

ТОНКАЯ МОРФОЛОГИЯ И ФИЛОГЕНИЯ *SPIROPLASMA* SP., ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ГЛАЗ ОВЕЦ, БОЛЬНЫХ СКРАПИ

© Ю. Я. Соколова

Центр микроскопии при Школе ветеринарной медицины
Государственного университета штата Луизиана в Батон Руж, США, 70803,
и Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 194064;
электронный адрес: yusokolova@gmail.com

Культуры спироплазмы были изолированы из глаз трех овец, больных трансмиссивной спонгиозной энцефалопатией жвачных (скрапи). Ранее было показано, что экспериментальное заражение этими изолятами лабораторных животных и клеточных линий вызывает внутриклеточную патологию, характерную для нейродегенеративных заболеваний (Bastian, 2014). В работе представлены данные световой (СМ) и электронной (ЭМ) микроскопии, а также данные филогенетического анализа на базе полученных сиквенсов гена малой субъединицы рибосомной РНК (16S-рДНК). По данным СМ, изученные микроорганизмы представляют собой удлинённые (до 10 мкм) спиралевидные клетки диаметром 100 нм. С помощью трансмиссионной и сканирующей ЭМ выявлены их разнообразные морфологические формы, в том числе спиралевидные, палочковидные и шаровидные. Сиквенс 16S-рДНК новых изолятов продемонстрировал более чем 99.9%-ное сходство с ортологами из *S. chrysopicola* и *S. syrphidicola*, комменсалами мух. На филогенетическом дереве изоляты, выделенные из глаз овец, размещались внутри клады «*S. chrysopicola*—*S. syrphidicola*—ТААС» среди группы видов спироплазм, ассоциированных с двукрылыми насекомыми. Это позволяет предположить, что мухи, которые часто садятся на глаза жвачных на пастбищах, являются переносчиками этих микроорганизмов. Данное предварительное исследование ставит ряд вопросов, требующих дальнейшего изучения: случайно ли микроорганизмы попали в глаза овец, больных скрапи; связаны ли спироплазмы с заболеванием; могут ли двукрылые насекомые быть облигатными или факультативными резервуарами и векторами возбудителя скрапи.

Ключевые слова: Mollicutes, молекулярная филогения, ультраструктура бактерий, Tabanidae, Syrphidae, трансмиссивная спонгиозная энцефалопатия, жвачные животные.

Принятые сокращения: 16S-рДНК — ген малой субъединицы рибосомной РНК, МА — молибдат аммония, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РГБ — роговица глаза быка, СМ — световая микроскопия, СЭМ — сканирующая электронная микроскопия, ТГЭ — трансмиссивные губчатые энцефалопатии, ТЭМ — трансмиссионная электронная микроскопия, ФВК — фосфорно-вольфрамовая кислота, ЭМ — электронная микроскопия, PBS — фосфатный солевой буфер, SMCA — возбудитель катаракты мышей (Suckling Mouse Cataract Agent).

Род *Spiroplasma* (Bacteria: Firmicutes: Mollicutes: Entomoplasmatales: Spiroplasmatales) представлен грамположительными бактериями спиралевидной формы, лишенными клеточной стенки. *Spiroplasma citri*, этиологический агент болезни цитрусовых, известной как «citrus stubborn disease», была первым видом, описанным в роде *Spiroplasma* (Saglio et al., 1973). Позднее были идентифицированы и другие виды данного рода, паразитирующие во флоэме растений (Williamson et al., 1989, 1999; Helias et al., 1998). В дальнейшем оказалось, что спироплазмы более распространены как симбионты насекомых, чем растений. Эти микроорганизмы были выделены из представителей нескольких отрядов насекомых (Phasmoptera, Hemiptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera и Lepidoptera), но максимальное число видов было найдено в представителях двукрылых насекомых, а именно в слепнях семейства Tabanidae (Whitcomb et al., 1997; Whitcomb, 2007; Gasparich, 2010). Кроме того, виды *Spiroplasma* были обнару-

жены в организмах клещей (Tully et al., 1981, 1982) и морских десятиногих раков (Wang et al., 2004b, 2011; Nunan et al., 2005). Таким образом, спироплазмы — это широко распространенные симбионты и паразиты беспозвоночных. Неясно, можно ли считать спироплазм патогенными микроорганизмами для млекопитающих. С одной стороны, по крайней мере один вид, а именно возбудитель катаракты мышей *S. mirum* (SMCA), выделенный из искодовых клещей, при экспериментальном введении в мозг грызунов (мышей и крыс) и копытных животных (овец и оленей) вызывал симптомы трансмиссивной губчатой энцефалопатии (ТГЭ) (Clark, 1969, 1974; Tully et al., 1976, 1977, 1981; Bastian, 2014). С другой стороны, случаев естественного инфицирования позвоночных животных *Spiroplasma* spp. описано не было, а тесты на наличие спироплазм и (или) их генетического материала в виде ДНК или РНК в мозге экспериментальных животных (хомяков) с ТГЭ были отрицательными (Alexeeva et al., 2006).

Сравнительно недавно *Spiroplasma* sp. были выделены из глаз трех овец, больных скрапи, инфекционной и фатальной ТГЭ, поражающей жвачных животных. Микроорганизмы, выделенные из глаз этих овец, ранее культивировали на искусственной среде, в культуре клеток роговицы глаза быка (РГБ) и в клетках мышинной нейробластомы. В предыдущих исследованиях не удавалось достичь пролиферации микроорганизмов, необходимой для их характеристики. Однако авторы продемонстрировали, что в клетках роговицы глаза быка и мышинной нейробластомы микроорганизмы, выделенные из овец, больных скрапи, вызывают развитие патологических изменений, характерных для ТГЭ; такие же патологические изменения вызывал и SMCA изолят *S. mirum*. При этом изоляты микроорганизмов, выделенных из овец, по своим иммунологическим характеристикам отличались от *S. mirum* (Bastian et al., 2011; Bastian, 2014). Долговременные бесклеточные культуры изолятов *Spiroplasma* sp., выделенных из овец, больных скрапи, были впервые получены проф. Вильямом Тоддом (Dr. William Todd, Louisiana State University) и любезно переданы нам для микроскопического и молекулярно-генетического анализа, результаты которого описаны в данной статье.

Цель настоящей работы — изучение ультраструктуры микроорганизмов, развивающихся в этих культурах, а также определение родственных связей изучаемых изолятов с другими представителями рода *Spiroplasma*. Культуры микроорганизмов находятся в настоящее время на хранении в NIAID Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository (США) и доступны по соответствующему запросу.

Материал и методика

Для изоляции микроорганизмов использовали глаза трех прион-положительных овец с симптомами скрапи (номера кейсов 296, 301 и 5061), приобретенные в Ветеринарном учебном центре Университета Айдахо (University of Idaho Caine Veterinary Teaching Center). Подробное описание кейсов приведено в работе Бастиана и соавторов (Bastian et al., 2011).

