ — клоны с активностью 4,0—5,9 $\lg LD_{50}$ и $mNsc^-$ — клоны с активностью ниже 4,0 $\lg LD_{50}$. Кроме того, определяли индекс инвазивности (II) — соотношение титров при внутримозговом и подкожном заражении. По этому маркеру клоны вируса подразделяли на высокоинвазивные ($II^+ > -1{,}5\ \lg LD_{50}$) и клоны с относительно сниженной инвазивностью ($II\pm < -1{,}5\ \lg LD_{50}$, но $> -4{,}0\ \lg LD_{50}$).

2. Размер бляшек, формируемых под агаром, и чувствительность к декстрансульфату (S- и DS-маркеры). При изучении этих маркеров использовали метод, предложенный Т. И. Дживанян и др. [5, 6]. Агаровое покрытие, содержащее 200 мкг/мл декстрансульфат (м.м. 2×10^6) или диэтиламиноэтилдекстран (м.м. 2×10^6), готовили по прописи авторов; S^+ обозначали клоны, образующие бляшки размером >3 мм, S^- — диаметром $<1{,}5$ мм и $S^{\pm}$ — среднего размера (2—3 мм). Клоны, у которых размер бляшек в присутствии декстрансульфата не изменялся, обозначали DS^+; символом DS^- обозначали клоны, у которых размер бляшек уменьшался.

3. Терморезистентность вариантов вируса изучали, прогревая вирусосодержащий материал (10 %-ная суспензия, приготовленная из мозга инфицированных мышей на растворе Хэнкса

или гемагглютинирующий антиген) при 50 °С или при 42 °С в течение 10, 20, 30 мин. Пробы охлаждали до 0 °С и определяли инфекционную (t_{50}-маркер) или гемагглютинирующую (t_{42}-маркер) активность, выражая последнюю в $\log_2$ обратной величины титра ($\log_2$ ГАЕ$_{0,2\ мл}$).

4. Устойчивость к денатурирующему воздействию мочевины определяли по модифицированному методу [26], используя раствор мочевины, приготовленный на 0,1 М фосфатном буферном растворе pH 7,2 или на боратном буферном растворе pH 9,0 [9] в конечной концентрации 2 М. Пробы инкубировали 30 мин при 35 °С, затем охлаждали до 0 °С и определяли остаточную активность в lg БОЕ/мл (U-маркер) или в $\log_2$ ГАЕ$_{0,2мл}$ (U_{ha}-маркер). Характеристикой клонов по t- и U-маркерам считали соотношение исходной (N_0) и остаточной инфекционной или гемагглютинирующей активности (N) в $\lg N/N_0$ или $\log_2 N/N_0$ [25]. Клоны, инфекционная и гемагглютинирующая активность которых уменьшалась при воздействии мочевины не более чем на 1 lg БОЕ/мл и 1 $\log_2$ ГАЕ$_{0,2мл}$ соответственно были обозначены как U^r. В том случае, когда инфекционная и гемагглютинирующая активность снижалась более значительно, клоны обозначали U^s. Определение плавучей плотности (ρ-маркер) проводили, используя преформированный градиент сахарозы (10—60 %). Исходные растворы сахарозы готовили на боратном буферном растворе, содержащем 0,1 % альбумина и 0,25 % глицина pH 9,0 [4]. Вирусосодержащую суспензию получали из мозга инфицированных мышей, применяя боратно-солевую экстракцию с последующей обработкой протаминсульфатом. Свежеприготовленную суспензию наслаивали на градиент и центрифугировали на ультрацентрифуге Spinco (ротор SW-27) 16 ч при 26000 об/мин и 4 °С. Фракции собирали, прокалывая дно центрифужной пробирки. Объем одной фракции 1,13 мл (14 капель). В собранных фракциях определяли гемагглютинирующую активность; активные фракции диализировали в течение ночи против раствора Хэнкса, содержащего канацимина сульфат в концентрации 100 ЕД/мл, и определяли их инфекционную активность (в lg ТЦД$_{50/0,2\ мл}$). Кроме того, во фракциях определяли показатель преломления, применяя для этого рефрактометр РДУ. Плотность раствора рассчитывали, используя калибровочную кривую, отражающую зависимость плотности и показателя преломления от процентного содержания сахарозы.

6. Ингибиторорезистентность (ir-маркер) вариантов вируса определяли в РТГА с нормальной сывороткой крови кролика, обработанной 10 %-ной взвесью гусиных эритроцитов.

Стабильность F-маркера устанавливали в процессе пассажей через мозг белых мышей и при ускоренных пассажах через висцеральные органы (печень, селезенка) подкожно зараженных новорожденных крысят.

Статистические методы

Коэффициенты корреляции рассчитывали по способу произведений [16]. Достоверность различий в количественных характеристиках между группой авидных и группой неавидных вариантов вируса КЭ и достоверность коэффициентов корреляции определяли по критерию Стьюдента [20]. Корреляционную структуру изучаемых маркеров исследовали, используя принцип «максимального корреляционного пути» [3].

Результаты и их обсуждение

Функциональная активность антигенов. При определении *F* в КРТГА активность клонов вируса КЭ в относительных единицах была равна 30,18; 26,16; 19,05; 10,46; 10,47; 10,26 (клоны 3745Р, 4072Р, 54*b*1Р, 1627/6Р, 1627/26Р и 80/2*f*7Р соответственно). Первые три отнесены к F^+-клонам, последние — к F^--клонам. F^+-клоны полностью выявляли антитела в исследуемых сыворотках за 4—6 ч контакта, часто в больших титрах, чем F^--клоны за 18 ч. Использование F^+-клонов в качестве диагностикумов для РТГА значительно повышает диагностическую ценность этой реакции. Количество положительных ответов повышается на 9—10 % в сравнении с эталонным штаммом Софьин. При этом титры антигемагглютининов в 30—36 % сывороток были выше в два — четыре раза.

Нейровирулентность. Все клоны демонстрировали высокую активность при интрацеребральном заражении мышей (6—7 $\lg LD_{50}$) и по *mNic*-маркеру могут быть отнесены к $mNic^+$-вариантам вируса КЭ. При подкожном заражении активность F^+-клонов не превышала значений 2,0—4,91 $\lg LD_{50}$, тогда как инфекционная активность F^--клонов достигала 6,0—6,75 $\lg LD_{50}$. Таким образом, F^+-клоны могут быть охарактеризованы как $mNsc^-$- и $mNsc^{\pm}$-варианты вируса КЭ, а F^--клоны — как $mNsc^+$-варианты. В соответствии с этим F^+-клоны обладают $II^{\pm}$ характеристикой, а F^--клоны — II^+.

Размер бляшек и чувствительность к декстрансульфату. F^--клоны образовывали в культуре клеток СПЭВ-44 крупные бляшки (7—8 мм), т. е. имели S^+-характеристику. Клон 4072Р образовывал наиболее мелкие бляшки — 0,8—1,3 мм (S^--маркер). Клоны 3745Р и 54*b*1Р формировали бляшки диаметром 2—2,5 мм ($S^{\pm}$-маркер). Таким образом, несмотря на некоторые различия, группа F^+-клонов характеризуется значительно меньшими размерами бляшек. Различий по чувствительности к декстрансульфату между F^+- и F^+-клонами мы не обнаружили. DS_+-характеристикой обладали как F^--клоны (3745Р и 54*b*1Р), так и F^--клоны (1627/6Р и 1627/26Р). Клоны 4072Р и 80/2*f*7Р имели DS^--характеристику.

Терморезистентность. Прогревание при 50 °С в течение 20 мин позволяет дифференцировать F^+- и F^--варианты вируса КЭ. Термостабильными считали варианты вируса, снижение инфекционных титров у которых не превышало 2 lg ТЦД$_{50}$, а термолабильными (t_{50}^-) — те, у которых наблюдалось снижение титров не менее чем на 3 lg ТЦД$_{50}$. Клоны 3745Р и 4072Р, прогревание которых приводило к снижению инфекционной активности в среднем на 3,5—3,75 lg ТЦД$_{50}$, отнесены к t_{50}^--вариантам. К t_{50}^+-вариантам отнесены клоны 1627/6Р, 1627/26Р и 80/2*f*7Р, снижавшие инфекционную активность на 1,92, 2,0 и 1,5 lg ТЦД$_{50}$, соответственно. Клон 54*b*1Р, снижавший инфекционную активность в среднем на 2,5lg ТЦД$_{50}$, охарактеризован как $t_{50}^{\pm}$-вариант. Так как уже 10-минутное прогревание при 50 °С приводило к практически полной инактивации гемагглютинирующей (ГА) активности изучаемых вариантов вируса КЭ, то для дифференциации F^+- и F^--клонов по термостабильности гемагглютининов был применен t_{42}-маркер [9]. По этому маркеру F^+-клоны были отнесены к t_{42}^--вариантам: прогревание при 42 °С в течение 30 мин приводило к снижению ГА-активности этих классов на 3 $\log_2$ ГАЕ и более. F-клоны, ГА-активность которых в этих же условиях снижалась не более чем на 1,5 $\log_2$ ГАЕ, отнесены к t_{42}^+-вариантам (табл. 1).

Чувствительность к денатурирующему воздействию мочевины. F^+- и F^--клоны по степени чувствительности к воздействию мочевины демонстрировали достоверные различия. Обработка мочевиной снижала инфекционную и ГА-активность F^+-клонов на 1,98—2,75 lg БОЕ и на 3,0—4,67 $\log_2$ ГАЕ; F^--клоны снижали активность на 0,58—0,82 lg БОЕ и 0,33—1,0 $\log_2$ ГАЕ. Таким образом, F^+-клоны представляют собой U^s-варианты вируса КЭ, а F^--клоны — U_r-варианты.

Плавучая плотность вирионов. Изучаемые клоны вируса КЭ при плотностном анализе имели индивидуальные особенности, выражающиеся в характере распределения гемагглютинирующего и инфекционного материала по плотностным зонам и пикам. Оценивая результаты плотностного анализа в целом, следует отметить, что F^+-клоны имели более широкие зоны распределения (1,114—1,216 г/см^3), чем F^--клоны (1,111—1,188 г/см^3). Кроме того, вершины пиков, формируемых F^+-клонами при ультрацентрифугировании, обнаруживали более высокие значения плавучей плотности (см. табл. 1).

Ингибиторорезистентность. При сравнительном изучении чувствительности вариантов вируса КЭ к нейтрализующему действию сывороточных ингибиторов были получены данные об отсутствии связи между степенью авидности изучаемых вариантов вируса и степенью их ингибиторорезистентности.

Стабильность признака функциональной активности. Клоны 4072Р (F^+) и 1627/6Р (F^-) прошли 20 пассажей через мозг

Таблица 1

Количественное выражение генетических маркеров авидных и неавидных вариантов вируса КЭ (средние значения)

Клоны вируса КЭ	Генетические маркеры									
	F, отн. ед.	$mNic$, $\lg LD_{50}$	$mNsc$, $\lg LD_{50}$	II, mNsc $\lg mNic$	S, мм	t_{50}, $\lg \frac{N}{N_0}$ ТЦД	t_{42}, $\log_2 \frac{N}{N_0}$ ГАЕ	U, $\lg \frac{N}{N_0}$ БОЕ	U_{ha}, $\log_2 \frac{N}{N_0}$ ГАЕ	ρ, г/см³
Авидные										
3745Р	30,18	6,08	2,08	—4,0	2,11	—3,5	—3,67	—2,75	—3,67	1,175
4072Р	26,16	6,08	2,0	—4,08	1,2	—3,75	—4,0	—2,76	—4,67	1,170
54*b*1Р	19,05	6,58	4,91	—1,67	2,15	—2,5	—3,0	—1,98	—3,0	1,165
Неавидные										
1627/6Р	10,46	6,91	6,5	—0,41	7,28	—1,92	—1,0	—0,59	—0,33	1,150
1627/26Р	10,47	7,0	6,16	—0,84	7,32	—2,0	—0,33	—0,82	—1,0	1,147
80/2*f*7Р	10,26	7,0	6,5	—0,5	7,68	—1,5	—1,0	—0,58	—0,67	1,151

белых мышей. На уровне 10 и 20 пассажей определяли F- и S-характеристики клонов. Исследования показали стабильность изучаемых вариантов по указанным маркерам. В то же время пассажи клона 1627/6Р через висцеральные органы новорожденных крысят (семь пассажей) привели к изменению F- и S-характеристик этого клона: индекс функциональной активности возрос с 10,46 до 16,09, а размер бляшек уменьшился до 2—3 мм. Крупные бляшки (5—8 мм) составляли 5,97 % от общего количества.

Биометрический анализ. Количественное выражение генетических маркеров авидных и неавидных вариантов вируса КЭ и значения попарных коэффициентов корреляции, характеризующих степень и направление связей между отдельными парами признаков, приведены в табл. 1 и 2. Используя метод корреляционных плеяд, по П. В. Терентьеву [17, 18], удалось показать, что изученные признаки представляют высокоинтегрированную систему: плеяда имела структуру «сеть» в пределах ряда распределения с очень высоким уровнем ($|r| \lessdot 0{,}8$), а большая часть связей была расположена на уровне $|r| \lessdot 0{,}9$ [13]. Плеяду, имеющую другую структуру, можно было бы разложить, используя метод парциальной корреляции, однако в рассмотренном случае этот прием терял смысл из-за наличия нескольких центральных членов. Поэтому при оценке корреляционной структуры изучаемой системы был использован принцип «максимального корреляционного пути» (МКП), позволяющий ввести упорядочение в систему n-признаков при помощи $n-1$-свя-

Таблица 2

Корреляционная матрица, отражающая взаимосвязь генетических маркеров авидных ($F+$) и неавидных ($F-$) вариантов вируса КЭ

	F	II	S	t_{50}	t_{42}	U	U_{ha}	ρ
F	0,001							
II	—0,974* / 0,002	0,001						
S	—0,935 / 0,01	0,883 / 0,05	0,001					
t_{50}	—0,971 / 0,002	0,987 / 0,001	0,840 / 0,05	0,001				
t_{42}	—0,959 / 0,01	0,950 / 0,01	0,983 / 0,001	0,956 / 0,01	0,001			
U	—0,979 / 0,001	0,790 / 0,02	0,970 / 0,02	0,964 / 0,002	0,996 / 0,001	0,001		
U_{ha}	—0,932 / 0,01	0,945 / 0,01	0,971 / 0,01	0,905 / 0,02	0,992 / 0,001	0,982 / 0,01	0,001	
ρ	0,981 / 0,001	—0,923 / 0,01	—0,948 / 0,002	—0,923 / 0,01	—0,958 / 0,01	—0,970 / 0,002	—0,929 / 0,01	0,001

* В числителе — коэффициент корреляции, в знаменателе — уровень значимости коэффициента корреляции; по главной диагонали матрицы расположены значения уровней значимости различий в количественном выражении отдельных маркеров у авидных и неавидных вариантов вируса КЭ.

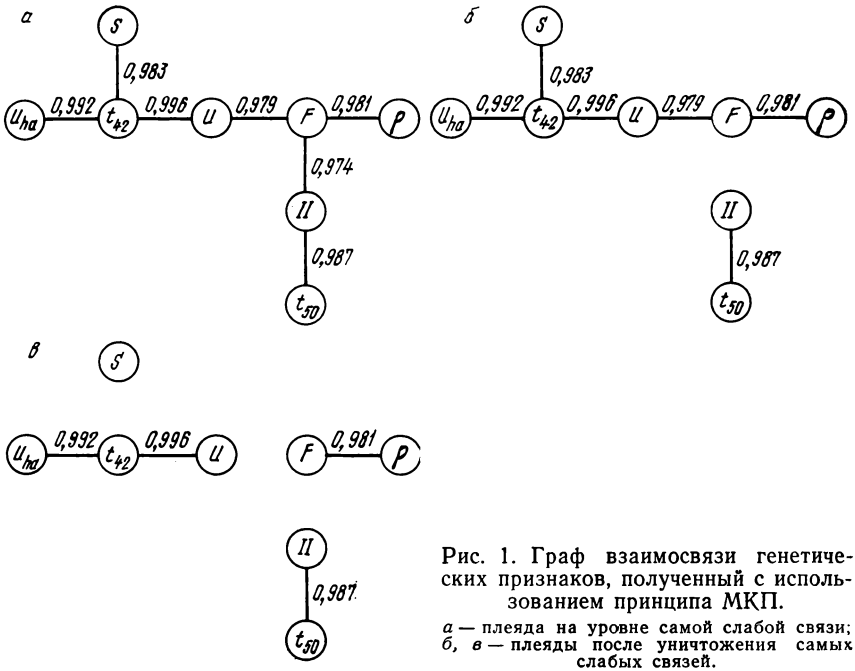


Рис. 1. Граф взаимосвязи генетических признаков, полученный с использованием принципа МКП.

