

На правах рукописи

МАКАШОВА МАРИНА АЛЕКСАНДРОВНА

**АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ *Yersinia pestis* С ПОЧВЕННОЙ
МИКРОФАУНОЙ ГОРНО-АЛТАЙСКОГО ВЫСОКОГОРНОГО ОЧАГА
ЧУМЫ**

1.5.11 – микробиология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Саратов – 2024

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУН Роспотребнадзора)

Научный руководитель:

Ерошенко Галина Александровна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное казенное учреждение науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии

Официальные оппоненты:

Дентовская Светлана Владимировна, доктор медицинских наук, Федеральное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, руководитель лаборатории микробиологии чумы

Шелудько Андрей Вячеславович, доктор биологических наук, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Саратовский научный центр Российской академии наук», заведующий лабораторией генетики микроорганизмов

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр "Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук"

Защита состоится _____ на заседании диссертационного совета 64.1.006.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном казенном учреждении науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46. Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru> ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 64.1.006.01
доктор медицинских наук

Бугоркова Светлана Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности проблемы

В XXI веке чума остается одной из главных биологических угроз для здравоохранения, что обусловлено высокой вирулентностью возбудителя, наличием природных очагов чумы более чем в 50 государствах и сохранением напряженной эпидемиологической ситуации по чуме на ряде территорий [Атлас природных очагов чумы России и зарубежных государств, 2022; WHO guidelines for plague management, 2021]. В Российской Федерации территории Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного природных очагов чумы на протяжении последних десятилетий проявляют постоянную эпизоотическую активность [Попов и др., 2024]. В 2014–2016 гг. на территории Республики Алтай произошло 3 случая заражения чумой человека, впервые после 35 лет отсутствия чумы в Российской Федерации [Кутырев и др., 2014; Балахонов и др., 2016; Попова и др., 2016]. Одним из наиболее актуальных направлений исследований этиологического агента чумы, *Yersinia pestis*, является изучение механизмов сохранения возбудителя в течение межэпизоотических периодов и последующей активизации природных очагов. В соответствии с классическими постулатами теории природной очаговости чумы возбудитель чумы *Y. pestis* сохраняется в природном биоценозе, циркулируя между носителями (преимущественно грызуны) и переносчиками артроподами (блохи, клещи, вши). На протяжении длительного времени господствовало мнение о невозможности сохранения *Y. pestis* вне паразитарной системы «грызун-блоха-грызун». Однако накапливается все больше данных, не согласующихся во всем с классической концепцией сохранения возбудителя и рассматривающих в качестве еще одной экологической ниши его существования почвенный биоценоз и его микрофауну.

Ранее в ряде экспериментов было показано сохранение *Y. pestis* в ассоциации с почвенными простейшими – *Hartmannella rhysodes*, *Tetrahymena pyriformis*, *Dictyostelium discoideum*, *Acanthamoeba castellanii* и круглыми червями – нематодами *Caenorhabditis elegans* [Никульшин и др., 1992; Пушкарева, 2003; Кошель и др., 2016; Benavides-Montaña, Vadyvaloo, 2017; Markman et al., 2018]. Разрабатывается гипотеза вертикальной трансмиссии *Y. pestis*, согласно которой возбудитель чумы может попадать из почвенного биотопа в наземный, используя альтернативную паразитарную систему трансмиссии «энтомопаразитические нематоды – блохи» [Попов и др., 2007; Кутырев и др., 2009; Попов и др., 2011; Kuttyrev et al., 2022]. Тем не менее исследования механизмов взаимодействия клеток *Y. pestis* и почвенных простейших и нематод находятся на начальных этапах. Необходимо проведение разностороннего анализа с применением современных технологий и мультидисциплинарных подходов для установления особенностей и закономерностей их взаимодействий; оценки оказываемого возбудителем чумы эффекта на почвенную микрофауну. Для решения вопроса о сохранении *Y. pestis* в природных очагах во время межэпизоотических периодов необходимым этапом является изучение долговременных взаимодействий организмов на молекулярном, организменном и популяционном уровнях. Особое значение для понимания механизмов энзоотии чумы имеет анализ

взаимоотношений организмов, выделенных на территории одного биоценоза. Отсутствуют данные о видовом разнообразии амёб и нематод в очагах горного и высокогорного типов, в то время как именно эти энзоотичные по чуме территории Российской Федерации находятся в настоящее время в активном состоянии. В связи с этим наиболее актуальным является изучение взаимодействий штаммов *Y. pestis* с представителями почвенной микрофауны, выделенными на эпизоотически активных территориях Горного Алтая, в которых циркулируют высоковирулентные и эпидемически значимые штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT античного биовара основного подвида.

Цель исследования: Комплексная характеристика свойств и взаимодействие штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

Задачи исследования:

1. Определить фенотипические и генетические особенности штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT из Горного Алтая и Тувы в сравнении со штаммами других филогенетических линий античного биовара из природных очагов мира.

2. Сконструировать флуоресцентные штаммы *Y. pestis* линии 4.ANT с использованием плазмид рTurboGFP-B и рKatushka-2S для моделирования процесса взаимодействия *Y. pestis* с членами почвенного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

3. Провести анализ взаимодействия и длительности сохранения *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с акантамебами из почв нор Горно-Алтайского высокогорного очага чумы и охарактеризовать видовой состав простейших.

4. Изучить особенности взаимодействия *Y. pestis* с использованием флуоресцентного штамма филогенетической линии 4.ANT со свободноживущими нематодами из почв нор Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, установить систематическую принадлежность нематод.

5. Определить систематическую принадлежность энтомопаразитических нематод из Тувинского горного очага чумы. Провести анализ микробиоты паразитических нематод Тувинского горного и Горно-Алтайского высокогорного очагов чумы.

Научная новизна. При исследовании фенотипических особенностей штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы выявлена зависимость их роста от аминокислот метионин, фенилаланин, треонин и вариабельность зависимости от аминокислоты цистеин, в отличие от штаммов других филогенетических линий античного биовара. Впервые определены питательные потребности штаммов филогенетических линий 1.ANT и 3.ANT2, получены новые данные по ауксотрофии штаммов 0.ANT3, 0.ANT5, 2.ANT3, 4.ANT античного биовара. У штаммов филогенетической ветви 0.ANT5 впервые установлена зависимость роста от присутствия в среде лейцина, вызванная сдвигом рамки считывания в гене *leuA*, а для штаммов ветви 1.ANT впервые определена уникальная для штаммов античного биовара питательная потребность в пролине. Выявлены 19 мутаций в 14 генах метаболических путей серы и цистеина,

при этом для каждой эволюционной линии античного биовара характерен свой мутационный профиль. Получен патент № RU 2769790 C1 «Набор рекомбинантных флуоресцентных штаммов бактерий вида *Y. pestis* античного биовара основного подвида и алтайского биовара центральноазиатского подвида для индикации возбудителя чумы в экспериментальных образцах». Показано и подтверждено при анализе нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов широкое распространение на различных участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в почвах нор грызунов простейших *A. castellanii* и *D. sphaerocephalum*. Впервые показано длительное в течение 22 месяцев сохранение *Y. pestis* линии 4.ANT в отсутствие питательных веществ при совместном культивировании с *A. castellanii*, выделенной на том же участке очага, а также установлена цикличность изменения концентрации возбудителя в этих условиях. Показано отсутствие токсичности и влияния штамма *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT на продолжительность жизни почвенных нематод *Panagrolaimus sp.* из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы при их культивировании на газоне этого штамма в течение 24 ч. В блохах *Citellophyllus tesquorum* и *Frontopsylla elatoides* с территории Тувинского горного очага чумы обнаружены энтомопаразитические нематоды рода *Rubzovinema*, филогенетически близкие полигостальному виду *R. polyxenica* из Волго-Уральского степного и Горно-Алтайского высокогорного очагов чумы. Впервые исследована микробиота паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы, в составе которой выявлены представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов, а именно родов *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*.

