

Мультилокусное генотипирование как современный подход в диагностике микроспоридий – облигатных внутриклеточных паразитов животных Токарев Ю. С.¹, Васильева А. А.², Грушевая И. В.³, Малыш Ю. М.⁴

¹Токарев Юрий Сергеевич / Tokarev Yurii Sergeevich – доктор биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория микробиологической защиты растений,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, г. Санкт-Петербург, Пушкин;

²Васильева Александра Андреевна / Vasilieva Aleksandra Andreevna – лаборант-исследователь, лаборатория микробиологической защиты растений,

Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург;

³Грушевая Инна Валентиновна / Grushevaya Inna Valentinovna – младший научный сотрудник;

⁴Малыш Юлия Михайловна / Malysh Yuliya Mikhailovna – кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатория сельскохозяйственной энтомологии,

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, г. Санкт-Петербург, Пушкин

Аннотация: в работе приведены данные о современном состоянии исследований в области диагностики микроспоридий, рассмотрены проблемы связей между возбудителями микроспориозов беспозвоночных и позвоночных хозяев, обобщены результаты мультилокусного генотипирования этой группы паразитов.

Abstract: data concerning modern state of microsporidia diagnostics are given. Problems concerning links between agents of microsporidiosis of invertebrate and vertebrate hosts are discussed. Results of multilocus genotyping of parasites of this group are summarized.

Ключевые слова: микроспоридии, оппортунистические инфекции, мультилокусное генотипирование.

Keywords: microsporidia, opportunistic infections, multilocus genotyping.

Микроспоридии – уникальный тип утративших митохондрии одноклеточных эукариот, имеющих общее происхождение с грибами. Микроспоридии паразитируют в представителях всех крупных таксонов царства Animalia, включая приматов и человека, а также в некоторых протистах, при этом наибольшее число видов описано в членистоногих. Микроспоридии – важный объект фундаментальных и прикладных исследований во всем мире. С одной стороны, микроспоридии представляют собой уникальную модель для изучения особенностей внутриклеточного паразитизма, демонстрируя предельно допустимую для эукариот минимизацию клетки и генома и, вследствие этого, максимальное возложение многих своих функций на клетку хозяина [1]. С другой стороны, имея широкое распространение в природе, эти паразиты существенно влияют на численность заражённых видов животных, в том числе хозяйственно значимых видов (как вредных, так и полезных, включая культивируемого человеком) и вызывают заболевания человека, прежде всего при иммунодефицитных состояниях [2]. Микроспоридии выступают в качестве естественных регуляторов численности членистоногих, в связи с чем пороговые значения заражённости микроспоридиями служат важными показателями в прогнозе динамики численности сельскохозяйственных и лесных вредителей [3]. На основе одного вида микроспоридий создана серия запатентованных препаратов для контроля численности нестадных саранчовых. В лабораторных и полевых условиях проводится тестирование совместимости микроспоридий с другими агентами химической, биологической и микробиологической защиты растений [4]. Для культивируемых человеком членистоногих заражённость микроспоридиями – важный фактор смертности, могущий привести к полному уничтожению культур в лабораторных и производственных условиях. Наконец, микроспоридии человека – возбудители оппортунистических инфекций, привлекающие к себе всё больше внимания в клинической практике [5]. Знания об их природных источниках неполны и требуют дальнейших исследований. Таким образом, проблема диагностики, идентификации и корректной интерпретации таксономического статуса у микроспоридий не ограничивается рамками сугубо академических вопросов, а имеет важное прикладное значение в различных отраслях сельского хозяйства и медицины.

Представления о методах систематизации видового разнообразия микроспоридий претерпели существенные изменения вследствие обнаружения несоответствия традиционного таксономического деления, основанного на морфологических признаках, филогенетическим отношениям этих паразитов [6]. В частности, в результате применения методов молекулярной биологии к анализу биоразнообразия микроспоридий обнаружено, что филогенетические связи между паразитами беспозвоночных и позвоночных животных гораздо более тесны, чем предполагалось ранее. Видовое разнообразие микроспоридий, заражающих человека, включает как широко распространённых и хорошо

охарактеризованных типичных для человека возбудителей микроспориозов, так и виды, считающиеся типичными паразитами членистоногих – это *Anncaliia algerae* из малярийного комара [7] и *Tubulinosema acridophagus* из американской саранчи [8], [9].

