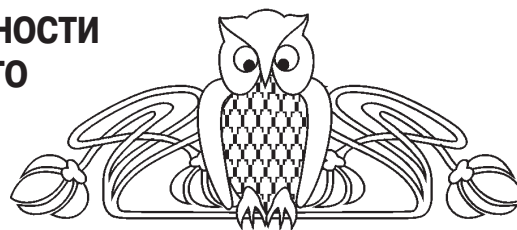




УДК 616.98:579.842.23

АНАЛИЗ СИСТЕМАТИЧЕСКОЙ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ПРОСТЕЙШИХ ИЗ ПОЧВ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГА ЧУМЫ

М. А. Макашова, Е. Г. Оглодин, К. А. Никифоров,
Н. А. Шарапова, Г. А. Ерошенко



Макашова Марина Александровна, студент биологического факультета, Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, makashova11@gmail.com

Оглодин Евгений Геннадьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, e.oglodin@rambler.ru

Никифоров Константин Алексеевич, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, nikiforov666666@mail.ru

Шарапова Наталия Анатольевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, podbor_nat@mail.ru

Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии, Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, geroshenko@yandex.ru

Характеристика видового состава доминирующих представителей простейших в природных очагах чумы важна для изучения некоторых сторон экологии и механизмов персистенции *Yersinia pestis*. Для определения систематической принадлежности амёб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы нами проведен анализ нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов этих простейших, выделенных на территории очага в 2016 г. Анализируемые участки рибосомальных генов получали с использованием специфичных праймеров методом ПЦР с последующим секвенированием ПЦР продуктов. Анализ данных фрагментарного секвенирования осуществляли выравниванием полученных нуклеотидных последовательностей на референсные нуклеотидные последовательности простейших из базы данных NCBI GenBank. Филогенетический анализ проводили с использованием программ Mega 7.0, Ugene 1.28.1 алгоритмом Maximum Likelihood. В результате установлена систематическая принадлежность простейших, выделенных из разных эпизоотических по чуме участков почв Горного Алтая, к видам *Acanthamoeba bacastellanii*, *Dictyostelium sphaerocephalum* и *D. mucoroides*. В совокупности с данными о высокой численности выделенных штаммов амёб и способности *Yersinia pestis* сохраняться в клетках этих простейших можно рассматривать идентифицированные виды амёб в качестве вероятных природных резервуаров чумы. Выделенные штаммы амёб могут быть использованы в качестве

модельных объектов при изучении особенностей экологии и механизмов сохранения возбудителя чумы в почвенных биоценозах нор грызунов природных очагов чумы.

Ключевые слова: Простейшие, *Acanthamoeba*, *Dictyostelium*, почвенный биоценоз, Горно-Алтайский высокогорный очаг чумы.

DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-325-330

Введение

Чума – зоонозная природно-очаговая бактериальная особо опасная инфекционная болезнь с преимущественно трансмиссивным механизмом передачи возбудителя [1]. Заражение возбудителем чумы в природных очагах во время эпизоотий происходит в соответствии с классической схемой горизонтальной трансмиссии: «грызун–блоха–грызун». Однако до сих пор не установлен механизм сохранения возбудителя во время длительных межэпизоотических периодов, когда не выделяются культуры возбудителя и не выявляются зараженные грызуны. Некоторые стороны экологии *Yersinia pestis*, связанные не только с длительным сохранением, но и с другими путями переноса возбудителя в макроорганизм млекопитающих, остаются малоисследованными. Предложено несколько гипотез, объясняющих сохранение возбудителя в биоценозах природных очагов чумы, но ни одна из них не доказана экспериментально. Недавно была сформулирована гипотеза вертикальной трансмиссии, по которой чумной микроб способен сохраняться в почвенных биоценозах очагов чумы в простейших и нематодах [2–4].

На сегодняшний день в литературе встречаются данные о способности *Y. pestis* сохраняться в клетках амёб *Acanthamoeba* и *Dictyostelium* от 5 дней до нескольких месяцев, что доказывает возможность рассмотрения их в качестве природных резервуаров возбудителя чумы с учетом высокой численности простейших в почве нор грызунов [5–7]. Однако механизмы сохранения и локализация возбудителя чумы как члена почвенного биоценоза остаются малоисследованными. В связи с этим представляет интерес идентификация доминирующих видов простейших из природных очагов чумы. Это позволит



охарактеризовать состав почвенного биоценоза в очагах и конкретизировать некоторые положения гипотезы вертикальной трансмиссии.

