

«Сейфуллин окулары-14: Жастар, ғылым, инновациялар: цифрландыру – жаңа даму кезеңі» атты Республикалық ғылыми-теориялық = **Материалы** Республиканской научно-теоретической конференции «Сейфуллинские чтения-14: Молодежь, наука, инновации: цифровизация – новый этап развития». - 2018. –Т.І, Ч.2. - С. 325-329.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ *METORCHIS BILIS*

Акимжанова А.М., магистрант;
Башимов К., магистрант;
Киян В.С., PhD

Трематоды, или дигенетические сосальщики (лат. *Digenea*) – это один из семи классов плоских червей. Также их выделяют, как одну из трех основных групп глистов, на ряду с нематодами и цестодами. В настоящее время описано приблизительно 6000 видов [1].

Трематоды семейства *Opisthorchiidae* являются возбудителями серьезных заболеваний во всем мире, с клинической патологией, связанных, главным образом, с хронической инфекцией. Они вызывают холедохолитиаз, восходящий холангит, панкреатит и холангиокарцинома печени из-за раздражения протока и последующей иммунной реакции хозяина [2]. Регулярное медицинское и паразитологическое обследование пострадавших пациентов обычно не позволяет различать описторхоз и меторхоз, и, таким образом, обычный диагноз «описторхоз» предполагалось включить патологию, вызванную заражением любым из видов *Opisthorchiidae*, часто примером таких случаев является постановка диагноза в России [3-6]. Принимая во внимание, что инфекции, вызванные *Clonorchis* и *Opisthorchis* spp. были широко изучено, имеется неполное понимание эпидемиологии, таксономии и патологии инфекций, вызванных паразитом вида *Metorchis*.

Одним из видов семейства *Opisthorchiidae* является *Metorchis bilis*. Взрослые черви *M. bilis* представляют собой средние трематоды листовидной формы, которого длина тела 1,75-3,75 мм, ширина составляет 1,0-1,5 мм (рисунок 1) [7-8].

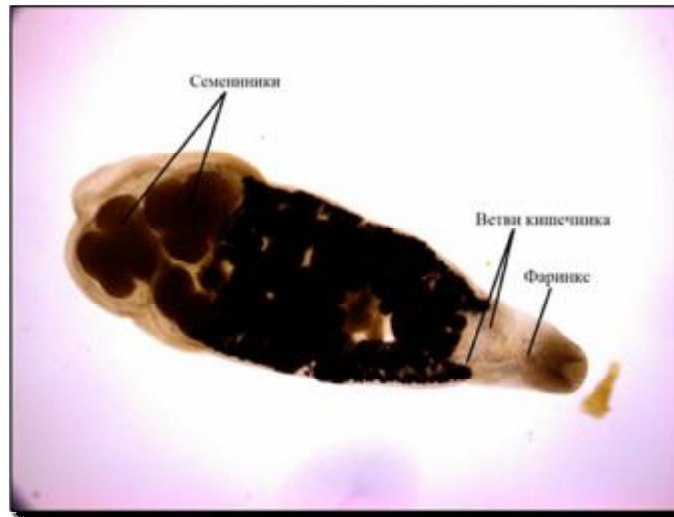


Рисунок 1 – Половозрелая форма *M. bilis*

M. bilis является зоонотическим паразитом, который имеет сложный жизненный цикл. Промежуточными хозяевами возбудителя *M. bilis* являются моллюски *Codiella inflata*, *Bithynia tentaculata* и, возможно, *Codiella troscheli* [1]. Дополнительными хозяевами *M. bilis* являются виды рыб семейства карповых, из которых доминируют язь, плотва, елец, линь, голянь, пескарь и др. *M. bilis* в основном локализованы в желчном протоке окончательного хозяина и является обычным паразитом прежде всего хищных птиц, обитающих вблизи водоемов, а также хищных млекопитающих, реже встречается у гусеобразных и веслоногих [9].

С развитием технологий секвенирования следующего поколения и биоинформационных методов [10], исследований способны эффективно упорядочить транскриптомы новых организмов, который обеспечивает эффективный инструмент для обнаружения генов, генома аннотации, идентификации лекарственных средств и разработке вакцин [11-12]. Хотя многие транскриптомы трематод были секвенированы [13-14], нет достаточной информации о нуклеотидной последовательности *Metorchis spp.* (молекулярные исследования метаболической регуляции, трансдукции сигнала, и иммунный ответ *Metorchis spp.* все еще недостаточно изучен).