Культивирование спироплазм. Небольшие (< 1 мм³) фрагменты размороженной ткани глазного яблока были добавлены к монослою клеток РГБ (ATCC CRL-2048), достигшему 60 % конfluence. Культуры клеток поддерживали в вентилируемых культуральных флаконах 25 или 75 мл (Corning, США) при 37 °С и 5 % CO₂ в среде DMEM, содержащей 1 % глутамата, 4,5 г/л глюкозы, 100 мМ Na₃PO₄, 1 М HEPES, 10 % сыворотки плодов крупного рогатого скота и 2,5 мкг/мл антибиотика ванкомицина. Для первоначальной изоляции и первых 2—3 пассажей дополнительно добавляли 10 мкг/мл ванкомицина. Замену культуральной среды и разведение клеток в 3—4 раза проводили еженедельно. Клетки отделяли от флаконов после добавления 0,25%-ного раствора трипсина. Наличие микроорганизмов в культуральной среде оценивали с помощью световой микроскопии в темном поле при общем увеличении 1000×. 1 раз в 2 нед клетки, осажденные с помощью центрифугирования, анализировали с использованием трансмиссионной электронной микроскопии (ЭМ) для выявления внутриклеточных форм микроорганизмов. После многократного пассирования через клетки РГБ в течение 6—12 мес спироплазмы были выделены в культуры, раз-

вивающиеся и пролиферирующие в жидкой среде SP-4 (Teknova, Канада), как это описано для изолята SMCA *S. mirum* (Tully et al., 1977). Равные объемы культуральной среды с микроорганизмами, освободившимися из клеток РГБ, смешивали с питательным бульоном SP-4 и инкубировали при 37 °С и 5 % CO₂ 2—3 нед, после чего культуры содержали при 31 °С без CO₂. 1 раз в 1—8 нед культуры разводили в 3 раза свежей порцией среды SP-4 и просматривали в световой микроскоп в темном поле. Бесклеточные культуры спироплазм поддерживали в течение 11 мес. Культуры анализировали с использованием ЭМ через 2 и 8 нед после последнего разведения и добавления свежей культуральной среды.

В качестве контроля использовали клетки РГБ после добавления фрагментов здорового глаза. Контрольные клеточные культуры также анализировали с использованием СМ и ЭМ, однако ни микроорганизмов, ни каких-либо патологических изменений в них не наблюдали.

Выделение ДНК, ПЦР-амплификация и секвенирование. Микроорганизмы концентрировали в 1000 раз центрифугированием при 14 000 g в течение 30 мин в настольной центрифуге 4515 R. ДНК изолировали с помощью кита Roche High Pure Template Preparations Kit (Roche Applied Sciences, Германия) согласно инструкции фирмы-производителя. Для амплификации участка 16S-рДНК использовали готовую смесь ДНК-полимеразы и других ингредиентов ПЦР (One TaqD Quick Load Master Mix) (New England Biolabs, США) и две пары праймеров: (1 — прямой праймер «SMCA 16s F»: 5'-GGGTGAGTAACACGTATCTAATCTACCCATTAGC3' и обратный праймер «SMSA16s R»: 5'-GTTTCAC-TCTTGCGAGCATACTACTCAG GCGGAG-3'; (2 — прямой праймер «SMCA 16s F» и обратный праймер «Ssyph16s R»: 5'-TCCCTCCTTACGGTTAGGATACCG-ACTTCTG-3'). Длины участков рДНК, амплифицированных с помощью этих праймеров, составили соответственно 700 (1) и 1300 (2) пар оснований (п.о.). ДНК экстрагировали из 2%-ного агарозного геля с помощью кита QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, США). Секвенирование проводили на базе Молекулярного центра Ветеринарной школы Университета Луизианы в Батон Руж (GenLab, School of Veterinary Medicine, Louisiana State University), на секвенаторе Beckman Coulter Seq 8000 DNA. Для реакции секвенирования использовали упомянутые выше праймеры и кит «Applied BioSystems BigDie Terminator Cycle Sequencing kit (version 3.1)». Полученные консенсусные последовательности были депозитированы в Генбанк под номерами KF840732—KF840734.

Филогенетический анализ. Для филогенетического анализа к полученным трем сиквенсам добавили 10 сиквенсов *Spiroplasma* sp. из Генбанка (табл. 1). Сиквенс *Mycoplasma hominis* (Acc#M24473) представлял внешнюю группу. Поскольку полученные нами сиквенсы значительно варьировали по длине, два набора сиквенсов были подготовлены для элайнмента. Элайнмент осуществляли с помощью программы «Muscle» (со стандартными параметрами (Edgar, 2004)), встроенной в программный пакет MEGA 5.05. Матрикс парных генетических дистанций (Pairwise genetic distances matrix) и филогенетический анализ методами «Ближайших соседей» (Neighbor-joining) и «Максимального сходства» (Maximum likelihood) также рассчитывали с помощью MEGA 5.05 (Tamura et al., 2011). Для расчетов была использована модель «Kimura-2 parameter model of nucleotide substitution with a discrete Gamma distribution» (Kimura, 1980), вы-

Три изолята *Spiroplasma* sp. из овец, больных скрапи, и другие виды и изоляты спируплазм, участвующие в филогенетическом анализе: номера в Генбанке (Acc #), виды и систематическое положение хозяев

| Виды и изоляты спируплазм | 16S rDNA Acc # | Вид хозяина | Систематическое положение хозяина |
|------------------------------|----------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| Изолят № 296 | KF840732 | <i>Ovis aries</i> | Chordata, Mammalia |
| 301 | KF840733 | То же | То же |
| 296 | KF840734 | » » | » » |
| <i>S. apis</i> | GU993267 | <i>Apis mellifera</i> | Arthropoda, Insecta, Hymenoptera |
| <i>S. citri</i> | AM285316 | <i>Circulifer haematoceps</i> | Arthropoda, Insecta, Hemiptera |
| » » | DQ112019 | <i>Daucus carota</i> | Plantae, Angiosperms |
| <i>S. ixodetis</i> | GU585671 | <i>Ixodes pacificus</i> | Arthropoda, Arachnida, Ixodida |
| <i>S. mirum</i> | JX898939 | <i>Haemaphysalis leporispolustris</i> | То же |
| <i>S. syrphidicola</i> | NR025711 | <i>Eristalis arbustorum</i> | Arthropoda, Insecta, Diptera |
| <i>S. chrysopicola</i> | NR025699 | <i>Chrysops</i> sp. | То же |
| <i>Spiroplasma</i> TAAS-1 | AY189314 | <i>Tabanus</i> sp. | » » |
| <i>Spiroplasma</i> BARC 2649 | EF491665 | То же | » » |
| <i>Spiroplasma</i> BARC 1357 | EF491664 | » » | » » |
| <i>Mycoplasma hominis</i> * | M24473 | <i>Homo sapiens</i> | Chordata, Mammalia |

Примечание. Звездочкой обозначена внешняя группа (outgroup).

бранная программой тестирования модели (model test). Статистическую достоверность узлов дерева тестировали в 1000 бутстрапных репликациях (Felsenstein, 1985).

Световая и флуоресцентная микроскопия. Для визуализации спируплазм 10—20 мкл культуральной среды просматривали в световом микроскопе с иммерсионным объективом 100× в темном поле или с использованием фазового контраста. В ряде случаев к образцам добавляли флуоресцентные ядерные красители Hoechst 33342 или DAPI в концентрации 1—5 мкМ. Для СМ использовали микроскоп Zeiss AxioPlan с приставкой для эпифлуоресценции и цифровой камерой Olympus DP73.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Клетки РГБ, инфицированные спируплазмами, или суспензии микроорганизмов из бесклеточных культур осаждали центрифугированием в центрифужных пробирках 1.5 мл. Осадки промывали солевым фосфатным раствором (PBS) и фиксировали 2—6 ч в растворе 2%-ного параформальдегида и 1.25%-ного глутаральдегида в 0.1 М какодилатном буфере с добавлением 5 % сахарозы. Осадки заключали в 3%-ную агарозу, постфиксировали 1%-ным раствором четырехоксида осмия, инкубировали в 2%-ном растворе уранил-ацетата в 0.1 М малеатном буфере (рН 5.2), обезвоживали в серии этанолов повышающихся концентраций и окиси пропилен и заливали в Эпон—Аралдит. Ультратонкие (80 нм) срезы окрашивали цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-1011 JEOL со встроенной цифровой камерой HAMAMATSU ORCA-HR.