В связи с вариабельностью морфологических признаков в зависимости от условий среды определение систематической принадлежности простейших вызывает затруднения, что может приводить к получению недостоверных данных. Наиболее надежным методом выявления родства организмов является сравнение их нуклеотидных последовательностей. Для определения видовой принадлежности эукариотических организмов используются участки рибосомальных генов, в частности, достаточно консервативный участок гена 18S рРНК и более вариабельные области – внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS1, ITS2) [8].

В данной работе представлены результаты по определению систематической принадлежности амёб из почв Горного Алтая по нуклеотидным последовательностям рибосомальных генов. Также приводятся данные филогенетического анализа исследованных штаммов простейших по нуклеотидным последовательностям рибосомальных генов.

Материалы и методы

Работа проводилась с ДНК амёб, выделенных из нор серого сурка в наиболее типичных

биотопах Горно-Алтайского высокогорного очага, в которых были зарегистрированы случаи возникновения эпизоотий в 2014–2016 гг. Для анализа было выбрано 8 точек (с номерами 4, 5, 8, 9, 10, 13, 18, 20) с выраженной эпизоотической активностью, расположенных в разных участках очага. Пробы забирались на разной глубине от 10 до 120 см (10–20 см, 30–50 см, 100 см и 120 см) по методу конверта. Амёб получали из вытяжек почвы посевом на голодный агар [8]. Выделенные штаммы простейших получили обозначение по номерам точек, в которых они были собраны.

Для установления принадлежности к *Acanthamoeba* использовали праймеры JDP1/JDP2 на участок гена 18S рРНК: прямой праймер – 5'GCCCAGATCGTTTACCGTGAA, обратный праймер – 5'TCTCACAAGCTGCTAGG-GGAGTCA, температура отжига составляла 59°C [8]. Для работы с родом амёб *Dictyostelium* были рассчитаны специфичные праймеры на нуклеотидные последовательности на ITS регион и прилегающие участки с помощью онлайн-сервиса Primer3Plus и программы Ugene 1.28.1 на основе референсных последовательностей из международной базы данных NCBI. Последовательности праймеров и температуры отжига представлены в таблице. Синтез праймеров осуществляли в лаборатории диагностических препаратов РосНИПЧИ «Микроб».

Последовательности праймеров на ITS регион *Dictyostelium spp.*

№	Название	Последовательность 5'-3'	Температура плавления T _m , °C
1	AR_D_F	TCCCTGCCCTTTGTACACAC	59,9
2	AR_D_R	TATTCCTCTTCACTCGCCG	59,9
3	AR_S	GCCACCATTTTGCCTCTTGAT	60
4	AR_As	CGTCTTCACTCGCCGTTACT	60,1
5	AR_D_S2	GTCCGGAAGGATTGGGTAAT	60
6	AR_D_As2	ATAAGCCTCATCCCCATTT	59,6

Специфичность рассчитанных праймеров была подтверждена с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для рассчитанных пар праймеров были оптимизированы условия проведения ПЦР. При проведении ПЦР использовали набор БиомастерLRHS-ПЦР (ООО «Биолабмикс», г. Новосибирск). Секвенирование полученных в ПЦР фрагментов проводили на генетическом анализаторе «Applied Biosystems 3500xL» в лаборатории геномного и протеомного анализа РосНИПЧИ «Микроб». Анализ полученных нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью выравнивания на референсные последовательности алгоритмом BLAST NCBI

GenBANK. Филогенетический анализ проводили с применением программы Mega 7.0, Ugene 1.28.1 алгоритмами Maximum Likelihood. Визуализация филогенетических деревьев осуществлялась программами FigTree 1.4.3 и Dendroscope.