а — плеяда на уровне самой слабой связи; *б*, *в* — плеяды после уничтожения самых слабых связей.

зей так, чтобы сумма коэффициентов корреляции связанных между собою признаков была максимальной. Используя алгоритм, предложенный Л. К. Выханду [3], мы получили связи[2] t_{42} — U (0,996), t_{42} — U_{ha} (0,992), II — t_{50} (0,987), t_{42} — S (0,983), F—ρ (0,981), F — U (—0,979), F — II (—0,974).

Признаки и связи между ними изображены в виде графа на рис. 1, *а* (признаки представлены как вершины, а связи — как ребра графа). Можно видеть, что признаки образуют единую плеяду на уровне самой слабой связи в МКП, который является остовом данной плеяды. Если повысить в плеяде корреляционный уровень (т. е. уничтожить самую слабую связь), то МКП распадется на две части — остовы двух соседних плеяд (см. рис. 1, *б*). Этот процесс можно продолжить и получить новые образования с более высоким корреляционным уровнем (см. рис. 1, *в*). Более наглядно формирование плеяд можно представить, если объединить данные, полученные с использованием МКП, и данные о выраженности и направленности связей между признаками, как это сделано на рис. 2. Расположение точек на этом рисунке получено в соответствии с расстояниями

[2] В скобках приведены значения коэффициентов корреляции.

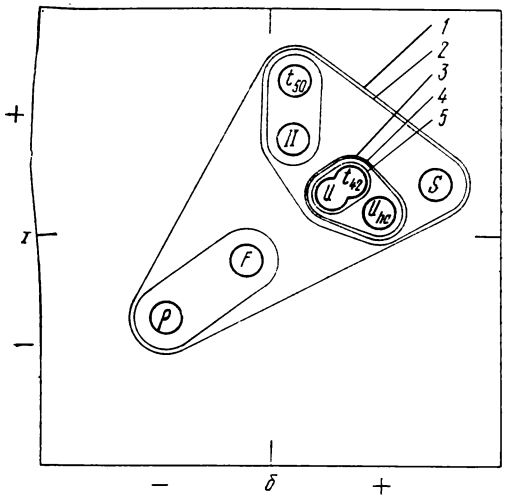


Рис. 2. Диаграмма, объединяющая данные МКП и первичного корреляционного анализа.
Объяснения см. в тексте.

МКП и направленностью связей. Расстояние[3] между признаками i и j определяли как $1-r_{ij}^2$. Оси «а» и «б» не вносят размерности, а лишь участвуют в формировании (+) и (—) полей. Признаки F и ρ, расположение в (—) поле, связаны между собой прямой связью, как и признаки t_{50}, II, U, U_{ha}, S и t_{42}, расположенные в (+) поле. В то же время эти две группы признаков обнаруживают обратную корреляционную связь, что и определяет их расположение в полях с разным знаком. Контуры выделяют связи, которые отнесены к одной группе в соответствии с величинами коэффициентов корреляции. Внешний контур *1* объединяет все признаки на уровне $|r| \leqslant 0{,}980$. Следующий контур *2* объединяет все признаки, связанные на уровне $|r| \leqslant 0{,}985$; контуры *3* и *4* — признаки, связанные на уровнях $|r| \leqslant 0{,}990$ и $|r| \leqslant 0{,}995$ соответственно. Признаки U и t_{42} объединяет на уровне $|r| > 0{,}995$ контур *5*. Таким образом, на схеме четко выделяются четыре плеяды: ρ — F, t_{50} — II, U — — t_{42} — U_{ha} и плеяда мощностью в один признак — S.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о возможности выделения из популяции вируса КЭ клонов, различающихся по функциональной активности при взаимодействии со специфическими антителами и сохраняющих эти различия при пассировании в определенной системе (мозг белых мышей). При сравнительном изучении генетических признаков клонов вируса КЭ, обладающих различной авидностью, установлено, что фенотип авидных вариантов (F^+) характеризуется сочетанием, следующих маркеров: $mNic^+$; $mNsc^+$($mNsc^\pm$); $II^\pm$; S^-($S^\pm$); t_{50}^- ($t_{50}^\pm$); t_{42}^-; U^s; ρ^+. Фенотип неавидных вариантов (F^-) характеризуется сочетанием маркеров $mNic^+$; $mNsc^+$; II^+; S^+; t_{50}^+; t_{42}^+; U_r; ρ^-.

---

[3] Следует отметить, что оценка расстояний правильна только в пределах указанных связей, так как, используя принцип МКП, невозможно составить схему на плоскости таким образом, чтобы правильными были расстояния между всеми маркерами.

Полученные данные свидетельствуют о существовании характерных особенностей в строении суперкапсидной оболочки вирионов, присущих авидным и неавидным вариантам вируса КЭ, что позволяет проводить дополнительную дифференциацию этих вариантов по ряду генетических маркеров. В то же время полученные результаты указывают и на определенные различия в строении оболочки вирионов, имеющие место как в группе авидных, так и в группе неавидных вариантов вируса: такие признаки, как ингибиторорезистентность и чувствительность к декстрансульфату, не имели связи с признаком авидности. Этот факт свидетельствует о том, что сама по себе авидность не отражает всех функциональных особенностей вирусных антигенов.

При введении порядка в систему признаков при помощи принципа МКП выявлено, что изученные признаки образуют плеяду с высоким корреляционным уровнем ($|r| \geqslant 0{,}974$), обладающую двумя центральными членами (t_{42} и F), которые имеют по три связи с другими членами плеяды. Наиболее тесную связь демонстрируют признаки $U - t_{42} - U_{ha}$. Примечательно, что F-маркер прямо связан с признаками, характеризующими степень патогенности (II), и признаками U и ρ, которые, по данным [26, 27], также связаны с вирулентностью вируса.

Сочетание маркеров с различными механизмами проявления, характерное для F^+- и F^--вариантов вируса КЭ, высокая степень достоверности различий по всем изученным маркерам наряду с выраженной корреляцией между ними делают правомерным вывод о сложном генетическом обеспечении F-маркера. Разумеется, наличие корреляции между признаками не указывает хотя бы на частичную зависимость одного признака от другого, но, тем не менее, такая корреляция позволяет говорить о «существовании некоторого процесса, связывающего обе измеренные величины» [20]. В данном случае таким процессом может служить аттенуация. Относительная стабильность вирусного генома не является препятствием для широкой внутривидовой изменчивости, но в то же время внутривидовую изменчивость нельзя рассматривать как абсолютно ненаправленную, она определяется уже сложившейся генотипической организацией [2, 21]. Если предположить, что в процессе аттенуации в первую очередь изменяются (под влиянием мутаций) наиболее «молодые» в филогенетическом отношении и, следовательно, наименее стабильные участки вирусного генома, то функционирование генома аттенуированных вариантов вируса будет обеспечиваться наиболее древними и наиболее стабильными участками [19]. В то же время эти древние участки генома, общие для вирусов данного вида, несут информацию, обеспечивающую наиболее характерную, видовую структуру антигенных детерминант, что в свою очередь определяет их функциональную активность при взаимодействии со специфическими

антителами. Безусловно, ставить знак равенства между аттенуированными и авидными вариантами вируса нельзя, как нельзя назвать «аттенуированными» изученные F^+-варианты, но нельзя и отрицать, что они имеют определенное сходство с таковыми. Заслуживает внимания и тот факт, что использование приема, ведущего к аттенуации вируса КЭ [7],— пассажи через висцеральные органы новорожденных крысят — привело к увеличению степени авидности у F^--клона. Следует отметить, что подобную связь между сниженной патогенностью и функциональной активностью в серологических тестах можно проследить у вирусов, относящихся к различным таксономическим группам: вирусы гриппа, полиомиелита, венесуэльского энцефаломиелита лошадей [15, 24, 28]. Вероятно, при спонтанных мутационных изменениях вирусного генома, наряду со снижением вирулентности вируса в результате нарушения тонких внутригеномных связей, идет повышение функциональной активности вирусных антигенов. Разумеется, не любое изменение в геноме находит свое фенотипическое выражение в форме повышения функциональной активности антигенов, но в общем процессе накопления мутаций, идущего под контролем отбора, могут концентрироваться и такие мутации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П., Воробьев А. А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз, 1962. 180 с.

2. Вавилов Н. И. Закон гомологических рядов в наследственной изменчивости.— В кн.: Классики советской генетики. Л.: Наука, 1968, с. 9—57.

3. Выханду Л. К. Об исследовании многопризнаковых биологических систем.— В кн.: Применение математических методов в биологии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1964, сб. 3, с. 19—22.

4. Дживанян Т. И., Каштанова Г. М. О возможности дифференциации рицинусовых и персулькатусовых типов вируса клещевого энцефалита в РСК с очищенными антигенами.— В кн.: Арбовирусы. Свердловск, 1977, с. 128—133.

5. Дживанян Т. И., Чупринская М. В., Лашкевич В. А. О факторах, влияющих на проявление ДС-признака вирусов комплекса клещевого энцефалита.— Вопр. вирусол., 1973, № 1, с. 86—91.

6. Дживанян Т. И., Лашкевич В. А., Чупринская М. В. и др. Дальнейшее изучение связи ДС-признака у вирусов комплекса клещевого энцефалита с видом переносчика.— В кн.: Медицинская вирусология. М., 1974, с. 79—83.

7. Ерофеев В. С. Материалы по селекции штамма вируса клещевого энцефалита со сниженной нейровирулентностью.— В кн.: Арбовирусы. М., 1969, с. 38.

8. Зильбер Л. А. Основы иммунологии. М.: Медгиз, 1958, с. 436—439.

9. Карпова Е. Ф. Изучение вариантов вируса японского энцефалита по генетическим признакам, связанным с белковой оболочкой вирионов. Дис. канд. . . . мед наук. М., 1972. 182 с.

10. Кокорев В. С., Гайдамович С. Я. Использование суспензионных адсорбционных методов для изучения арбовирусов.— Вопросы вирусологии, 1977, № 4, с. 488—492.

11. Кокорев В. С., Гайдамович С. Я., Цицин В. А., Федотова Т. Т. Критерии авидитета в оценке функциональной активности анти-

генов, антител и неспецифических сывороточных ингибиторов на модели кинетической реакции подавления гемагглютинации с арбовирусами.— Ж. микробиол., 1976, № 9, с. 45—51.

12. Кокорев В. С., Подоплекин В. Д., Федотова Т. Т. Исследование плавучей плотности некоторых арбовирусов в градиенте сахарозы и чувствительность различных фракций их гемагглютининов к нейтрализующему действию антител.— Acta virol., 1976, vol. 20, p. 353—360.

13. Колотвинов С. В. Метод корреляционных плеяд.— В кн.: Вирусные инфекции. Свердловск, 1979, с. 96—99.

14. Колотвинов С. В., Масленников В. А. Метод оценки функциональной активности вирусных антигенов.— Ж. микробиол., 1980, № 8, с. 58—61.

15. Кудрявцева В. К., Неведомская Г. Н. Кинетика нейтрализации вирусов гриппа различной вирулентности антителами иммунных сывороток.— Сб. трудов ВНИИ гриппа, 1975, т. 12, с. 129—134.

16. Плохинский Н. А. Биометрия. Новосибирск: Изд-во СО АН СССР, 1961.

17. Терентьев П. В. Метод корреляционных плеяд.— Вестн. ЛГУ. Серия биол., 1959, вып. 2, № 9, с. 137—141.

18. Терентьев П. В. Дальнейшее развитие метода корреляционных плеяд.— В кн.: Применение математических методов в биологии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1960, с. 27—36.

19. Цилинский Я. Я., Львов Д. К. Популяционная генетика вирусов позвоночных. М.: Медицина, 1977.

20. Bailey N. T. J. Statistical Methods in Biology: The English University Press Ltd., 1959. 271 p.

21. Bertalanffy L. von. Evolution der Organismen.— In: Schophungsglaube und Evolutionstheorie. Stuttgart, 1955.

22. Chanock R. M., Sabin A. B. The hemagglutinin of St. Louis encephalitis virus.— J. Immunol., 1953, vol. 70, p. 271—316.

23. Clarke D. H., Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses.— Amer. J. Trop. Med. Hyg., 1958, vol. 7, p. 561—573.

24. Hahon N. Neutralization of residual infectivity of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by anti-gammaglobulin.— J. Gen. Virol., 1970, vol. 6, p. 361—372.

25. Mayer V. Изучение вирулентности вируса клещевого энцефалита, IV. Термочувствительность вирионов и отношение к другим генетическим маркерам.— Acta virol., 1965, vol. 9, p. 397—407.

26. Mayer V., Sabo A. Изучение вирулентности вируса клещевого энцефалита, V. Действие мочевины на термолабильные и термостабильные варианты.— Acta virol., 1966, vol. 10, p. 486—495.

27. Nishimura C., Nomura M., Kitaoka M. Comparative studies on the structure and properties of two selected strains of Japanese encephalitis virus.— Japan. J. Med. Sci. Biol., 1968, vol. 21, N 1, p. 1—10.

28. Vonka V., Janda Z., Simon J. The stability of the intratypic antigenic character of Sabin's type 1 attenuated virus (LSc—2ab).— Arch. Ges. Virusforsch., 1962, vol. 12, p. 7—18.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ · 1983

В. С. КОКОРЕВ, Е. Г. КОЛОТВИНОВА, Г. И. СОТНИКОВА

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА

Ранее нами была изучена антигенная и адсорбционная активность авидных и неавидных штаммов вируса клещевого энцефалита (КЭ), проведено сравнение компонентов из популяций по плавучей плотности, гемагглютинирующей и инфекционной активности, способности реагировать с антигемагглютининами [2, 5, 6]. Цель настоящей работы — дальнейшее более глубокое и всестороннее изучение структурно-функциональных особенностей популяций различных вариантов вируса КЭ, разработка критериев их дифференциации.

Материалы и методы

В работе использовали вирусы комплекса КЭ (КЭ, ОГЛ, КЛБ, ШЭО, Повассан), полученные из Музея вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР, штаммы вируса КЭ (авидные — 1524, 4072, 3745 и неавидные — 1509, 1627, 855, 80), выделенные в Свердловской области, иммунные сыворотки к указанным вирусам и штаммам. Функциональную активность антигенов и антител изучали в кинетической РТГА (КРТГА), модифицированной РТГА и КРТГП (МРТГА и МКРТГА) и в реакции истощения антигемагглютининов (РИАт), методики которых описаны ранее [3, 7, 8]; оценку авидитета проводили по разработанному [3, 11] количественному показателю (С), оценку аффинитета — по полноте образования нейтрального комплекса антиген — антитело (титр антител в КРТГА). Описание методов получения, гель-хроматографии и ультрацентрифугирования в градиенте плотности вирусосодержащих суспензий (культуральных, мозговых боратно-солевой экстракции — БС; мозговых боратно-солевой экстракции, обработанных протаминсульфатом — ПС) представлено ранее [5, 6]. Инфекционную (ИФ), гемагглютинирующую (ГА) и комплементсвязующую (КС) активность вирионов определяли по общепринятым методикам. Обработку антигенных препаратов твином 80-эфиром и ультразвуком проводили по методу Халонена и др. [15] и Ардуан и др. [13].

Результаты и их обсуждение

Функциональная активность антигенов авидных и неавидных штаммов вируса клещевого энцефалита в реакции с антителами к вирусам комплекса КЭ и другим арбовирусам группы В. Функциональные особенности антигенных детерминант авидных и неавидных штаммов выявлялись не только, как было показано [4], при взаимодействии вирусов со штаммоспецифическими антителами, но и в комплексспецифических серологических реакциях (табл. 1). Из таблицы видно, что ГА антигены авидных штаммов более активно реагировали в КРТГА и с антителами к различным видам вирусов комплекса КЭ. По результатам нескольких серий опытов показатели C_x-антигенов авидных штаммов (1524, 4072, 3745) на 0,18—0,38 превышали показатели С неавидных штаммов (1627, 855, 80). Индексы РИАт (способность к нейтрализации антигемагглютининов) при постановке реакции с теми же антисыворотками у антигенов авидных штаммов были ниже, чем у неавидных.

При исследовании авидных и неавидных сывороток к вирусу КЭ в КРТГА с антигенами вирусов комплекса КЭ была выявлена более выраженная функциональная активность авидных антител ($C_{\bar{x}}=0{,}94$) в реакции со всеми исследованными вирусами (табл. 2). Показатели C неавидных антител ($C_{\bar{x}}=0{,}54$) возрастали в опытах с антигенами вирусов ШЭО и Повассан. Эти вирусы, судя по показателям авидитета ко всем исследованным сывороткам, являются наиболее авидными.