Теоретическая и практическая значимость. Выявленные фенотипические и генетические особенности дополняют характеристику и молекулярный портрет штаммов *Y. pestis* различных филогенетических линий античного биовара и могут быть использованы в качестве генетических меток для внутривидовой дифференциации возбудителя. Определение видового состава простейших и нематод из почв нор грызунов расширяет знания о членах почвенного биоценоза Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Установление возможности длительного сохранения и размножения в амебах *A. castellanii* штаммов *Y. pestis* основного подвида античного биовара филогенетической линии 4.ANT, выделенных на тех же участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, и получение данных о взаимодействии этих штаммов с почвенными нематодами составляют основу для выявления природных резервуаров чумы в почвенных биоценозах природных очагов. Установленная систематическая принадлежность энтомопаразитических нематод и выявленная полигостальность нематод-паразитов блох указывает на их важную роль в регуляции численности блох – переносчиков чумы и, как следствие, в регуляции интенсивности эпизоотических процессов в очагах. Полученные сведения о составе микробиоты паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы расширяют представления об условиях персистенции и сообществе организмов, в которых может оказаться возбудитель чумы во время

своего жизненного цикла, и дополняют имеющиеся представления о паразитарной системе природных очагов чумы. Сконструированные флуоресцентные штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, содержащие плазмиды pTurboGFP-B и Katushka-2S, могут быть использованы для изучения взаимодействия *Y. pestis* с микро- и макроорганизмами. Методика получения флуоресцентных штаммов оформлена в виде методических рекомендаций учрежденческого уровня «Получение рекомбинантных биолюминесцентных штаммов *Yersinia pestis* и *Escherichiacoli*» (одобрены Ученым советом ФКУН Российского противочумного института «Микроб» и утверждены директором института, протокол № 5 от 05.12.2019). Полученные штаммы *Y. pestis* депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российского противочумного института «Микроб» под номерами КМ2083 и КМ2084. В международной базе данных NCBI GenBank депонированы 29 нуклеотидных последовательностей, включающих участки рибосомальных генов почвенных амёб и нематоды из Горно-Алтайского высокогорного очага, энтомопаразитических нематод *Rubzovinema sp.* и бактерии *Wolbachia sp.* Данные по выявлению возможных природных резервуаров возбудителя чумы в почвенных биоценозах Горно-Алтайского высокогорного очага чумы могут быть использованы для оптимизации тактики эпизоотологических обследований на очаговых территориях.

Положения, выносимые на защиту:

1. Штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT античного биовара основного подвида, как и штаммы других линий эволюции этого биовара, зависят от присутствия в среде аминокислот фенилаланина, метионина и треонина, но отличаются от них вариабельностью зависимости от цистеина. Штаммы других филогенетических линий нуждаются дополнительно в лейцине и пролине. В 14 генах метаболических путей серы и цистеина античного биовара содержится 19 мутаций, для большинства эволюционных линий характерен свой мутационный профиль этих генов.

2. Штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, выделенные в Горно-Алтайском высокогорном очаге, в условиях эксперимента способны сохраняться в ассоциации с амёбами *A. castellanii* в отсутствие питательных веществ в течение 22 месяцев без изменения свойств и потери вирулентности, формировать биопленку на кутикуле почвенных нематод *Panagrolaimus sp.* и образовывать конгломераты клеток в их пищеварительном тракте, не оказывая значимого влияния на продолжительность жизни нематод.

3. В блохах *C. tesquorum* и *F. elatoides* из Тувинского горного очага чумы присутствуют энтомопаразитические нематоды рода *Rubzovinema*. Микробиота паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы включает представителей α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов родов *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследование. Диссертационное исследование было выполнено на базе лаборатории мо-

лекулярной микробиологии отдела микробиологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в рамках научно-исследовательских тем: № 78-3-19 «Анализ закономерностей эволюции и персистенции *Yersinia pestis* в почвенных биоценозах и совершенствование молекулярного типирования возбудителя чумы» 2019–2021 гг. (№ гос. регистрации АААА-А16-116112810061-0), и № 98-3-22 «Пространственно-временные закономерности эволюции, циркуляции и персистенции *Yersinia pestis* в природных очагах чумы Восточной Европы и Центральной Азии» (№ гос. регистрации 121112200283-5).

Личный вклад автора состоит в проведении основного объема исследований, а именно анализа литературных источников, планировании экспериментов, получении, анализе и оформлении результатов исследования. Автором выполнены исследования по изучению филогении, биохимических особенностей, фенотипических и генетических основ ауксотрофности штаммов *Y. pestis* античного биовара, изучению взаимодействий *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с членами почвенной микрофауны, определению систематического положения и филогенетическому анализу почвенных организмов, энтомопатогенных нематод и микробиоты паразитарной системы. Эксперименты по определению систематического положения организмов и длительному выживанию *Y. pestis* с акантамебами спланированы совместно с сотрудником лаборатории молекулярной микробиологии к.б.н., в.н.с. Оглодиным Е.Г. Совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной микробиологии и сектора генной инженерии получены флуоресцентные штаммы *Y. pestis*. Совместно с сотрудниками лаборатории геномного и протеомного анализа получены полногеномные последовательности штаммов *Y. pestis* и последовательности участков рибосомальных генов других организмов.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность результатов работы подкреплена значительным объемом исследований в серии повторяющихся экспериментов с использованием современного сертифицированного оборудования и методов, соответствующих задачам и целям исследования.

Материалы исследования были представлены на ряде конференций и съездов различного уровня: X Региональной научной конференции «Исследования молодых ученых в биологии и экологии» (Саратов, 16–20 апреля 2018 г.), XIV Межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 20–21 ноября 2018 г.), межучрежденческих онлайн-семинарах-конференциях «Перспективные направления научных исследований в области эпидемиологии, разработки и совершенствования методов диагностики опасных инфекций, анализа генома, протеома их возбудителей» (11 июня 2019 г.) и «Применение молекулярно-генетических и иммунологических методов для совершенствования мониторинга природно-очаговых и особо опасных инфекций» (24 мая 2022 г.), XI Всероссийской научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Уфа, 2–4 октября 2019 г.), на XIV–XV Ежегодном Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского

(Москва, 24–26 мая 2021 г., 28–30 марта 2022 г., 27–29 марта 2023 г.), на XV Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (Иркутск, 5–6 октября 2021 г.), на Международном симпозиуме “Yersinia 14” (Санкт-Петербург, 26–28 сентября 2022 г.), на итоговых конференциях ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора (2018, 2021–2022 гг.); на конгрессе с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2023» (Москва, 27–28 апреля 2023 г.), на XXV Международной научной конференции «Current Issues on Zoonotic Diseases» (Улан-Батор, 23 июня 2023 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, включая 1 патент на изобретение, 4 статьи в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России», из которых 3 статьи опубликованы в журналах, индексируемых в МБД Scopus.

Структура диссертации. Диссертация представлена на 189 странице текста, состоит из введения, главы обзора литературы, трех глав собственных исследований, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 18 таблицами и 28 рисунками. Библиографический список содержит 288 отечественных и зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Рассмотрены основные сведения о генетическом разнообразии и географическом распространении штаммов *Y. pestis*, классические и современные представления о механизмах энзоотии чумы в природных очагах. Обобщенные литературные данные показывают актуальность и перспективность изучения взаимодействий *Y. pestis* с простейшими и нематодами в рамках расширения представлений об экологии и персистенции *Y. pestis* в природных очагах чумы.

