

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.166-168

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МЕТАЦЕРКАРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РЫБ

*Уахит Р.С.,
Смагулова А.М., Киян В.С.*

Паразитологическая ситуация в водоеме является составной частью его экологического состояния. Вследствие двойственности среды обитания (внешняя среда и организм хозяина) паразиты представляют собой естественную составную часть биоценоза водоема и его видового разнообразия, формируя особый структурный уровень экосистем. Кроме того, паразитарный фактор – один из существенных, определяющих численность видов хозяев, и через нее влияющий на структуру и функционирование экосистем [1].

К основным паразитам, циркулирующим в водоемах Акмолинской области, относятся дигенетические сосальщики. В теле рыбы церкарии локализуются в чешуе, жабрах, плавниках, мышцах, где инцистируются и превращаются в метацеркарий. Развитие церкарий в организме рыбы протекает при температуре не ниже 19°C [2].

Ранее проведенные нами исследования по идентификации метацеркарий стандартными паразитологическими методами показали, что рыба в значительной степени заражена метацеркариями, опасных для человека и животных, с весьма значительным уровнем интенсивности инвазии [3]. Наиболее инвазированной по результатам исследований является рыба семейства карповые – язь.

Язь – пресноводная рыба, которая обитает в реках, проточных озёрах и речных прудах. Данные рыбы всеядные – питаются растительной и животной пищей, в том числе насекомыми, особенно их личинками, моллюсками, червями, которые являются одним из промежуточных хозяев многих дигенетических сосальщиков [4]. Язь обыкновенный распространен в пределах Казахстана и водится в бассейнах рек Иртыш и Урал, в озерах и реках Северного Казахстана [5]. Инвазированность карповых рыб личинками описторхид зависит от площади и степени рекреационного использования водоема. Данный показатель довольно высок в водоемах Акмолинской области и служит основным очагом заражения плотоядных животных и людей близлежащих поселков и городов.

На данное время изучение рыбы на наличие дигенетических сосальщиков проводится с помощью стандартного паразитологического метода – компрессионное исследование мышечной ткани. Данный метод является самым практичным и экономически выгодным, но не позволяет достоверно идентифицировать видовую и родовую специфичность метацеркарий, паразитирующих в рыбе.

Для решения обозначенной проблемы нами была поставлена цель – провести молекулярно-генетическую идентификацию метацеркарий, выделенных из рыбы

семейства карповые. В качестве материала исследования была отловлена рыба язь из озера Шолак Коргалджинского района Акмолинской области.

Для обнаружения метацеркарий применялся метод компрессирования мышечной ткани рыб с последующим просмотром и подсчетом личинок паразита в 1 г. мышц под микроскопом. Навеска подкожного слоя мышц бралась с середины тела рыбы под спинным плавником, где локализуются обычно до 32% всех личинок [6]. Выделение метацеркарий проводили путем переваривания мышечной ткани путем смешивания с искусственным желудочным соком в соотношении 1:10 (11мл концентрированной соляной кислоты, 7 г пепсина, 9 г поваренной соли на 1 л дистиллированной воды) в течение 30 мин при 37°C, что позволяет освободить личинки метацеркарий из мышц.

Далее, полученную смесь из переваренной мышечной ткани просматривали под микроскопом и выделили личинки. Из множества найденных метацеркарий были выделены три основные группы, отличающиеся между собой строением и характером движения личинки внутри цисты (рисунок 1).