Для негативного контрастирования 10 мкл суспензии микроорганизмов инкубировали 2 мин на сеточке с формваровой подложкой. Затем жидкость убрали с помощью фильтровальной бумаги и добавляли 10 мкл 1—4%-ного раствора формваровой кислоты (ФВК) или молибдата аммония (МА). Через 1 мин раствор удаляли, сеточки высушивали на воздухе и просматривали в электронном микроскопе.

Сканирующая электронная микроскопия. 5 мл суспензии микроорганизмов фильтровали через по-

ликарбонатные фильтры с порами диаметром 0.22 мкм (Osmonics Laboratory Products, США). Фильтры промывали PBS, фиксировали в растворе глутаральдегида—параформальдегида и обезвоживали в серии этанолов. 100%-ный этанол замещали CO₂ в аппарате для сушки при критической точке (Polaron E3000 Standard Critical Point Drier). В качестве альтернативы 30—50 мкл культуры микроорганизмов помещали на круглые пластиковые покровные стекла диаметром 13 мм (Nunc™ Brand Products, США), подсушивали на воздухе и обрабатывали, как описано выше для поликарбонатных фильтров. Фильтры или покровные стекла помещали на алюминиевые столики, напыляли смесью золота и палладия с помощью вакуумного напылителя EMS 550X Sputter Coater и исследовали в микроскопе Fei Quanta 200 ESEM.

Использованные реактивы: агароза, глюкоза, натрия фосфат, сыворотка плодов крупного рогатого скота, PBS, HEPES, уранил-ацетат, DAPI (Sigma, США); ванкомицин (MP Biomedicals, Канада); культуральная среда DMEM, глутамат (Gibco, ThermoFisher Scientific, США); Hoechst 33342 (Thermo Scientific Rockford, США); культуральная среда SP-4 (Teknova, Канада); сахароза, натрия какодилат, натрия цитрат, соли свинца (цитрат, ацетат и нитрат), 4%-ный раствор четырехоксида осмия, 25%-ный раствор глутаральдегида, 16%-ный раствор параформальдегида (EMS, США); трипсин (Gibco-Life Technologies, США); кит для выделения ДНК из агарозного геля (QIAGEN, США); кит для выделения ДНК из клеток и тканей (Roche Applied Sciences, Германия); кит для ПЦР (New England Biolabs, США).

Результаты

Морфологические особенности *Spiroplasma* sp., выделенных из глаз овец, при культивировании в бесклеточных системах. 14-суточные («молодые») культуры изолятов № 296, 301 и 5061 на светооптическом уровне исследования содер-

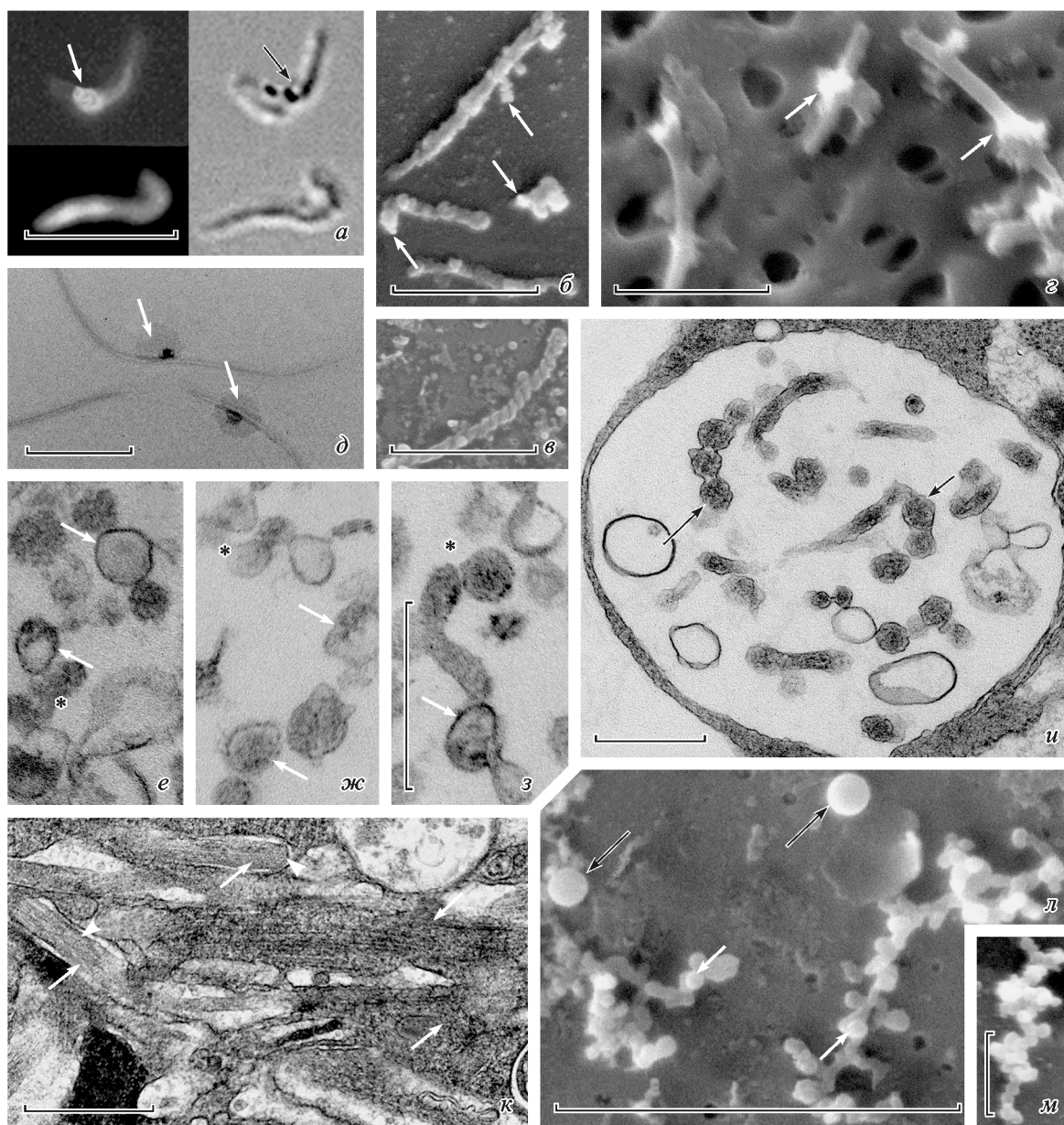


Рис. 1. Морфологические формы *Spiroplasma* sp., изолированных из глаз овец, больных скрапи.

