

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университетінің 60 жылдығына арналған «Сейфуллин оқулары– 13: дәстүрлерді сақтай отырып, болашақты құру» атты Республикалық ғылыми-теориялық конференциясының материалдары = Материалы Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения – 13: сохраняя традиции, создавая будущее», посвященная 60-летию Казахского агротехнического университета имени С.Сейфуллина. - 2017. - Т.1, Ч.6. - С.161-164

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАРАЗИТОВ СЕМЕЙСТВА *OPISTHORCHIDAE*, ОБИТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ АКМОЛИНСКОЙ ОБЛАСТИ

Сампиева М.Б., Киян В.С.,

К семейству *Opisthorchiidae* относятся паразитические плоские черви – *Opisthorchis felineus*, *Opisthorchis viverrini*, *Clonorchis sinensis* и *Metorchis bilis*, вызывающие такие заболевания, как описторхоз, клонорхоз и меторхоз [1]. На основании имеющихся литературных данных было установлено, что у рыб семейства карповых, отловленных в реках Обь-Иртышского речного бассейна, нередко встречаются метацеркарии не только *O. felineus*, но и других представителей семейства *Opisthorchidae*, в частности – *Metorchis bilis* [2, 3, 4].

Описторхоз и меторхоз – широко распространенные антропозоонозные заболевания человека, плотоядных животных и рыб, обусловленное паразитированием в них различных стадий гельминтов, локализующихся в желчных протоках печени, желчном пузыре и поджелудочной железе, возбудителем которого является *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*. Заражение человека и животных в обоих случаях происходит при употреблении в пищу инвазированной личинками описторхисов и меторхисов рыбы семейства карповых (сазан, карась, язь, елец, чебак, вобла, линь, лещ и др.) [5].

В литературных источниках показано, что инвазии *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* вызывают значительные изменения в гепатобилиарной системе, предрасполагают к развитию панкреатита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, а также способствует развитию холангиокарциномы, рака поджелудочной железы и желудка [6, 7]. Общность биологии и эпидемиологии возбудителей меторхоза и описторхоза определяет сходство клинических проявлений обоих гельминтозов. Жизненный цикл, также, существенных отличий не имеет, и включает трех хозяев: промежуточного (пресноводный жаберный моллюск *Bithynia inflata* или *Bithynia leachi*), затем дополнительного (рыбы семейства карповых) и окончательного – человек, кошки, собаки и др.) [8].

Важным звеном цикла развития как описторхов, так и меторхов является попадание выделенных с фекалиями больных животных и человека яиц гельминта в пресные водоемы, в которых имеются заглатывающие их переднежаберные моллюски рода *Bithynia*. В организме этих промежуточных хозяев из яиц появляются личинки гельминта мирацидии (первая личиночная стадия), которые за 2 месяца проходят несколько стадий развития, включающих размножение, и превращаются в церкарии. Церкарии, имеющие в качестве органа передвижения хвост, выходят в воду и активно внедряются в тело пресноводных карповых рыб. В мышцах этого дополнительного хозяина церкарии превращаются в следующие личинки метацеркарии, покрытые защитной оболочкой [9].

Высокий уровень заболеваемости людей описторхозом, вызываемый трематодами *O. felineus* является важной социальной проблемой населения стран Азии и восточной Европы. Наиболее мощный очаг находится в Западной Сибири (бассейн Оби и Иртыша), к которому относятся реки Северного и Восточного Казахстана. Рассматривая распространение описторхоза на территории Казахстана, необходимо отметить, что наиболее высокие показатели данной инвазии среди людей были зафиксированы в Павлодарской области, Костанайской и Западно-Казахстанской областях, наиболее низкие – в Северо-Казахстанской, Акмолинской и Карагандинской областях [10, 11].

Анализ литературных данных по зараженности людей возбудителем *Metorchis bilis* в Казахстане показал, что имеются лишь упоминания распространения на данной территории вида, но научно-обоснованных данных по видовой идентификации не проводилось [12].

Вышеназванные проблемы в изучении видового разнообразия дигенетических сосальщиков послужили для постановки цели по идентификации возбудителей семейства *Opisthorchiidae* на территории Акмолинской области.

Материалы и методы. В качестве материала исследования нами использовались половозрелые формы возбудителей, полученные путем искусственного заражения собак рыбой, пораженной метацеркариями дигенетических сосальщиков. Выделение ДНК из отдельных марит проводили по стандартному протоколу фенольно-хлороформного метода. Для идентификации экстрагированной ДНК из марит описторхов были использованы праймеры к ядерным областям рибосомных ДНК *ITS1* и *ITS2* и митохондриальным генам *COI* (*COX1*). ПЦР проводили в 50 мкл реакционной смеси состоящей из 10 мкл 5^x буфера, 1 мкл 10 мМ dNTP, 2 мкл праймеров (forward и reverse), 1 мкл Mg⁺⁺, 1 мкл ДНК-полимеразы, 100 мкг изучаемой ДНК и бидистиллированной воды. Условия термоциклирования включали первоначальную денатурацию при 95°C в течение 2 минут, последующие 18 циклов при 95°C в течение 50 сек, 65°C в течение 50 сек и 68°C в течение 7 минут. Завершающие 72°C в течение 5 минут были использованы для синтеза пост-амплификационных скрытых концов. Результаты ПЦР анализировали на 2% агарозном геле.