Важно отметить, что данные о нуклеотидных последовательностях ДНК для большинства видов микроспориций ограничиваются депонированными в Генбанке сиквенсами генов рибосомальной РНК, прежде всего малой субъединицы (мсрРНК). За последние десять лет количество видов микроспориций, охарактеризованных на уровне молекулярных гаплотипов гена мсрРНК, заметно возросло. В частности, работами только нашего научного коллектива получено более 40 уникальных гаплотипов новых или ранее описанных видов этих паразитов [10], [11], [12]. Среди них обнаружены как новые самостоятельные формы, однозначно представляющие новые таксоны ранга рода и вида, так и формы, близкородственные ранее описанным видам и требующие уточнения своего таксономического положения [13]. Тем не менее, отсутствие для большинства из них данных о других генетических системах существенно ограничивает возможности применения к данным объектам подходов мультигенной филогении, которая уже стала новым стандартом современной систематики для многих групп макро- и микроорганизмов, существенно превосходя по уровню разрешающей способности и филогенетической достоверности филогенетические исследования, основанные на последовательностях генов рРНК [14]. Накопление данных о нуклеотидных последовательностях других генов микроспориций, в том числе кодирующих белки, ведётся в отношении лишь некоторых видов, прежде всего в рамках геномных проектов [15], [16], [17], [18]. Как известно, геномные проекты весьма ресурсоёмки; и последние десять лет заметна тенденция расширения круга анализируемых объектов благодаря продвижению технологий высокопроизводительного секвенирования [19]. Круг микроспориций, в отношении которых ведётся полногеномное секвенирование, включает скромное количество видов и только в малой степени отражает биоразнообразие этих паразитов. Для целей мультигенной филогении приоритетная задача заключается в получении не максимально большого набора сиквенсов ДНК для одного вида (что характерно для полногеномного секвенирования), а ограниченного набора гомологичных сиквенсов для как можно большего числа видов, имеющих разную степень родства. Безусловно, геномные проекты – один из важнейших источников данных для мультигенных филогенетических построений, однако концентрация усилий молекулярных биологов и биоинформатиков в рамках отдельно взятого геномного проекта существенно ограничивает число потенциальных объектов, требующих анализа методами мультигенной филогении. До сих пор не проводились сравнительные исследования варьирования показателей дивергенции различных генных систем в зависимости от уровня родства микроспориций, что существенно сужает круг доступных молекулярных критериев для таксономических исследований этих паразитов. Всё это свидетельствует о необходимости запуска проектов, альтернативных полногеномному секвенированию, которые были бы сосредоточены на анализе биологических образцов из разных источников с целью мультилокусного генотипирования выборки микроспориций, как можно более полно отражающей разнообразие видового состава и уровней родства этих облигатных внутриклеточных паразитов.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей различных участков генома, кодирующих структурные и функциональные белки, позволит решить сразу несколько важных теоретических и практических задач, связанных с молекулярной эволюцией и филогенией, систематикой, идентификацией и диагностикой микроспориций. В частности, для форм, систематическое положение которых хорошо обосновано, могут быть предложены новые критерии молекулярной систематики и диагностики. Для видов, представляющих разные эволюционные ветви, использование полученных данных позволяет существенно повысить достоверность филогенетических реконструкций и, возможно, открыть новые закономерности молекулярной эволюции, связанные с перестройками нуклеотидных последовательностей в зависимости от адаптаций микроспориций к различным условиям (прежде всего, в связи с формированием гостальной специфичности). Для близкородственных форм, отнесение которых к одному или разным видам представляется проблематичной задачей, необходима ревизия молекулярных и морфологических признаков с учётом принципов построения универсальной системы микроспориций [20] и новых молекулярных критериев. Наконец, изоляты одного вида микроспориций, полученные из разных зон ареала или из разных хозяев, исследованы методами мультилокусного генотипирования для решения проблемы их дифференциации [21], что не представлялось возможным на основании варибельных участков гена рибосомальной РНК, включая такие спейсеры, как ITS и IGS, из-за их высокого полиморфизма даже внутри одного генома [22]. Данные исследования послужат важным звеном в понимании закономерностей эволюционных преобразований микроспориций и в совершенствовании методов диагностики этих паразитов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№№ 13-04-00693-а и 15-34-20567-мол_а_вед) и Президента РФ № МД-4284.2015.4.