Неавидные иммунные сыворотки были более аффинными к менее авидным вирусам (КЭ, ОГЛ, КЛБ), чем к авидным (абсолютные $X_{геом}$-титры антител 1 : 45—1 : 130). Аффинитет неавидных антител к авидным вирусам ШЭО и Повассан был менее выражен ($X_{геом}$-титры антител 1 : 20—1 : 25). Выявлен-

Таблица 1

Оценка способности антигенов авидных и неавидных штаммов вируса КЭ реагировать с комплекс-реактивными антителами по результатам КРТГА

Иммунные сыворотки к вирусам комплекса КЭ	Показатели C_x антигенов штаммов			
	3745 авидный	4072 авидный	1627 неавидный	80 неавидный
ШЭО (штамм *S*-1)	1,63	0,99	0,55	0,82
ОГЛ (штамм ОГЛ)	1,24	1,1	0,66	0,68
КЛБ (штамм *g*-11388)	1,08	0,8	0,54	0,78
Повассан (штамм Байерс)	0,55	0,75	0,52	0,55
Показатель $C_{\bar{x}}$ по группам штаммов	1,01		0,63	

Таблица 2

Оценка способности авидных и неавидных сывороток к вирусу КЭ реагировать с антигенами вирусов комплекса КЭ по результатам КРТГА

Антигены вирусов	Показатели $C_{\bar{x}}$ антител по группе иммунных сывороток		$X_{геом}$-титры антител по группе иммунных сывороток	
	авидных	неавидных	авидных	неавидных
КЭ (штамм Софьин)	0,83	0,37	70	130
ОГЛ (штамм ОГЛ)	0,83	0,39	70	45
КЛБ (штамм *g*-11338)	1,0	0,38	70	65
ШЭО (штамм *S*-1)	1,0	0,76	70	25
Повассан (штамм Байерс)	1,0	0,83	70	20
Показатели $C_{\bar{x}}$ иммунных сывороток к вирусам комплекса КЭ	0,93	0,54	70	57

Примечание. В КРТГА с каждым вирусом исследовали пробы от четырех серий авидных и четырех серий неавидных иммунных сывороток к вирусу КЭ.

ные закономерности не распространялись, однако, на показатели сывороточного авидитета. Можно полагать, что эти данные — свидетельство антигенного родства вирусов КЭ, ОГЛ и КЛБ. Они подкрепляют известные представления о соотношении антигенных связей вирусов комплекса КЭ и то, что дифференциацию вирусов одного комплекса и установление антигенных связей лучше проводить, используя неавидные сывороточные препараты. Сходные закономерности по авидитету антигенов и антител отмечались и прежде при постановке перекрестных штаммоспецифических реакций. Во всяком случае показатели аффинитета (титры антител) и авидитета (C) не всегда соответствовали друг другу, и последние, очевидно, следует использовать лишь при оценке в целом авидности исследуемых препаратов. Результаты, подтверждающие различную способность авидных и неавидных антител вступать во взаимодействие с антигенами вирусов комплекса КЭ, были получены при исследовании функциональной активности этих антигенов и антител в МКРТГА. Модифицированная КРТГА представляется нам более пригодной для исследования аффинитета антител, поскольку дает возможность точно определить количество АЕ того или иного вируса, которое может быть нейтрализовано антителами исследуемой сыворотки (взятой в различных разведениях). Вместе с тем, оценивая в этой реакции скорость связывания антигенов и антител, можно одновременно определить и авидитет реагентов. Как оказалось,

закономерности взаимодействия указанных антигенов и антител сохранялись. Аффинитет антител был более выражен по отношению к вирусам КЭ и ОГЛ и в меньшей степени — к вирусам ШЭО и Повассан. Вместе с тем последние отличались большей авидностью. Вирус КЛБ обладал и высокой авидностью, и способностью реагировать с аффинными антителами.

Полученные данные являются, по нашему мнению, доказательством качественного или количественного преобладания у авидных штаммов и вирусов видовых или комплекс-реактивных антигенных детерминант над аналогичными детерминантами неавидных штаммов и вирусов. Различия в авидитете не выявлялись при исследовании ГА антигенов авидных (4072, 3745) и неавидных (1627, 80) штаммов вируса КЭ в РТГА с антителами к вирусам ЯЭ и Западного Нила. Таким образом, авидитет антигенов арбовирусов — это способность их как к штаммоспецифическим, так и к комплексспецифическим перекрестным серологическим реакциям, т. е. штаммовый авидитет не связан с групповыми антигенными детерминантами вирусов.

В связи с изложенным можно полагать, что данные о более эффективной серодиагностике КЭ при использовании набора антигенных препаратов вирусов комплекса КЭ [1] объясняются не столько циркуляцией на территории Свердловской области вирусов, отличающихся по антигенной структуре от вируса КЭ и являющихся, как предполагалось, этиологическим фактором регистрируемых заболеваний, сколько прежде всего более выраженным авидитетом ряда использованных диагностикумов, а также аффинитетом или авидитетом исследуемых иммунных сывороток к тому или иному антигену (диагностикуму) в каждом конкретном случае.

Хроматографические характеристики авидных и неавидных вариантов вируса КЭ. При гель-хроматографии культуральных антигенных препаратов штаммов 80 и Софьин (эталонный) выявляли два пика или два компонента одного пика ГА активности, у штамма 4072 — один пик. Полнота открытия ГА в пиковых фракциях была в пределах 10 % от исходных титров, а ИФ активность достигала исходного уровня или даже была выше, что объясняется, по-видимому, дезагрегацией вирионов, концентрированных ПЭГ или освобождением их от ингибиторов вирусной активности. Сходное явление мы наблюдали при исследовании вирусосодержащих препаратов суспензионными адсорбционными методами. Если первые пики ИФ активности всех исследованных штаммов соответствовали на хроматографических профилях в основном первым пикам ГА активности, хотя точного совпадения максимумов не наблюдали, то вторые и третьи выявляли в зоне полного отсутствия ГА. Происхождение их связано, по-видимому, с незрелыми вирусными формами или, точнее, с вирионами, у которых изменена структура оболочки таким образом, что они имеют меньшие размеры

или (и) меньший молекулярный вес. У неавидного штамма 80 на эту зону и особенно на третий пик приходится намного больше (по сравнению со штаммом 4072 и Софьин) вирусных частиц. У авидного штамма 4072, в отличие от других штаммов, не выявлялся третий пик ИФ активности.

Структурно-функциональные особенности авидных (4072, 1524) и неавидных (80, 1509) штаммов вируса КЭ выявлены и при гель-хроматографии БС антигенных препаратов и исследовании полученных фракций в РИАт (табл. 3). Анализ результатов этих исследований позволил сделать следующие основные выводы: 1) авидные и неавидные штаммы вируса КЭ отличаются по хроматографическим свойствам, причем первые менее гетерогенны по своему составу и по функциональной активности фракций при взаимодействии с антителами, чем вторые; 2) вирусные фракции авидных штаммов менее активны в РИАт (слабее истощают иммунную сыворотку), чем фракции неавидных штаммов, что соответствует способности иммунной сыворотки в более высоких разведениях нейтрализовать 8 АЕ авидного вируса в общепринятой РТГА; 3) основная активность в РИАт у авидных штаммов приходится на ГА фракции, а у неавидных — и на все другие (что предопределяет возможность их конкуренции в серологической реакции за антитела); 4) антитела в меньших разведениях более активно истощаются в РИАт вирионами неавидных штаммов, чем авидных (что соответствует, по-видимому, способности 8 АЕ неавидных штаммов нейтрализовать антитела в общепринятой РТГА, тем самым «снижая» их действительный титр, и, с другой стороны, свидетельствует косвенно о необходимости значительно более высокой концентрации антител для нейтрализации неавидных вирусных частиц).

Структурно-функциональный анализ штаммов при ультрацентрифугировании в градиенте плотности. Профиль ГА активности неавидного штамма 80, в отличие от активности авидного штамма 4072, при разделении ПС антигенных препаратов в градиенте плотности был растянут, имел два выраженных пика, и в целом фракции его обладали более выраженной способностью истощать антитела в РИАт. Вирионы авидных штаммов были менее гетерогенны, чем неавидных, по антигенной активности в РГА, РИАт и РСК. Анализ характера распределения ИФ и ГА активности вирионов на хроматографических профилях и по фракциям градиента при ультрацентрифугировании, а также показателей удельной инфекционности, дает основание полагать, что в популяциях неавидных штаммов имеется значительное количество негемагглютинирующих (неГА) вирусных форм, в оболочке которых, по-видимому, повышено содержание липидов (частицы с $\rho < 1{,}068$, ПС антигенный препарат). При этом показатели плавучей плотности вирионов основного пика ГА активности неавидного штамма были

Таблица 3

Сравнительная оценка активности в РИАт ГА компонентов популяций авидных и неавидных штаммов вируса КЭ

Штамм	Рабочая доза сыворотки в РИАт	Индексы РИАт при использовании в реакции вирусных фракций																				
		10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
4072, авидный	1:40	0—2	0—2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0—2	0—2	0—2	0—2	0—2	2	0—2	0—2	2	2
	1:80	0—2	0—2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0—2	0—2	0—2	0—2	0—2	2	0—2	0—2	2	2
80, неавидный	1:20	4	2	2	2	4	2	4	4	2	2—4	2—4	4	4	2	2—4	2—4	2—4	2—4	2—4	2—4	4
	1:40	0—2	0	2	0	2	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
1524, авидный	1:40	0	0—2	0—2	0—2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0—2	0
	1:80	0—2	0	0—2	0	0—2	0	0	0—2	0—2	0	0—2	2	2	2	0—2	0	0	0	0	0	0
1509, неавидный	1:40	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2—4	2—4	2	2	2	2
	1:80	2	0—2	0	2	0—2	0—2	2	2	2	0—2	0—2	0—2	2	0—2	4	2	4	0	4	4	4

Примечание. Гель-хроматография БС антигенных препаратов. РИАт ставили с гомологичными иммунными сыворотками к указанным штаммам вируса КЭ.

Таблица 4

Чувствительность ГА компонентов популяций авидного и неавидного штаммов вируса КЭ к нейтрализующему действию гомологичных и гетерологичных антител, а также ингибиторов НКС (результаты МРТГА)

№ фракций от дна пробирки	Плавучая плотность, г/см³	Штамм 4072 (авидный)				Штамм 80 (неавидный)			
		антитела к штамму			ингибиторы НКС	антитела к штамму			ингибиторы НКС
		4072	Софьин	80		4072	Софьин	80	
3	1,214	0	0	0	Не опр.	0	0	0	Не опр.
4	1,211	0	0	0	То же	0	0	0	То же
5	1,207	0—1	0	0	»	0	0	0	»
6	1,197	0—1	0—1	0	1	0	0	0	»
7	1,185	1	1	0	2	0—1	0—1	0	»
8	1,178	1	1	1	2	0	0	0—1	»
9	1,169	0	0	0	2	0	0	—	0—1
10	1,163	2	2	2	4	0	0	0—1	0—1
11	1,157	1	2	1	4	Не опр.			1
12	1,147	4	2	4	32	1	1	0—1	2
13	1,137	1—2	2—4	4	32	Не опр.			2
14	1,125	4	4	4	32	1	0—1	0—1	4
15	1,108	8	4	4	8	1	0—1	0	32
16	1,098	Не опр.	0—1	0—1	4	2	2	0—1	8
17	1,088	Не опр.			4	1—2	2	1	4
18	1,07	То же				2	4	1	4
19	1,068	«				2	4	4	Не опр.

Примечание. Ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы ПС антигенных препаратов. Приводится число АЕ вируса, нейтрализованного в течение 45 мин.

ниже ($\rho = 1{,}108—1{,}125$), чем авидного ($\rho = 1{,}125—1{,}147$). Показатели КС/ГА неавидных штаммов были выше, чем у авидных ($X_{\text{арифм}}$ по фракциям градиента соответственно 0,34 и 0,27).

Исследование полученных в результате гель-хроматографии и ультрацентрифугирования фракций вирионов в модифицированных перекрестных РТГА, а позднее и в РИАт, позволило выявить вирионы — «носители» авидитета штаммов, способные наиболее активно реагировать с антителами к штаммоспецифическим и комплекс-реактивным детерминантам. Так, для авидного штамма 4072 — это фракции (ПС антигенного препарата) с $\rho = 1{,}108—1{,}147$, для неавидного штамма 80 — с $\rho = 1{,}068—1{,}098$ (табл. 4). Вместе с тем получены свидетельства того, что штаммовый авидитет определяется не только количественным содержанием авидных (или, наоборот, неавидных) частиц в исследуемом препарате, но и, в конечном итоге, химической структурой вирионов. В связи с этим следует отметить, что чувствительные фракции авидных штаммов нейтрализовались (в МРТГА) более активно, чем такие же фракции неавидных вариантов вируса за тот же период времени. Осо-

бенности в активности ГА компонентов авидных и неавидных вариантов вируса были выявлены в реакции с неспецифическими сывороточными ингибиторами.

Различия в структуре и свойствах вирионов авидных и неавидных штаммов по другим характеристикам. Результаты, полученные при изучении вопросов штаммового авидитета, свидетельствуют о различиях в химической структуре вирионов авидных и неавидных вариантов вируса КЭ. Эти различия проявлялись не только в реакциях с рецепторами антител и сывороточных ингибиторов, но и в реакциях с рецепторами неорганических и органических сорбентов [2], с ингибиторами, содержащимися в сахарозе (отмечена более выраженная стабильность неавидных штаммов), при взаимодействии с эритроцитами. Оптимум pH для проявления ГА активности авидных штаммов был в пределах 6,4—6,8, неавидных — 6,0—6,2.

Важным свидетельством зависимости авидитета антигенных препаратов от состояния структуры вирионов является тот факт, что при обработке неавидного вируса твин-эфиром и особенно ультразвуком активность его антигенов при взаимодействии с антителами достигла активности авидного варианта.

Влияние обработки твин-эфиром или ультразвуком на активность антигенного препарата из авидного и неавидного варианта вируса КЭ в реакции с антителами — результат РТГА с иммунной кроличьей сывороткой к штамму Софьин:

	Штамм вируса	
	3745 (авидный)	80 (неавидный)
НО*	1:1280	1:320
ТЭ	1:1280	1:1280
УЗ	1:2560	1:2560

* НО, ТЭ, УЗ — препарат не обработанный, обработанный твином 80 и эфиром или ультразвуком соответственно.

Вирионы неавидных штаммов более термостабильны при 37°, что, вероятно, является одной из причин сравнительно высокой ГА активности культуральных антигенных препаратов штамма 80, полученных при репродукции его в культуре ткани фибробластов куриного эмбриона (титр ГА этого штамма был в 2—16 раз выше титра ГА штамма 4072).

Неавидные штаммы, как показали некоторые наши наблюдения и специально проведенные в этом плане исследования С. В. Колотвинова [9], обладают более высокой патогенностью для белых мышей. Определенную связь между снижением патогенности и увеличением степени функциональной активности вирусов (относящихся к разным таксономическим группам) при взаимодействии с антителами можно отметить при

Таблица 5

Сравнительная характеристика свойств авидных и неавидных штаммов вируса КЭ

Свойства			Штаммы	
			авидные	неавидные
Антигенные и связанные с проявлением антигенной активности вируса	ГА активность	После репродукции в клетках ФК	1:4—1:16	До 1:32—1:64
		После репродукции в мозгу белых мышей (ПС препарат)	До 1:128	До 1:128
	Чувствительность к нейтрализации антителами (в РТГА и РБН)	Антитела к штаммоспецифическим и комплекс-реактивным антигенным детерминантам	Высокая	Низкая
		Антитела к групповым антигенным детерминантам	На уровне общей внутригрупповой (эталонного штамма Софьин) +	
	Способность нейтрализовать антитела в РИАт		Низкая	Высокая
	Ингибиторочувствительность (+) или резистентность (—)		±	±
	Способность индуцировать формирование авидных (+) или неавидных (—) антител		±	±
	Показатель КС/ГА ($\bar{X}$)		0,27	0,34
	Оптимум pH для проявления ГА активности		6,4—6,8	6,0—6,2
	Чувствительность ГА к ингибиторам сахарозы		Чувствительны	Менее чувствительны
Адсорбционные и связанные с изучением структуры вирусной популяции	Адсорбция на неорганические сорбенты		Активная	Менее активная
	Адсорбция на чувствительные клетки		Менее активная	Активная
	Содержание неГА вирусных частиц в популяции вируса		Низкое	Высокое

Свойства				Штаммы	
				авидные	неавидные
Биофизические и связанные с изучением структуры вирусной популяции	Ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы	Зона ГА активности (ρ, г/см³)		1,088—1,214	<1,05—1,214
		Максимумы ГА активности	Количество	1	2 (3)
			ρ, г/см³	1,125—1,147	1,108—1,125; 1,169—1,188; (1,211).
			Удельная инфекционность	0,4	1,0 0,55 (1,2)
		Максимумы ИФ активности	Количество	1 (2)	2 (3)
			ρ, г/см³	1,157 (1,211)	1,088; 1,169; (1,211).
			Удельная инфекционность	1,0	2,0; 1,3; (1,2)
		Содержание неГА вирусных частиц в популяции вируса		Низкое	Высокое
	Гель-хроматография на колонке с сефарозой 2В	Зона ГА активности (№ фракций)		7—29	10—45
		Максимумы ГА активности	Количество	1	2
			№ фракций	10—16	12—16; 18—24.
			Удельная инфекционность (в пределах различных фракций)	1,0—1,2	1,0—1,1; 0,9—1,0
			Количество	2	3

Окончание табл. 5

Свойства				Штаммы	
				авидные	неавидные
		Максимумы ИФ активности	№ фракций	15—20; 56—57	20—21; 40—41; 56
			Удельная инфекционность	1,0—1,67 неГА вирус	1,0—1,4; неГА вирус; неГА вирус
		Содержание неГА вирусных частиц в популяции вируса		Низкое	Высокое
	Термостабильность ГА при 37°			Термолабильны	Термостабильны
Патогенность для белых мышей (lg LD50/0,03 мл обратной величины титра ИФ)	При заражении в мозг			До 6,0—6.5	До 7,0—7,5
	При заражении подкожно			До 2,0—3,0	До 6,0—6,5

Примечания. 1. В таблице обобщены данные по группе авидных (1524, 4072, 3745) и неавидных (80, 1509, 1627) штаммов вируса КЭ. Методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности и гельхроматографии исследовали соответственно ПС и БС антигенные препараты сравниваемых штаммов. Данные по патогенности обобщены на основании материалов собственных исследований и работы С. В. Колотвинова [9].