Материалы и методы. В работе использовали 39 штаммов *Y. pestis*, 1 штамм *Y. pseudotuberculosis*, 1 штамм *E. coli*. Работу с культурой *Y. pestis* вели в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами [СанПин 3.3686-21]. Штаммы культивировали на плотной и жидкой средах LB (pH 7,2) в течение 24–48 ч при 28 °С или 37 °С. Изучение культуральных, биохимических свойств штаммов, определение чувствительности к бактериофагам, признака пигментсорбции, зависимости роста от ионов кальция осуществляли по стандартным методикам лабораторной диагностики чумы [Практическое руководство «Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней», 2013]. Питательные потребности штаммов *Y. pestis* определяли на минимальной синтетической среде с добавлением определенных аминокислот [Куклева и др., 2013; Brubaker, 1970]. Вирулентность штаммов оценивали заражением беспородных белых мышей подкожно в дозах 1×10^3 и 1×10^4 КОЕ/мл. Компетентные клетки *Y. pestis* подготавливали по методике R. Conchas, E. Carniel [Conchas, Carniel, 1990] и трансформировали плазмидами pTurboGFP-B и pKatushka2S-B (Евроген, Россия) методом электропорации в приборе Gene Pulser Xcell (BioRad, США). Образцы почв собраны на участках Кош-

Агачского района Республики Алтай в 2016 г. Выделенных из почвенных образцов простейших и нематод культивировали в климатической камере KBF 720 (Binder, Германия) при температуре 22 °С и относительной влажности воздуха 60 % на плотной среде NGM с газонами *E. coli* OP50, аксенические культуры амёб выращивали в жидкой среде PYG. Образцы нематод-паразитов блох из Республики Тыва получены из ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Выделение ДНК *Y. pestis* проводили набором AxyPrep (AXYGEN Biosciences, США), для выделения ДНК из образцов амёб и нематод использовали комплект реагентов «ДНК-сорб-Д» (АмплиСенс, Россия). Полногеномное секвенирование штаммов *Y. pestis* проводили в системе Ion GeneStudio S5 System (Thermo Fischer Scientific, США). Капиллярное секвенирование продуктов ПЦР осуществляли на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 XL (Applied Biosystems, США). Систематическую принадлежность выделенных штаммов амёб, нематод и бактерий устанавливали на основании процента гомологии нуклеотидных последовательностей рибосомальных генов программой NCBI BLAST алгоритмом megablast и результатам филогенетического анализа с помощью программы Mega 7.0, Mega 11 (метод Maximum Likelihood, эволюционная модель Tamura-Nei, бутстреп-подкрепление 500 итераций). Филогенетическую реконструкцию штаммов *Y. pestis* проводили с использованием программ Wombac 2.0, SeaView 5.0.5 (метод Maximum Likelihood, эволюционная модель HKY85, бутстреп-подкрепление 1000 итераций).

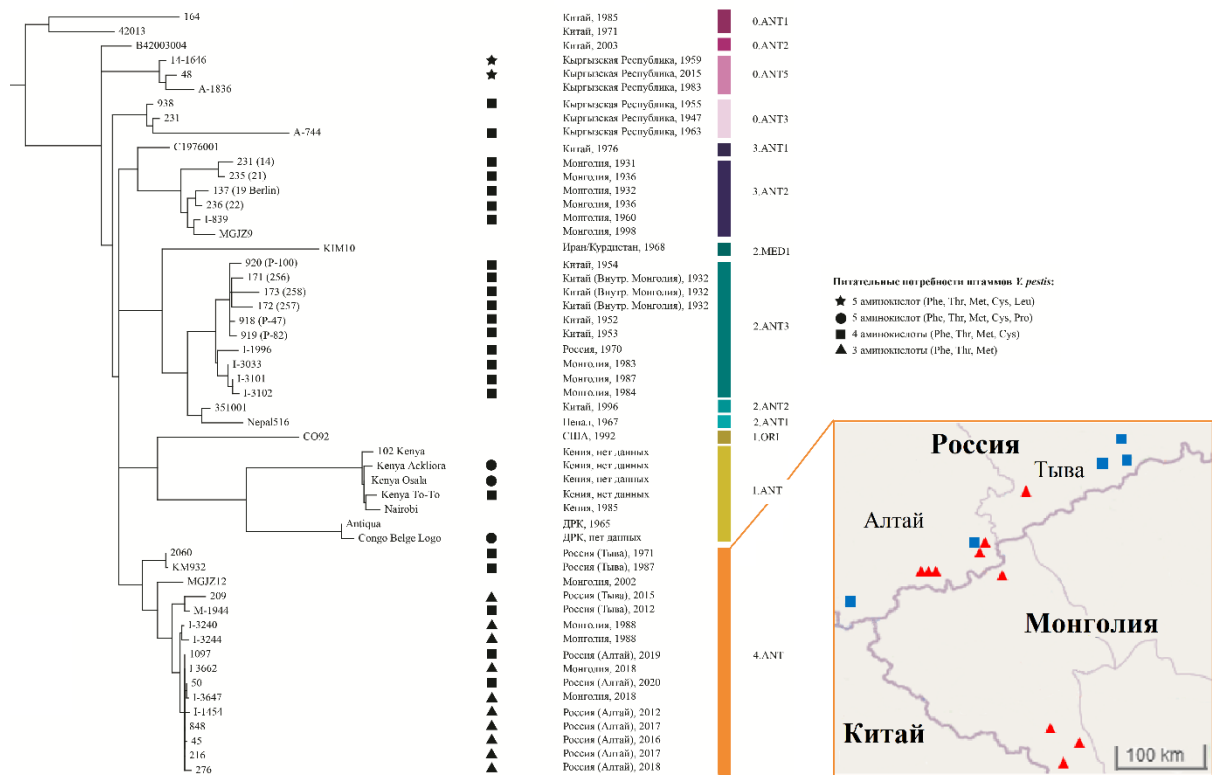
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1 Характеристика свойств штаммов *Y. pestis* античного биовара филогенетической линии 4.ANT, конструирование флуоресцентных штаммов

*Фенотипические и генетические особенности штаммов *Y. pestis* из Горно-Алтайского высокогорного очага в сравнении со штаммами античного биовара из других природных очагов чумы*

Для изучения взаимодействий *Y. pestis* с почвенной микрофауной был выбран активный в настоящее время Горно-Алтайский высокогорный очаг чумы, на территории которого циркулируют эпидемически значимые и высоковирулентные штаммы филогенетической линии 4.ANT. Необходимым является получение представления об особенностях современных штаммов этой эволюционной группы и их отличий от штаммов других ветвей этого биовара. Были изучены фенотипические и генетические свойства 38 штаммов *Y. pestis* античного биовара, выделенных в разных странах (Российская Федерация, Монголия, Китайская Народная Республика, Кыргызская Республика, Кения и Демократическая Республика Конго) в период 1928–2020 гг. В результате проведенных исследований установлено, что взятые в исследование штаммы возбудителя чумы принадлежали к филогенетическим ветвям 0.ANT3, 0.ANT5, 1.ANT, 2.ANT3, 3.ANT2, 4.ANT и обладали типичными для античного биовара биохимическими свойствами, но отличались различными потребностями в факторах роста, связанными с их географическим происхождением и филогенетической принадлежностью (Рисунок 1). Выявлено, что помимо трех аминокислот (треонин, метионин, фенилаланин), необходимых для роста штаммов основного

подвида, для полноценного роста штаммов различных филогенетических групп также требуется присутствие в среде лейцина (0.ANT5), пролина (1.ANT) и цистеина. Единственной филогенетической группой, внутри которой выявлены штаммы, не нуждающиеся для своего роста в цистеине, является линия 4.ANT, что может быть обусловлено адаптацией к конкретным ландшафтно-географическим условиям.



Дендрограмма получена алгоритмом Maximum Likelihood на основе 1756 коровых SNPs 57 штаммов из природных очагов мира. Условные обозначения присвоены штаммам, для которых в настоящем исследовании были изучены питательные потребности.