Результаты исследований. Микроскопический анализ имеющихся марит дигенетических сосальщиков показал наличие двух видов половозрелых особей, выделенных из печени зараженных собак. Морфологическое строение данных видов имеет существенные различия и указывает на отношение их к видам *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* (рисунок 1).



Рисунок 1 – Половозрелые формы дигенетических сосальщиков

Для молекулярно-генетической идентификации нами использовались универсальные праймеры, позволяющие специфически идентифицировать маркерные гены, свойственные данному виду описторхид. Так, нами были использованы праймеры для ядерных областей рибосомных ДНК *ITS1* и *ITS2* (*internal transcribed spacer sequences*) и *cox1* взаимодействующий с консервативной областью митохондриальной субъединицы цитохрома С оксидазы 1 (*mitochondrial cytochrome c oxidase I, COI*). Данные участки используются для решения филогенетических вопросов в близкородственных видах, и являющиеся маркерами в таксономических исследованиях дигенетических сосальщиков [13]. Для более точной идентификации *O. felineus*, нами использовались праймеры, предложенные для дифференциальной диагностики различных видов дигенетических сосальщиков. Праймеры OF и MB предложенные Pauly A. с соавторами, основаны на способности амплифицировать участки ДНК митохондриального гена *COI* размером 201 и 116 п.н. соответственно, и позволяют со 100% специфичностью идентифицировать *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* [14].

Таким образом, в результате проведенных исследований, нам удалось идентифицировать два возбудителя семейства *Opisthorchiidae* - *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*, последний из которых вызывает заболевание миторхоз и до недавнего времени не был идентифицирован на территории изучаемого района.

Список литературы

1. Сурков А.А., Денисова Н.П. Описторхиды (сем. *Opisthorchiidae*) в промежуточных хозяевах, обитающих в р. Сож // Молодой ученый – 2014 – №8 – С. 331-333.
2. Sripa B., Nawa Y., Sithithaworn P., Andrews R., Brindley P.J. Discovery of human opisthorchiasis: a mysterious history. *Parasitol. Int.* Elsevier Ireland Ltd. – 2012. – №61.– С. 3-4.

3. Беэр С.А. Закономерности и механизмы регуляции взаимоотношений трематод и моллюсков/С.А. Беэр, С.М. Герман //Актуальные проблемы общей паразитологии / Под ред. С. А. Беэр. М.: Наука, 2000. – С. 5-33.
4. Бронштейн А.М. Анализ 4-х схем лечения празиквантелом лиц инвазированных *Opisthorchis felinus* в условиях, исключающих реинвазию / А.М. Бронштейн, Н.Н. Озерецковская, Е.Я. Пантелеева // Мед. паразитол. и паразитар. болезни. – 1988. – №5. – С. 19-23.
5. Sripa B., Kaewkes S., Sithithaworn P. et al. Liver Fluke Induces Cholangio carcinoma // PLoS Medicine. – 2007. – Vol. 4. – P. 1148-1155.
6. King S., Scholz T. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview // The Korean journal of parasitology. – 2001. – Vol. 39. – № 3. – С. 209-221
7. Мартынова Н.А., Одинцова И.Н. Рак печени в регионе Сибири и Дальнего Востока // Сибирский онкологический журнал. – 2003. – Вып. 2. – С. 77-78.
8. Алшинбаева Г.У., Имамбаева Г.Г. Гельминтозы: учебное пособие. – Астана, 2009. – С. 5-15.
9. Sauer H. Enzyme immunoassay of the level of parasite-specific IgE antibodies in Schistosomiasis using the monoclonal antibody BL-IgEG/H. Sauer // Allerg. Immunol. – 1990. – Vol. 36, №1. – P.37-45.
10. Пазюк Е.А., Маянский А.Н. НСТ-тест в клинике инфекционно-аллергических заболеваний/Е.А. Пазюк, А.Н. Маянский //Тер. архив. 1981. - №11. - С.88-91.
11. Epstein-Barr virus-specific antibodies in Epstein-Barr virus-positive and -negative gastric carcinoma cases in Japan/R. Shinkura, N. Yamamoto, C. Koriyama et al.//J. Med. Virol. 2000. - Vol.60, №4. - P.411-416.
12. Катохин А.В., Бруснецов И.И., Мордвинов В.А. и др. Перспективы использования молекулярно-генетических методов исследований в диагностике описторхозных инвазий // Ветеринарная медицина. – 2010. – №94. – С. 273-274.
13. Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Brusentsova I.V., Shekhovtsov S.V., Borovikov S.N., Goncharenko G.G., Lider L.A. et al. Low genetic diversity in widespread Eurasian liver fluke *Opisthorchis felinus* suggests special demographichistory of this trematode species // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(4). – P. 62453.
14. Pauly A., Schuster R., Steuber S. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction // Parasitol. Res. – 2003. – Vol. 90(5). – P. 409-414.