

АНАЛИЗ МЕТАГЕНОМА САЛАМАНДРЫ С ЗАБОЛЕВАНИЕМ НЕИЗВЕСТНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Бронзит Э. К.¹, Свинин А. О.²

Научный руководитель – канд. биол. наук, Свинин А. О.¹

¹Университет ИТМО
elinabronzit@gmail.com

Введение

Амфибии представляют собой одну из наиболее уязвимых групп позвоночных животных. В настоящее время во всем мире наблюдается массовое сокращение численности и вымирание популяций земноводных [1]. Данный процесс обусловлен комплексом антропогенных и биотических факторов, среди которых, наряду с разрушением естественных местообитаний, ключевую роль играет распространение заболеваний, вызываемых вирусами, бактериями и патогенными грибами [1]. В связи с этим, необходим постоянный мониторинг патогенов с целью оценки и прогноза всевозможных рисков, связанных с распространением новых заболеваний пойкилотермных животных.

В секторе зоопарков и частных аквакультур амфибий на протяжении последних десятилетий среди хвостатых амфибий наблюдается заболевание неясной этиологии. Клиническая картина заболевания характеризуется появлением на коже черного налета, нередко отслаивающегося в виде лоскутов (отторжение эпидермиса). Это сопровождается учащенной линькой, снижением общей активности животных и, в конечном итоге, приводит к летальному исходу. Данное заболевание представляет серьезную угрозу для культивируемых групп амфибий, приводя к гибели аквакультур амфибий (в том числе, угрожаемых видов из списка IUCN), и относится к категории трудно поддающихся терапии инфекций. Применение стандартных схем антибиотикотерапии и антимикотических препаратов не приводит к выздоровлению пораженных особей.

Данное пионерное исследование в области изучения этиологии заболевания включало в себя метагеномный анализ зараженного образца, представляющего собой погибшую от заболевания особь *Salamandra s. gallaica* (подвид огненной саламандры из Португалии), проведенный с целью детекции инфекционного агента.

Основная часть

В 2024 году был получен мертвый экземпляр огненной саламандры *Salamandra salamandra gallaica* Seoane, 1884 (Amphibia: Salamandridae) из частной коллекции (ваучер BS1) с симптомами летального синдрома. Выделение ДНК проведено из образцов кожи инфицированного экземпляра, зафиксированных в 70% этаноле, с использованием набора Magen HiPure Universal DNA Kit (Magen Biotechnology, Гуанчжоу, Китай). Итоговая концентрация ДНК в растворе, измеренная с помощью микроспектрофотометра Nano-500 (Allsheng Instruments, Ханчжоу, Китай), составила 10,5 нг/мкл. Парно-концевые ДНК-библиотеки размером 150 п.н. были подготовлены использованием TruSeq Nano DNA Library Prep kit и секвенированы на платформе Illumina NovaSeq 6000 (Illumina, Сан Диего, Калифорния, США). Качество прочтений оценивали с помощью MultiQC v1.26 [2]. Последовательности были очищены от адаптеров и химерных последовательностей с использованием Trimmomatic v. 0.36 [3]. Сборка прочтений в контиги осуществлялась с помощью MEGANIT v. 1.2.9 [4]. Идентификация собранных контигов проведена с использованием Kraken2 [5] путем

сравнения с базой данных нуклеотидных последовательностей вирусов, бактерий и эукариот.

В состав микробного сообщества инфицированного экземпляра входили *Pseudomonas protegens*, *Acinetobacter gyllenbergii*, *Alcaligenes* sp., *Achromobacter* sp., *Brevundimonas pondensis*, *Comamonas testosteroni*, *Delftia acidovorans*, *Myroides odoratus*, *Providencia rettgeri*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Sphingobacterium multivorum*. Большинство обнаруженных бактерий относятся к порядкам Burkholderiales, Pseudomonadales и Enterobacterales. Анализ представленности бактериальных родов в сборке показал, что доминирующим компонентом микробиома были бактерии *Myroides odoratus*, *Comamonas testosteroni* и *Alcaligenes* sp. SORT26. Почти все найденные виды бактерий являются представителями нормальной микрофлоры кожных покровов амфибий, однако представители родов *Achromobacter*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Providencia* и *Myroides* также являются оппортунистическими патогенами, которые при ослаблении иммунитета хозяина и повреждении кожи могут вызывать вторичные инфекции. Анализ вирома (ДНК-содержащих вирусов) не выявил патогенные вирусы амфибий, обнаружив небольшой спектр фагов, поражающих бактериальные клетки. Метагеномный анализ подтвердил отсутствие ранавирусной инфекции, имеющей другой набор симптоматических признаков (покраснение кожи, геморрагии). Анализ образцов на наличие грибковой ДНК не выявил патогенных видов.

Выводы

Таким образом, анализ микробиома зараженной огненной саламандры показал, что развитие вторичной полимикробной инфекции произошло на фоне первичного поражения небактериальной природы. Данный факт позволяет сузить круг поисков этиологического агента до РНК-содержащих вирусов и возбудителей микотических инфекций. Дальнейший транскриптомный анализ и исследование образцов на наличие грибковой ДНК могут прояснить причину данного заболевания.

Литература

1. O'Hanlon, Simon J et al. Recent Asian origin of chytrid fungi causing global amphibian declines // *Science*. 2018. Vol. 360, no. 6389. P. 621-627. <https://doi.org/10.1126/science.aar1965>
2. Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., Källner, M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report // *Bioinformatics*. 2016. Vol. 32, no. 19. P. 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
3. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // *Bioinformatics*. 2014. Vol. 30, no. 15. P. 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
4. Li D, Liu C-M, Luo R, Sadakane K, Lam T-W. MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph // *Bioinformatics*. 2015. Vol. 31, no. 10. P. 1674–1676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033>
5. Wood, D. E., Lu, J., Langmead, B. Improved metagenomic analysis with Kraken 2 // *Genome Biology*. 2015. Vol. 20, no. 257. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1891-0>