Представлена часть дендрограммы, отображающая только штаммы античного биовара
Рисунок 1 – Питательные потребности штаммов *Y. pestis* античного биовара различных филогенетических ветвей и места выделения штаммов линии 4.ANT

Для установления генетических причин зависимости роста штаммов возбудителя чумы от фенилаланина, треонина и метионина проведен сравнительный анализ последовательностей 82 генов метаболических путей синтеза этих аминокислот у референсных штаммов *Y. pestis* CO92 и *Y. pseudotuberculosis* IP 32953. При сравнении полногеномных последовательностей штаммов возбудителей чумы и псевдотуберкулеза, секвенированных в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» и взятых из NCBI GenBank, в 7 генах метаболических путей фенилаланина, треонина, метионина и цистеина были выявлены мутации, приводящие к изменению аминокислотных последовательностей продуктов генов, в 4 из них мутации были обнаружены впервые, а именно в генах: *tyrB* (TC→GA в позициях 1080–1081 от начала гена, AspArg→GluSer), *YPO3343* (G→A в позиции 544 от начала гена,

Asp→Asn), *apk* (A→T в позиции 234 от начала гена, Glu→Asp), *metH* (C→T в позиции 620 от начала гена, Ala→Val).

В целях поиска отличий в генах биосинтеза аминокислот различных филогенетических групп античного биовара основного подвида проводили сравнение последовательностей генов 48 штаммов *Y. pestis* античного биовара из NCBI GenBank с установленной филогенетической принадлежностью [Cui et al., 2013] и 38 штаммов, рассматриваемых в настоящем исследовании. В результате анализа последовательностей метаболического пути синтеза лейцина найдена делеция 11 п.н. в гене *leuA* (позиции 1409–1419 от начала гена), уникальная для штаммов *Y. pestis* филогенетической ветви 0.ANT5, а в гене *leuD* выявлена nsSNP (G→A в позиции 157 от начала гена, Gly→Ser), специфичная для штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 1.ANT. В отношении пролина, необходимого для роста штаммам линии 1.ANT, единой причины, объясняющей ауксотрофность в отношении этой аминокислоты, найти не удалось, несмотря на присутствие отдельных мутаций в генах *poaA*, *proB*, *pip* и *proV*. Анализ метаболических путей серы и цистеина античного биовара показал высокую вариативность мутаций (19 мутаций в 14 генах), при том что для каждой эволюционной линии характерен свой мутационный профиль этих генов (Таблица 1).

Таблица 1 – Характерный профиль мутаций штаммов *Y. pestis* разных филогенетических ветвей античного биовара в генах синтеза цистеина, метионина и обмена серы

Мутации/филогенетические ветви	0.ANT1	0.ANT2	0.ANT3	0.ANT5	1.ANT*3	1.ANT*4	2.ANT1	2.ANT2	2.ANT3	3.ANT1	3.ANT2	4.ANT*5	4.ANT*6	4.ANT*7
<i>metH</i> (+74 п.н.)														+
<i>metC</i> YPO0278 (nsSNP)						+								
<i>metC</i> YPO3006 (nsSNP)							+	+	+					
<i>mtn</i> (nsSNP)					+									
<i>ssuA</i> (+30 п.н.)	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+		
<i>ssuA</i> (+15 п.н.)									+				+	+
<i>ssuD</i> (nsSNP)		+												
<i>ssiA</i> (-3 п.н.)			+		+	+								
<i>ssiA</i> (-91 п.н.)						+								
<i>ssiA</i> (-18 п.н.)					+									
<i>cysJ</i> (-36 п.н.)					+	+								
<i>cysJ</i> (-18 п.н.)	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+
<i>cysJ</i> (nsSNP)											+			
<i>cysM</i> (-52 п.н.)													+	+
YPO4110*1 (nsSNP)									+					
YPO1319 (nsSNP)												+		
YPO4111 (nsSNP)					+	+								
<i>dmsA</i> (nsSNP)							+	+	+					
<i>spb1</i> *2 (nsSNP)											+			

*1 мутация в гене YPO4110 характерна для штаммов из Китая, области Внутренней Монголии (171 (256), 172 (257), 173 (258)); *2 мутация в гене *spb1* характерна для штаммов 137 (19), Berlin, 236 (22); *3 группа штаммов из ДРК; *4 группа штаммов из Кении; *5 группа штаммов 4.ANT из Тывы (2060, KM932); *6 группа штаммов 4.ANT из Республики Тыва (M-1944, 209); *7 группа штаммов 4.ANT из РФ (Республики Алтай) и Монголии

На основании зависимости роста от присутствия в среде цистеина, данных филогенетического анализа и сравнения структур генов метаболических путей обмена серы и цистеина штаммы филогенетической линии 4.ANT были разделены на 4 группы: ауксотрофные по цистеину штаммы *Y. pestis* из Республики Тыва (1971 и 1987 гг.); вариабельные по ауксотрофности по цистеину штаммы *Y. pestis* из Республики Тыва (2012 и 2015 гг.); вариабельные по ауксотрофности по цистеину штаммы *Y. pestis* из Республики Алтай; не зависящие от цистеина штаммы *Y. pestis* из Монголии. Популяция штаммов из Горно-Алтайского высокогорного очага продемонстрировала вариабельность зависимости роста от цистеина и обладала сходным профилем мутаций со штаммами, выделенными на территории Монголии, что подтверждает близкое родство штаммов 4.ANT, циркулирующих на российской и монгольских частях Сайлюгемского природного очага чумы и природного очага чумы Хуух-Сэрх-Мунх-Хаирхан в Монголии. Данные о зависимости роста штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT от присутствия в среде аминокислот впоследствии учтены при планировании экспериментов по моделированию взаимодействия с почвенной микрофауной.

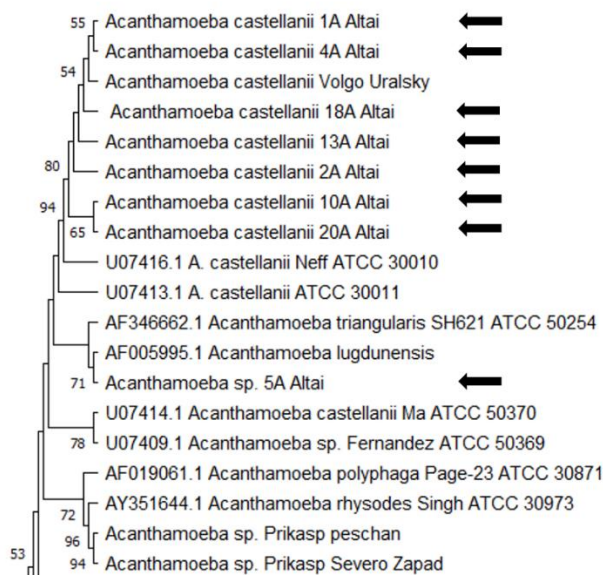
Получение рекомбинантных флуоресцентных штаммов Y. pestis филогенетической линии 4.ANT с использованием плазмид pTurboGFP-B и pKatushka-2S

Для дальнейших экспериментов по изучению взаимодействия возбудителя чумы с членами почвенной микрофауны необходимым этапом было получение рекомбинантных штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT, упрощающих детекцию бактериальных клеток в образцах и селекцию колоний за счет специфического свечения в заданной области спектра и устойчивости к антибиотику. В качестве реципиентного использовали штамм античного биовара основного подвида *Y. pestis* 216, выделенный в 2017 г. от серого сурка (*Marmota baibacina*) на территории Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Для конструирования флуоресцентных штаммов использовали два варианта векторных конструкций, несущих два разных флуоресцентных белка и селективный ген β -лактамазы, обеспечивающей устойчивость к ампициллину: плазида pTurboGFP-B (4103 п.н.) имеет в своем составе ген зеленого флуоресцентного белка TurboGFP с максимумом возбуждения/испускания 482/502 нм; плазида pKatushka2S-B (4138 п.н.) содержит ген красного флуоресцентного белка Katushka2S с максимумом возбуждения/испускания 588/633 нм. Полученные рекомбинантные флуоресцентные штаммы *Y. pestis* депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий на базе ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора под номерами: *Y. pestis* KM2083 – содержит плазмиду pTurboGFP-B; *Y. pestis* KM2084 – содержит плазмиду pKatushka2S-B. Установлено, что трансформирование плазмидами не привело к изменению культурально-морфологических и биохимических свойств, чувствительности к бактериофагам и вирулентности штаммов *Y. pestis*. Сконструированный набор флуоресцентных штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT может быть использован для изучения локализации и взаимодействия бактериальных клеток как с микро-, так и макроорганизмами.