Kang et al. секвенировал *ITS1* одного экземпляра из *Metorchis* (называемый *bilis*) из Испания [15]. *Ai et al.* секвенировал локус *ITS* и митохондриальный *CO1* и *ND1* локусов из изолятов метацеркарий *M. orientalis* из Китая [16]. Шеховцов и др. произвели частичное секвенирование гена парамозина *M. xanthosomus* и двух дополнительных образцов *Metorchis*, которые были неопознанными по видам [17]. Несколько других неопубликованных последовательностей ДНК доступны в базе данных *NCBI GenBank*, включающие недавно выпущенную полную митохондриальную последовательность генома *M. orientalis* (*NCBI GenBank* в соотв. № KT239342). Несмотря на все эти работы, проблема в изученности генетической составляющей данного паразита остается открытой.

Поэтому, нами была поставлена цель, провести молекулярно-генетическую идентификацию мариит, выделенных от зараженных животных найденных на территории Акмолинской области. Для этого из отобранных описторхов была выделена ДНК с целью использования в реакции ПЦР. Выделение ДНК проводили по методу, описанному *Boom R.* с соавторами [18].

Для 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 [19].

Для более точной идентификации *M. bilis*, 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 *O. felineus* и *M. bilis* [20].

Для исключения *O. viverrini* нами была использована пара праймер (*Trem24-F* и *OV25-4R*), предложенная *Parvathi A.* с соавторами и разработавшими на ее основе дифференциальную диагностику методом ПЦР. Данные праймеры позволяют амплифицировать участок ДНК длиной 229 п.н. [21].

Для молекулярно-филогенетического анализа использовали пять образцов ДНК, выделенные от взрослых *M. bilis*. ПЦР проводили при необходимых условиях в течение 35 циклов. Продукты ПЦР разделяли 1,5% агарозным электрофорезом (рисунок 2). Праймерные пары *ITS1* и *ITS2* позволили амплифицировать фрагменты размером 664 п.н. и 525 пар оснований. Использование праймера *cox1* не дал результатов, как и при амплификации ДНК *M. bilis* по парам праймеров *OF* и *MB*. Пара праймеров *OV*, используемых в качестве контроля вместе с шаблоном ДНК, и ddH₂O (контрольный - без шаблона), отображали отрицательные результаты (как показано на рисунке 2).

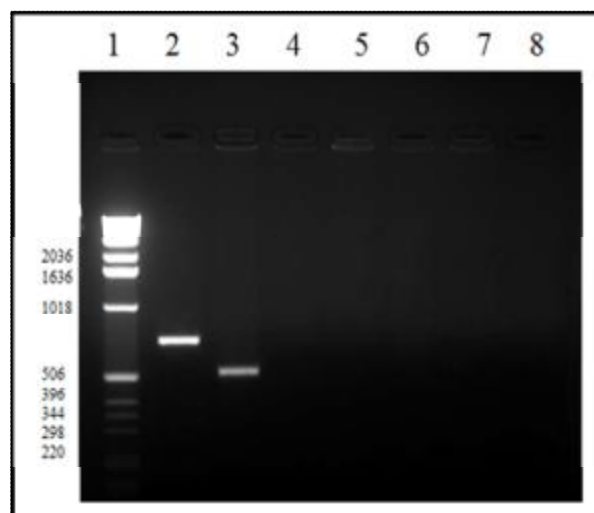


Рисунок 2 – ПЦР-продукты основе ДНК *M. bilis*. 1 – маркер; 8 – отрицательный-контроль; 2-7 – праймеры *ITS1*, *ITS2*, *cox1*, *OF*, *MB* и *OV* соответственно

В нашем исследовании использовались ранее описанные праймеры *ITS1*, *ITS2* и *cox1* для идентификации видов. Авторы, разработавшие эти праймеры, подчеркнули свою высокую специфичность для идентификации видов *O. felineus* и *M. bilis*. Фрагменты ДНК взрослых трематод, амплифицированные с помощью праймеров *ITS1* и *ITS2*, методом секвенирования подтвердили видовую специфичность выделенных нами парит *M. bilis*.

Кроме этого, следует отметить, что мы не смогли амплифицировать фрагменты ДНК *M. bilis* не только с использованием праймеров *cox 1*, но и с помощью праймеров *MB*, конструкция которых была основана на последовательности гена *M. bilis*. Неспособность амплифицировать фрагменты ДНК *M. bilis* с использованием упомянутых праймеров требует детального изучения.

Список литературы

1. Olson P. D., Cribb T. H., Tkach V. V., Bray R. A. & Littlewood D. T. J. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda) // International Journal for Parasitology. – Vol. 33(7). – P. 733–755.
2. MacLean J.D., Arthur J.R., Ward B.J., Gyorkos T.W., Curtis M.A., Kokoskin E., Common source outbreak of acute infection due to the North American liver fluke *Metorchis conjunctus*. – 1996. – P. 154–158.
3. Skrjabin K.I., Petrov A.M. Superfamily Opisthorchoidea Faust.// Essentials of Trematodology. – Moscow: Nauka. – 1950. – P. 81–328 (in Russian).
4. Sidorov E.G., Natural foci of opisthorchiasis. – Alma-Ata: NaukaKaz SSR, 1983 (in Russian).
5. Romashov B.V., Romashov V.A., Semenov V.A., Filimonova L.V. Opisthorchiasis in the Upper Don Basin (Voronezh Oblast): the liver fluke fauna,

ecological and biological patterns of circulation and foci of Opisthorchiasis, Voronezh State University. – Voronezh, 2005 (in Russian).

6. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V., *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. // *Parasitol. Int.* – 2012. – Vol.61. P. 25–31.

7. Romashov B.V., Romashov V.A., Semenov V.A., Filimonova L.V. *Opisthorchiasis in the Upper Don Basin (Voronezh Oblast): the liver fluke fauna, ecological and biological patterns of circulation and foci of Opisthorchiasis.* – Voronezh: Voronezh State University, 2005. [in Russian].

8. Erhardt A., Germer W.D., Hoerning B. *Die Opisthorchiasis, hervorgerufen durch den Katzenleberegel Opisthorchis felinus (Riv.).* – Jena: Veb Gustav Fischer Verlag, 1962

9. Schuster R.K., Heidrich J., Pauly A., Nöckler K., Liver flukes in dogs and treatment with praziquantel. // *Vet. Parasitol.* – 2007. – Vol.150. – P. 362–365.

10. Mangiola S., Young N.D., Korhonen P., Mondal A., Scheerlinck J.P., Sternberg P.W., Cantacessi C., Hall R.S., Jex A.R., Gasser R.B. Getting the most out of parasitic helminth transcriptomes using HelmDB: implications for biology and biotechnology. // *Biotechnol. Adv.* – 2013. – Vol.31. – P. 1109–1119.

11. Ranganathan S., Menon R., Gasser R.B. Advanced in silico analysis of expressed sequence tag (EST) data for parasitic nematodes of major socioeconomic importance fundamental insights toward biotechnological outcomes. // *Biotechnol. Adv.* – 2009. – Vol. 27 (4). – P.439–448.

12. Nagaraj S.H., Gasser R.B., Ranganathan S. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. // *Brief. Bioinform.* – 2007. – Vol. 8. P. 6–21.

13. Young N.D., Jex A.R., Cantacessi C., Hall R.S., Campbell B.E., Spithill T.W., Tangkawattana S., Tangkawattana P., Laha T., Gasser R.B. A portrait of the transcriptome of the neglected trematode, *Fasciola gigantica* biological and biotechnological implications. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2011. – Vol.5. – P. 1004.

14. Pomaznoy M.Y., Logacheva M.D., Young N.D., Penin A.A., Ershov N.I., Katokhin A.V., Mordvinov V.A. Whole transcriptome profiling of adult and infective stages of the trematode *Opisthorchis felinus*. // *Parasitol. Int.* – 2015. – Vol.65. – P.12-19.

15. Kang S., Sultana T., Loktev V.B., Wongratanacheewin S., Sohn W.-M., Eom K.S., Park J.-K. Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchid liver fluke species (*Opisthorchiidae*: Trematoda). // *Parasitol. Int.* – 2008. – Vol.57. – P.191–197.

16. Ai L., Chen S.H., Zhang Y.N., Zhou X.N., Li H., Chen M.X., Guo J., Cai Y.C., Zhu X.Q., Chen J.X. Sequences of internal transcribed spacers and two mitochondrial genes: effective genetic markers for *Metorchis orientalis*. // *Anim. Vet. Adv.* – 2010. – Vol. 9. – P. 2371–2376.

17. Shekhovtsov S.V., Katokhin A.V., Romanov K.V., Besprozvannykh V.V., Fedorov K.P., Yurlova N.I., Serbina E.A., Sithithaworn P., Kolchanov N.A., Mordvinov V.A. A novel nuclear marker, Pm-int9, for phylogenetic studies of

Opisthorchis felineus, *Opisthorchis viverrini*, and *Clonorchis sinensis* (Opisthorchiidae, Trematoda). // Parasitol. Res. – 2009. – Vol.106. – P. 293–297.

18. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and Simple Method for Purification of Nucleic Acids // Journal of clinical microbiology. – 1990. – Vol. 28(3) – P. 495–503.

19. 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 wide-spread Eurasian liver fluke *Opisthorchis felineus* suggests special demographichistory of this trematode species // PLoS One. – 2013. – Vol. 8(4). – P. 62453.

20. Pauly A., Schuster R., Steuber S. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction // Parasitol. Res. – 2003. – Vol. 90(5). – P. 409–414.

21. Parvathi A., Umesha K.R., Kumar S., Sithithaworn P., Karunasagar I., Karunasagar I. Development and evaluation of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the detection of *Opisthorchis viverrini* in fish // Acta Trop. – 2008. – Vol. 107(1). – P. 13–16.