

УДК 576.895.121.56 / 599.742.11

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
*ECHINOCOCCUS CANADENSIS* (CESTODA, TAENIIDAE)  
ОТ ВОЛКА ИЗ КИРОВСКОЙ ОБЛАСТИ**

© 2023 г. **О. А. Логинова<sup>а,\*</sup>, С. Э. Спиридонов<sup>а</sup>,  
О. В. Масленникова<sup>б</sup>, Л. А. Букина<sup>б</sup>**

<sup>а</sup>ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН»,  
Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

<sup>б</sup>ФГБОУ ВО «Вятский государственный агротехнологический университет»,  
Октябрьский просп., 133, Киров, 610017 Россия

\*e-mail: loginova\_spb@bk.ru

Поступила в редакцию 13.12.2022 г.

После доработки 19.01.2023 г.

Принята к публикации 21.01.2023 г.

Представлены результаты изучения молекулярной характеристики паразитических ленточных червей *Echinococcus canadensis*. Гельминты были обнаружены при вскрытии волка (*Canis lupus* Linnaeus, 1758), добытого охотниками в Кировской области в 2021 г. Молекулярно-филогенетическое исследование проводили путем анализа последовательности фрагмента первой субъединицы митохондриального гена цитохромоксидазы (*Cox1*). Установили, что обнаруженные эхинококки относятся к генотипу G10 *E. canadensis*, обычному для волков на северных территориях Голарктики. Обнаружены четыре позиции, по которым выявляются характерные только для этого генотипа замены. Обнаружена также замена по одной из позиций, которая характерна исключительно для представителей генотипа G10, обнаруженных в России и Финляндии.

**Ключевые слова:** эхинококк, *Echinococcus canadensis*, G10, волк, Кировская область

**DOI:** 10.31857/S0031184723010039; **EDN:** FJCPFX

Паразитические ленточные черви рода *Echinococcus* Rudolphi, 1801 известны человечеству еще со времен Гиппократ, Аретей и Галена (Beaver et al., 1984). Однако даже в XXI столетии в изучении эхинококков остается много нерешенных вопросов. Например, все еще нет полного понимания и единства мнений относительно систематического положения видов этого рода. Известен список из девяти валидных видов, включая *E. granulosus* s. str., *E. canadensis* (он же – *E. g. canadensis* или *E. g. borealis*), а также генотипы *E. canadensis* – G6/G7, G8 и G10. Т.е. *E. canadensis*,

с одной стороны, входит в группу *E. granulosus* s. lato, а с другой – подразделяется на генетически различные субъединицы. Важно, что генотипы *E. canadensis* имеют некоторые различия по областям распространения, дефинитивным и промежуточным хозяевам (Nakao et al., 2013a, 2013b). Было высказано предложение закрепить видовое название *E. canadensis* за генотипом G10, генотип G6/G7 называть *E. intermedius*, а G8 – *E. borealis* (Lymbery et al., 2015). В этой связи должна быть использована любая возможность расширить наши представления о молекулярных характеристиках эхинококков.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

### Отбор проб

10.10.2021 на границе Свечинского и Даровского районов Кировской области (58°65'13.4 N, 47°69'88.2 E) охотники добыли волка (*Canis lupus* Linnaeus, 1758). В тонком отделе кишечника были обнаружены цестоды цвета слоновой кости длиной 3–6 мм. Методом многократного промывания (Скрябин, 1928; Ивашкин и др., 1971) их извлекли и произвели подсчет по сколексам (2920 экз.). Морфометрические характеристики собранных цестод соответствуют диагнозу вида *E. granulosus* (Петров, Черткова, 1959 по: Абуладзе, 1964). Эхинококков поместили в пластиковую пробирку, которую наполнили дистиллированной водой и заморозили для последующего хранения и транспортировки.