2 Анализ взаимодействия штаммов *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с простейшими из почв Горно-Алтайского высокогорного очага

Систематическая принадлежность простейших из почв нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага

Следующим шагом исследования было выделение доминирующих видов почвенных простейших на разных эпизоотически активных участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы в целях дальнейшего моделирования взаимодействий между ними и штаммом *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT. В результате из проб почв, собранных в 2016 г. на 10 участках Горно-Алтайского высокогорного очага чумы с выраженной эпизоотической активностью, получены 15 культур простейших, по морфологическим признакам относившиеся к двум разным группам. К первой группе были отнесены простейшие, клетки которых обладали амeboидной формой и были способны к образованию цист, ко второй – одноклеточные организмы, образующие сложные плодовые тела, отнесенные к группе клеточных миксомицетов *Dictyostelium*. Для определения систематической принадлежности выделенных цистообразующих амeб были использованы праймеры на фрагмент гена 18S рРНК [Schroeder et al., 2001], для простейших рода *Dictyostelium* были рассчитаны специфичные праймеры на нуклеотидные последовательности региона, содержащего консервативные участки рибосомальных генов 17S, 5.8S, 26S и разделяющие их последовательности внутренних спейсеров ITS1 и ITS2. По результатам анализа нуклеотидных последовательностей участка гена 18S рРНК (размером от 431 до 457 п.н.) 8 изолятов цистообразующих амeб установлен высокий процент гомологии (97–100 %) с последовательностями генов амeб рода *Acanthamoeba* при высоком покрытии генома 99–100 %, что однозначно доказывает принадлежность выделенных амeб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага к этому роду. При анализе участков рибосомальных генов амeб рода *Dictyostelium* размером от 876 до 928 п.н., была выявлена высокая степень гомологии последовательностей 9 исследуемых изолятов (99–100 %) с последовательностями *Dictyostelium* при 100 % покрытии. В совокупности с результатами филогенетического анализа установлена принадлежность выделенных простейших к видам *A. castellanii* и *D. sphaerocephalum*. На рисунке 2 приведена дендрограмма филогенетических связей простейших рода *Acanthamoeba* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага.

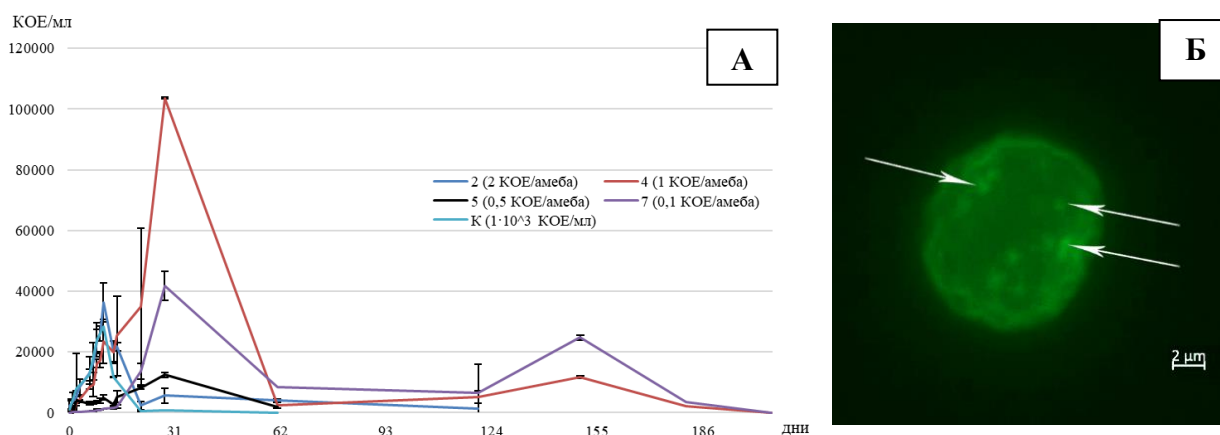


Программа Mega 11, алгоритм Maximum Likelihood, модель Tamura-Nei, 500 бутстреп-реплика. Стрелками отмечены изоляты из Горно-Алтайского очага. Представлена часть дендрограммы, отображающая только представителей рода *Acanthamoeba* генотипа T4
 Рисунок 2 – Анализ филогенетических связей простейших рода *Acanthamoeba* из почв Горно-Алтайского высокогорного очага по последовательностям участка 18S рНК

Моделирование долговременного сохранения в акантамебах Y. pestis с использованием флуоресцентного штамма 4.ANT с плазмидой pTurboGFP-B и анализ динамики взаимодействия штамма возбудителя чумы и акантамеб

Для установления возможности использования клеток амёб возбудителем чумы в качестве защитной и репликативной ниш и выяснения закономерностей взаимодействия этих организмов наиболее перспективным является использование организмов, адаптированных к одним и тем же факторам окружающей среды. С этой целью для постановки эксперимента использованы штамм *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* 13A, исходно выделенные на одном участке Горно-Алтайского природного очага чумы (Рисунок 3). По результатам наблюдения за сокультурой *Y. pestis* и *A. castellanii*, инкубируемой на плотной питательной среде, установлен положительный таксис клеток акантамеб по отношению к бактериальным колониям и формирование на питательной среде вторичных колоний возбудителя чумы, что указывает на наличие взаимодействий между двумя культурами. В целях моделирования наиболее тесных взаимодействий *Y. pestis* и *A. castellanii* сокультивирование проводили в жидкой среде (буфер АВ) с добавлением 50 ед/мл ампициллина в климатической камере при температуре 22 °С и влажности 60 %. Во избежание возможного размножения бактерий за счет ресурсов среды, культивирование организмов проводили в солевом буфере, поддерживающем жизнедеятельность амёб, но не содержащем необходимых для роста штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT аминокислот (фенилаланин, треонин и метионин). Для установления закономерностей взаимодействия культур на протяжении 14 дней были использованы соотношения *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* A13 – 3 КОЕ/амеба, 2 КОЕ/амеба, 1,5 КОЕ/амеба, 1 КОЕ/амеба, 0,5 КОЕ/амеба, 0,3 КОЕ/амеба, 0,1 КОЕ/амеба. Контрольным образцом являлась