a—з — 14-суточные культуры: *a* — спиральные подвижные формы; утолщение в центре (стрелка) интенсивно окрашено флуоресцентным ядерным красителем Hoechst 33342 (слева), справа — светлое поле; *б* — слегка изогнутые палочковидные формы и сферические элементы (стрелки) на поверхности покровного стекла; *в* — плотноупакованные спиральные формы; *з* — палочковидные структуры с центральным утолщением (стрелки) на поликарбонатном фильтре с порами 0.22 мкм; *д* — тонкие длинные нити с округлыми телами, прикрепленными к центральной части (стрелки); *е—з* — срезы через осадок, полученный при центрифугировании бесклеточных культур трех изолятов *Spiroplasma* sp. (№ 5061 — *е*, № 301 — *ж*, № 296 — *з*); мембранные профили (белые стрелки) соединены друг с другом (звездочка) и соответствуют, вероятно, срезу через одну спиралевидную клетку спироплазмы. *и* — спиралевидные спироплазмы, высвобождающиеся из клеток ВСЕ в культуральную среду (стрелки). *к* — срез через клетку РГБ, содержащую продольно перерезанные микроорганизмы (стрелки), мембраны паразитофорной вакуоли обозначены головками стрелок. *л, м* — 8-недельные культуры: *л* — глобулы диаметром 200—400 нм (черные стрелки), равномерно распределенные по поверхности фильтра, и анастомозирующие структуры, состоящие из сферических образований меньшего диаметра (белые стрелки); *м* — сферические образования, собранные в спиралевидные структуры. *a* — световая микроскопия; *б, в, л, м* — сканирующая электронная микроскопия (СЭМ); *д* — трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ), негативное контрастирование с 2 % ФВК; *и, к* — ТЭМ, тонкие срезы. Масштабные отрезки: *a—г, л* — 5 мкм; *д, м* — 2 мкм; *е—к* — 500 нм.

жали многочисленные тонкие спиралевидные клетки, типичные для представителей рода *Spiroplasma*, длина которых составляла приблизительно 5—7 мкм, ширина — 0.2 мкм. Некоторые клетки имели центральные утолщения, интенсивно окрашиваемые ядерным красителем Hoechst 33342 или DAPI (рис. 1, *a*). При сканирующей электронной микроскопии спироплазмы выглядели как прямые или слегка изогнутые палочки диаметром до 100 нм, часто покрытые гранулярным материалом. Они проходи-

ли через фильтры с размером пор 0.22 мкм и были видны только на покровных стеклах (рис. 1, *б*). На фильтрах и на покровных стеклах периодически наблюдали плотноупакованные спиральные структуры длиной 5—10 мкм и толщиной 0.2—0.3 мкм (рис. 1, *в*), а также палочковидные структуры с центральным утолщением (рис. 1, *з*). 14-суточные культуры, окрашенные ФВК и МА, на ультраструктурном уровне представляли собой скопление длинных тонких нитей (2—10 × 0.08—0.12 мкм) с округ-

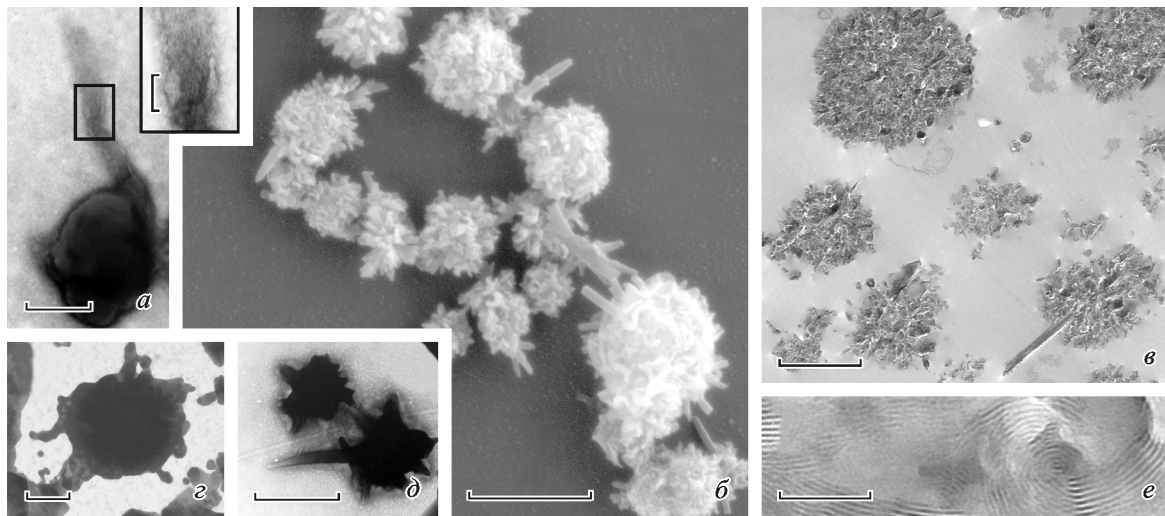


Рис. 2. Необычные морфологические формы, наблюдаемые в 8-недельных бесклеточных культурах спироплазм.

a — структура в форме головастика (tadpole-like form), состоящая из филамента, прикрепленного к электронно-плотному овальному образованию; в правом верхнем углу виден увеличенный участок «хвоста» (выделен прямоугольником) с трехслойной мембраной, ограничивающей центральный электронно-плотный филамент. *б–д* — образования в форме ежей (hedgehog-like structures) — палочковидные структуры, погруженные в кристаллоподобный матрикс. *e* — срез через кристаллоподобный матрикс (решетка из чередующихся полос высокой и низкой электронной плотности). *a, z, д* — ТЭМ, негативное контрастирование 2 % ФВК; *б* — СЭМ; *в, e* — ТЭМ, тонкие срезы. Масштабные отрезки: *a–д* — 500 нм, вставки на *a* и *e* — 100 нм.

лыми структурами («blebs»), прикрепленными к центральной части нити. Практически в каждой округлой структуре наблюдали центральное электронно-плотное утолщение (рис. 1, *д*). На сеточках также наблюдали отдельные округлые структуры и нити без таковых, видимо отсоединенные друг от друга. Тонкие срезы 14-суточных культур, осажженных центрифугированием, содержали мембранные профили, окруженные аморфным материалом (рис. 1, *e–z*). Диаметр мембранных профилей варьировал от 85 до 167 нм. Некоторые профили были связаны между собой и, вероятно, представляли собой срезы через одну клетку спиралевидной формы. Интересно, что удлиненные внутриклеточные фибриллоподобные формы спироплазм, которые мы наблюдали внутри клеток РГБ и в окружающей культуральной среде, имели примерно такой же диаметр (в среднем 100 нм). Внутриклеточные спироплазмы были окружены мембраной паразитофорной вакуоли (рис. 1, *и–к*).

Культуры, растущие в культуральной среде SP4 в течение 8 нед («старые культуры»), содержали заметно меньше спиралевидных клеток. При СЭМ выявляли многочисленные глобулы диаметром 100–400 нм, а также агрегации мелких глобул в переплетающиеся нитевидные (рис. 1, *л*) или спиралевидные (рис. 1, *м*) структуры. При использовании ТЭМ на негативно контрастированных препаратах старых культур часто наблюдали образования, условно названные нами «головастикоподобными» («tadpole-like structures»). Они были образованы филаментами толщиной 100–150 нм, прикрепленными к овальным электронно-плотным структурам (рис. 2, *a*). Наиболее заметным компонентом «старых» культур были образования, состоящие из гладких палочковидных структур диаметром 80–110 нм, окруженные кристаллоподобным матриксом. По форме такое образование напоминает ежа (рис. 2, *б–e*). Кристаллоподобный матрикс по своей структуре был сходен с центральным утолщением палочковидных структур, выделенных из 14-суточных культур (рис. 1, *z*). Размеры таких «ежеподобных» образований варьировали от 1 до 3,7 мкм. На негативно окра-

шенных препаратах эти образования выглядели как разветвленные тела причудливой формы (рис. 2, *z–д*), напоминающие «головастико- и черепахоподобные тела» (tadpole- and tortoise-like bodies), описанные для *S. eriocheir*, бактерии, вызывающей поражения нервной системы (tremor disease) краба *Eriocheir sinensis* (Wang et al., 2004a, 2011). При ТЭМ осадков, полученных из старых культур, и центрального утолщения палочковидных структур из молодых культур кристаллоподобный матрикс выглядел сходным образом и представлял собой решетку чередующихся электронно-плотных и электронно-прозрачных слоев шириной приблизительно 10 нм (рис. 2, *e*).