### Молекулярно-филогенетическое исследование

Фрагменты стробилы трех эхинококков трижды ополоснули в стерильной воде, разделили на части (размером не более 1–2 мм<sup>3</sup>) и поместили в пробирки Эппендорфа объемом 1.5 мл. Выделение ДНК проводили с помощью колонок из набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США) в соответствии с протоколом производителя. От выделенных проб эхинококков использовали от 1.0 до 1.6 мкл экстрагированной ДНК для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Таксономическую принадлежность цестод устанавливали путем анализа последовательности фрагмента первой субъединицы митохондриального гена цитохромоксидазы (*CoxI*). Для этого осуществляли постановку ПЦР с помощью праймеров Thg452 (TGCATT-TAGCTGGTGCCTCAAGTA) и Thg1326R (ACAAACACGCCGGGGTAACC) и соответствующего протокола (Littlewood et al., 2008) на амплификаторе T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Для визуальной оценки амплификации прибегали к электрофоретическому разделению продукта ПЦР в 1%-ном агарозном геле в течение 30 мин при напряжении 100 В в системе для электрофореза Mini-Sub Cell GT + PowerPac Basic (Bio-Rad, США) с последующим просмотром геля в трансиллюминаторе EXC-F15.M (Vilber Lourmat, Германия). Получив продукт ожидаемого размера (что определяли на основании оригинальных публикаций или собственного предшествующего опыта), оценивали его количество. В случае получения лишь слабых полос продукта проводили дополнительную амплификацию. Достаточное количество продукта объединяли в одну пробу и проводили ее очистку в 0.8% агарозном геле с помощью продолжительного (70–90 мин) электрофореза. Полосу с нужным размером продукта вырезали из геля пластиковым ножом. Из вырезанного фрагмента геля с амплифицированной ДНК выделяли продукт ПЦР с помощью набора SV Gel and PCR Clean-Up (Promega, США). Очищенный с помощью этих колонок продукт подвергали дополнительной очистке с помощью преципитации спиртом в присутствии ацетата аммония. Очищенный осадок разводили в автоклавируемой воде высокой очистки – Molecular Grade Water (G-Biosciences, США). Количество добавляемой воды

меняли от 10 до 40 мкл, в зависимости от выраженности полос в геле. С помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США) определяли концентрацию ДНК в полученной пробе. Пробы с высокой концентрацией ДНК разводили до концентрации 15–30 нг на 1 мкл. В дальнейшем на базе центра коллективного пользования «Генотех» (Институт молекулярной биологии РАН) проводили прямое секвенирование (т.е. секвенирование с теми же праймерами, которые были использованы для получения первичного ПЦР продукта).