2. В настоящее время нами получены определенные свидетельства несколько более выраженной активности неавидных вариантов вируса КЭ при взаимодействии с антителами к групповым антигенным детерминантам. Исследования в этом плане продолжаются.

3. В скобках — минорный пик.

рассмотрении результатов работ ряда исследователей [10, 12, 14, 17].

Наши данные по сравнительной оценке вариантов вируса КЭ во многом сходны с результатами исследования различных штаммов вируса ЯЭ, полученными Нишимурой и др. [16], причем низкое значение ρ вирулентного (и, по-видимому, неавидного) штамма вируса ЯЭ объяснялось преобладанием липидов в оболочке, маскирующих ГА, в связи с чем и индекс КС/ГА у высокопатогенного штамма был выше. Материалы по сравнительной характеристике авидных и неавидных штаммов суммированы в табл. 5.

Можно полагать, что авидные варианты являются продуктом естественной «аттенуации» вируса КЭ в результате спонтанных мутационных изменений вирусного генома в ходе эволюции. Так это или иначе, но использование этих вариантов для диагностических целей, как и изучение вопросов авидитета вирусных антигенов и его материальных основ, представляет собой актуальную проблему.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубенко А. В., Кокорев В. С., Курсакова А. С. и др. Материалы к характеристике иммунитета у больных, госпитализированных с подозрением на клещевой энцефалит.— В сб.: Вирусные инфекции. Свердловск, 1979, с. 109—112.

2. Кокорев В. С. Методы суспензионной адсорбции в изучении структуры популяций тогавирусов и функциональной активности тогавирусных антигенов.— В сб.: Арбовирусы. Свердловск, 1977, с. 62—74.

3. Кокорев В. С., Федотова Т. Т. Показатель степени авидности антигенов, антител и ингибиторов.— В сб.: Вопросы этиологии, эпидемиологии, патогенеза и диагностики вирусных заболеваний. Свердловск, 1972.

4. Кокорев В. С., Федотова Т. Т. Некоторые вопросы сравнительной оценки функциональной активности антигенов различных штаммов вируса КЭ при взаимодействии с антителами и ингибиторами.— В сб.: Арбовирусы. Свердловск, 1977, с. 86—93.

5. Кокорев В. С., Подоплекин В. Д., Переверзев В. Д., Федотова Т. Т. Исследование плавучей плотности некоторых арбовирусов в градиенте сахарозы и чувствительности различных фракций их гемагглютининов к нейтрализующему действию антител.— Acta virol., 1976, vol. 20.

6. Кокорев В. С., Сотникова Г. И., Филипповец Р. В. и др. Использование гель-хроматографии и ультрацентрифугирования для структурно-функционального анализа популяций тогавирусов в динамике развития инфекционного процесса в культуре ткани.— В сб.: Арбовирусы. Свердловск, 1977, с. 74—86.

7. Кокорев В. С., Гайдамович С. Я., Федотова Т. Т., Филипповец Р. В. Реакция истощения антигемагглютининов в изучении активности антигенных препаратов арбовирусов.— Вопр. вирусол., 1979, № 6, с. 646—650.

8. Кокорев В. С., Пономарев Д. Н., Федотова Т. Т. и др. Методы повышения эффективности серологической диагностики клещевого энцефалита.— В сб.: Материалы научно-практических работ специалистов санитарно-эпидемиологической службы Свердловской области. Свердловск, 1981, т. 8, ч. 1, с. 116—120.

9. Колотвинов С. В. Материалы по структурному анализу вирусной популяции (на модели вируса клещевого энцефалита и компьютерная модель): Дис. канд. ... мед. наук. Свердловск, 1979, с. 220.

10. Кудрявцева В. К., Неведомская Г. Н. Кинетика нейтрализации вирусов гриппа различной вирулентности антителами иммунных сывороток.— Труды ВНИИ гриппа, 1975, вып. 12, с. 129—134.

11. Леденцова Р. Ю., Кокорев В. С., Маликов Г. К. Методы количественной оценки авидитета и антигенов.— В сб.: Математические методы в эпидемиологии микробиологии. Л., 1979, т. 51, с. 119—126.

12. Марченко Н. М. Разработка и испытание живой культуральной вакцины венесуэльского энцефаломиелита лошадей: Дис. канд. ... мед. наук. Томск, 1975.

13. Ardoin P., Clarce D. H., Hannoun C. The preparation of arbovirus hemagglutinins by sonication and trypsin treatment.— Amer. J. Med. Hyg., 1969, vol. 18, N 4, p. 592—598.

14. Hahon W. Neutralization of Residual Infectivity of Venezuelan Equine Encephalomyelitis Virus by Anti-gamma Globulin.— J. Gen. Virol., 1970, vol. 4, p. 361—372.

15. Halonen P. E., Stewart J. A., Hall A. D. Rubella hemagglutinin prepared in serum free suspension culture of BHK-21 cells.— Ann. Med. Exp. Fenn., 1967, vol. 45, p. 182—185.

16. Nishimura C., Nomura M., Kitaoka M. Comparative studies on the structure and properties of two selected strains of Japanese encephalitis virus.— Jap. J. Med. Sci. Biol., 1968, vol. 21, N 1, p. 1—10.

17. Vonka V., Janda Z., Simon J. The stability of the Intratypic Character of Sabin's Type I Attenuated Virus (LSc-2ab).— Arch. Ges. Virusforsch., 1962, vol. 12, p. 7—16.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ • 1983

В. С. КОКОРЕВ, Т. Т. ФЕДОТОВА

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ ИСТОЩЕНИЯ АНТИГЕМАГГЛЮТИНИНОВ И МОДИФИЦИРОВАННОЙ РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ВИРУСНОЙ ПОПУЛЯЦИИ

Реакция истощения антигемагглютининов (РИАт) прежде была использована нами [2, 4] для изучения функциональной неоднородности компонентов вирусных популяций, антигенной активности негемагглютинирующих (неГА) вирусных частиц и индикации минимальных количеств вируса. Целью настоящего исследования являлось изучение возможности применения РИАт в комплексе с другими методами для оценки степени гетерогенности вирусных популяций по признаку авидности их компонентов, оценки качества антигенных препаратов, а также использование авидных фракций вирусов в модифицированной РТГА (МРТГА) для выявления сероконверсий при клещевом энцефалите (КЭ).

Материалы и методы исследований

В работе использовали культуральные антигенные препараты вируса КЭ (штамм Софьин), выращенного в культуре ткани фибробластов куриного эмбриона и концентрированного полиэтиленгликолем [3].

Метод гель-хроматографии вирусосодержащей суспензии описан ранее [3]. Полученные фракции вирионов исследовали в РИАт, МРТГА [4, 5] и РТГА с иммунными кроличьими сыворотками (ИКС) к вирусу КЭ, ШЭО, Повассан и ЯЭ, с иммунными человеческими (реконвалесцентов) сыворотками (ИЧС) к вирусу КЭ; в РСК — с иммунной к вирусу КЭ крысиной асцитной жидкостью. РТГА и РСК ставили по общепринятым методикам. В ряде опытов исследовали антигенные препараты из авидных (4072, 3745) и неавидных (80, 855, 106) штаммов вируса КЭ.

Результаты и их обсуждение

Прежде всего следует отметить, что РИАт может быть поставлена с различными разведениями иммунной сыворотки. Такая аранжировка дает возможность полнее оценить способ-

ность вирионов различных фракций нейтрализовать (истощать) специфические антитела. Изучение активности вирионов в такой «кинетике» взаимодействия с антителами показало следующее: 1) большинство фракций антигенного препарата, содержащих вирионы, в пределах чувствительности метода истощали антигемагглютинины в большей или меньшей степени (в зависимости от особенностей функциональной активности вирионов и активности использованной иммунной сыворотки); 2) среди ГА и неГА вирусных частиц имелись фракции вирионов, активно (во всех разведениях сыворотки) нейтрализующие антитела, активно нейтрализуемые антителами (поскольку антитела истощались ими только в высоких разведениях) и, наконец, «в равной степени» нейтрализующие антитела и нейтрализуемые ими (истощали антитела только в определенном разведении сыворотки, ниже которого истощения не отмечалось); 3) среди неГА вирусных частиц (незрелых форм) имелись фракции, не нейтрализуемые антителами (эти вирионы не реагировали с антителами в более высоких разведениях сыворотки и реагировали — истощали антитела — при высокой концентрации последних).

Следует обратить внимание на одно обстоятельство. Если в РИАт по снижению активности антител исследуется способность вирусных антигенов нейтрализовать антитела, то в МРТГА по уменьшению числа АЕ в препарате — способность антител нейтрализовать вирус. Предстояло изучить, как коррелируют высокая или низкая активность вирусных фракций при взаимодействии с антителами в РИАт с активностью их в МРТГА, РТГА и РСК, вирионы каких фракций являются «носителями» (или материальным субстратом) авидитета антигенов в нашем обычном понимании его как способности выявлять антитела в минимальных титрах, или, как было показано, способности антигенов к внутривидовым и межвидовым перекрестным серологическим реакциям — способности реагировать с антителами к штаммоспецифическим и комплекс-реактивным антигенным детерминантам вирусов. С этой целью исследована активность вирионов основных ГА-фракций антигенных препаратов в МРТГА и других серологических реакциях с теми же иммунными сыворотками, которые использованы в РИАт. Результаты исследований, проведенных в разных аранжировках (различные антигенные препараты, иммунные сыворотки), были однозначны: ГА-вирусные фракции, обладавшие способностью истощать антитела в РИАт, слабо выявляли их в других серологических тестах и, наоборот, при использовании в этих реакциях ГА-фракций, малоактивных в РИАт, т. е. активно нейтрализуемых антителами, антитела выявлялись в высоких титрах (табл. 1 и 2). Так, к первым относились фракции 13—19, ко вторым — фракции 20—26. Как видно из представленных данных, титры антител, выявляемых в серологических

Таблица 1

Сопоставление результатов РИАт, модифицированной РТГА и РСК с целью определения способности вирионов различных фракций антигенного препарата реагировать с антителами

№ фракции	ГА-активность	Индекс РИАт при разведении сыворотки		Результат модифицированной РТГА: разведение сыворотки, нейтрализующее				Результат РТГА при использовании в реакции				Результат РСК
		1:80	1:160	1АЕ	2АЕ	4АЕ	8АЕ	4АЕ	8АЕ	16АЕ	32АЕ	
9	4	4	2	Не опр. из-за нестабильности гемагглютининов								10
10	4	2—4	2									10
11	6	2—4	2									10
12	6	2—4	2									10
13	7	2—4	2	320	160	<160	—	80	—	—	—	10
14	8	2	0—2									20
15	7	2—4	2	320	160	<160	—	80	—	—	—	20
16	7	4	2									10
17	7	4	2	320	160	<160	—	—	40	—	—	10
18	7	4	2									10
19	6—7	4	2	640	320	160	160	—	—	40	—	10
20	6—7	2	0—2									20
21	6	2	0—2	640	320	160	160	—	—	—	160	20
22	6	0—2	0—2									40
23	6	0—2	0	640	320	320	320	—	—	—	160	20
24	6	0—2	0									10
25	5—6	0	0	640	320	160	—	—	—	—	160	10
26	4—5	0—2	0—2									10
27	5	0	0	640	320	160	—	—	—	160	—	—
28	5	0—2	2									
29	4	0—2	2	320	160	<160	—	—	80	—	—	—
30	4	2	2									
31	3	2	2	320	160	<160	—	160	—	—	—	—
32	3	0—2	2									
Нефракционированный ПС антигенный препарат	9	Не опр.		320	160	<160	—	—	320	—	—	10

Примечания: 1. ГА активность — в $\log_2$ обратной величины титра, антиГА и КС активность — обратные величины титров.

2. Для исследования в РИАт, МРТГА и РТГА фракции объединяли в пробу по две, РСК ставили с фракциями, разведенными в два раза.

3. В РТГА с нефракционированным препаратом использовали 18-часовое связывание вируса и антител, в РТГА и МРТГА с фракциями — 5-часовое связывание.

4. Фракции препарата использовали в РТГА непосредственно после их получения с последующим определением количества АЕ вируса в реакции.

5. Выделены зоны максимальной активности вирионов различных фракций в реакциях.

Таблица 2

Результаты МРТГА с сыворотками крови больных КЭ в зависимости от функциональной активности вирионов, взаимодействующих с антителами

№ фракции	ГА-активность	Индекс РИАт	Результаты МРТГА									
			ИЧС №1+вирус					ИЧС № 2+вирус		ИЧС № 3+вирус	ИЧС № 4+вирус	ИЧС № 5+вирус
			1АЕ	2АЕ	4АЕ	8АЕ	16АЕ	1АЕ	2АЕ	1АЕ	1 АЕ	1АЕ
9	4	>2	40	<40	—	—	—	0	0	0	0	0
10	4	>2										
11	4	>2	80	40	<40	—	—	0	0	0	0	0
12	4	>2										
13	4	>2	Не опр. из-за нестабильности гемагглютининов									
14	4	>2										
15	4—5	>2	40	<40	—	—	—	0	0	0	0	0
16	4—5	>2										
17	4—5	>2	80	40	<40	—	—	80	<80	0	0	0
18	4—5	>2										
19	4—5	>2	160	80	40	<40	—	80	80	0	10	10
20	5	>2										
21	5	2	320	160	80	80	40	160	80	10	10	10
22	5	2										
23	5	2	320	160	80	80	—	160	80	0	0	0
24	4—5	0										
25	4—5	0	320	160	80	40	—	80	<80	0	0	0
26	4—5	0										
27	3—4	0	160	80	<80	—	—	80	<80	0	0	0
28	3	2										
29	2—3	>2	Не опр.									
30	2	2										
Нефракционированный ПС антигенный препарат	9	Не опр.	160	80	40	40	—	80	80	0	0	0

Примечание. В РИАт использовали ИЧС в рабочих разведениях 1 : 20, остальное см. в примечаниях к табл. 1.

реакциях с наиболее чувствительными вирусными фракциями, были в два-четыре раза выше контрольных (при использовании других фракций и нефракционированного диагностикума), а в реакции с отдельными фракциями (21, 22) антитела обладали даже способностью подавлять количество АЕ вируса, в 16 и более раз превышающее то, которое они нейтрализуют, взаимодействуя с нефракционированным диагностикумом. Следует отметить, что практически в 100 % обследованных «серонегативных» случаев заболеваний КЭ (с клинически подтвержденным диагнозом) нам удавалось выявить минимальные количества антител, используя в серологических реакциях именно наиболее активные фракции вирусов. С одной фракцией антигенного препарата микрометодом можно исследовать до 16 проб сывороток крови.

Максимальная активность фракций в РСК и МРТГА (РТГА) не всегда совпадала, однако наиболее активные в МРТГА вирусные фракции 22—24, а в ряде случаев и 20—21, выявляли КС антитела в титрах намного выше, чем исходный (нефракционированный) препарат, причем титр КС антигена этих фракций был выше, равен или только в два раза ниже титра исходного препарата, несмотря на значительное разведение антигена при колоночной хроматографии. Таким образом, вирусные фракции могут быть использованы для проведения серологических исследований без дополнительного концентрирования. С одной вирусной фракцией можно исследовать микрометодом в РСК до 20 проб сывороток крови.