Литература

1. Vávra J., Lukeš J. Microsporidia and 'the art of living together' // Adv. Parasitol. 2013. V. 82. P. 253–319.
2. Исси И. В., Токарев Ю. С. Оценка перспектив применения микроспоридий в биологической защите растений // Мат. XIV Съезда РЭО. Санкт-Петербург, 2012. С. 169.
3. Токарев Ю. С., Малыш Ю. М., Дубинина Е. В., Алексеев А. Н., Фролов А. Н., Исси И. В. Значение микроспоридий для микробиологического контроля численности вредных членистоногих // Защита и карантин растений. 2007. № 12. С. 14–16.
4. Tokarev Y. S., Levchenko M. V., Naumov A. M., Senderskiy I. V., Lednev G. R. Interactions of two insect pathogens, *Paranosema locustae* (Protista: Microsporidia) and *Metarhizium acridum* (Fungi: Hypocreales), during a mixed infection of *Locusta migratoria* (Insecta: Orthoptera) nymphs // J. Invertebr. Pathol. 2011. V. 106. P. 336–338.
5. Didier E. S., Bessinger G. T. Host-parasite relationships in microsporidiosis: animal models and immunology. In: Wittner. M. (Ed.), The microsporidia and microsporidiosis. Washington, D. C., 1999. P. 225–257.
6. Vossbrinck C. R., Debrunner-Vossbrinck B. A. Molecular phylogeny of the Microsporidia: ecological, ultrastructural and taxonomic considerations // Folia Parasitol. 2005. V. 52. P. 131–142.
7. Franzen C., Nasonova E. S., Scholmerich J., Issi I. V. Transfer of the members of the genus *Brachiola* (Microsporidia) to the genus *Anncaliia* based on ultrastructural and molecular data // J. Eukaryot. Microbiol. 2006. V. 53. P. 26–35.
8. Choudhary M. M., Metcalfe M. G., Arrambide K., Bern C., Visvesvara G. S., Pieniazek N. J., Bandea R. D., DeLeon-Carnes M., Adem P., Choudhary M. M., Zaki S. R., Saeed M. U. *Tubulinosema* sp. microsporidian myositis in immunosuppressed patient // Emerg. Infect. Dis. 2011. V. 17. P. 1727–1730.
9. Meissner E. G., Bennett J. E., Qvarnstrom Y., da Silva A., Chu E. Y., Tsokos M., Gea-Banacloche J. Disseminated microsporidiosis in an immunosuppressed patient // Emerg. Infect. Dis. 2012. V. 18. P. 1155–1158.
10. Malysh J. M., Tokarev Y. S., Sitnicova N. V., Martemyanov V. V., Frolov A. N., Issi I. V. *Tubulinosema loxostegi* sp.n. (Microsporidia: Tubulinosematidae) from the beet webworm *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Crambidae) in Western Siberia // Acta Protozool. 2013. V. 52. P. 299–308.
11. Токарев Ю. С. Филогения и паразитические свойства энтомопатогенных микроспоридий. Дисс. ... д. б. н. 2013. С-Петербург, Пушкин.
12. Tokarev Y. S. Molecular phylogeny of entomopathogenic microsporidia, a review of the last five years of study // Euroasian Entomol. J. 2010. V. 9. P. 571–576.
13. Tokarev Yu.S., Malysh J. M., Kononchuk A. G., Seliverstova E. V., Frolov A. N., Issi I. V. Redefinition of *Nosema pyrausta* (Perezia pyraustae Paillot 1927) basing upon ultrastructural and molecular phylogenetic studies. Parasitol. Res. 2015. V. 114(2). P. 759–761.
14. Cavalier-Smith T., Chao E. E., Snell E. A., Berney C., Fiore-Donno A. M., Lewis R. Multigene eukaryote phylogeny reveals the likely protozoan ancestors of opisthokonts (animals, fungi, choanozoans) and Amoebozoa // Mol. Phylogenet. Evol. 2014. V. 81. P. 71–85.
15. Cornman R. S., Chen Y. P., Schatz M. C., Street C., Zhao Y., Desany B., Egholm M., Hutchison S., Pettis J. S., Lipkin W. I., Evans J. D. Genomic analyses of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of honey bees // PLoS Pathog. 2009. V. 5 (6). P. e1000466.
16. Capella-Gutiérrez S., Marcet-Houben M., Gabaldón T. Phylogenomics supports microsporidia as the earliest diverging clade of sequenced fungi // BMC Biol. 2012. V. 10. P. 47.
17. Cuomo C. A., Desjardins C. A., Bakowski M. A., Goldberg J., Ma A. T., Becnel J. J., Didier E. S., Fan L., Heiman D. I., Levin J. Z., Young S., Zeng Q., Troemel E. R. Microsporidian genome analysis reveals evolutionary strategies for obligate intracellular growth // Genome Res. 2012. V. 22(12). P. 2478–2488.
18. Haag K. L., James T. Y., Pombert J. F., Larsson R., Schaer T. M., Refardt D., Ebert D. Evolution of a morphological novelty occurred before genome compaction in a lineage of extreme parasites // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2014. V. 111(43). P. 15480–15485.
19. van Dijk E. L., Auger H., Jaszczyszyn Y., Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. Trends Genet. 2014. V. 30(9). P. 418–426.
20. Issi I. V., Tokarev Y. S., Seliverstova E. V., Voronin V. N. Taxonomy of *Neoperezia chironomi* and *Neoperezia semenoviae* comb. nov. (Microsporidia, Aquasporidia): lessons from ultrastructure and ribosomal DNA sequence data // Eur. J. Protistol. 2012. V. 48. P. 17–29.
21. Токарев Ю. С., Воронин В. Н., Сендерский И. В., Исси И. В. Микроспоридия *Glugea gasterostei* Voronin 1974 (Microsporidia: Marinosporida) из трехиглой колюшки *Gasterosteus aculeatus* (Actinopterygii: Gasterosteiformes) как самостоятельный вид // Паразитология. 2015. Т. 49. С. 81–92.

22. *Sagastume S., del Aguila C., Martín-Hernández R., Higes M., Henriques-Gil N.* Polymorphism and recombination for rDNA in the putatively asexual microsporidian *Nosema ceranae*, a pathogen of honeybees // *Environ Microbiol.* 2011. V. 13(1). P. 84–95.