Результаты филогенетического анализа. Размеры сиквенсов, полученных из бесклеточных культур изолятов 296, 301 и 5061, составляли соответственно 1284, 696 и 699 пар оснований (п. о.). Участок 16S-рДНК длиной 696 п. о. был идентичен во всех трех изолятах и демонстрировал более чем 99%-ное сходство с ортологами *S. syrphidicola* и *S. chrysopicola*. Эволюционные расстояния между видами рассчитывали сначала на основе выравнивания участков 16S-рДНК девяти ортологичных сиквенсов длиной 694 п. о. (668 информативных позиций), среди которых были три новых изолята и пять ближайших сиквенсов из базы данных Genbank, выявленных с помощью программы BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Этот анализ показал отсутствие эволюционной дивергенции (значения параметра дивергенции в матрице было равно 0.0000) между тремя изолятами *Spiroplasma* из овец, *S. syrphidicola* и *S. chrysopicola*. Филогенетический анализ этих сиквенсов с использованием методов «Ближайших соседей» и «Максимального сходства» помещал три новых изолята, *S. syrphidicola* и *S. chrysopicola* в один клад, хорошо поддержанный статистически (рис. 2, *a*). Последующий филогенетический анализ проводили на основании выравнивания последовательностей длиной 1284 п. о. (1251 информативная позиция), соответственно для него использовали только сиквенс № 296, имевший достаточную длину. В данном

Таблица 2

Матрица попарных эволюционных расстояний между видами и изолятами *Spiroplasma* spp.^a

| Виды и изоляты <i>Spiroplasma</i> spp. | То же, что в верхнем горизонтальном ряду | Номера видов и изолятов <i>Spiroplasma</i> spp. | | | | | | | | | | | | |
|--|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|--|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| Изолят № 296 | 1 | — | | | | | | | | | | | | |
| <i>S. syrphidicola</i> | 2 | .0000 | | | | | | | | | | | | |
| <i>S. chrysopicola</i> | 3 | .0000 | .0000 | | | | | | | | | | | |
| <i>Spiroplasma</i> sp. BARC1357 | 4 | .0016 | .0016 | .0016 | | | | | | | | | | |
| <i>Spiroplasma</i> sp. TAAS-1 | 5 | .0008 | .0008 | .0008 | .0008 | | | | | | | | | |
| <i>Spiroplasma</i> sp. BARC2649 | 6 | .0064 | .0064 | .0064 | .0064 | .0056 | | | | | | | | |
| <i>S. citri</i> DQ112019 | 7 | .0304 | .0304 | .0304 | .0320 | .0312 | .0337 | | | | | | | |
| <i>S. citri</i> AM157769 | 8 | .0312 | .0312 | .0312 | .0329 | .0320 | .0345 | .0008 | | | | | | |
| <i>S. apis</i> | 9 | .0970 | .0970 | .0970 | .0970 | .0961 | .0980 | .0999 | .1008 | | | | | |
| <i>S. ixodetis</i> | 10 | .1279 | .1279 | .1279 | .1279 | .1269 | .1309 | .1409 | .1418 | .1313 | | | | |
| <i>S. mirum</i> | 11 | .0336 | .0336 | .0336 | .0353 | .0344 | .0404 | .0387 | .0395 | .0949 | .1258 | | | |
| <i>Mycoplasma hominis</i> | 12 | .2256 | .2256 | .2256 | .2255 | .2245 | .2256 | .2224 | .2234 | .2052 | .2187 | .2116 | — | |

Примечание. ^a Матрица рассчитана с помощью модели «Kimura-2-parameter model of base substitutions».

случае также выявили нулевые попарные эволюционные расстояния между изолятом *Spiroplasma* из овцы, *S. syrphidicola* и *S. chrysopicola*. Низкие значения, близкие к нулевым, разделяли изолят № 296 и виды *Spiroplasma*, заражающие табанид: 0.0008 — изолят № 296 и *Spiroplasma* sp. TAAS-1, 0.0016 — изолят № 296 и *Spiroplasma* sp. BARC-1357, 0.0064 — изолят № 296 и *Spiroplasma* sp. BARC-2649 (табл. 2). На дереве все эти таксоны принадлежали к одной кладе и представляли собой сестринскую группу по отношению к ветви *S. citri*. Внутри клады «*S. syrphidicola*—изолят № 296—*Spiroplasma* sp. TAAS1», изолят № 296 группировался с *S. syrphidicola* и *S. chrysopicola*. Ветвь *S. mirum* занимала базальную позицию по отношению к дихотомии *S. syrphidicola*—*S. citri* (рис. 3, б), что хорошо соответствует описанным ранее филогениям (Gasparich et al., 2004; Heres, Lightner, 2010).

Обсуждение

Несколько авторов описывали ранее полиморфизм *Spiroplasma* spp. и указывали на наличие двух основных форм этих микроорганизмов — спиралевидных филаментов и округлых или сферических тел («blebs» в англоязычной литературе) (Itoh et al., 1989; Wang et al., 2004a; Bastian, 2014). В частности, в жизненном цикле изолята SMCA *S. mirum* присутствуют спиральные формы («филаменты»), мелкие сферические структуры (дериваты этих филаментов) и закрученные спирали, образующиеся из сферических структур. Последние способны в свою очередь распадаться на еще более мелкие сферические формы, которые авторы рассматривали как «наименьшие репродуктивные образования, способные воспроизводить жизненный цикл представителей класса Mollicutes в бесклеточных системах» (Itoh et al., 1989). Анастомозирующие вытянутые структуры, распадающиеся на мелкие сферические образования, аналогичные описанным для внеклеточных культур в настоящей работе, наблюдали также при образовании биопленок несколькими видами

спироплазм, в том числе и *S. syrphidicola* (Bastian et al., 2012). Структуры, состоящие из палочковидных образований, впаянных в кристаллоподобный матрикс, и напоминающие ежей, функционально, возможно, представляют собой приспособления для концентрации генетического материала и его сохранения во внешней среде. Сходные структуры, описанные при использовании негативного контрастирования, были отмечены для *S. erioheir* (Wang et al., 2004a, 2011).

