

АННОТАЦИЯ

на диссертационную работу Бекеновой Айганым Бекайдаровны на тему: «Молекулярно-генетическая дифференциальная диагностика описторхоза и меторхоза» на соискание степени доктора философии PhD по образовательной программе 8D09102 – «Санитарно-экологическая безопасность продуктов животноводства»

Актуальность темы. Инвазионные заболевания, вызываемые представителями семейства *Opisthorchiidae*, занимают 8 место по распространению среди всех паразитов, проникающих через пищу. Наиболее распространенными представителями описторхид являются *Opisthorchis felineus* (*O. felineus*), *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis viverrini* и *Metorchis spp.* Личиночные стадии *O. felineus* и *Metorchis bilis* (*M. bilis*) обладают схожей морфологией и практически одинаковым жизненным циклом, однако на стадии развития мариты они локализуются в разных органах дефинитивного хозяина и вызывают различные паразитарные заболевания, например, *O. felineus* паразитирует во внутрипеченочных желчных протоках и вызывает описторхоз, тогда как *M. bilis* локализуется преимущественно в желчном пузыре и вызывает меторхоз, который характеризуется меньшей патогенностью для хозяйского организма.

В нашей стране диагноз «описторхоз» устанавливается независимо от видовой принадлежности возбудителя из семейства *Opisthorchiidae*, которым инфицировано животное или человек. Клиническая диагностика описторхоза затруднена вследствие отсутствия специфических симптомов и синдромов, характерных исключительно для данного заболевания. Для точной диагностики, качественной и количественной оценки заболевания необходим комплексный подход с использованием различных методов. Клинические проявления описторхоза многообразны и зависят как от длительности и интенсивности инвазии, так и от индивидуальных особенностей организма.

В ветеринарной и медицинской практике при постановке диагноза описторхоза традиционно используют копроовоскопические исследования и дуоденальное зондирование. Указанные методы основаны на микроскопическом выявлении яиц возбудителя в биологическом материале. Вместе с тем цикличность яйцеобразования гельминтов, а также неравномерное распределение яиц в содержимом кишечника, зачастую обуславливает получению ложноотрицательных результатов.

В качестве дополнительного метода диагностики описторхоза применяют иммунодиагностику. Однако данный метод имеет высокую диагностическую ценность только при острой форме описторхоза, тогда как при хроническом описторхозе иммунный ответ к описторхидам проявляется только в 75% случаев заражения. Также антигенное сходство описторха и меторха приводит к ложноположительному результату по диагнозу «описторхоз» при микст-инвазии.

Окончательный хозяин заболевает описторхозом/меторхозом при поедании сырой или недостаточно приготовленной рыбы, содержащей личинки-метацеркарии. Исследование рыб на наличие возбудителей описторхоза происходит путем микроскопирования спинных мышц карповых рыб. Данный метод является трудоемким и требует высокой квалификации специалиста. Также дифференциация личинок возбудителей *O. felineus* и *M. bilis* вызывает затруднения из-за схожести морфологических признаков.

Использование молекулярно-генетических методов для диагностики и дифференциации описторхид могут решить данную проблему. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет определить *O. felineus* и *M. bilis* на любой стадии жизненного цикла (яйцо, мирацидий, метацеркария, марита). Разработка высокочувствительных и специфических ПЦР-тестов для идентификации описторхид является важной актуальной проблемой с большим ветеринарным и медицинским значением. В свою очередь, использование ДНК казахстанских изолятов при разработке ПЦР-теста для дифференциации описторхид позволит повысить специфичность и чувствительность разработанного метода.

Цель исследований: Разработать молекулярно-генетический метод для детекции и дифференциации трематод семейства *Opisthorchiidae*.

Для достижения поставленной цели были определены следующие научные задачи:

- проведение ветеринарно-санитарной экспертизы рыбы на наличие возбудителей трематод семейства *Opisthorchiidae*;
- выделение метацеркарий трематод семейства *Opisthorchiidae* для получения ДНК возбудителей;
- проведение ПЦР-анализа, секвенирования и биоинформатического анализа генетических маркеров трематод семейства *Opisthorchiidae*;
- дизайн и синтез праймеров для выявления и дифференциальной идентификации возбудителей;
- определение оптимальных условий, определение чувствительности и специфичности ПЦР-анализа для идентификации и дифференциальной диагностики *O. felineus* и *M. bilis*;
- разработка научно-технической документации для разработки и применения ПЦР-теста в лабораторной практике.

Материалы исследования. Исследование проводилось в 2018-2020 годах в рамках научного проекта «ПЦР-тест для детекции и дифференциальной диагностики возбудителей описторхоза и меторхоза» (AP05131132) и в 2024-2026 годах в рамках бюджетной программы «Повышение уровня безопасности пищевых продуктов» (BR22885795).

Исследование выполнялись в Научно-исследовательской платформе сельскохозяйственной биотехнологии НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина».

Методы исследования. В работе применён комплекс паразитологических, молекулярно-генетических и статистических методов.

Для проведения паразитологического исследования рыбы на наличие возбудителей описторхоза и меторхоза в мышцах рыбы был применен компрессорный метод.