взвесь штамма *Y. pestis* KM2083 в концентрации 1×10^3 КОЕ/мл в солевом буфере АВ без добавления клеток акантамеб. В результате сокультивирования на протяжении первых 8 дней во всех образцах происходило постепенное накопление биомассы бактерий, после чего отмечались колебания концентрации, вероятно связанные с влиянием акантамеб на популяцию возбудителя чумы, которые продолжались до конца двухнедельного срока эксперимента. Для установления закономерностей более длительного существования возбудителя чумы в сокультуре с амёбами экспериментальные образцы в соотношениях концентраций *Y. pestis* KM2083 и *A. castellanii* А13 2 КОЕ/амеба, 1 КОЕ/амеба, 0,5 КОЕ/амеба, 0,1 КОЕ/амеба продолжали высевать далее. По результатам эксперимента длительностью 22 месяца установлено, что в сокультуре с амёбами *A. castellanii* 13А жизнеспособные клетки возбудителя чумы сохраняются на протяжении гораздо более длительного периода времени, чем в образцах без акантамеб. Так, к концу эксперимента через 22 месяца жизнеспособные клетки *Y. pestis* KM2083 сохранились в 4 из 7 экспериментальных образцов с различными соотношениями концентраций *Y. pestis* и *A. castellanii*, что доказывает возможность сохранения *Y. pestis* в ассоциации с клетками акантамеб в почвах природных очагов чумы. Кроме того, через 1 и 5 месяцев от начала сокультивирования были отмечены резкие повышения концентраций *Y. pestis*, свидетельствующие о размножении возбудителя за счет питательных ресурсов, предоставляемых амёбами. Следует заметить, что при длительном сокультивировании *Y. pestis* и *A. castellanii* в жидкой среде на протяжении 7 месяцев при подсчете клеток акантамеб в образцах помимо неактивных форм, присутствовали амёбоидные трофозоиты, способные вступать во взаимодействия с клетками возбудителя чумы.



А. Изменения концентрации *Y. pestis* KM2083 в сокультуре с *A. castellanii* 13А в различных соотношениях концентраций на протяжении 7 месяцев. Доверительный интервал трех измерений представлен планками погрешностей, уровень значимости $\alpha=0,05$; Б. Фотография цисты *A. castellanii* 13А с клетками *Y. pestis* KM2083 (показаны стрелками). Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Светофильтр с длиной волны эмиссии 502 нм, увеличение $1500\times$

Рисунок 3 – Изменения концентрации *Y. pestis* KM2083 в сокультуре с *A. castellanii* 13А в различных соотношениях концентраций на протяжении 7 месяцев и фотография цисты *A. castellanii* 13А после 22 месяцев сокультивирования с находящимися внутри клетками *Y. pestis* KM2083

*Влияние длительного сосуществования *Y. pestis* и акантамеб на сохранение фенотипических, генетических и вирулентных свойств клеток *Y. pestis**

Для оценки влияния длительного совместного культивирования в среде с *A. castellanii* без дополнительных питательных веществ на свойства возбудителя чумы проведен сравнительный анализ свойств штамма *Y. pestis* KM2083 до и после сокультивирования. Из 111 исследованных колоний клетки 9 % колоний сохранили способность продуцировать флуоресцентный белок. Утрата клетками этой способности, как и потеря плазмиды pTurboGFP-B, может быть следствием деградации в среде антибиотика ампициллина, способствовавшего отбору бактериальных клеток с рекомбинантной плазмидой. Для дальнейшего анализа свойств были отобраны производные штамма *Y. pestis* KM2083 как сохранившие, так и утратившие свойство флуоресценции. Установлено, что при сравнении с исходным штаммом *Y. pestis* KM2083 его производные (продуцирующий и не продуцирующий флуоресцентный белок TurboGFP) после сокультивирования с амебами не претерпели существенных изменений культурально-морфологических и биохимических свойств и питательных потребностей, плазмидного состава. При сравнении полногеномных нуклеотидных последовательностей выявлено 9 нуклеотидных замен в генах, не влияющих на основные свойства возбудителя чумы, 4 из которых несинонимичны. Отсутствие влияния на вирулентные свойства штаммов возбудителя чумы длительного сокультивирования с амебами в жидкой минимальной среде доказано фактом сохранения основных детерминант вирулентности (плазида кальций-зависимости и хромосомная *pgm*-область пигментации) и гибелью всех взятых в эксперимент беспородных белых мышей, зараженных подкожно в дозах 1×10^3 КОЕ/мл и 1×10^4 КОЕ/мл. Сохранение основных свойств и вирулентности *Y. pestis* является важной составляющей для рассмотрения акантамеб в качестве защитных и репликативных ниш, поддерживающих потенциально вирулентный пул клеток *Y. pestis* в почве природных очагов чумы.

3 Анализ взаимодействия *Y. pestis* с нематодами. Определение систематической принадлежности нематод из Горного Алтая и Тувы

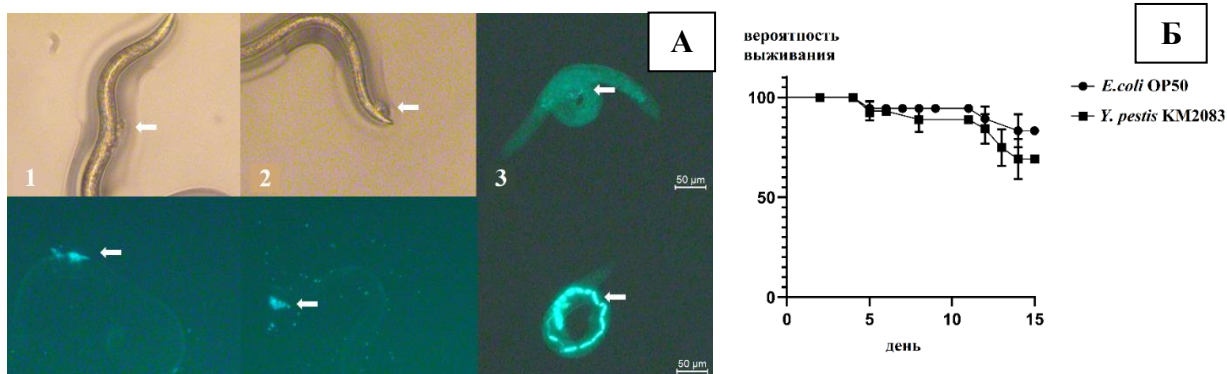
Определение систематической принадлежности почвенных нематод из нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы

На основании широкого распространения свободноживущих нематод в почвенных биоценозах и способности *Y. pestis* образовывать биопленку на их кутикуле актуальным является изучение видового разнообразия нематод в природных очагах чумы. С этой целью нами был проведен анализ почвенных образцов почв с эпизоотически активных территорий Горно-Алтайского высокогорного очага чумы, собранных в 2016 г., результатом которого стало выделение двух представителей свободноживущих нематод. Установление систематической принадлежности выделенных организмов проводили по нуклеотидным последовательностям участка 18S рРНК, полученных с помощью специфичных праймеров [Blaxter et al., 1998]. Сравнение полученной нуклеотидной последовательности размером 922 п.н. с депонированными последовательностями в базе данных NCBI GenBank позволило выявить

родство одного изолята с нематодами *Panagrolaimus sp.* 4164 (№ NCBI GenBank MK301117.1) при проценте идентичности 97,79 % и общим покрытием последовательностей 97 %. Представители этого рода относятся к группе бактерио-детритофагов и распространены в различных типах почв и биоценозов Республики Алтай, что подчеркивает вероятность встречи этих нематод с клетками возбудителя чумы в почве [Гагарин, 2001; Сущук и др., 2022; Oglodin et al., 2019]. При анализе последовательности участка гена 18S рРНК размером 830 п.н. второго образца нематод установлено, что при 99 % равенстве длин нуклеотидных последовательностей наибольший процент идентичности был выявлен с последовательностями *Fictor sp.* (№ NCBI GenBank KJ877233.1) и *Sudhausia aristotokia* (№ NCBI GenBank KJ877231.1), сходство с которыми составляет 83,14 % и 83,16 % соответственно. Таким образом видовую принадлежность этих нематод установить не удалось по причине отсутствия нуклеотидных последовательностей с высокой степенью идентичности в генетических базах данных, что может свидетельствовать о том, что этот изолят выявлен впервые или является представителем неизвестного в настоящий момент таксона. Можно говорить только о принадлежности выделенных нематод к семейству Diplogasteroidae, многие представители которого способны образовывать ассоциации с насекомыми и паразитировать на них, из чего может следовать вывод об возможном влиянии этих нематод на паразитарную систему природных очагов чумы.