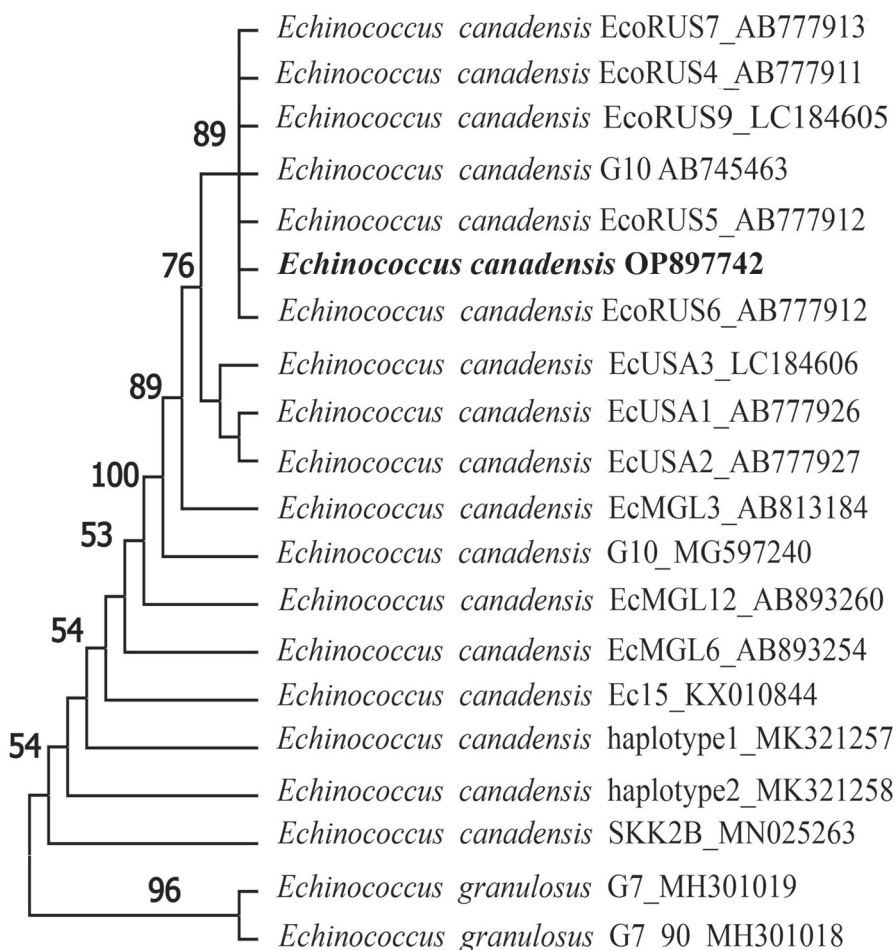
Полученные хроматограммы в формате ab1 для прямого и обратного прочтений объединяли и анализировали с помощью программы Chromas 2.6.6 (Technelium Pty Ltd, Австралия). В ГенБанке (GenBank NCBI) проводили поиск филогенетически близких последовательностей с помощью алгоритма BLASTN 2.13.0+ (Zhang et al., 2000; Morgulis et al., 2008). В качестве внешней группы сравнения выбирали представителя другого семейства, рода или группы видов. Собственные и полученные из ГенБанка данные использовали для построения выравниваний в программе Clustal X (UCD, Ирландия). Полученные выравнивания в формате aln переводили в формат msf для обработки в программе GeneDoc 2.6.002 – удаления несовпадающих по длине частей последовательностей (необходимость этого определяется тем, что в ГенБанке депонированы последовательности разной длины). Полученную прямоугольную матрицу с данными анализировали в программе MEGA 7.0.14 (Kumar et al., 2016). Использовали три основных алгоритма анализа: 1) максимальной экономии (maximum parsimony, MP); 2) присоединения ближайшего соседа (neighbor-joining, NJ); 3) максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML). Для последнего варианта анализа определяли наиболее правдоподобную модель эволюции с помощью встроенной подпрограммы в MEGA7.0.14. Конечная длина выравнивания по гену *CoxI* составила 539 п.н. для всех последовательностей.

Ваучерный образец (№ 14308), содержащий 10 особей эхинококка в 80% этаноле, передали на хранение в Музей гельминтологических коллекций Центра Паразитологии ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук» (Москва). Выделенная нуклеотидная последовательность депонирована в ГенБанк NCBI под номером OR897742.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Филогенетический анализ изученных образцов эхинококков представлен на рис. 1. Полученные нами нуклеотидные последовательности гена *CoxI* имагинальных эхинококков от волка из Кировской области оказались на 100% идентичны таковым: 1) из личинок эхинококков от лося (*Alces alces*) из России, депонированных Yanagida, Chinchuluun и Nakao (2017) под номером LC184605 (Yanagida et al., 2017); 2) из личинок эхинококков от северного оленя (*Rangifer tarandus*) из России, депонированных Yanagida и Nakao (2013) под номером AB777913 (Konyaev et al., 2013); 3) от взрослых эхинококков от волка из России, депонированных Yanagida и Nakao (2013) под номером AB777912 (Konyaev et al., 2013); 4) из личинок эхинококков от лося из России, депонированных Yanagida и Nakao (2013) под номером AB777911 (Konyaev et al., 2013); 5) из личинок эхинококков от лося из Финляндии, депонированных Nakao (2013) под номером AB745463 (Nakao et al., 2013a, 2013b).