Проведенные эксперименты позволили не только объяснить различную диагностическую эффективность ГА антигенных препаратов и определить пути ее повышения, а также пути стандартизации арбовирусных диагностикумов, но и по-новому рассмотреть некоторые вопросы авидитета вирусных антигенов, «взаимоотношений» и взаимосвязи авидитета антигенов и антител, закономерностей их взаимной нейтрализации.

Прежде всего следует отметить, что РИАт в совокупности с МРТГА дает возможность четко разделить компоненты того или иного антигенного препарата по признаку авидности, и авидными, по нашему мнению, следует считать фракции, активно нейтрализуемые антителами, хотя это не означает, что другие (неавидные) ГА фракции обладают меньшей функциональной активностью в серологических реакциях. Она только, по крайней мере в гомологичной системе, носит другой характер. У неавидных в нашем понимании вирионов не снижена способность реагировать с антителами (кстати, такой возможности тоже нельзя исключить, хотя более реальна она для гетерологичных систем), а преобладает способность нейтрализовать антитела при взаимной их нейтрализации.

Таким образом, характеристика авидных ГА антигенов должна включать более выраженную чувствительность их к

нейтрализующему действию антител к штаммоспецифическим и комплекс-реактивным антигенным детерминантам. Следует отметить, что комплекс антитела — авидные вирионы обладал и более выраженной способностью фиксировать комплемент.

РИАт и МРТГА дают возможность оценить ряд качественных и количественных сторон авидитета вирусных антигенов и противовирусных антител. Если проводить количественную оценку авидитета и антител по полноте образования нейтрального комплекса (индекс РИАт; количество АЕ нейтрализованного вируса), то возникает вопрос о причинах преобладания в нейтральном комплексе действия одного реагента над другим. Можно полагать, что с фракциями вирусов, наиболее чувствительных к нейтрализующему действию антител, взаимодействуют наиболее аффинные антитела, представленные *Ig g*. Последнее подтверждается высокой активностью указанных фракций в РСК (в которой этот класс иммуноглобулинов, как известно, наиболее активно вступает во взаимодействие с вирусом). Вирионы указанных фракций сравнительно невелики по размеру (или обладают меньшим молекулярным весом) по сравнению с теми, которые при колоночной хроматографии элюируют раньше и обладают способностью более активно истощать антитела. В нейтрализации же небольших молекул антигенов возрастает роль микроглобулиновых антител [8]. Можно полагать также, что эти вирионы несут большее количество штаммоспецифических и комплекс-реактивных антигенных детерминант, ответственных за авидитет. С вирусными частицами большего размера (или молекулярного веса) реагируют, по всей вероятности, в основном менее аффинные *Ig M* или *Ig g* с широким спектром действия. Такие вирионы несут, по-видимому, преимущественно групповые антигенные детерминанты, отличающиеся структурными особенностями, если учесть, что количество первых у флавивирусов сравнительно невелико [12]. Известно, что эффективность воздействия на процесс адсорбции антител зависит от относительных размеров молекул вируса и антитела [7]. В связи с этим «крупные» вирусные частицы способны нейтрализовать и большее количество антигемагглютининов.

Прямым подтверждением сказанному является то обстоятельство, что вирусные фракции (например 16—19), обладавшие способностью активно нейтрализовать антитела к вирусу КЭ, были так же активны и в РИАт с антителами к вирусам комплекса КЭ и, главное, к вирусу ЯЭ (табл. 3). Следовательно, можно полагать, что вирионы хорошо нейтрализуются (при наличии соответствующих рецепторов) аффинными антителами, а менее аффинные (в частности, групповые) антитела они активнее нейтрализуют сами. Об этом свидетельствуют, например, абсолютные величины индексов РИАт при нейтрализации вирионами 16—19 фракций антител к вирусу КЭ, Повассан

реакциях с наиболее чувствительными вирусными фракциями, были в два-четыре раза выше контрольных (при использовании других фракций и нефракционированного диагностикума), а в реакции с отдельными фракциями (21, 22) антитела обладали даже способностью подавлять количество АЕ вируса, в 16 и более раз превышающее то, которое они нейтрализуют, взаимодействуя с нефракционированным диагностикумом. Следует отметить, что практически в 100 % обследованных «серонегативных» случаев заболеваний КЭ (с клинически подтвержденным диагнозом) нам удавалось выявить минимальные количества антител, используя в серологических реакциях именно наиболее активные фракции вирусов. С одной фракцией антигенного препарата микрометодом можно исследовать до 16 проб сывороток крови.

Максимальная активность фракций в РСК и МРТГА (РТГА) не всегда совпадала, однако наиболее активные в МРТГА вирусные фракции 22—24, а в ряде случаев и 20—21, выявляли КС антитела в титрах намного выше, чем исходный (нефракционированный) препарат, причем титр КС антигена этих фракций был выше, равен или только в два раза ниже титра исходного препарата, несмотря на значительное разведение антигена при колоночной хроматографии. Таким образом, вирусные фракции могут быть использованы для проведения серологических исследований без дополнительного концентрирования. С одной вирусной фракцией можно исследовать микрометодом в РСК до 20 проб сывороток крови.

Проведенные эксперименты позволили не только объяснить различную диагностическую эффективность ГА антигенных препаратов и определить пути ее повышения, а также пути стандартизации арбовирусных диагностикумов, но и по-новому рассмотреть некоторые вопросы авидитета вирусных антигенов, «взаимоотношений» и взаимосвязи авидитета антигенов и антител, закономерностей их взаимной нейтрализации.

Прежде всего следует отметить, что РИАт в совокупности с МРТГА дает возможность четко разделить компоненты того или иного антигенного препарата по признаку авидности, и авидными, по нашему мнению, следует считать фракции, активно нейтрализуемые антителами, хотя это не означает, что другие (неавидные) ГА фракции обладают меньшей функциональной активностью в серологических реакциях. Она только, по крайней мере в гомологичной системе, носит другой характер. У неавидных в нашем понимании вирионов не снижена способность реагировать с антителами (кстати, такой возможности тоже нельзя исключить, хотя более реальна она для гетерологичных систем), а преобладает способность нейтрализовать антитела при взаимной их нейтрализации.

Таким образом, характеристика авидных ГА антигенов должна включать более выраженную чувствительность их к

нейтрализующему действию антител к штаммоспецифическим и комплекс-реактивным антигенным детерминантам. Следует отметить, что комплекс антитела — авидные вирионы обладал и более выраженной способностью фиксировать комплемент.

РИАт и МРТГА дают возможность оценить ряд качественных и количественных сторон авидитета вирусных антигенов и противовирусных антител. Если проводить количественную оценку авидитета и антител по полноте образования нейтрального комплекса (индекс РИАт; количество АЕ нейтрализованного вируса), то возникает вопрос о причинах преобладания в нейтральном комплексе действия одного реагента над другим. Можно полагать, что с фракциями вирусов, наиболее чувствительных к нейтрализующему действию антител, взаимодействуют наиболее аффинные антитела, представленные *Ig g*. Последнее подтверждается высокой активностью указанных фракций в РСК (в которой этот класс иммуноглобулинов, как известно, наиболее активно вступает во взаимодействие с вирусом). Вирионы указанных фракций сравнительно невелики по размеру (или обладают меньшим молекулярным весом) по сравнению с теми, которые при колоночной хроматографии элюируют раньше и обладают способностью более активно истощать антитела. В нейтрализации же небольших молекул антигенов возрастает роль микроглобулиновых антител [8]. Можно полагать также, что эти вирионы несут большее количество штаммоспецифических и комплекс-реактивных антигенных детерминант, ответственных за авидитет. С вирусными частицами большего размера (или молекулярного веса) реагируют, по всей вероятности, в основном менее аффинные *Ig M* или *Ig g* с широким спектром действия. Такие вирионы несут, по-видимому, преимущественно групповые антигенные детерминанты, отличающиеся структурными особенностями, если учесть, что количество первых у флавивирусов сравнительно невелико [12]. Известно, что эффективность воздействия на процесс адсорбции антител зависит от относительных размеров молекул вируса и антитела [7]. В связи с этим «крупные» вирусные частицы способны нейтрализовать и большее количество антигемагглютининов.

Прямым подтверждением сказанному является то обстоятельство, что вирусные фракции (например 16—19), обладавшие способностью активно нейтрализовать антитела к вирусу КЭ, были так же активны и в РИАт с антителами к вирусам комплекса КЭ и, главное, к вирусу ЯЭ (табл. 3). Следовательно, можно полагать, что вирионы хорошо нейтрализуются (при наличии соответствующих рецепторов) аффинными антителами, а менее аффинные (в частности, групповые) антитела они активнее нейтрализуют сами. Об этом свидетельствуют, например, абсолютные величины индексов РИАт при нейтрализации вирионами 16—19 фракций антител к вирусу КЭ, Повассан

Таблица 3

Оценка активности вирионов различных фракций в перекрестных видовых РИАт

№ фракции ПС антигенного препарата вируса КЭ (штамм Софьин)	ГА активность	Индексы РИАт при нейтрализации антител к вирусам									
		КЭ (штамп Софьин)			ШЭО (штамм S=1)		Повассан (штамм Байерс)		ЯЭ (штамм Пекин-1)	КЭ (штамм Софьин)	
		1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:40	1:80	1:40	1:10	1:20
8	0	0	0	0	0	0—2	0	2	0	2	0—2
9	2	0	4	>2	0	0	0—2	2	0	2	2
10	4	0	2—4	>2	0	0—2	0—2	2	0—2	2	0—2
11	4	0	2—4	>2	0	0	2	2	0—2	2	2
12	4	0	2—4	>2	0	0	2	2	0—2	2	>2
13	6	2	2—4	2	0	2	2	2	2	4	>2
14	6	0—2	2	0—2	0	2	2	2	0—2	4	>2
15	5	2	2—4	>2	0	2	2	2—4	0	0	>2
16	5	2	4	>2	4	>4	2	4	4	4	>1
17	5	0—2	4	>2	>8	>4	2	4	4	4	>2
18	5	0—2	4	>2	>8	>4	2—4	4	4	2—4	>2
19	5	0—2	4	>2	>8	>4	2	4	4	4	2
20	5	0	2	0—2	8	>4	0—2	4	4	2	2
21	5	0	2	0—2	8	>4	0—2	4	2—4	0—2	2
22	4	0	0—2	0—2	4	>4	0	2—4	0—2	2	0—2
23	3—4	0	0—2	0	2—4	4	0—2	2—4	0—2	2	0
24	3—4	0	0—2	0	4	4	4	2	0—2	0—2	0
25	4	2	0	0	0	2—4	0—2	2	0—2	0	0
26	4	0	0—2	0—2	0	4	2—4	0—2	2	0—2	0
27	4	0—2	0	0	0	0—2	0—2	2	0—2	0—2	2
28	2	0—2	0—2	2	0	0—2	0—2	2	0—2	2	0
29	2	0—2	0—2	2	0	0	0	0	0	2	2
30	1	0—2	2	2	0	0	0	0	0	0—2	2

Примечания: 1. В РИАт в разведении 1 : 10, 1 : 20 (две последние графы) использовали ИЧС, в остальных разведениях — ИКС.

2. Выделена зона преобладания групповых реакций; другие примечания см. в табл. 1.

и ЯЭ в разведении сывороток (ИКС) 1 : 40 — менее аффинные антитела к вирусу ЯЭ нейтрализовались полнее.

Более активная нейтрализация авидных частиц антителами наблюдалась и при сравнительном исследовании в РИАт фракций авидных и неавидных штаммов. Практически все ГА компоненты популяций неавидных штаммов хорошо нейтрализовали антитела. Не исключено, что вирионы этих компонентов несут детерминанты со своеобразной химической структурой, обусловленной, возможно (если учесть их сравнительно низкую плавучую плотность), большим содержанием липидов в оболочке. Вместе с тем, следует отметить, что если неавидные

вирусные частицы вступают во взаимодействие с антителами и нейтрализуют их, то отдельные фракции незрелых вирусных форм, о чем упоминалось выше, вступают во взаимодействие с антителами (и нейтрализуют их) только в меньших разведениях сыворотки. Таких компонентов в популяциях неавидных штаммов значительно больше, чем в популяциях авидных вариантов вируса КЭ. Это находило подтверждение не только при анализе результатов РИАт с вирусными фракциями и гомологичными иммунными сыворотками к вирусу, но и когда РИАт ставили с нефракционированными антигенными препаратами авидных (3745, 4072) и неавидных (80, 855, 106) штаммов и сыворотками к вирусам комплекса КЭ (КЭ, ШЭО, Повассан). Индекс РИАт неавидных штаммов был выше при использовании меньшего разведения сыворотки в два — четыре раза, чем при использовании большего разведения, и в 2—16 раз превышал индекс РИАт авидных штаммов в реакции с аналогичным меньшим разведением сыворотки. По-видимому, для нейтрализации отдельных фракций неавидных и незрелых вирусных форм необходим не только определенный класс иммуноглобулинов, но и определенная их концентрация, ниже которой взаимодействия не происходит или антитела и антиген взаимодействуют слабо. Нельзя исключить при этом и возможность более выраженной диссоциации нейтрального комплекса. На существование не нейтрализуемых фракций вируса указывали ряд исследователей [1, 6, 9—11].

Несомненно, что проблема авидитета антигенов нуждается в дальнейшем изучении. Антигенные особенности вариантов вируса КЭ могут быть генетически детерминированы, зависеть от условий репродукции вируса в той или иной биологической системе, а также определяться факторами внешнего воздействия на вирион на различных стадиях обработки (очистка, инактивация, концентрирование, стабилизация) антигенного препарата. Если степень авидности антигенного препарата, изготовленного из конкретного варианта вируса КЭ, определяется преобладанием вирусных частиц с такими особенностями структуры белковой оболочки, от которых зависит более активное взаимодействие (нейтрализация) их с антителами, то степень авидности антигенного препарата, связанная с технологией получения и обработки вирусосодержащей суспензии, будет определяться не только качеством очистки последней от балластных веществ, но и условиями репродукции вирионов, различными факторами химического и физического воздействия, влияющими на антигенные детерминанты. Таким образом, функциональное состояние антигенных детерминант вирионов зависит от комплекса всех указанных факторов, характер действия которых необходимо тщательно оценивать при стандартизации условий получения диагностикумов. И в этом случае, по нашему мнению, простым и удобным методическим приемом

является комплексное использование гель-хроматографии, РИАт и модифицированной РТГА.

Аналитический подход к оценке функциональной активности различных компонентов вирусных популяций важен, как нам представляется, для углубленного изучения вопросов «штаммового» и «сывороточного» авидитета, для рационального конструирования антигенных препаратов, объективной оценки их диагностической эффективности, для совершенствования и дальнейшего развития методов серологической разведки и диагностики арбовирусных инфекций.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жданов В. М., Гаврилов В. И. Дополнение к проблеме изучения молекулярных основ хронических вирусных инфекций.— В сб.: Вопросы медицинской вирусологии. М., 1975, с. 562—564.

2. Кокорев В. С. Некоторые методы оценки функциональной активности диагностикумов арбовирусов и их совершенствования.— В сб.: Арбовирусы. М., 1978, с. 77—80.

3. Кокорев В. С., Сотникова Г. И., Филипповец Р. В. и др. Использование гель-хроматографии и ультрацентрифугирования для структурно-функционального анализа популяций тогавирусов в динамике развития инфекционного процесса в культуре ткани.— В сб.: Арбовирусы. Свердловск, 1977, с. 74—86.

4. Кокорев В. С., Гайдамович С. Я., Федотова Т. Т., Филипповец Р. В. Реакция истощения антигемагглютининов в изучении активности антигенных препаратов арбовирусов.— Вопр. вирусол., 1979, № 6, с. 646—650.

5. Кокорев В. С., Пономарев Д. Н., Федотова Т. Т. Методы повышения эффективности серологической диагностики клещевого энцефалита.— В сб.: Материалы научно-практических работ специалистов санитарно-эпидемиологической службы Свердловской области. Свердловск, 1981, т. 8, ч. 1, с. 116—120.

6. Минаева В. М., Пшеничнов А. В., Слуцкая М. С. О выявлении не нейтрализуемой фракции в популяции вируса клещевого энцефалита.— В сб.: Арбовирусы. М., 1967, с. 98.

7. Соловьев В. Д., Баландин И. Г. Клетка и вирус. М.: Медицина, 1973, с. 7—16.

8. Чернохвостова Е. В. Биологические особенности антител, принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов.— Усп. совр. биол., 1972, т. 73, № 3, с. 444—457.

9. Dulbecco G., Vogt M., Stricland A. G. A study of the basic aspects of neutralization of two animal viruses, western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus.— Virology, 1956, vol. 2, p. 162—205.