ДНК из метацеркарий была выделена фенол-хлороформным методом, с предварительной обработкой исследуемых образцов экстрагирующим буфером и *Proteinase K*. Амплификацию экстрагированной ДНК из метацеркарий возбудителей семейства *Opisthorchiidae* проводили в реакционной смеси объемом 25 μ l. ПЦР продукты очищали от остатков олигонуклеотидов методом дефосфолирования с помощью щелочной фосфатазы *SAP* (*shrimp alkaline phosphatase*) и эндонуклеазы. Секвенирование ПЦР-продуктов проводили методом Сэнгера с применением набора *BigDye Terminator* (*Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, США*) в соответствии с инструкциями производителя. Полученные продукты секвенирования анализировали на генетическом анализаторе *ABI 3130XL* (*Applied Biosystems, США*), а обработка и редактирование хроматограмм выполнялись с помощью программного обеспечения *Sequencing Analysis 5.2, Patch 2* (*Applied Biosystems, США*). После секвенирования продукты очищали ацетатно-спиртовой смесью. Выравнивание полученных нуклеотидных последовательностей осуществлялась с помощью программы онлайн-ресурса *Nucleotide Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Дизайн праймера и картирование праймеров проводили на программном обеспечении *Ultra Edit 32*. Конвертирование специфического праймера *Reverse* проводили в программном обеспечении *SeqState*. Анализ появления гомо- и гетеродимеров, содержания GC и оптимальную температуру отжига проверяли через программное обеспечение *Oligo Analyzer*.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием методов вариационной статистики. Экстенсивность инвазии выражали в процентах как отношение числа зараженных рыб к общему числу исследованных особей. Для оценки достоверности различий между категориальными признаками использовали критерии χ^2 Пирсона.

Объект исследования. Метацеркарии возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*, а также нуклеотидные последовательности ДНК изучаемых видов трематод.

Научная новизна исследования. Разработаны праймеры для амплификации нуклеотидных последовательностей участка *ITS2* кластера ядерных генов рибосомных РНК и фрагмента митохондриального гена *COX1*. На основе данных праймеров разработан видоспецифический и мультиплексный ПЦР-тест для двух важных трематод описторхид – *O. felineus* и *M. bilis*.

Практическая значимость. ПЦР-тест на основе праймеров для амплификации рибосомного маркера *ITS2* определяет ДНК возбудителей *O. felineus* и *M. bilis* при низкой концентрации исследуемого образца, а для видовой дифференциации возбудителей хорошо подходит ПЦР-тест на основе праймеров для амплификации митохондриального гена *COX1*, который позволяет определить ДНК сразу двух изучаемых возбудителей в

одной пробе. Разработанные ПЦР-тесты могут быть применены при детекции возбудителей описторхоза и меторхоза на любой жизненной стадии, в том числе и при ветеринарно-санитарной экспертизе рыбы на наличие гельминтов.

Разработана научно-техническая документация для изготовления и применения ПЦР-теста в лабораторной практике:

- лабораторный регламент производства «ПЦР-тест система для детекции и дифференциальной диагностики *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*»;
- методические рекомендации по дифференциальной диагностике описторхоза и меторхоза.

Результаты исследования, полученные в рамках диссертационной работы применяются в учебном процессе НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет им. С.Сейфуллина» при чтении лекции и проведения лабораторно-практических занятий студентов по образовательной программе 6B05102 – «Биотехнология» при изучении дисциплин «Молекулярно-генетические основы биотехнологии» и «Молекулярная генетика и генетическая инженерия».

Основные положения, выносимые на защиту:

- специфические праймеры для идентификации трематод семейства *Opisthorchiidae* на основе маркерной области ядерного (*ITS2*) и митохондриального (*COX1*) гена возбудителей;
- видоспецифический ПЦР-тест на основе рибосомального кластера для идентификации *O. felineus* и *M. bilis*;
- мультиплексный ПЦР-тест для детекции и дифференциации описторхид *O. felineus* и *M. bilis* на основе митохондриального гена *COX1*.

Публикация и апробация результатов диссертации.

Основные результаты исследования отражены в 13 (тринадцати) опубликованных работах, в четырех изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования РК, в статьях журналов входящих в базу Scopus: «Advances in Animal and Veterinary Sciences» (2020), процентиль 32; «Veterinary World» (2025), процентиль 87 и трудах международных конференций, получен патент на изобретение РК

Личный вклад автора. Основная часть работ, выполненных в рамках темы диссертации, была осуществлена при непосредственном участии автора. Сбор и анализ литературных данных, формирование направления исследования, определение целей и задач, проведение экспериментальных исследований, обработка и интерпретация полученных результатов, подготовка научных статей и написание текста диссертации являются личным вкладом автора. Оформление рукописи и введение полученных результатов в научный оборот также входили в ответственность автора.

Структура и объем диссертационной работы. Работа изложена на 90 страницах компьютерного текста. Диссертация состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных

исследований обсуждение результатов, заключение, список использованных источников и приложения. Диссертационная работа содержит 6 таблиц, 38 рисунок. Список источников использованных литературы включает 127 источников, в том числе 102 на иностранном языке.