Изученный нами образец попадает в группу (филогенетическую кладу) форм со средним уровнем поддержки при анализе методом максимальной экономии (MP) и



**Рисунок 1.** Филогенетические связи образца половозрелого *Echinococcus canadensis*, выявленного у волка (*Canis lupus*) в Кировской области, по результатам анализа частичной последовательности митохондриального гена цитохромоксидазы I.

Значения bootstrap-поддержки даны в формате MP/NJ/ML (если данная филогенетическая клада при данном виде анализа не выявляется, это отмечено знаком «-»).

Для ML-анализа использовали модель НКУ. Для всех видов анализа для определения значения bootstrap-поддержки применяли анализ при 500 псевдо-повторах.

**Figure 1.** Phylogenetic relationships of a sample of adult *Echinococcus canadensis*, found in a wolf (*Canis lupus*) in the Kirov Region, according to the results of analysis of a partial sequence of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene. Bootstrap support values are given in MP/NJ/ML format (noted with “-“ if this phylogenetic clade is not detected in this type of analysis).

Maximum Likelihood (ML) method was used according HKY model with 500 bootstrap replicates.

присоединения ближайшего соседа (NJ). При анализе методом максимального правдоподобия (ML) эта группа не выявляется. При всех трех методах анализа самую высокую поддержку (99–100%) показывает группа, объединяющая, как нам представляется, исключительно изученные формы *E. canadensis* генотипа G10. Визуальный анализ полученного выравнивания позволил обнаружить четыре позиции, по которым выявляются характерные только для этого генотипа замены. Примечательно, что в выравнивании можно обнаружить и замену по одной из позиций, которая характерна исключительно для представителей генотипа G10, обнаруженных в России и в Финляндии (Nakao et al., 2013a, 2013b). Сам по себе генотип G10 приурочен к северным территориям и таким дефинитивным хозяевам, как волки и собаки.

Несмотря на неразрешенный вопрос о таксономическом статусе *E. canadensis*, важно понимать, что исследованные нами эхинококки не относятся к виду *E. multilocularis* (син. *Alveococcus multilocularis* (Leukart, 1863) Abuladse, 1960). Мы особо подчеркиваем этот момент, поскольку известны случаи смешанной инвазии эхинококков разных видов у волков (Schurer et al., 2014).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, эхинококки, обнаруженные при вскрытии волка в Кировской области, относятся к генотипу G10 *E. canadensis*. А нуклеотидная последовательность гена *Cox1* у изученных образцов обладает уникальной для G10 заменой, что позволяет рассматривать ее как биогеографический маркер.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Абуладзе К.И. 1964. Основы цестодологии: Тениаты – ленточные гельминты животных и человека и вызываемые ими заболевания (том IV). М., Наука, 530 с. [Abuladze K.I. 1964. Principles of cestodology: Taeniata of Animals and Man and Diseases Caused by Them (Vol. IV). Moscow, Nauka, 530 pp. (In Russian)] (English translation, Israel Program for Scientific Translations, 1970).
- Ивашкин В.М., Контримавичус В.Н., Назарова Н.С. 1971. Методы сбора и изучения гельминтов наземных млекопитающих. М., Наука, 123 с. [Ivashkin V.M., Kontrimavichus V.N., Nazarova N.S. 1971. Methods for collecting and studying helminths of terrestrial mammals. Moscow, Nauka, 123 pp. (In Russian)]
- Скрябин К.И. 1928. Метод полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека. М., Изд-во МГУ, 45 с. [Skryabin K.I. 1928. Method of complete helminthological dissections of vertebrates, including humans. Moscow, Publishing House of Moscow State University, 45 pp. (In Russian)]
- Beaver P.C., Jung R.C., Cupp E.W. 1984. Clinical Parasitology, 9th ed. Philadelphia, Pennsylvania, Lea & Febiger, 825 pp.
- Konyaev S.V., Yanagida T., Nakao M., Ingovatova G.M., Shoykhet Y.N., Bondarev A.Y., Odnokurtsev V.A., Loskutova K. S., Lukmanova G. I., Dokuchaev N. E., Spiridonov S., Alshinecky M. V., Sivkova T.N., Andreyanov O. N., Abramov S. A., Krivopalov A. V., Karpenko S. V., Lopatina N. V., Dupal T.A., Sako Y., Ito A. 2013. Genetic diversity of *Echinococcus* spp. in Russia. Parasitology 140 (13): 1637–1647. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001340>
- Kumar S., Stecher G., Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis. Version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution 33: 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Littlewood D.T. J., Waeschenbach A., Nikolov P.N. 2008. In search of mitochondrial markers for resolving the