10. Hashimoto N., Prince A. M. Kinetic studies on the neutralization between Japanese encephalitis virus and antiserum.— Virology, 1963, vol. 19, p. 261—272.

11. Rubin H., Franclin R. M. On the mechanism of Newcastle disease virus neutralization by immune serum.— Virology, 1957, vol. 3, p. 84—95.

12. Trent D. W. Antigenic Characterization of Flavivirus Structural Protein Separated by Isoelectric Focusing.— Virology, 1977, vol. 22, N 3, p. 608—618.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ · 1983

Е. Ф. КАРПОВА, Я. Я. ЦИЛИНСКИЙ

ИЗУЧЕНИЕ ГЕТЕРОГЕННОСТИ ПОПУЛЯЦИИ ВИРУСОВ ВЕНЕСУЭЛЬСКОГО ЭЕЦЕФАЛОМИЕЛИТА ЛОШАДЕЙ ПО ФУНДАМЕНТАЛЬНЫМ ПРИЗНАКАМ

В настоящее время для различных групп вирусов установлена гетерогенность природных популяций по ряду биологических свойств, таких как вирулентность для животных и человека, спектр чувствительных к инфекции клеточных линий, антигенные свойства, морфология бляшек, эпидемиологическое поведение и т. д. У некоторых вирусов выявлены различия природных штаммов по структурным белкам вирионов [2, 13, 15].

Природная популяция вируса Венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ) также гетерогенна по антигенным свойствам, морфологии бляшек, вирулентности для различных хозяев, эпидемиологическим характеристикам [9, 10, 16, 17], что позволяет подразделять географические штаммы вируса ВЭЛ на антигенные субтипы и варианты. Для установления молекулярной основы этих биологических различий рядом авторов было проведено сравнительное биохимическое изучение вирионов и вирусоспецифических компонентов представителей антигенного комплекса вируса ВЭЛ [4, 5, 8, 14]. Прямой корреляции между свойствами белков вириона и биологическими характеристиками штаммов не обнаружено. Однако отмечена высокая стабильность характеристик структурных компонентов вирионов при их исследовании методами электрофореза в полиакриламидном геле, хроматографии на гидроксилапатите или электрофокусировки. Поэтому изменения в таких параметрах могут служить индикатором сдвига в составе популяции. Наряду с достаточно широким использованием молекулярно-биологических характеристик для сравнения природных популяций вируса ВЭЛ процессы внутрипопуляционной изменчивости структурных компонентов вирионов почти не изучены. Целью нашего исследования было выявление возможной гетерогенности популяции лабораторного штамма вируса ВЭЛ по некоторым молекулярно-биологическим параметрам и изучение стабильности этих характеристик у некоторых мутантов.

Материалы и методы исследований

Из лабораторного штамма вируса ВЭЛ, полученного из музея вирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского, были выделены 20 бляшечных изолятов. Отбор изолятов производили из бляшек различной морфологии, полученные варианты, прошедшие трехкратное клонирование, хранили при —70 °С.

Вирусы размножали в роллерных культурах первичнотрипсинизированных культур клеток куриного эмбриона (ККЭ). Множественность инфекции 0,1—0,5 БОЕ/мл, поддерживающая среда 199 с 1 %-ной нормальной бычьей сывороткой. В некоторых экспериментах вводили радиоактивную метку вирусных компонентов. Сбор вируса осуществляли через 24 ч после заражения. Получение препарата очищенного и концентрированного вируса проводили по методике Вейб и Шерер [14] с некоторыми модификациями.

Для определения плавучей плотности вирионов суспензию очищенного и концентрированного вируса подвергали изоплотностному центрифугированию в преформированном линейном градиенте плотности сахарозы 20—60 % при 40 000 об/мин 18 ч в роторе SW 50 центрифуги L — 5 — 50. Положение вируса в градиенте определяли по поглощению при 260 нм или по пику H^3-радиоактивности. Плавучую плотность рассчитывали по рефрактометрическому индексу.

Для изучения структурных белков вирусный осадок растворяли в трис-буфере, содержащем 1 % SDS и 1 % 2-меркаптоэтанола, прогревали 3—5 мин при 100° и подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле в системе, содержащей SDS, по методу Лэммли [6]. Для некоторых клонов определяли влияние pH на гемагглютинирующую активность, как было описано ранее [1].

Результаты и их обсуждение

Изоляты, выделенные из лабораторного штамма вируса ВЭЛ, различались по размеру бляшек под агаром (см. таблицу). На основании этого признака клоны можно было подразделить на три группы: мелкобляшечные с диаметром бляшек менее 2 мм, среднебляшечные — от 2 до 4 мм и крупнобляшечные — более 4 мм. Отмечено, что некоторые мелкобляшечные клоны давали при пассировании некоторое количество бляшек среднего размера. Таких более крупных бляшек, обнаруженных в популяции клона 4, выделены среднебляшечные клоны 4/1, 4/2 и 4/3. Подобным образом выделен клон 3/1 из популяции клона 3.

Изученные клоны различались также по репродуктивной активности в культуре клеток КЭ. Накопление инфекционного

Некоторые характеристики популяризации вируса ВЭЛ

Клон	Размер бляшек под агаром, мм	Накопление в жидкой фазе культур клеток, БОЕ/мл	Плавучая плотность вирионов, г/см³	Молекулярные массы структурных белков вирионов, Кд		
				E1	E2	C
1	1,6	6×10^{7}	Не опр.	54	51	33
2	1,3	2×10^{8}	То же	53	51	33
3	1,2	9×10^{7}	»	53	51	34
4	1,1	5×10^{7}	1,19	55	50	33
5	0,9	1×10^{9}	Не опр.	Не опр.	Не опр.	Не опр.
6	1,4	4×10^{9}	1,18	»	»	»
7	1,8	5×10^{10}	1,18	56	52	33
8	2,4	4×10^{9}	1,19	Не опр.	Не опр.	Не опр.
9	2,8	5×10^{8}	Не опр.	56	49	35
10	2,9	3×10^{9}	То же	57	52	33
11	3,9	2×10^{9}	»	Не опр.	Не опр.	Не опр.
12	3,6	6×10^{9}	1,18	56	49	34
3/1	2,4	8×10^{8}	Не опр.	56	52	32
4/1	2,3	4×10^{8}	То же	57	50	31
4/2	2,4	6×10^{8}	»	57	50	29
4/3	2,2	5×10^{8}	»	58	50	30
13	4,5	6×10^{10}	1,19	57	52	33
14	4,3	9×10^{9}	Не опр.	Не опр.	Не опр.	Не опр.
15	4,4	6×10^{9}	То же	56	49	35
16	4,4	8×10^{9}	»	56	50	35

вируса в жидкой фазе культур клеток КЭ колебалось от 5×10^{7} (клон 4) до 6×10^{10} БОЕ/мл (клон 13). Прямой корреляции с признаком размера бляшек не обнаружено, хотя крупнобляшечные клоны репродуцировались более активно, чем средне- и мелкобляшечные (см. таблицу). Средний уровень накопления для крупнобляшечных клонов составлял 2×10^{10} БОЕ/мл, тогда как титры мелкобляшечных клонов составляли в среднем 4×10^{7} БОЕ/мл, а среднебляшечных клонов 6×10^{8} БОЕ/мл. Однако среди мелкобляшечных и крупнобляшечных клонов имелись варианты с высоким уровнем репродукции (клоны 5—8, 10—12). Для молекулярно-биологических исследований были выбраны клоны с высокой репродуктивной способностью, так как это существенно облегчает получение достаточных для анализа количеств высокоочищенных препаратов вирионов.

По уровню гемагглютинирующей активности клоны вируса ВЭЛ также различались, но четкой зависимости этой характеристики от репродуктивной активности не отмечено. Некоторая корреляция наблюдалась между репродуктивной активностью клона и оптимальным pH в РГА: высокорепродуктивные клоны имели оптимум pH в зоне 6,0—6,1, тогда как слаборепродуцирующиеся мелкобляшечные клоны проявляли максимальную гемагглютинирующую активность при pH 6,2.

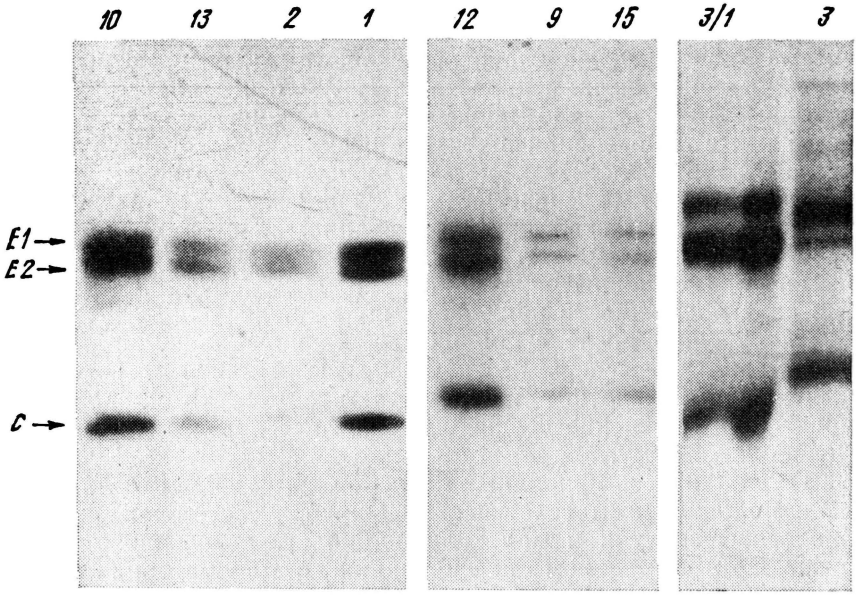
Анализ шести выборочных клонов из популяции вируса

ВЭЛ показал, что плавучая плотность вирионов соответствовала 1,18—1,19 г/см^3, небольшие изменения были в пределах ошибки метода. Таким образом, изучение плавучей плотности вирионов не позволяет выявить гетерогенность популяции вируса. Сравнительный анализ структурных белков вириона методом электрофореза в полиакриламидном геле был проведен на моделях 15 клонов, которые различались по своим биологическим свойствам. Обнаружено, что все изученные клоны имеют стандартное для вируса ВЭЛ количество белков: два белка оболочки с молекулярными массами в среднем 50 и 55 Кд и белок нуклеокапсида с молекулярной массой в среднем 33 Кд. Однако некоторые клоны существенно отличались от среднестатистического уровня по электрофоретической подвижности белков. Молекулярные массы белка Е1 колебались в пределах 58—53 Кд, белка Е2 — в пределах 49—52 Кд. В отдельных экспериментах не могли разделить белки оболочки, которые давали на электрофореграмме одну широкую полосу. Для некоторых клонов отмечена повышенная подвижность нуклеокапсидного белка, молекулярная масса которого для клонов 3/1, 4/1, 4/2, 4/3 равнялась 29—32 Кд. Характеристика клона по электрофоретической подвижности белков вириона не была связана прямо с каким-либо другим генетическим маркером клона, однако для каждого клона эта характеристика была достаточно стабильной и при пассажах вируса не менялась. Лишь у клона 3/1, оказавшегося нестабильным по признаку размера бляшек и после серии пассажей ревертировавшегося к исходному мелкобляшечному фенотипу клона 3, отмечено также изменение молекулярной массы нуклеокапсидного белка от 32 до 34 Кд, характерной для клона 3 (см. рисунок).

Исследованные 20 клонов вируса ВЭЛ были отобраны из гетерогенной по признаку размера бляшек популяции лабораторного штамма, прошедшего большое число пассажей как через мозг белых мышей, так и в культуре клеток. В выборку клонов попали крупно-, средне- и мелкобляшечные клоны, различающиеся также по репродуктивной активности. На моделях различных тогавирусов показано, что размер бляшек, как и патогенность, является полигенным признаком, прямо не коррелирующим с другими генетическими маркерами. Поэтому нами предприняты попытки выявить гетерогенность данной полуляции и по другим параметрам.

Признак плавучей плотности вирионов оказался непригодным для характеристики популяции, так как резко различающиеся по биологической активности клоны давали близкие показатели плавучей плотности 1,18—1,19 г/см^3.

Различия в биологической активности вируса могут быть связаны с более тонкими биохимическими изменениями в структурных компонентах вириона, которые не влияют на плавучую плотность. В настоящее время большинство исследователей



Электрофоретический профиль структурных белков вирионов некоторых клонов из популяции вируса ВЭЛ.

SDS — электрофорез в пластинах полиакриламидного геля. Разделяющий гель 10 %, фокусирующий гель 3 %, напряжение 30 мА на пластину геля. Окраска амидовым черным. Цифрами обозначены номера клонов. E1 и E2 — белки оболочки, C — белок РНП.

связывают биологическую активность вирусов с особенностями первичной структуры компонентов вириона, которая кодируется вирусным геном, поэтому для характеристики отдельных штаммов и клонов вируса используются все более широко биохимические методы [4, 5, 12, 14]. Изменение таких характеристик, как хроматографическое поведение на различных носителях, электрофоретические профили структурных белков и РНК, фингерпринтные карты олигонуклеотидов и олигопептидов, электрофокусировка при определенных pH и других, может отражать изменения, происходящие в структуре отдельных вирионов, образующих популяцию, и в конечном счете характеризовать качественный состав популяции. Это могут быть как отдельные штаммы и географические варианты в природной популяции вируса, так и отдельные мутанты, изолированные из популяции лабораторного штамма. Леон и его соавторы [7] выделили вариант вируса Синдбис с измененным белком E2 из выбранной наугад бляшки, не отличающейся по морфологии от остальных бляшек в популяции. Браха и Шлезингер выделили клон с измененным гликопротеином E1 [3].

Модификация оболочечного гликопротеина вируса Синдбис сопровождалась повышением стабильности вируса и нараста-

нием инфекционности для культур клеток [11]. В нашей предыдущей работе были выявлены различия по комплексу признаков клонов вируса японского энцефалита, которые различались по биологическим свойствам [1]. Все это приводит к необходимости регулярно проверять популяции вирусов, пассированных в лаборатории в течение нескольких лет, по биохимическим характеристикам, не ограничиваясь контролем только за биологическими свойствами. Стабильность такой характеристики, как электрофоретическая подвижность структурных белков вириона, может служить показателем стабильности мутантов, полученных в лаборатории. Изменение электрофоретической подвижности нуклеокапсидного белка клона 3/1, которое произошло после серии пассажей вируса в культуре клеток, можно объяснить нестабильностью мутанта и реверсией к исходному фенотипу клона 3, тем более что параллельно произошло изменение среднебляшечного фенотипа к исходному мелкобляшечному.

Гетерогенность природных штаммов вируса ВЭЛ была выявлена по различным генетическим маркерам, отражающим как биологические, так и молекулярно-биологические свойства вируса. При длительном пассировании в лаборатории одного штамма вируса клоны, полученные из него разными способами и на разных пассажных уровнях, гетерогенны по своему генотипу, а после серии пассажей популяции этих клонов могут обладать уже хорошо выраженными различиями в фенотипическом проявлении некоторых молекулярно-биологических свойств. Таким образом, в лаборатории в ограниченном масштабе моделируются процессы, происходящие в природе и приводящие к гетерогенности природных популяций вируса по этим признакам.

ЛИТЕРАТУРА

1. Карпова Е. Ф., Логинова Н. В., Гаврилов В. И. Коррелятивная взаимосвязь генетических признаков вируса японского энцефалита.— В сб.: Арбовирусы. М., 1974, с. 160—164.

2. Beckman D. L., Caliquri A., Silly L. S. Cleavage site alterations in poliovirus specific precursor proteins.— Virology, 1976, vol. 13, p. 216—217.

3. Bracha M., Schlesinger M. J. Altered E2 glycoprotein of Sindbis virus and its use in complementation studies.— J. Virol., 1976, vol. 26, p. 126—135.

4. France J. K., Wyrick B. C., Trent D. W. Biochemical and antigenic comparisons of the envelope glycoproteins of Venezuelan equine encephalomyelitis virus strains.— J. Gen. Virol., 1979, vol. 44, p. 725—740.

5. Jahrling P. B., Eddy G. A. Comparisons among members of the Venezuelan encephalitis virus complex using hydroxylapatite column chromatography.— Amer. J. Epidemiol., 1977, vol. 106, p. 408—417.

6. Laemmly U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage.— Nature (Lond.), 1970, vol. 227, p. 680—685.

7. Leone A., Calantuoni V., Pontarelli G., Cancedda R. Defective mutant of Sindbis virus with a smaller molecular weight form of the E1 glycoprotein.— J. Virol., 1980, vol. 34, p. 598—603.

8. Pedersen C. E., Eddy G. A. Comparative analysis of members of the Venezuelan equine encephalomyelitis virus complex.— Amer. J. Epidemiol., 1975, vol. 101, p. 245—252.