Результаты и их обсуждение

Из проб почв, собранных в разных участках Горно-Алтайского высокогорного очага, были выделены простейшие, которые по морфологическим характеристикам были отнесены к *Acanthamoeba* и *Dictyostelium*. К акантамебам были отнесены штаммы, выделенные в точках забора с номерами 10, 18, 20, и по этому признаку



штаммы акантамеб были обозначены как 10А, 18А и 20А. Аналогично из точек 4, 5, 8, 9, 10, 13 были выделены слизевики рода *Dictyostelium*. Выделенные штаммы были обозначены как 4D, D5, D8, 9D, 10D, D13. Для подтверждения систематической принадлежности выделенных штаммов амёб был проведен анализ их нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов.

Согласно литературным данным, для определения систематической принадлежности акантамеб используется участок гена 18S рРНК, нуклеотидные последовательности которого являются достаточно информативными и наиболее широко представлены в генетических базах данных. Поэтому для подтверждения принадлежности выделенных нами амёб к роду *Acanthamoeba* были использованы праймеры JDP1/JDP2 на участок гена 18S рРНК. Полученные методом ПЦР с помощью этих праймеров

нуклеотидные последовательности штаммов амёб 10А, 18А, 20А размером около 450 п.н. показали 100% гомологию с последовательностями *A. castellanii*, депонированными в базе данных GenBank. Это подтверждает сделанное нами на основе морфологического анализа предположение об их принадлежности к роду *Acanthamoeba*. Филогенетический анализ полученных образцов проводился с помощью программы Ugene 1.28.1 алгоритмом Maximum Likelihood. В соответствии с установленным процентом гомологии выделенные штаммы образуют общий кластер с *A. castellanii*, что соответствует идентичности анализируемого участка гена 18S рРНК. Полученные результаты доказывают, что исследованные штаммы, выделенные в части участков Горно-Алтайского высокогорного очага, относятся к виду *A. castellanii*. Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 1.