Изучение особенностей биопленкообразования и влияния Y. pestis филогенетической линии 4.ANT на нематод

В подавляющем большинстве экспериментов влияние *Y. pestis* на нематод изучали на модельном организме *C. elegans*, тогда как наиболее актуальным является изучение особенностей взаимодействий организмов, являющимися членами одного биоценоза. С этой целью в эксперимент были взяты флуоресцентный штамм *Y. pestis* KM2083 линии 4.ANT и аксеническая культура нематод *Panagrolaimus sp.*, выделенные с одного участка Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Для оценки влияния *Y. pestis* на продолжительность жизни почвенных нематод группу из 40 особей на стадии L4 культивировали на газоне *Y. pestis* KM2083 при 22 °C и влажности 60 % в течение 24 ч, затем переносили на газоны с *E. coli* OP50. Контрольную группу нематод (40 шт.) культивировали на газоне *E. coli* OP50. Установлено, что культивирование нематод на газоне *Y. pestis* KM2083 в течение 24 ч не привело к изменению продолжительности жизни нематод при сравнении с контрольным образцом, что свидетельствует об отсутствии влияния возбудителя чумы на нематод. По прошествии 14 дней со дня начала эксперимента на поверхности нематод в области половых органов и хвоста зафиксировано образование биопленки штаммом *Y. pestis* KM2083 (Рисунок 4), не приводившей к иммобилизации нематод. Кроме того, в кишечном тракте *Panagrolaimus sp.* 13Н присутствовало скопление клеток возбудителя чумы. Все эти факты говорят о возможном распространении клеток возбудителя чумы во время передвижения нематод в почве природных очагов чумы и роли нематод в инициации эпизоотий в очагах.



А. Биопленки флуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2083 на нематодах *Panagrolaimus sp.* 13Н. Микроскоп Axio Imager Z2 (Carl Zeiss, Германия), увеличение 100×; Б. Результаты анализа выживаемости нематод *Panagrolaimus sp.* 13Н на протяжении двух недель, после 24 ч совместного культивирования нематод на газоне *Y. pestis* KM2083 (экспериментальный образец) и на газоне *E. coli* OP50 (контрольный образец), р-уровень = 0,35
 Рисунок 4 – Биопленки флуоресцентного штамма *Y. pestis* KM2083 в области вульвы (1) и хвоста (2) нематод *Panagrolaimus sp.* 13Н и скопления клеток возбудителя чумы в кишечном тракте нематоды (3), анализ выживаемости нематод *Panagrolaimus sp.* 13Н на газоне *Y. pestis* KM2083

Определение систематической принадлежности энтомопаразитических нематод блох из Тувинского горного очага чумы

Гипотеза вертикальной трансмиссии предусматривает участие в трансмиссии возбудителя паразитических нематод на трансларвальной стадии развития, в связи с чем значительный интерес представляло рассмотрение спектра нематод, паразитирующих в блохах, основных векторах переноса *Y. pestis*, на активных в настоящий момент природно-очаговых территориях Тувинского горного очага чумы, граничащего с Горно-Алтайским высокогорным, поскольку систематическая принадлежность нематод с этой территории оставалась неизвестной. В результате сравнения нуклеотидных последовательностей участков генов 18S, 5.8S, 28S рРНК и межгенных транскрибируемых спейсеров (ITS1, ITS2), полученных с помощью специфичных праймеров на этот участок [Vrain et al., 1992], установлен наибольший процент сходства (94,43–97,67 %) с последовательностью нематоды *Rubzovinema sp.* (№ NCBI GenBank KF155281.1), выделенной в Волго-Уральском степном очаге, что свидетельствует о принадлежности выделенных энтомопаразитических нематод из Тувинского горного очага к роду *Rubzovinema*. Для части нематод систематическая принадлежность уточнена до ранее обнаруженного на территориях Горно-Алтайского высокогорного и Волго-Уральского степного очагов полигостального вида *R. polyxenica*. Полученные данные свидетельствуют о широком ареале распространения энтомопаразитических нематод этого рода на значительных пространствах степной зоны России.

Определение состава микробиоты энтомопаразитических нематод из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного природных очагов чумы

Помимо определения спектра энтомопаразитических нематод, немаловажным является определение микробного окружения, в котором может существовать *Y. pestis*. По этой причине нами был проведен анализ микробиоты паразитической

системы «энтомопаразитические нематоды-блохи» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы по участкам гена 16S рРНК и гена домашнего хозяйства *recA*. В результате анализа 22 образцов нематод, полученных из блох Тувинского горного и Горно-Алтайского очагов чумы, в 15 образцах в составе микробиоты нами выявлены представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицет при покрытии 100 % и идентичности, превышающей 90 %. Так, в 10 образцах выявлены бактерии рода *Cutibacterium* (идентичность 97,21–99,73 %), в 3 – *Pseudomonas* (идентичность 92,31–97,20 %), в 1 – *Brevundimonas* (идентичность 94,50 %), в 1 – *Wolbachia* (идентичность 100 %). Обнаружено сходство в составе микробного сообщества блохо-нематодной системы вне зависимости от географического происхождения, а именно присутствие бактерий родов *Cutibacterium* и *Pseudomonas* в нематодах из Горно-Алтайского и Тувинского очагов. Все эти сведения расширяют представления об условиях и сообществе организмов, в которых может оказаться возбудитель чумы во время своего жизненного цикла и дополняют имеющиеся представления о паразитарной системе природных очагов чумы, что важно для понимания закономерностей их функционирования, и, как следствие, для оптимизации комплекса проводимых профилактических мероприятий.

В результате выполнения настоящего исследования были решены все поставленные задачи и достигнута цель исследования, заключающаяся в установлении характера взаимодействий *Y. pestis* с почвенной микрофауной Горно-Алтайского высокогорного очага чумы. Клетки амёб *A. castellanii*, распространенных обитателей почв Горного Алтая, могут выступать для *Y. pestis* в роли потенциальных репликационных ниш, доказательством чему служит увеличение концентраций возбудителя чумы при совместном культивировании с амёбами. Кроме того, популяция *A. castellanii* способна поддерживать длительное сохранение *Y. pestis* в отсутствие органических питательных веществ в минимальной жидкой среде. Благодаря сконструированным штаммам, продуцирующим флуоресцентный белок, доказана локализация возбудителя чумы внутри цист амёб, демонстрирующая возможность использования простейших в качестве защитных ниш. *Y. pestis* образует биопленку на кутикуле нематод *Panagrolaimus sp.*, также выделенных из почв Горного Алтая, и локализуется внутри пищеварительного тракта, не оказывая влияния на жизнеспособность нематод, из чего можно сделать вывод о возможном участии нематод в распространении возбудителя чумы в пределах почвенного биотопа. Данные об особенностях и закономерностях взаимодействий с почвенной микрофауной, а также оказываемом возбудителем чумы эффекте на почвенных нематод, полученные в настоящем исследовании, пополняют знания в области экологии возбудителя чумы и механизмов энзоотии чумы. В совокупности с приведенными данными все более очевидным становится участие представителей почвенной микрофауны в сохранении и распространении *Y. pestis* в пределах почвенного биоценоза природного очага, а также их роль в активизации эпизоотических процессов.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT из Горного Алтая и Тувы имеют общие потребности роста в аминокислотах треонин, метионин, фенилаланин с другими штаммами античного биовара, но в отличие от них переменны по признаку зависимости от цистеина. Штаммы других линий античного биовара имеют дополнительные потребности в лейцине и пролине. В 14 генах метаболических путей серы и цистеина античного биовара выявлено 19 мутаций, для большинства эволюционных линий характерен свой мутационный профиль этих генов.