9. Pedersen C. E., Slocum D. R., Robinson D. R. Comparative studies of plague variants derived from a Florida strain of Venezuelan equine encephalomyelitis virus.— Infect. Immun., 1972, vol. 6, p. 779—784.

10. Scherer W. F., Pancane B. A. Comparisons of Venezuelan encephalitis virus strains by hemagglutination-inhibition test with chiken antibodies.— J. Clin. Microbiol., 1977, vol. 6, p. 578—585.

11. Symington J., Schlesinger M. J. Characterization of Sindbis virus variant with altered host range.— Arch. Virol., 1978, vol. 58, p. 127—136.

12. Trent D. W., Clewley J. P., France J. K., Bishop D. H. L. Immunochemical and oligonucleotide fingerprint analysis of Venezuelan equine encephalomyelytis complex virus.— J. Gen. Virol., 1979, vol. 43, p. 365—381.

13. Villers E. M., de. Comparisons of two capsid polipeptides of various bluetongue virus serotypes.— Intervirology, 1974, vol. 3, p. 47—53.

14. Weibe M. E., Scherer W. F. Heterogeneity of envelope polypeptides among strains of Venezuelan encephalitis virus.— Virology, 1979, vol. 94, p. 474—478.

15. Wunner W. H., Pringle C. R. A temperature-sensitive mutant of vesicular stomatitis virus with two abnormal virus proteins.— J. Gen. Virol., 1974, vol. 23, p. 97—106.

16. Zarate M. L., Scherer W. F. A comparative study of virulences, plaque morphologies and antigenic characteristics of Venezuelan encephalitis virus strains.— Amer. J. Epidemiol., 1969, vol. 89, p. 489—502.

17. Young N. A., Johnson K. M. Antigenic variants of Venezuelan equine encephalitis virus: their geographyc distribution and epidemiologic significance.— Amer. J. Epidemiol., 1969, vol. 89, p. 286—307.

АКАДЕМИЯ НАУК СССР • УРАЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ • 1983

В. К. СЛОБОДЕНЮК, Н. П. ПЛОТНИКОВ, Г. А. КВАШНИНА

ВИРУСНЫЕ АССОЦИАЦИИ У ЖИВОТНЫХ С КЛИНИЧЕСКИМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ПНЕВМОНИИ

Одна из своеобразных форм гетерогенности вирусной популяции — вирусно-вирусные ассоциации, представляющие собой экологические системы со сложными и многообразными кооперативными взаимоотношениями, протекающие на фоне измененной реактивности клетки и организма. В литературе имеются сообщения о выявлении у животных вирусных ассоциаций, представленных смешанными популяциями коронавирусов и ротавирусов, пикорна- или парвовирусы с коронавирусами, ротавирусами, вирусами герпеса и аденовирусами [4, 8]. Выявление и изучение вирусных ассоциаций представляет интерес с позиций эпидемиологии вирусных инфекций [3].

Ранее нами было предпринято изучение этиологии пневмонии свиней при вспышках в одном из хозяйств Свердловской области. Комплексными бактериологическими, серологическими и вирусологическими методами исключен ряд распространенных этиологических агентов, вызывающих у животных клинические проявления пневмонии и определено участие энтеровирусов свиней типа 2 в этиологии данной инфекции [2]. Дальнейшие наблюдения показали, что в популяции вирусов, выделенных во время вспышек пневмонии, присутствуют как идентичные данному серотипу энтеровирусы, так и варианты, отличающиеся в антигенном отношении. Фракционирование такого варианта (предварительно очищенного и концентрированного) с помощью гель-хроматографии на колонке с сефарозой 4В позволило выявить несколько пиков, обладающих инфекционной активностью, и предположить наличие смешанной вирусной популяции, в состав которой входят вирионы, отличающиеся друг от друга размером. В настоящей работе представлены результаты исследования предполагаемой смешанной популяции вирусов.

Материалы и методы исследований

Выделение вируса проводили, используя в качестве исходного материала носовые смывы, взятые у 75-дневных поросят с клиническими проявлениями пневмонии. После обработки

исходного материала антибиотиками (пенициллин, стрептомицин 500 Ед/мл) им заражали перевиваемую культуру клеток почки эмбриона свиньи (СПЭВ).

Инфекционную активность определяли путем титрования вирусосодержащей суспензии на той же культуре ткани. Титры выражали в $\lg ТЦД_{50/мл}$. Титрование выделенного вируса проводили в реакции биологической нейтрализации (РБН), используя постоянную дозу вируса и разведения типовых гипериммунных сывороток к энтеровирусам свиней 2—9-го типов. Индикаторной системой служила культура клеток.

Концентрирование и частичную очистку вируса проводили двумя способами. В первом случае вирусосодержащую суспензию, осветленную центрифугированием при 3500 об/мин в течение 30 мин для концентрирования вируса, обрабатывали полиэтиленгликолем (ПЭГ) с м.м. 6000. Конечная концентрация ПЭГ 4—5 %. Методика осаждения соответствовала описанной в [6]. Во втором случае применяли ультрацентрифугирование (ультрацентрифуга Spinco L2—65B, ротор SW 50.1, 36 000 об/мин в течение 1,5 ч). В части опытов осаждение проводили в присутствии стабилизатора — глютарового альдегида в конечной концентрации 3 %.

Препараты вируса для электронной микроскопии готовили капельным методом, используя для негативного контрастирования 1,5 %-ный раствор фосфорновольфрамовой кислоты (ФВК), pH 6,8. Сетки, покрытые угольной пленкой, накладывали на каплю вирусосодержащего материала (10 мин), а затем на каплю ФВК (30—60 с). Готовые препараты просматривали в электронном микроскопе JEM — 100S при инструментальном увеличении 50 000—100 000.

Результаты и их обсуждение

Цитопатическое действие (ЦПД) вируса обнаруживали с первого пассажа. Титр вируса составил в среднем 6 $\lg ТЦД_{50/мл}$. При типировании в РБН с эталонными иммунными сыворотками к различным серотипам энтеровирусов свиней выявлено антигенное родство выделенного вируса с энтеровирусом типа 2. Наибольшее разведение антисыворотки, нейтрализующее 100 ТЦД вируса, составляло 1/128 (при титре сыворотки 1/512). У сывороток к серотипам 3, 4, 5, 8 и 9 нейтрализатия выявлялась в первых разведениях (1/2—1/8). Антисыворотки к серотипам 6 и 7 не нейтрализовали вирус.

Применение ПЭГ для частичной очистки и концентрировании вируса увеличивало его количество в 100 раз, что позволило получить препараты для электронной микроскопии, в которых выявлялись скопления малых оферических частиц размером 24—30 нм, сходных по морфологии с энтеровирусами свиней. В таких препаратах, приготовленных из осадка, полу-

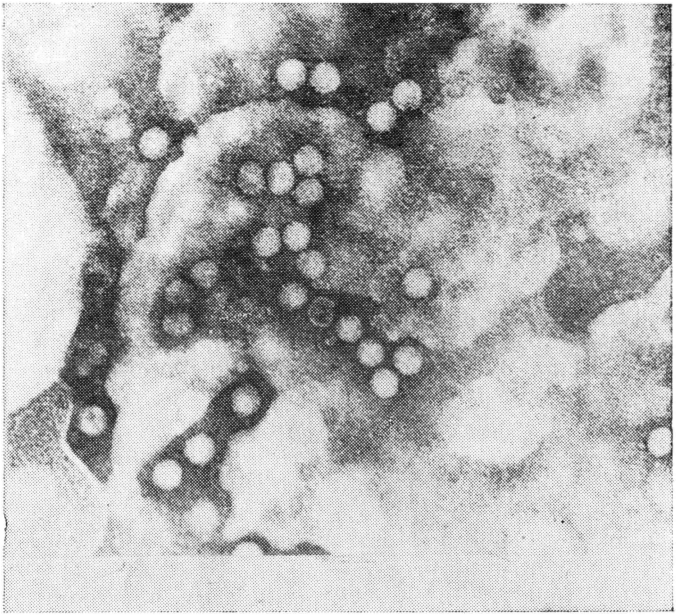


Рис. 1. Энтеровирусы, выделенные из носовых смывов животных с клиническими проявлениями пневмонии. ×150000.

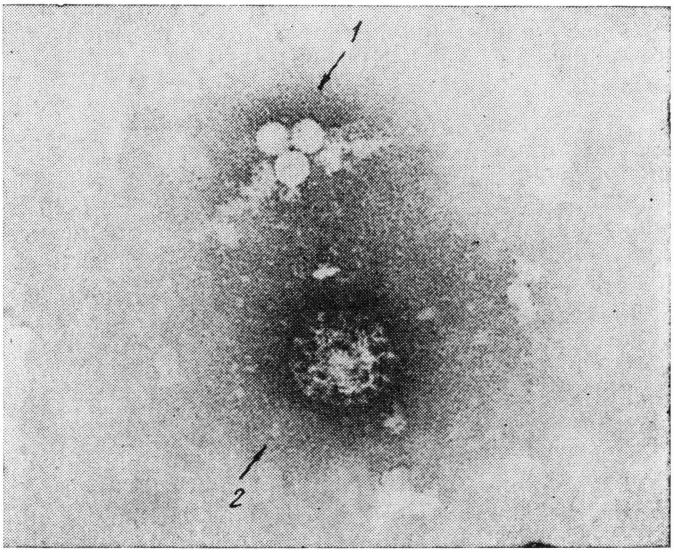
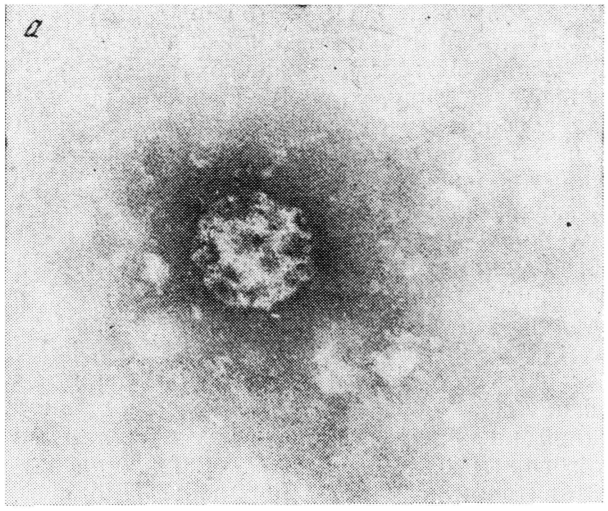


Рис. 2. Вирусная ассоциация. ×180000.
1 — энтеровирусы, *2* — реоподобный вирус.



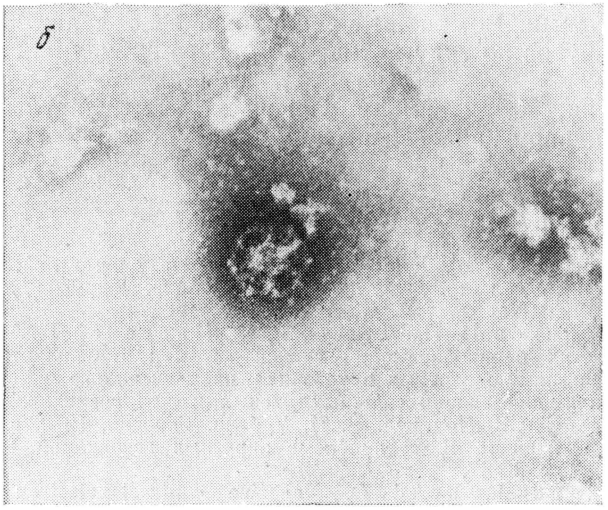


Рис. 3. Морфологические формы реоподобных вирусов.
а — частица диаметром 90 нм, ×150000; *б* — частица диаметром 60 нм, ×175000.

ченного при использовании ПЭГ, можно было увидеть большие группы энтеровирусов (рис. 1). В препаратах, полученных при концентрировании вирусосодержащего материала с помощью ультрацентрифугирования, наряду с энтеровирусами обнаруживались вирусоподобные структуры диаметром 60—80 нм, лишенные четких поверхностных границ. Применение в качестве стабилизатора глютарового альдегида позволило получить микрофотографии таких частиц. На рис. 2 можно увидеть группу энтеровирусов (*1*), ниже которой расположена круглой формы частица диаметром 75 нм (*2*), имеющая четкие поверхностные границы и решетчатоподобную структуру, более выраженную к периферии частицы. На рис. 3 показаны две частицы, одна из которых диаметром 90 нм имеет «сотообразную» поверхность, у другой хорошо виден шестигранный контур, ее диаметр 60 нм. «Сотообразная» структура, наличие четких границ наружной поверхности, как и размеры вирусных частиц, позволяют говорить о морфологическом сходстве данных вирусов с представителями семейства Reoviridae [1, 5, 7].

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности существования смешанной инфекции в форме вирусной ассоциации, представленной энтеровирусами и реоподобными вирусами. Возникает предположение о взаимосвязи изучаемых вирусов по типу активации одного вируса под действием другого.

Экологический и эпидемиологический смысл существования найденной вирусной ассоциации требует дальнейшего изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Королев М. Б., Хаустов В. И., Шекоян Л. А. Морфогенез ротавируса человека в культуре клеток.— Вопр. вирусол., 1981, № 3, с. 309—314.

2. Плотников Н. П., Душук Р. В., Надточей Г. А. и др. Изучение этиологии бронхопневмоний свиней.— В кн.: Профилактика и меры борьбы с болезнями животных в условиях промышленного животноводства: [Тезисы докл. конференции молодых ученых и вет. специалистов Нечерноземной зоны РСФСР]/Под ред. В. П. Урбана. Горький, 1979, с. 89—90.

3. Погодина В. В. К проблеме вирусных ассоциаций.— Вопр. вирусол., 1977, № 1, с. 8—17.

4. England J., Read D. Negative contrast electron microscopic techniques for diagnosis of viral of veterinary importenc.— Cornell. Veter., 1980, vol. 70, N 2, p. 125—135.

5. Fenner F., McAuslan B. R., Mims P. A. et al. The Biology of Animal Viruses: N.Y.; Lond., Acad. Press., 1974.

6. Heinz F., Kunz Ch. Концентрирование и очистка вируса клещевого энцефалита, выращенного в суспензии клеток куриного эмбриона.— Acta virolog., 1977, vol. 21, № 4, p. 301—307.

7. Kogasaka R., Akihara M., Horino K. et al. A morphological study of human rotavirus.— Archiv. Virol., 1979, vol. 61, p. 41—48.

8. Sail L. J., Bohl E. H., Theil K. W. et al. Rotavirus-like, calicivirus-like and 23 nm virus-like particles associated with diarrhea in joung pigs.— J. Clin. Microbiol., 1980, vol. 12, N 1, p. 105—111.

СОДЕРЖАНИЕ

Бактериальная популяция

Ю. В. Пашин, Р. А. Пшеничнов. Общие принципы выбора методов оценки потенциальных генетических эффектов факторов окружающей среды 5
Ю. Н. Маслов, З. Л. Парамонова. Изучение гетерогенности природных популяций кишечной палочки. Сообщение I. Генетические маркеры природной популяции кишечной палочки, выделенной из открытых естественных водоемов 10
Ю. Н. Маслов Изучение гетерогенности природных популяций кишечной палочки Сообщение II. Генетические маркеры природной популяции кишечной палочки, выделенной из промышленных стоков с высоким содержанием химических мутагенов 14
Р. А. Пшеничнов, С. В. Колотвинов. Изучение гетерогенности природных популяций кишечной палочки. Сообщение III. Биометрический анализ взаимосвязи генетических маркеров 18
А. А. Еремина, Н. В. Галясная, В. А. Демаков. Оценка мутагенной активности стимуляторов роста растений 28
В. М. Колотов, В. Ф. Петров. Изготовление и контроль препаратов сухой микросомальной фракции для выявления потенциальных мутагенов окружающей среды . . 33
А. Д. Шустов, Н. Я. Ковязин, С. Ю. Солодников, В. Н. Ченцов, Н. П. Чернышев, М. Р. Пшеничнов. Оценка мутагенной и антимутагенной активности некоторых лекарственных растений (предварительное сообщение) 37
В. П. Шеховцев. Изучение роста бактериальных колоний при помощи нового термостатированного микрокультиватора 42

Вирусная популяция

Я. Я. Цилинский. К вопросу о скорости и направлении эволюции вирусов 47
Г. И Карпухин, С. С. Галитаров, Д. Б. Голубев. Гетерогенность популяции вируса гриппа в естественных условиях и в эксперименте 53
Т. И. Дживанян. Различия вирусов комплекса клещевого энцефалита по чувствительности их гемагглютининов к действию детергентов и по олигопептидным картам гемагглютининов 67
С. В. Колотвинов, Л. С. Субботина. Сравнительное изучение вариантов вируса клещевого энцефалита, обладающих различной функциональной активностью в серологических тестах 74

В. С. Кокорев, Е. Г. Колотвинова, Г. И. Сотникова. Структурно-функциональный анализ штаммов вируса клещевого энцефалита 86
В. С. Кокорев, Т. Т. Федотова. Использование реакции истощения антигемагглютининов и модифицированной реакции торможения гемагглютинации для оценки степени гетерогенности вирусной популяции 98
Е. Ф. Карпова, Я. Я. Цилинский. Изучение гетерогенности популяции вируса Венесуэльского энцефаломиелита лошадей по фундаментальным признакам . . . 107
В. К. Слободенюк, Н. П. Плотников, Г. А. Кашнина. Вирусные ассоциации у животных с клиническими проявлениями пневмонии 114

УДК 575.246

Общие принципы выбора методов оценки потенциальных генетических эффектов факторов окружающей среды. Пашин Ю. В., Пшеничнов Р. А.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Учитывая выраженное влияние мутаций на формирование гетерогенности природных популяций, анализируем описанные в литературе и модифицированные авторами методы генетического контроля на бактериальных тест-системах, культурах клеток, организменном уровне. Описывается принципиальная схема, позволяющая выявлять в популяциях генные (точковые) мутации, хромосомные повреждения и геномные нарушения. Делается заключение, что указанная схема пригодна для испытаний на мутагенную активность химических факторов, загрязняющих окружающую среду.