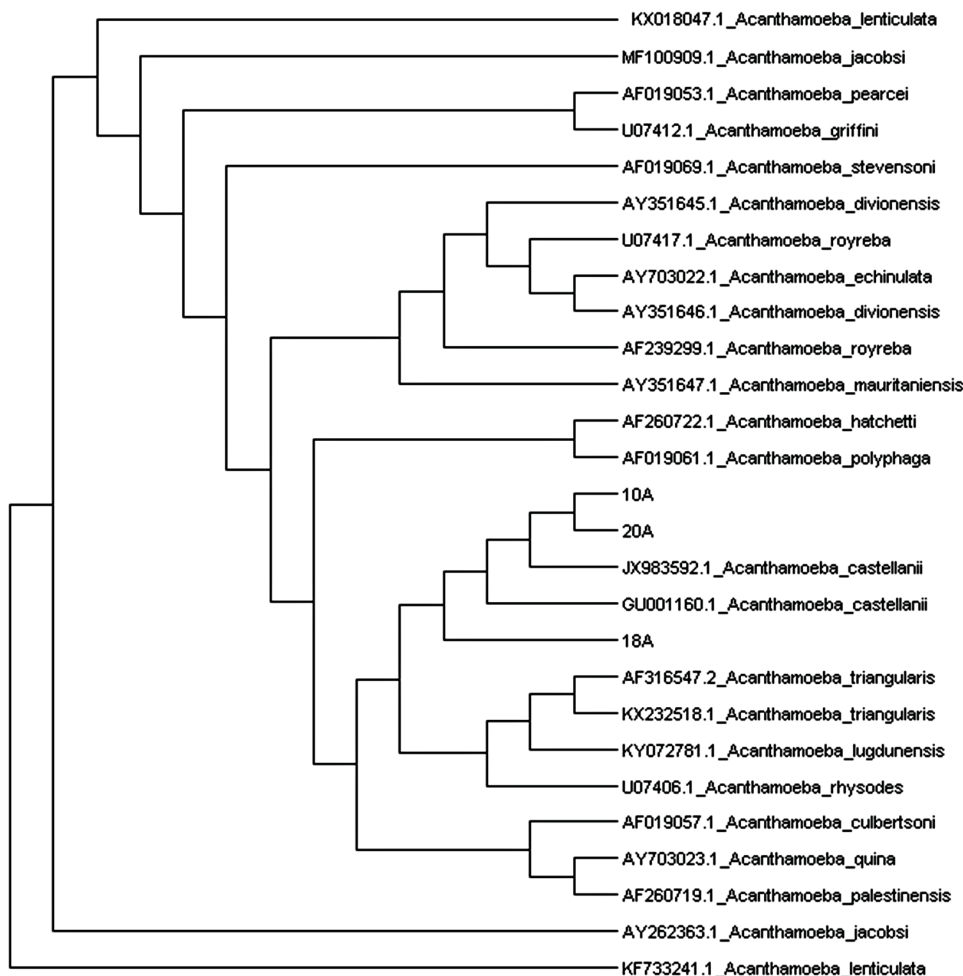


Рис. 1. Филогенетический анализ амёб рода *Acanthamoeba* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага по нуклеотидным последовательностям участка 18SpРНК (программа Ugene 1.28.1, алгоритм Maximum Likelihood). Вертикальной чертой отмечено положение исследованных штаммов амёб из Горного Алтая



Ранее была установлена систематическая принадлежность штаммов акантамеб из почв очагов Прикаспия [8]. Изолят из Волго-Уральского степного очага также относится к *A. castellanii*. Таким образом, можно сделать вывод о том, что данный вид широко распространен в природных очагах чумы степной зоны России.

Для установления систематической принадлежности других выделенных штаммов амёб (4D, D5, D8, 9D, 10D, D13), которые по морфологическим признакам были идентифицированы как *Dictyostelium*, нами был взят протяженный участок рибосомальных генов (часть гена 17S, спейсер ITS1, участок 5.8S, спейсер ITS2, часть гена 26S рРНК). Анализируемый

участок содержал как вариабельные (ITS1, ITS2), так и высококонсервативные нуклеотидные последовательности. Нами были рассчитаны праймеры, позволяющие амплифицировать весь этот участок размером 1000–1200 п.н. (см. таблицу). При анализе данных фрагментарного секвенирования полученных ПЦР фрагментов была выявлена гомология с *D. sphaerocephalum* штаммов D8 и 10D (по 99%), с *D. mucoroides* – 4D, D5, D13 (по 99%), 9D (98%). На основании полученных данных был проведен филогенетический анализ с помощью программы Ugene 1.28.1, алгоритм Maximum Likelihood. Результаты филогенетического анализа представлены на рис. 2. Из полученной дендрограммы следует,