2. Сконструированы рекомбинантные штаммы *Y. pestis* филогенетической линии 4.ANT с плазмидами флуоресценции pTurboGFP-B и pKatushka-2S, не отличающиеся по свойствам и вирулентности от исходных штаммов и позволяющие моделировать взаимодействие с членами почвенной микрофауны Горно-Алтайского высокогорного очага чумы.

3. В почвах нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы выявлены цистообразующие амебы *A. castellanii* и представители миксомицет *D. sphaerocephalum*. В эксперименте по совместному культивированию с простейшими *A. castellanii* из Горно-Алтайского высокогорного очага установлена способность *Y. pestis* филогенетической ветви 4.ANT сохраняться в солевом буфере в отсутствие необходимых органических веществ до 22 месяцев без изменения основных свойств и вирулентности.

4. Установлено, что в почвах нор грызунов Горно-Алтайского высокогорного очага чумы распространены свободноживущие нематоды рода *Panagrolaimus* и семейства Diplogasteroidae. Показана способность штаммов *Y. pestis* линии 4.ANT формировать биопленку на кутикуле почвенных нематод в области половых органов и хвоста и образовывать конгломераты клеток *Y. pestis* в пищеварительном тракте нематод. Не обнаружено значимого влияния на продолжительность жизни нематод *Panagrolaimus sp.* на протяжении 24 часов их культивирования на газоне штамма *Y. pestis* линии 4.ANT.

5. Выявлено присутствие энтомопаразитических нематод рода *Rubzovinema* в блохах *C. tesquorum* и *F. elatoides* из Тувинского горного очага чумы. Исследована микробиота паразитарной системы «нематода-блоха» из Горно-Алтайского высокогорного и Тувинского горного очагов чумы, в составе которой выявлены представители α -протеобактерий, γ -протеобактерий и актиномицетов, а именно родов *Cutibacterium*, *Pseudomonas*, *Brevundimonas*, *Wolbachia*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Экспериментальные статьи:

1. Макашова, М.А. 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 // **Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Химия. Биология. Экология.** – 2018. – Т. 18. – № 3. – С. 325–330. (из «Перечня ВАК...»)

2. Макашова, М.А. Длительное сохранение *Yersinia pestis* в ассоциации с *Acanthamoeba castellanii* в эксперименте / **М.А. Макашова**, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Н.А. Шарапова, Е.А. Нарышкина, В.Г. Германчук, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // **Проблемы особо опасных инфекций.** – 2022. – № 4. – С. 82–89. (из «Перечня ВАК...»)

3. Макашова, М.А. Влияние *Yersinia pestis* на почвенных нематод *Panagrolaimus sp.* из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы / **М.А. Макашова**, Е.Г. Оглодин, Н.А. Шарапова, А.Е. Самойлов, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // **Проблемы особо опасных инфекций.** – 2023. – № 2. – С. 127–133. (из «Перечня ВАК...»)

4. Макашова, М.А. Ауксотрофность штаммов *Yersinia pestis* античного биовара и ее генетические основы / **М.А. Макашова**, Л.М. Куклева, Н.С. Червякова, Е.А. Нарышкина, А.В. Коврижников, Г.А. Ерошенко, И.Г. Швиденко, В.В. Кутырев // **Проблемы особо опасных инфекций.** – 2023. – № 4. – С. 96–105. (из «Перечня ВАК...»)

Патент:

5. Макашова М.А. Пат. 2769790 РФ, МПК C12N 1/21, C12N 15/74. Набор рекомбинантных флуоресцентных штаммов бактерий вида *Yersinia pestis* античного биовара основного подвида и алтайского биовара центральноазиатского подвида для индикации возбудителя чумы в экспериментальных образцах [Текст] / **М.А. Макашова**, О.А. Морозов, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, Н.С. Червякова, И.В. Тучков, В.В. Кутырев. Опубл. 06.04.2022, Бюл. № 10.

Публикации в сборниках научных и научно-практических конференций:

6. Макашова М.А. Определение систематической принадлежности амёб из почв Горно-Алтайского высокогорного очага чумы [Текст] / **М.А. Макашова**, Е.Г. Оглодин, К.А. Никифоров, Н.А. Шарапова, Г.А. Ерошенко // Материалы XIV Межгосударственной научно-практической конференция «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в том числе на территории трансграничных природных очагов чумы», посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». (Саратов, 20–21 ноября 2018 г.) «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ». – 2018. – С. 240–242.

7. Макашова М.А. Выявление симбионтов энтомопаразитических нематод *Rubzovinema sp.* из Тувинского горного очага чумы / **М.А. Макашова**, Е.Г. Оглодин,

Е.Г. Токмакова [Текст] // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Материалы XI Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Уфа, 02–04 октября 2019 г.) – Уфа, 2019 – С. 255–259.

8. Макашова М.А. Длительное сосуществование *Yersinia pestis* и *Acanthamoeba castellanii* в замкнутой системе в отсутствие питательных ресурсов [Текст] / М.А. Макашова, Е.Г. Оглодин, Г.А. Ерошенко // Сборник трудов XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 24–26 мая 2021 г.). – Москва, 2021. – С. 204.

9. Макашова М.А. Вариабельность генов *Yersinia pestis*, ответственных за взаимодействие с макрофагами [Текст] / М.А. Макашова, Е.Г. Оглодин // Сборник трудов XIII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 24–26 мая 2021 г.). – Москва, 2021. – С. 203-204.

10. Макашова М.А. Набор рекомбинантных флуоресцентных штаммов *Yersinia pestis* античного биовара основного подвида и алтайского биовара центрально-азиатского подвида [Текст] / М.А. Макашова, Е.Г. Оглодин, Л.М. Куклева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней: материалы XV Межгосударственной научно-практической конференции. (Иркутск, 5–6 октября 2021 г.). – Иркутск, 2021. – С. 161–163.

11. Makashova M.A. Interaction of *Yersinia pestis* with the microfauna of soil biocenoses of natural plague foci of the Altai Mountains [Text] / М.А. Makashova, E.G. Oglodin, G.A. Eroshenko // Proceedings of International Symposium «Yersinia 14» (Saint-Petersburg, September 26–28, 2022) – Saint-Petersburg, 2022. – P. 51.

12. Макашова М.А. Влияние *Yersinia pestis* на почвенных нематод *Panagrolaimus sp.* из Горно-Алтайского высокогорного очага чумы [Текст] / М.А. Макашова, Е.Г. Оглодин, Н.П. Гусева, Г.А. Ерошенко, В.В. Кутырев // Сборник трудов XV Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 27–29 марта 2023 г.) – Москва, 2023. – С. 139.

13. Макашова М.А. Генетическая основа ауксотрофности по лейцину штаммов *Yersinia pestis* античного биовара [Текст] / М.А. Макашова, Л.М. Куклева, Е.А. Нарышкина, Г.А. Ерошенко // Молекулярная диагностика и биобезопасность – 2023: сборник тезисов Конгресса с международным участием (Москва, 27–28 апреля 2023 г.) – Москва, 2023. – С. 108.

14. Makashova M.A. Interaction of *Yersinia pestis* with the microfauna of natural plague foci in Gorny Altai [Text] / М.А. Makashova, E.G. Oglodin, G.A. Eroshenko, V.V. Kuttyrev // Proceedings of 25th International Scientific Conference «Current issues on zoonotic diseases» (Ulaanbaatar, June 23, 2023) – Ulaanbaatar, 2023. – P. 61.

Подписано к печати 00.00.2024
Формат 60 x 84 1/16. Печать лазерная. Бумага офисная
Объем 1,0 усл. п. л. Тираж 100 экз.
Отпечатано в типографии «Техно-Декор»
г. Саратов, ул. Московская, 160
тел (8452) 77-08-48, sar-print.ru