Таблиц 1. Библ. 12 назв.

УДК 576.095

Изучение гетерогенности природных популяций кишечной палочки. Сообщение I. Генетические маркеры природной популяции кишечной палочки, выделенной из открытых естественных водоемов. Маслов Ю. Н., Парамонов З. Л.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Изучение гетерогенности природной популяции кишечной палочки, находящейся в условиях минимального воздействия мутагенных факторов, предпринято с целью фиксации фоновой гетерогенности данного микроорганизма, определения «исходной точки» при создании системы генетического мониторинга бактериальной популяции. У 50 клонов кишечной палочки изучены маркеры, характеризующие биохимическую активность, характер питательной зависимости, чувствительность к антибиотикам, колицинорезистентность и др. (всего более 50 маркеров). Проведенные исследования показали широкую внутрипопуляционную неоднородность клонов кишечной палочки по всем изученным признакам, позволили определить структуру этой неоднородности и, таким образом, достигнуть поставленной цели.

Библ. 7 назв.

УДК 576.8.095

Изучение гетерогенности природных популяций кишечной палочки. Сообщение II. Генетические маркеры природной популяции кишечной палочки, выделенной из промышленных стоков с высоким содержанием химических мутагенов. Маслов Ю. Н.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Изучение гетерогенности бактериальной популяции, обитающей в экстремальных условиях, необходимо для проверки эффективности системы генетического мониторинга как индикатора последствий загрязнения окружающей среды. Исследовано 50 клонов кишечной палочки, выделенных из сточных вод производственного объединения «Пермнефтеоргсинтез». Мутагенная активность сточных вод была предварительно доказана с использованием тест-штаммов ЭЙМСА. Проведенные исследования позволили выявить определенные

сдвиги в генетической структуре бактериальной популяции. Следовательно, наблюдения за структурой генофонда природных бактериальных популяций позволяют регистрировать мутационный процесс, идущий под влиянием антропогенных факторов. Этот факт указывает на возможность создания эффективной системы слежения за генетическими последствиями загрязнения окружающей среды.

Таблиц 2.

УДК 576.8.095

Изучение гетерогенности природных популяций кишечной палочки. Сообщение III. Биометрический анализ взаимосвязи генетических маркеров. Пшеничнов Р. В., Колотвинов С. В.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

С использованием метода корреляционных плеяд проведен биометрический анализ взаимосвязи генетических маркеров природных популяций кишечной палочки. Определены значительные различия в генетической структуре популяций, выделенных из чистой проточной воды и из воды с высоким содержанием мутагенов. В целом результаты биометрического анализа свидетельствуют о выраженной функциональной интеграции участков генома у клонов, выделенных из чистой проточной воды, и повышении относительной роли внутренних факторов развития у группы клонов, выделенных из промышленных стоков, в результате чего эти клоны становятся менее зависимыми по отношению к действию факторов внешней среды.

Ил. 15. Библ. 3 назв.

УДК 576.8

Оценка мутагенной активности стимуляторов роста растений. Еремина А. А., Галясная Н. В., Демаков В. А.— В сб.: Гетерогенность популяций микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Изучены мутагенные свойства гиббереллина, кинетина, этиленхлоргидрина с помощью микробных тест-систем и культур клеток млекопитающих. Исследован характер действия веществ и определены зависимости величины мутагенных эффектов от доз препаратов. Мутагенная активность установлена для этиленхлоргидрина на индикаторном штамме ТА 100 и культурных тканей эукариот.

Таблиц 2. Библ. 8 назв.

УДК 576.8

Изготовление и контроль препаратов сухой микросомальной фракции для выявления потенциальных мутагенов окружающей среды. Колотов В. М., Петров В. Ф.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

С целью усовершенствования методики индикации потенциальных мутагенов на бактериальных тест-системах (метод Эймса) разработан способ стабилизации микросомальной фракции печени грызунов. Для этого свежеприготовленную фракцию лиофилизируют с последующим запаиванием ампул с высушенным препаратом под вакуумом. Динамическими

контрольными проверками установлено, что сухая фракция сохраняет свою биологическую активность в течение не менее 12 мес. хранения.

Таблиц 1. Библ. 7 назв.

УДК 575.246

Оценка мутагенной и антимутагенной активности некоторых лекарственных растений (предварительное сообщение). Шустов А. Д., Ковязин Н. Я., Солодников С. Ю., Ченцов В. Н., Чернышев Н. И., Пшеничнов М. Р.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

На микробных тест-системах по методикам Эймса изучена антимутагенная и мутагенная активность фильтратов сока 49 видов лекарственных растений. Антимутагенной активностью обладают восемь видов из 42 (наибольшей — зверобой обыкновенный *Hypericum perforatum* L.) и мутагенной — один вид (дягиль лекарственный *Archangelica officinalis* Hoffm).

Таблиц 1. Библ. 5 назв.

УДК 576.8

Изучение роста бактериальных колоний при помощи нового термостатированного микрокультиватора. Шеховцов В. П.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Сообщается о приборе, предназначенном для изучения процесса формирования и строения бактериальных микроколоний. Конструктивные особенности прибора позволяют инкубировать культуру в интерфазе агар — воздух и создать оптимальный режим аэрации, регулируемой смены газовой среды, температуры, влажности, длительно сохранять стерильность.

Получены новые данные об особенностях формирования микроколоний четырех вариантов *Bac. brevis* var. G.—B. и двух видов трихомных бактерий *Caryophanon* Peshkoff.

Ил. 1. Библ. 4 назв.

УДК 576.858.095.5

К вопросу о скорости и направлении эволюции вирусов. Цилинский Я. Я.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Проблема скорости и направления эволюции вирусов рассматривается с позиций общей эволюционной теории. Генетическое содержание эволюции вирусов, как и эволюции на более высоких ступенях жизни, заключается в преобразовании генетической структуры популяции. Благодаря примитивному строению последней, эволюция вирусов может осуществляться чрезвычайно быстро. Направление эволюции определяется условиями среды. Биохимический и структурно-функциональный консерватизм клетки сдерживает эволюцию вирусов в направлении увеличения размеров генома и изменения способов реализации генетической информации. Непостоянство и разнообразие других компонентов среды определяют возможность изменения тканевого тропизма, спектра хозяев, антигенной структуры и уровня вирулентности. В эволюционном

прошлом этот процесс привел к образованию многочисленных видов, не отличающихся по фундаментальным свойствам, но имеющих неодинаковые патогенные потенции и адаптированных к различным хозяевам. Следствием продолжающейся эволюции этих видов может стать появление новых вариантов возбудителя, создающих повышенную эпидемическую опасность.

Библ. 6 назв.

УДК 576.858.095.5

Гетерогенность популяции вируса гриппа в естественных условиях и в эксперименте. Карпухин Г. И., Галитаров С. С., Голубев Д. Б.—В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

В современной науке о гриппе четко противостоят друг другу две альтернативные концепции происхождения пандемических штаммов вируса гриппа: зооантропонозная и антропонозная. Хотя и имеются попытки объяснить происхождение антигенных анахронизмов вируса гриппа А с позиций зооантропонозной концепции, но сам факт периодического выделения вирусов гриппа А уже известных сероподтипов «не в свое время» свидетельствует об их сохранении в человеческой популяции в межпандемический период и, следовательно, против их зоонозной природы. Центральным при изучении каждого анахронизма является вопрос об его аутентичности (истинности).

В статье описаны два новых антигенных анахронизма: A/H2N2/ — в 1980 г. в г. Ленинграде и A/H0N1/ — в г. Киеве. Вирусы A/H2N2/, выделенные в основном от детей в г. Ленинграде весной 1980 г., оказались близки по ряду лабораторных параметров к эталонам A/H2N2/1957 г., а по некоторым из них — неотличимыми от этих эталонов. Решающие доказательства аутентичности этого анахронизма получены при проведении серологического исследования, выявившего достоверные и в целом ряде случаев изолированные сероконверсии к гемагглютининам H2 за счет Jg M-глобулинов. Аутентичность анахронизма A/H0N1/ в 1981 г. в г. Киеве документирована результатами лабораторного изучения выделенных вирусов, показавшего, в частности, их несходство со всеми эталонами /H0N1/1933—1947 гг. выделения по полипептидному составу и электрофоретической подвижности фрагментов РНК.

Таблиц 7. Ил. 3. Библ. 23 назв.

УДК 576.858.095.5

Различия вирусов комплекса клещевого энцефалита по чувствительности их гемагглютининов к действию детергентов и по олигопептидным картам гемагглютининов. Дживанян Т. И.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Приведен обзор описанных в литературе генетических маркеров вируса клещевого энцефалита (КЭ). Кратко обсуждается значение работ по изучению генетических признаков для решения проблем современной эпидемиологии и экологии вируса КЭ. Описываются два новых признака, по которым дифференцируются штаммы вируса КЭ, имеющие различную нейровирулентность и экологические характеристики:

1) признак чувствительности гемагглютининов вируса КЭ к детергентам гиамину 10Х, тритону Х-100 и дезоксихолату натрия; 2) олигопептидный состав вирионного белка V_3 (Е).

Таблиц 1. Ил. 1. Библ. 44 назв.

УДК 576.858.095.5

Сравнительное изучение вариантов вируса клещевого энцефалита, обладающих различной функциональной активностью в серологических тестах. Колотвинов С. В., Субботина Л. С.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Изучены некоторые генетические маркеры клонов вируса клещевого энцефалита, обладающих различной функциональной активностью в серологических тестах (авидностью), и соотношение этих маркеров между собой. Показано, что фенотип авидных клонов характеризуется сниженной нейровирулентностью при периферическом инфицировании мышей, термолабильностью, чувствительностью к денатурирующему воздействию мочевины, высокими значениями плавучей плотности и небольшими размерами бляшек, формируемых под агаровым покрытием. Выявлена стабильность признака авидности при пассажах вируса через мозг белых мышей. Проведен биометрический анализ взаимосвязи генетических признаков с использованием принципа максимального корреляционного пути. Обсуждается вопрос о природе функциональной активности вирусных антигенов.

Таблиц 2. Ил. 2. Библ. 28 назв.

УДК 576.858.095.5

Структурно-функциональный анализ штаммов вируса клещевого энцефалита. Кокорев В. С., Колотвинова Е. Г., Сотникова Г. И.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Изучены антигенные и связанные с проявлением антигенной активности свойства вирионов авидных и неавидных вариантов вируса КЭ, функциональная активность и некоторые биофизические свойства компонентов различных (по штаммовым особенностям вируса) популяций. Выявлена значительная функциональная неоднородность фракций вирусов. Структура популяций авидных штаммов и функциональные характеристики их компонентов более однородны, чем неавидных.

Впервые показано, что авидитет антигенного препарата обусловлен активностью отдельных фракций вирусов, обладающих у каждого штамма строго определенными биофизическими характеристиками, а авидные ГА антигены более чувствительны, чем другие, к нейтрализующему действию антител к штаммоспецифическим и комплекс-реактивным антигенным детерминантам. Получены свидетельства зависимости авидитета от состояния структуры вирионов.

Показана целесообразность использования разработанных методических подходов и приемов для дифференциации штаммов арбовирусов, изучения вопросов авидитета вирусных антигенов и его материальных основ, выбора штаммов для диагностических целей.

Таблиц 5. Библ. 17 назв.

УДК 576.858.095

Использование реакции истощения антигемагглютининов и модифицированной реакции торможения гемагглютинации для оценки степени гетерогенности вирусной популяции. Кокорев В. С., Федотова Т. Т.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Показана возможность комплексного использования гельхроматографии, РИАт и МРТГА для оценки степени гетерогенности вирусной популяции по признаку авидности составляющих ее компонентов и целесообразность применения этих методов для изучения закономерностей взаимной нейтрализации антигенов и антител, стандартизации и анализа качества диагностикумов арбовирусов.

Таблиц 3. Библ. 12 назв.

УДК 576.858.095.5

Изучение гетерогенности популяции вируса Венесуэльского энцефаломиелита лошадей по фундаментальным признакам. Карпова Е. Ф., Цилинский Я. Я.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Выявлена гетерогенность популяции лабораторного штамма вируса Венесуэльского энцефаломиелита лошадей по признакам морфологии бляшек, репродуктивной активности, электрофоретической подвижности структурных белков вириона. При сохранении постоянного количества белков клоны были гетерогенны по молекулярным массам не только белков оболочки вириона, но и по белку РНП. Корреляции признака электрофоретической подвижности белков с биологическими свойствами вирусов не обнаружено. Для каждого клона эта характеристика была стабильной. Реверсия одного из мутантов к бляшечному фенотипу родительского клона сопровождалась реверсией по признаку электрофоретической подвижности нуклеокапсидного белка также к исходному фенотипу. По признаку плавучей плотности вирионов популяция вируса ВЭЛ оказалась достаточно стабильной (1,18—1,19 г/см^3).

Таблиц 1. Ил. 1. Библ. 17 назв.

УДК 576.858.095.5

Вирусные ассоциации у животных с клиническими проявлениями пневмонии. Слободенюк В. К., Плотников Н. П., Квашнина Г. А.— В сб.: Гетерогенность популяции микроорганизмов. Свердловск: УНЦ АН СССР, 1983.

Представлены результаты изучения этиологии пневмонии свиней. С помощью электронной микроскопии удалось показать, что возможным этиологическим фактором является вирусная ассоциация, представленная энтеровирусом (типа 2) и вирусом, обладающим характерными морфологическими чертами представителей семейства Reoviridae.

Ил. 3. Библ. 8 назв.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ

Утверждено к печати
Ученым советом
Института экологии растений и животных
Редакционно-издательским советом
Уральского научного центра АН СССР

Редактор Т. П. Бондарович
Техн. редактор Н. Р. Рабинович
Обложка художника М. Н. Гарипова
Корректоры О. П. Естишина, Е. М. Бородулина

РИСО УНЦ № 1198—21 (83). Сдано в набор 24.08.82. НС 19133. Подписано к печати 20.06.83. Формат 60×90 1/16. Бумага типографская № 2. Усл. печ. л. 8. Уч.-изд. л. 8,5. Тираж 600. Заказ 422. Цена 1 р. 20 к.

РИСО УНЦ АН СССР, Свердловск, ГСП-169,
ул. Первомайская, 91.
Типография изд-ва «Уральский рабочий».
Свердловск, пр. Ленина, 49.

ВЫХОДИТ В СВЕТ

сборник научных статей сотрудников Института экологии растений и животных

Серые лесные почвы Предуралья и их рациональное использование. 6 п. л. Цена 60 коп.

В сборнике обобщены результаты многолетних исследований физических и химических свойств серых лесных почв Предуралья на основе проведенного впервые на Урале крупномасштабного почвенно-лесотипологического картирования и подробной аналитической характеристики. Предлагается классификация серых лесных почв, рассматриваются их генетические особенности и лесорастительные свойства.

Выявлены закономерности распределения серых лесных почв, описана структура почвенного покрова Предуралья и взаимосвязь лесной растительности с почвами. Исследованы принципиальные отличия серых лесных почв Предуралья на основе сравнительного их изучения с аналогичными почвами Зауралья.

Сборник является первой сводной работой о серых лесных почвах Предуралья Свердловской области, представляет интерес для почвоведов, лесоводов, работающих как в научно-исследовательских, так и в проектных институтах.

Заявки присылать по адресу:

620169, Свердловск, ул. Первомайская, 91
РИСО УНЦ АН СССР