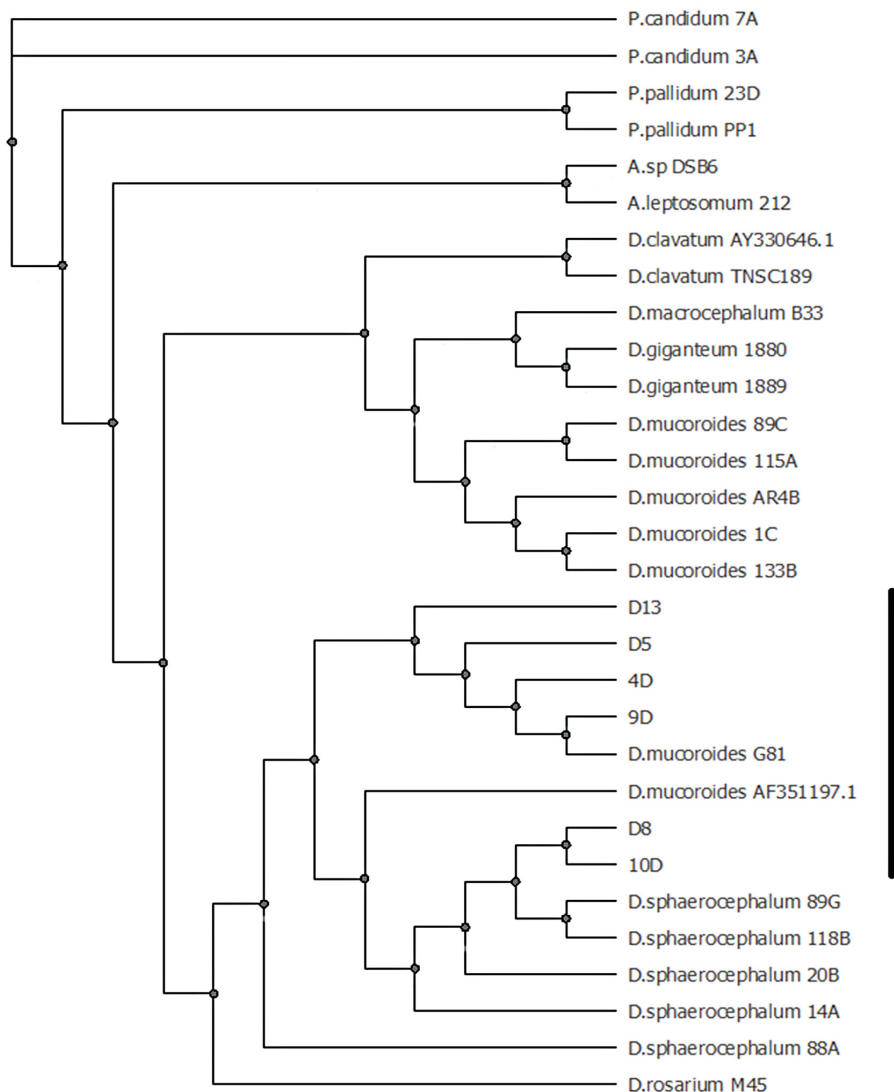


Рис. 2. Филогенетический анализ амёб рода *Dictyostelium* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага по нуклеотидным последовательностям участка рибосомальных генов, включающего фрагмент 17S – ITS1 – 5.8S – ITS2 – фрагмент 26S рРНК (программа Ugene 1.28.1, алгоритм Maximum Likelihood). Вертикальной чертой отмечено положение исследованных штаммов амёб из Горного Алтая



что анализируемые штаммы образуют большой общий кластер с другими представителями *Dictyostelium*. При этом каждый из них входит в один подкластер с тем видом, с которым наблюдается максимальный процент гомологии полученной нуклеотидной последовательности, включая виды *D. sphaerocephalum* и *D. mucoroides*. Таким образом, на основании процента гомологии и филогенетического родства установлено, что анализируемые штаммы *Dictyostelium* относятся к данным видам.

Заключение

Таким образом, на основании анализа морфологических признаков и сравнения нуклеотидных последовательностей установлена принадлежность простейших, выделенных в разных эпизоотических участках Горно-Алтайского высокогорного очага, к родам *Acanthamoeba* и *Dictyostelium*, и уточнена их видовая принадлежность, включающая виды *A. castellanii*, *D. sphaerocephalum* и *D. mucoroides*. В целом определение систематической принадлежности выделенных штаммов простейших пополняет знания о доминантных членах почвенного биоценоза нор грызунов природных очагов чумы. Полученные данные в совокупности с публикациями отечественных и зарубежных исследователей подтверждают, что простейшие являются перспективной моделью для изучения механизмов сохранения и передачи возбудителя чумы. Выявление природных резервуаров возбудителя чумы в почвенных биоценозах в дальнейшем позволит оптимизировать комплекс профилактических мер, проводимых в природных очагах чумы.

Список литературы

1. Природные очаги чумы Кавказа, Прикаспия, Средней Азии и Сибири / под ред. Г. Г. Онищенко, В. В. Кутырева. М.: Медицина, 2004. 191 с.
2. Кутырев В. В., Ерошенко Г. А., Попов Н. В., Видяева Н. А., Коннов Н. П. Молекулярные механизмы взаимодействия возбудителя чумы с беспозвоночными животными // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2009. Вып. 4. С. 6–13.
3. Попов Н. В., Слудский А. А., Удовиков А. И., Анкин В. В., Яковлев С. А., Караваева Т. Б. К роли нематод [Secernentae, Rhabdidae] – паразитов блох в энзоотии чумы // Энтомологические и паразитологические исследования в Поволжье. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2006. Вып. 5. С. 88–93.
4. Попов Н. В., Слудский А. А., Удовиков А. И., Коннов Н. П., Караваева Т. Б., Храмов В. Н. Оценка роли биоплёнок *Yersinia pestis* в механизме энзоотии чумы // ЖМЭИ. 2008. Вып. 4. С. 118–120.
5. Кошель Е. И., Ерошенко Г. А., Анисимова Л. В., Новичкова Л. А., Широков А. А., Буров А. М., Кузнецов О. С., Кутырев В. В. Оценка длительности сохранения штаммов *Yersinia pestis* в клетках почвенных амёб *Acanthamoeba* sp., в экспериментальных условиях // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. Вып. 2. С. 69–74.
6. Benavides-Montaño J. A., Vadyvaloo V. *Yersinia pestis* Resists Predation by *Acanthamoeba castellanii* and Exhibits Prolonged Intracellular Survival // Appl. Environ. Microbiol. 2017. Vol. 83, № 13. P. 1–15.
7. Markman D. W., Antolin M. F., Bowen R. A., Wheat W. H., Woods M., Gonzalez-Juarrero M., Jackson M. *Yersinia pestis* Survival and Replication in Potential Ameba Reservoir // Emerg Infect Dis. 2018. Vol. 24, № 2. P. 294–302.
8. Кошель Е. И., Анисимова Л. В., Новичкова Л. А., Видяева Н. А., Гусева Н. П., Ерошенко Г. А., Кутырев В. В. Определение систематической принадлежности почвенных амёб из очагов чумы Прикаспия на основе анализа участков рибосомного оперона // Генетика. 2015. Вып. 51. С. 39–45.