Попарное сравнение эволюционного расстояния между таксонами, рассчитанное на основании сравнения последовательностей 16S-рДНК, демонстрирует минимальный уровень дивергенции между видами, принадлежащими к кладе *Chrysopicola*—*Citri*—*Mirum*; значения параметра дистанции в этой группе колебались от 0.0000 до 0.0336. Наименьшие значения (табл. 2) наблюдали внутри монофилетической группы *Chrysopicola*—*Syrphidicola*—TAAS (соответствующей серотипу VIII), что совпадает с ранее опубликованными результатами (Gasparich et al., 2004; Whitcomb et al., 2007). Изолят № 296 попадает в эту кладу и демонстрирует крайнюю близость с *S. chrysopicola* и *S. syrphidicola*, двумя видами спироплазм, изолированными соответственно из слепней-златоглазиков *Chrysops* sp. (Diptera: Brachicera: Tabanidae: Chrysopsinae) и мух-журчалок *Eristalis arbustorum* (Diptera: Brachicera: Syrphidae). Считается, что филогенетический анализ на основании малой субъединицы рибосомной ДНК не в состоянии разрешить взаимоотношения между таксонами класса Mollicutes в случае, если уровень сходства последовательностей превышает 97% (Whitcomb et al., 2007). Более чем 99%-ное сходство гена малой субъединицы рРНК между таксонами говорит либо об идентичности изолятов, либо о крайне близком родстве. Наиболее простое объяснение такого сходства — это случайное попадание спироплазм, идентичных или близкородственных *S. chrysopicola* и *S. syrphidicola*, в глаза животных. Виды рода *Spiroplasma* — обычные комменсалы слепней, которые регулярно садятся на глаза жвачным животным на пастбищах. Глаза — это извест-

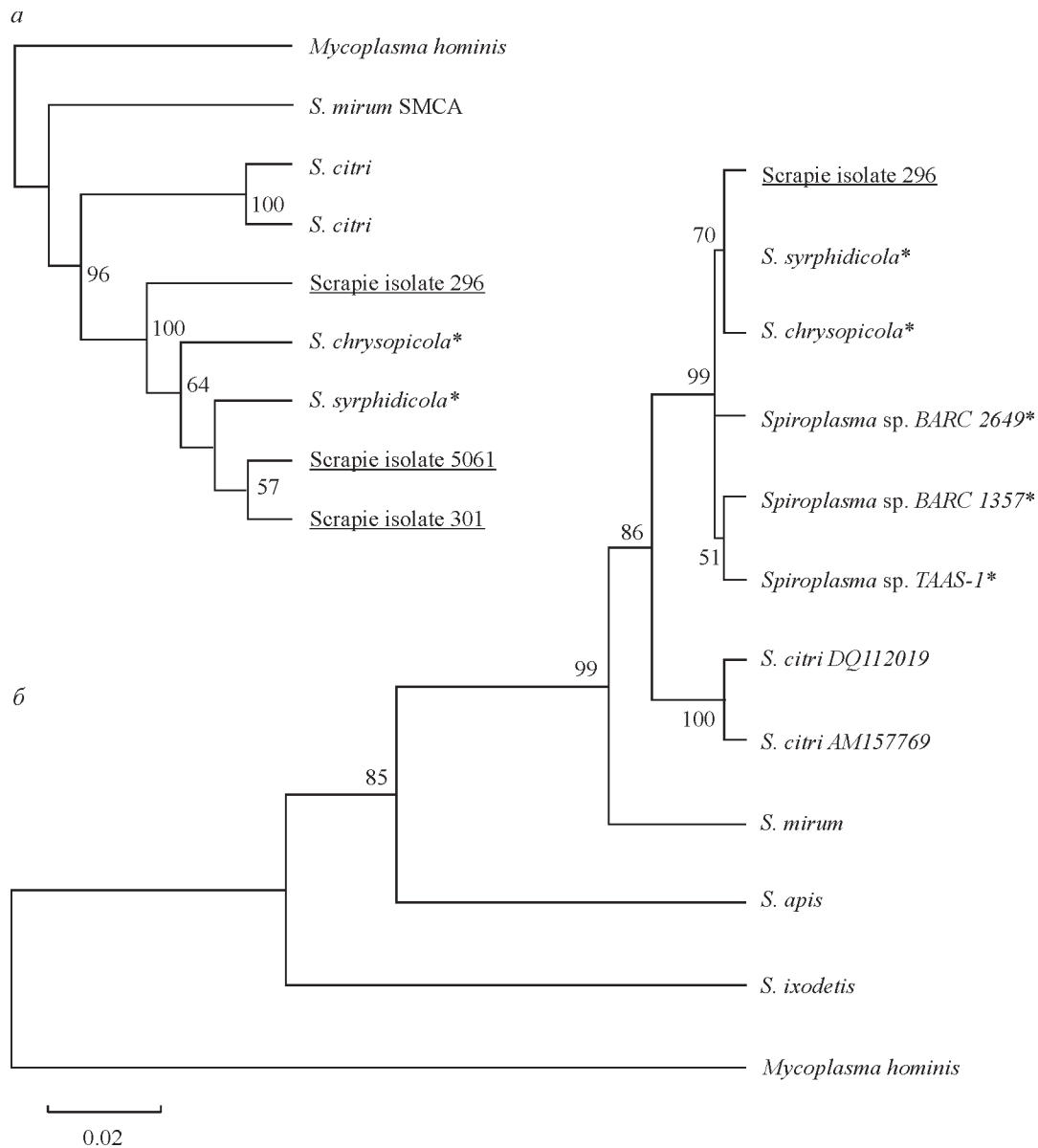


Рис. 3. Филогенетические деревья, построенные на основании сравнения последовательностей гена малой субъединицы рибосомной РНК и демонстрирующие положение изолятов, выделенных из овец, по отношению к другим представителям рода *Spiroplasma*.

a — дерево, построенное с помощью метода «Ближайших соседей» (Neighbor joining algorithm) на базе выравнивания 9 последовательностей длиной в 694 п. о. (668 информативных позиций). Анализировали 3 новых изолята и 5 последовательностей с наибольшей степенью гомологии из Генбанка (определены с помощью программы BLAST). Все 3 изолята из овец, *S. syrphidicola* и *S. chrysopicola* попадают в одну кладу с высокой статистической вероятностью. *б* — эволюционные взаимоотношения между изолятом № 296 и 10 другими видами и изолятами рода *Spiroplasma*, вычисленные на основании выравнивания последовательностей длиной 1284 п. о. (1251 информативная позиция), с помощью метода «Максимального сходства» (Maximum likelihood, ML). Изолят № 296 попадает в одну кладу с *S. syrphidicola*, *S. chrysopicola* и тремя другими *Spiroplasma* spp., симбионтами двукрылых семейства Tabanidae. Длина ветвей ML-дерева пропорциональна эволюционному расстоянию между видами. Значение бутстрапов указаны в узлах дерева. Внешняя группа — *Mycoplasma hominis*. Масштабный отрезок: 0.02 замены. Изоляты из овец больных скрапи *подчеркнуты*; виды, выделенные из слепней, отмечены *звездочкой*.

ная иммунопривилегированная ниша для многих паразитических организмов. В случае овец с терминальным скрапи ослабленный иммунитет препятствовал естественному очищению организма от инфекции. Глаза могли также служить воротами инфекции для заражения мозга и центральной нервной системы, которые также относятся к органам с иммунной привилегией, защищенным от действия антител, в частности благодаря гематоэнцефалическому барьеру. Таким образом, мухи непосредственно заносят спироплазм в глаза животных, по-

добно тому как исследователь инъецирует изолят SMCA *S. mirum*, выделенный из иксодовых клещей, в мозг мышшей (Tully et al., 1977), вызывая этим симптомы ТГЭ. Вопрос о том, может ли заражение спироплазмами быть основной или альтернативной причиной ТГЭ, имеет основательные аргументы «за» (суммированы в: Bastian et al., 2014) и «против» (Alexeeva et al., 2006) и остается, на наш взгляд, открытым.