- phylogeny of cyclophyllidean tapeworms (Platyhelminthes, Cestoda) – A test study with Davaineidae. *Acta Parasitologica* 53 (2): 133–144. <https://doi.org/10.2478/s11686-008-0029-4> 2008
- Lymbery A.J., Jenkins E.J., Schurer J.M., Thompson R.C.A. 2015. *Echinococcus canadensis*, *E. borealis*, and *E. intermedius*. What's in a name? *Trends in Parasitology* 31 (1): 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.003>
- Morgulis A., Coulouris G., Raytselis Y., Madden T.L., Agarwala R., Schäffer A.A. 2008. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. *Bioinformatics* 24: 1757–1764. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn322>
- Nakao M., Lavikainen A., Yanagida T., Ito A. 2013a. Phylogenetic systematics of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae). *International Journal for Parasitology* 43 (12–13): 1017–1029. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2013.06.002>
- Nakao M., Yanagida T., Konyaev S., Lavikainen A., Odnokurtsev V.A., Zaikov V.A., Ito A. 2013b. Mitochondrial phylogeny of the genus *Echinococcus* (Cestoda: Taeniidae) with emphasis on relationships among *Echinococcus canadensis* genotypes. *Parasitology* 140 (13): 1625–1636. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000565>
- Schurer J., Gesy K., Elkin B., Jenkins E. 2014. *Echinococcus multilocularis* and *Echinococcus canadensis* in wolves from western Canada. *Parasitology* 141 (2): 159–163. <https://doi.org/10.1017/S0031182013001716>
- Yanagida T., Lavikainen A., Hoberg E.P., Konyaev S., Ito A., Sato M.O., Zaikov V.A., Beckmen K., Nakao M. 2017. Specific status of *Echinococcus canadensis* (Cestoda: Taeniidae) inferred from nuclear and mitochondrial gene sequences. *International Journal of Parasitology* 47 (14): 971–979. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2017.07.001>
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* 7 (1–2): 203–214. <https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

## MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *ECHINOCOCCUS CANADENSIS* (CESTODA, TAENIIDAE) IN WOLF FROM THE KIROV REGION

O. A. Loginova, S. E. Spiridonov, O. V. Maslennikova, L. A. Bukina

**Keywords:** *Echinococcus canadensis*, G10, wolf, Kirov region

### SUMMARY

The molecular characteristics of parasitic tapeworms of the genus *Echinococcus* were studied. Helminths were discovered during the autopsy of a wolf (*Canis lupus* Linnaeus, 1758), hunted in the Kirov region in October of 2021. Molecular phylogenetic study was performed by analyzing the sequence of a fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) gene. It was found that the obtained helminths belong to the G10 *E. canadensis* genotype, which is common in wolves in the northern territories of the Holarctic. Four positions were found for which substitutions characteristic only for this genotype are identified. A substitution was also found for one of the positions, which is characteristic only for representatives of the G10 genotype found in Russia and Finland.