Analysis of the Systematic Appurtenance of Protozoa from the Soils of the Gorno-Altai High-mountain Plague Focus

M. A. Makashova, E. G. Oglodin, K. A. Nikiforov, N. A. Sharapova, G. A. Eroshenko

Marina A. Makashova, ORCID 0000-0002-7713-7959, Saratov State University, 83, Astrakhanskaya Str., Saratov, 410012, Russia, makashova11@gmail.com

Evgeniy G. Oglodin, ORCID 0000-0002-2955-3034, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, e.oglodin@rambler.ru

Konstantin A. Nikiforov, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, nikiforov666666@mail.ru

Nataliya A. Sharapova, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, podbor_nat@mail.ru

Galina A. Eroshenko, ORCID 0000-0001-5403-989X, Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», 46, Universitetskaya Str., Saratov, 410005, Russia, geroshenko@yandex.ru

Characterization of the species composition of the dominant representatives of Protozoa in natural plague foci is important for the study of certain aspects of ecology and persistence mechanisms of *Yersinia pestis*. Determination of systematic belonging of amoebas isolated from the soils of the Gorno-Altai high-mountain plague focus in 2016 year was carried out by analyzing nucleotide sequences of ribosomal genes of these protozoans. The analyzed sequences of ribosomal genes were obtained by PCR with specific



primers followed by sequencing of PCR products. Analysis of the data of sequencing was performed by aligning the obtained nucleotide sequences to the reference nucleotide sequences of the protozoans from the NCBI GenBank database. Phylogenetic analysis was carried out using Mega 7.0, Ugene 1.28.1 with Maximum Likelihood algorithm. As a result, the systematic belonging of the protozoans, isolated from various epizootic plague sites of the Gorny Altai soils, to the species *Acanthamoeba castellanii*, *Dictyostelium sphaerocephalum* and *D. mucoroides* was established.

Together with data on the high number of isolated amoebas and the ability of *Yersinia pestis* to survive in the cells of these protozoans, the identified amoeba species can be considered as probable natural plague reservoirs. Isolated strains of amoebas can be used as a model organisms in studying of the ecology features and the persistence mechanisms of the plague agent in soil biocenosis of rodent's burrows of natural plague foci.

Key words: Protozoa, *Acanthamoeba*, *Dictyostelium*, soil biocenosis, Gorno-Altai high-mountain plague focus.

Образец для цитирования:

Макашова М. А., Оглодин Е. Г., Никифоров К. А., Шарпова Н. А., Ерошенко Г. А. Анализ систематической принадлежности простейших из почв горно-алтайского высокогорного очага чумы // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 3. С. 325–330. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-325-330

Cite this article as:

Makashova M. A., Oglodin E. G., Nikiforov K. A., Sharapova N. A., Eroshenko G. A. Analysis of the Systematic Appurtenance of Protozoa from the Soils of the Gorno-Altai High-mountain Plague Focus. *Izv. Saratov Univ. (N. S.), Ser. Chemistry. Biology. Ecology*, 2018, vol. 18, iss. 3, pp. 325–330 (in Russian). DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-3-325-330