Принимая во внимание, что жизненный цикл многих спироплазм включает в себя второго хозяина, который

служит вектором для горизонтальной передачи микроорганизмов (Regassa, Gasparich, 2006; Jaenike et al., 2010; DiBlasi et al., 2011; Osaka et al., 2013), можно предположить, что жизненные циклы вымерших или ныне живущих представителей клады *Chrysopicola—Syrphidicola—TAAS* имели (или имеют) облигатную или факультативную стадию жизненного цикла, связанную со жвачными животными. Следует отметить, что ассоциация со жвачными типична для жизненных циклов представителей группы *Mycoplasma mycoides*, относящейся к кладе *Mycoides—Entomoplasmales*, сестринскому таксону по отношению к кладе *Citri—Chrisopicola—Mirum* (Gasparich et al., 2004). Связь спироплазм с Tabanidae, впервые выявленная Кларком (Clark, 1982, 1984), имеет глубокие эволюционные корни и повсеместное распространение (Whitcomb et al., 2007; Regassa et al., 2009). Представители клады *Citri—Chrisopicola—Mirum*, к которой относятся изучаемые изоляты, известны своими сложными жизненными циклами. Например, одни виды группы *Citri* развиваются в специализированных сосущих насекомых — листоблошках (Hemiptera, Cicadellidae), а также во флоэме растений (Clark, 1984; Gasparich, 2010), другие, такие как виды, инфицирующие плодовых мушек рода *Drosophila*, передаются горизонтально с помощью эктопаразитических клещей (Jaenike et al., 2007; Osaka et al., 2013). Для спироплазм, относящихся к группе *Chrysopicola—Syrphidicola—TAAS*, ассоциированных с двукрылыми из семейств Syrphidae и Tabanidae (Gasparich et al., 2004), наличие второго хозяина неизвестно, но не исключено. Анализ ископаемых остатков говорит о том, что древние представители подотряда Brachicera (включающего в себя современных сирфид и табанид) были основными опылителями покрытосеменных растений в позднем триасе (Ren, 1998; Thien et al., 2009). Эволюционные пути Brachicera и растительных спироплазм могли пересечься приблизительно в это время. Тогда предки современных табанид питались пыльцой и нектаром растений, как современные мухи-сирфиды. Гематофагия самок и ассоциация со жвачными животными развились позднее (Ren, 1998; Thien et al., 2009). Можно предположить, что какие-то группы эндосимбиотических спироплазм, развивающихся в двукрылых насекомых, освоили новый путь горизонтальной передачи посредством жвачных животных, после того как их насекомые-хозяева сменили свои пищевые предпочтения с сока растений на гематофагию.

Мы впервые описали необычную морфологию спироплазм, выделенных из глаз овец, больных скрапи, на разных этапах внеклеточного культивирования этих прокариотов. Интерпретация и функциональное объяснение выявленных структур, а также реконструкция жизненного цикла изученных микроорганизмов нуждаются в дополнительных исследованиях с использованием иммуноцитохимических и генетических маркеров.

Выявленная гомология последовательностей гена малой субъединицы рибосомной РНК между новыми изолятами *Spiroplasma* sp., *S. chrysopicola* и *S. syrphidicola* и их расположение на филогенетических деревьях заставляют предположить, что источником изучаемых микроорганизмов, скорее всего, были двукрылые насекомые, контактирующие с овцами на пастбищах. Представители семейства Tabanidae и другие двукрылые хорошо известны как векторы многочисленных патогенов про- и эукариотической природы (Lehane, 2005) и вполне могут играть роль переносчиков возбудителя скрапи у овец вне зависи-

мости от природы заболевания, на что, вероятно, следует обратить внимание ветеринарным службам.

Случайно ли микроорганизмы попали в глаза овец, больных скрапи? Связаны ли эти микроорганизмы с заболеванием в качестве возбудителей, векторов или триггеров? Играют ли двукрылые насекомые роль облигатных или факультативных векторов или резервуаров спироплазм? Эти вопросы, поднятые в нашей скромной, изначально чисто морфологической работе, требуют дальнейших полевых и лабораторных исследований, включающих в себя секвенирование геномов новых изолятов и их сравнение с опубликованными геномами *S. syrphidicola* и *S. chrysopicola* (Ku et al., 2013).

Исследование было выполнено в Центре микроскопии Школы ветеринарной медицины Университета штата Луизиана. Автор выражает глубочайшую благодарность Вильяму Тодду (Dr. William J. Todd, LSU) за культивирование микроорганизмов, дискуссии и активную поддержку на всех стадиях работы, включая редактирование первых вариантов рукописи. Автор также благодарен Лидии Дубицкой (Dr. Lidia Dubitska, LSU) за помощь и советы при выполнении молекулярных исследований.

Культуры изолятов *Spiroplasma* sp. были депозитированы Вильямом Тоддом в коллекцию культур «NIAID Biodefense and Emerging Infections Research Resources Repository» (www.beiresources.org).

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Сельскохозяйственного центра Университета штата Луизиана для Ф. О. Бастиана и В. Дж. Тодда (Drs. F. O. Bastian и W. J. Todd), частного фонда «Margaret Pahl Stewart Foundation» и Грегга Хендерсона (Dr. Gregg Henderson, LSU).

Список литературы

- Alexeeva I., Elliott E. J., Rollins S., Gasparich G. E., Laza, J., Rohwer R. G. 2006. Absence of *Spiroplasma* or other bacterial 16S rRNA genes in brain tissue of hamsters with scrapie. J. Clin. Microbiol. 44 : 91—97.
- Bastian F. O. 2014. The case for involvement of spiroplasma in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies. J. Neuropath. Exp. Neurol. 73 : 104—114.
- Bastian F. O., Boudreaux C. M., Hagius S. D., Bulgin M. S., Sorensen-Melson S. J., Enright F. M., Elzer P. H. 2011. Spiroplasma found in the eyes of scrapie affected sheep. Vet. Ophthalmol. 14 : 10—17.
- Bastian F. O., Elzer P. H., Wu X. 2012. Spiroplasma spp. biofilm formation is instrumental for their role in the pathogenesis of plant, insect and animal diseases. Exp. Mol. Pathol. 93 : 116—128.
- Clark H. F. 1969. Rat cataract induced by suckling mouse cataract agent. Amer. J. Ophthalmol. 68 : 304—307.
- Clark H. F. 1974. Suckling mouse cataract agent (SMCA) — slow mycoplasma-like agent. Prog. Med. Virol. 18 : 307—322.
- Clark T. B. 1982. Spiroplasmas — diversity of arthropod reservoirs and host-parasite relationships. Science. 217 : 57—59.
- Clark T. B. 1984. Diversity of spiroplasma host-parasite relationships. Isr. J. Med. Sci. 20 : 995—997.
- DiBlasi E., Morse S., Mayberry J. R., Avila L. J., Morando M., Dittmar K. 2011. New *Spiroplasma* in parasitic *Leptus* mites and their *Agathemera* walking stick hosts from Argentina. J. Invertebr. Pathol. 107 : 225—228.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucl. Acids Res. 32 : 1792—1797.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution. 39 : 783—791.