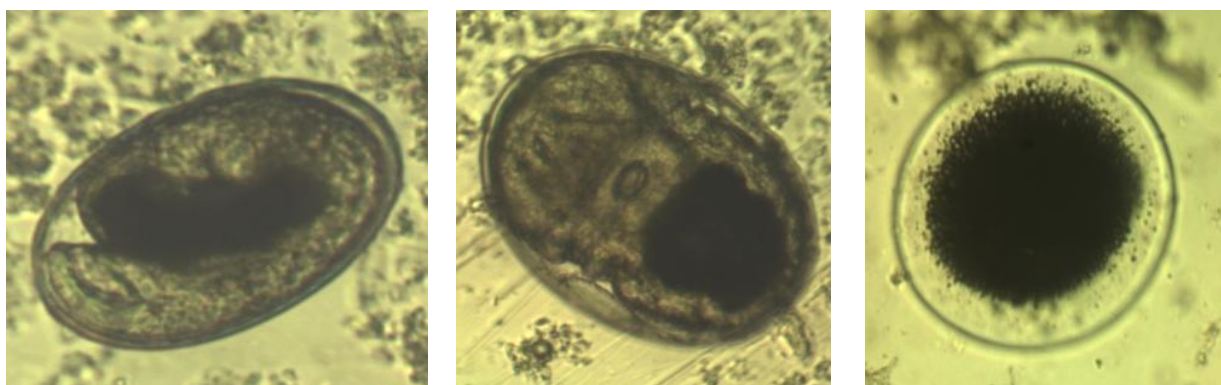


Рисунок 1 – Виды метацеркарий, выделенные из мышечной ткани рыбы

Было собрано более 80 штук различных метацеркарий, которые в дальнейшем подвергли детальному молекулярно-генетическому анализу. Для этого на первом этапе были выделены ДНК из собранных метацеркарий и проведен ПЦР анализ. Для проведения ПЦР анализа нами были использованы видоспецифические праймеры ITS1F и ITS1R. Постановку реакции проводили по общепринятой схеме с небольшими модификациями. В результате был получен ПЦР продукт, который анализировался с помощью 1% агарозного электрофореза, данные которого приведены на рисунке 2.

М 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
18

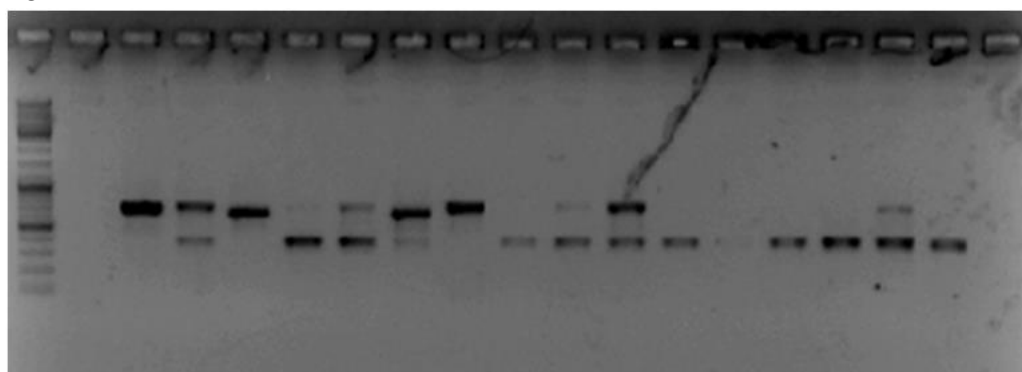


Рисунок 2 – Результаты постановки ПЦР в электрофорезном геле: М – маркер, 1-18 – изучаемые образцы, выделенные из различных метацеркарий

ПЦР продукты выделяли из геля с помощью коммерческих наборов «QIAEX II Gel Extraction Kit» («ИнтерЛабСервис», РФ) и в дальнейшем использовали для секвенирования полученных фрагментов ДНК. Для этого проводили ПЦР с очищенными фрагментами ДНК используя праймер ITS1F и фермент BigDye, после чего загружали в секвенатор для расшифровки последовательностей ДНК.

В результате проведенной работы по видовой идентификации метацеркарий с помощью молекулярно-генетических методов нам удалось доказать, что все изученные метацеркарии принадлежат к 4 видам паразитов: *Opisthorchis felineus*, *Metorchis bills*, *Metorchis xanthosoma*, *Holostephanus dubinini*.

Список литературы

1. Сидоров Е.Г. Паразиты промысловых рыб Казахстана // Справочник. – Алматы: «Бастау». – 2008. – С. 100.
2. Малая медицинская энциклопедия. – М.: Медицинская энциклопедия. – 1996.
3. Киян В.С., Булашев А.К., Токпан С.С., Байболин Ж.К., Алёшина А. Изучение описторхозной инфекции в Акмолинской области // Вестник ЕНУ им. Л.Н. Гумилева. Серия Биология. – Астана, 2015. – №6 (109). – С. 134-142.
4. Чебышева Н.В. Медицинская паразитология: учебное пособие – М.: Медицина, – 2012. – С. 304.
5. M. Scholten, C. Wirtz, E. Fladung, R. Thiel: The modular habitat model (МНМ) for the ide, *Leuciscus idus* (L.) - a new method to predict the suitability of inshore habitats for fish // USA. Journal of Applied Ichthyology. Vol. 19, Issue 5 October 2003. – Pag. 315-329.
6. Сабанеев Л.П. Жизнь и ловля пресноводных рыб // Харьков: Прогресс, ЛТД. – 1993. – С. 433-480.
7. Размашкин Д.А. Болезни и паразиты рыб водоемов Западной Сибири // Сборник научных трудов. – Л., 1979. – Вып. 226.– С. 65-66.