- Gasparich G. E. 2010. Spiroplasmas and phytoplasmas: microbes associated with plant hosts. *Biologicals*. 38 : 193—203.
- Gasparich G. E., Whitcomb R. F., Dodge D., French F. E., Glass J., Williamson D. L. 2004. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the *Mycoplasma mycoides* clade. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54 : 893—918.
- Hélias C., Vazeille-Falcoz M., Le Goff F., Abalain-Colloc M. L., Rodhain F., Carle P., Whitcomb R. F., Williamson D. L., Tully J. G., Bové J. M., Chastel C. 1998. *Spiroplasma turonicum* sp. nov. from Haematopota horse flies (Diptera: Tabanidae) in France. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 48 : 457—461.
- Heres A., Lightner D. V. 2010. Phylogenetic analysis of the pathogenic bacteria *Spiroplasma penaei* based on multilocus sequence analysis. *J. Invertebr. Pathol.* 103 : 30—35.
- Itoh K., Pan I. J., Koshimizu K. 1989. A proposed life cycle model of *Spiroplasma mirum* based on scanning electron microscopical observations of growth in liquid culture. *Microbiol. Immunol.* 33 : 821—832.
- Jaenike J., Polak M., Fiskin A., Helou M., Minhas M. 2007. Interspecific transmission of endosymbiotic *Spiroplasma* by mites. *Biol. Lett.* 3 : 23—25.
- Jaenike J., Stahlhut J. K., Boelio L. M., Unckless R. L. 2010. Association between *Wolbachia* and *Spiroplasma* within *Drosophila* neotestacea: an emerging symbiotic mutualism. *Mol. Ecol.* 19 : 414—425.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16 : 111—120.
- Ku C., Lo W.-S., Chen L.-L., Kuo C.-H. 2013. Complete genomes of two dipteran-associated spiroplasmas provided insights into the origin, dynamics, and impacts of viral invasion in *Spiroplasma*. *Genome Biol. Evol.* 5 : 1151—1164.
- Lehane M. 2005. The biology of blood-sucking insects. New York: Cambridge Univ. Press. 321 p.
- Nunan L. M., Lightner D. V., Oduori M. A., Gasparich G. E. 2005. *Spiroplasma penaei* sp. nov., associated with mortalities in *Penaeus vannamei*, Pacific white shrimp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55 : 2317—2322.
- Osaka R., Watada M., Kageyama D., Nomura M. 2013. Detection of *Spiroplasma* from the mite *Macrocheles* sp. (Acari; Macrochelidae) ectoparasitic to the fly *Drosophila hydei* (Diptera; Drosophilidae): a possible route of horizontal transmission? *Symbiosis*. 60 : 79—84.
- Regassa L. B., Gasparich G. E. 2006. Spiroplasmas: evolutionary relationships and biodiversity. *Front. Biosci.* 11 : 2983—3002.
- Regassa L. B., Murphy A. C., Zarzuela A. B., Jandhyam H. L., Bostick D. S., Bates C. R., Gasparich G. E., Whitcomb R. F., French F. E. 2009. An Australian environmental survey reveals moderate *Spiroplasma* biodiversity: characterization of four new serogroups and a continental variant. *Can. J. Microbiol.* 55 : 1347—1354.
- Ren D. 1998. Flower-associated Brachycera flies as fossil evidence for Jurassic angiosperm origins. *Science*. 280 : 85—88.
- Saglio P., Lhospita M., Lafleche D., Dupont G., Bové J. M., Tully J. G., Freundt E. A. 1973. *Spiroplasma citri* gen. and sp. nov. a mycoplasma-like organism associated with stubborn disease of citrus. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 23 : 191—204.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 : 2731—2739.
- Thien L. B., Bernhardt P., Devall M. S., Chen Z.-d., Luo Y.-B., Fan J.-H., Yuan L.-C., Williams J. H. 2009. Pollination biology of basal angiosperms (ANITA grade). *Amer. J. Bot.* 96 : 166—182.
- Tully J. G., Rose D. L., Yunker C. E., Cory J., Whitcomb R. F., Williamson D. L. 1981. Helical mycoplasmas (spiroplasmas) from Ixodes ticks. *Science*. 212 : 1043—1045.
- Tully J. G., Whitcomb R. F., Clark H. F., Williamson D. L. 1977. Pathogenic mycoplasmas: cultivation and vertebrate pathogenicity of a new spiroplasma. *Science*. 195 : 892—894.
- Tully J. G., Whitcomb R. F., Rose D. L., Bové J. M. 1982. *Spiroplasma mirum*, a new species from the rabbit tick (*Haemaphysalis leporispalustris*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32 : 92—100.
- Tully J. G., Whitcomb R. F., Williamson D. L., Clark H. F. 1976. Suckling mouse cataract agent is a helical wall free prokaryote (spiroplasma) pathogenic for vertebrates. *Nature*. 259 : 117—120.
- Wang W., Chen J. X., Du K. H., Xu Z. K. 2004a. Morphology of spiroplasmas in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* associated with tremor disease. *Res. Microbiol.* 155 : 630—635.
- Wang W., Gu W., Gasparich G. E., Bi K., Ou J., Meng Q., Liang T., Feng Q., Zhang J., Zhang Y. 2011. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., associated with mortality in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61 : 703—708.
- Wang W., Wen B. H., Gasparich G. E., Zhu N. N., Rong L. W., Chen J. X., Xu Z. K. 2004b. A spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Microbiol.-Sgm.* 150 : 3035—3040.
- Whitcomb R. F. 2007. Evolution and devolution of minimal standards for descriptions of species of the class Mollicutes: analysis of two *Spiroplasma* descriptions. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 : 201—206.
- Whitcomb R. F., French F. E., Tully J. G., Carle P., Hene-gar R., Hackett K. J., Gasparich G. E., Williamson D. L. 1997. *Spiroplasma* species, groups, and subgroups from north American Tabanidae. *Curr. Microbiol.* 35 : 287—293.
- Whitcomb R. F., Tully J. G., Gasparich G. E., Regassa L. B., Williamson D. L., French F. E. 2007. *Spiroplasma* species in the Costa Rican highlands: implications for biogeography and biodiversity. *Biodiversity and Conservation*. 16 : 3877—3894.
- Williamson D. L., Sakaguchi B., Hackett K. J., Whitcomb R. F., Tully J. G., Carle P., Bové J. M., Adams J. R., Konai M., Hene-gar R. B. 1999. *Spiroplasma poulsonii* sp. nov., a new species associated with male-lethality in *Drosophila willistoni*, a neotropical species of fruit fly. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49 : 611—618.
- Williamson D. L., Tully J. G., Whitcomb R. F. 1989. The genus *Spiroplasma*. In: R. F. Whitcomb, J. G. Tully (Eds.). *The Mycoplasmas*. San Diego, CA: Acad. Press. 71—111.

Поступила 28 III 2016

FINE MORPHOLOGY AND PHYLOGENY OF *SPIROPLASMA* SP. ISOLATED FROM EYES OF SCRAPIE SHEEP

Yu. Ya. Sokolova

School of Veterinary Medicine, Louisiana State University in Baton Rouge, USA, 70803,
and Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, 194064;
e-mail: yysokolova@gmail.com

Spiroplasma sp. isolated from eyes of sheep with terminal scrapie were reported previously to produce intracellular pathology typical for neurodegenerative diseases in experimentally infected cell lines (Bastian et al., 2014). These isolates have not been yet characterized morphologically or genetically. The paper presents light

and electron microscopic description, as well as 16SrDNA sequence data-based phylogenetic analysis of these isolates grown cell-free. The microorganisms were elongated cells of transient helicity up to 10 μm long, and about 100 nm in diameter. Transmission and scanning electron microscopies revealed variable morphology, including presence of helical and non-helical forms. The 16SrDNA from the novel isolates revealed >99.9% similarity to the orthologues from *S. chrysopicola* and *S. syrphidicola*, common commensals of tabanid and syrphid flies. On phylogenetic trees the scrapie sheep isolates fell into the *S. chrysopicola*—*S. syrphidicola*—TAAS group of Diptera-associated species suggesting likely route of infection through flies contacting eyes of sheep in pastures. The question, whether microorganisms occasionally contaminate eyes of sheep with terminal scrapie upon contacts with flies, or spiroplasmas are linked with the disease, and tabanids play a role of their obligate or facultative vectors and reservoirs, warrants further investigation.

Key words: Mollicutes, molecular phylogeny, ultrastructure, Tabanidae, Syrphidae, transmissible spongiform encephalopathy, ruminants.
