

НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет
им. С. Сейфуллина»

УДК 619:616.995 :575.113.12(043)

На правах рукописи

БЕКЕНОВА АЙГАНЫМ БЕКАЙДАРОВНА

**Молекулярно-генетическая дифференциальная диагностика описторхоза и
меторхоза**

8D138 – Ветеринария

Диссертация на соискание степени
доктора философии (PhD)

Научный консультант
доктор PhD,
профессор
В.С. Киян

Зарубежный научный консультант
кандидат биологических наук,
А.В. Катохин

Республика Казахстан
Астана, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Биология представителей семейства <i>Opisthorchiidae</i>	11
1.2 Распространение описторхоза и меторхоза на территории Республики Казахстан	22
1.3 Методы диагностики возбудителей <i>Opisthorchis felinus</i> и <i>Metorchis bilis</i>	26
1.4 Состояние генетических исследований представителей семейства <i>Opisthorchiidae</i>	34
2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
2.1 Объекты исследования.....	38
2.1.1 Материалы исследования	38
2.1.2 Методы исследования	40
2.2 Результаты собственных исследований.....	43
2.2.1 Ветеринарно-санитарная экспертиза рыбы на наличие возбудителей семейства <i>Opisthorchiidae</i>	43
2.2.2 Создание коллекции ДНК возбудителей <i>O. felinus</i> и <i>M. bilis</i>	47
2.2.3 Видоспецифический ПЦР-тест на основе праймеров рибосомального кластера.....	62
2.2.4 Мультиплексный ПЦР-тест на основе праймеров для митохондриального гена <i>COX1</i>	67
2.2.5 Тестирование чувствительности и специфичности мультиплексного ПЦР-теста.....	71
2.2.6 Определение экономической эффективности разработанного теста....	74
2.2.7 Обсуждение результатов исследований.....	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	80
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	82
ПРИЛОЖЕНИЕ А – Лабораторный регламент	91
ПРИЛОЖЕНИЕ Б – Методические рекомендации.....	92
ПРИЛОЖЕНИЕ В – Акт о внедрении в учебный процесс.....	93
ПРИЛОЖЕНИЕ Г – Отчет по НИР в рамках ГФ и ПЦФ.....	94
ПРИЛОЖЕНИЕ Д – Регистрационные номера нуклеотидных последовательностей, депонированных в базе данных <i>GenBank</i>.....	98
ПРИЛОЖЕНИЕ Е – Патент на изобретение.....	106

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

СТ РК 2779-2015. Продукты пищевые. Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их переработки.

ГОСТ 7.32-2001. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления.

ГОСТ 7.32-2001. Библиографическая запись. Общие требования и правила составления.

ГОСТ 25336–82. Посуда и оборудование лабораторные стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.

ГОСТ 29169–91. Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки с одной отметкой.

ГОСТ 9147–80. Посуда и оборудование лабораторные фарфоровые. Технические условия.

ГОСТ 27025–86. Реактивы. Общие указания по проведению испытаний.

ГОСТ 31339-2006. «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб».

ГОСТ 4517–87. Реактивы. Методы приготовления вспомогательных реактивов и растворов, применяемых при анализе.

ГОСТ 4919.2–77. Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов.

ГОСТ 6709–72. Вода дистиллированная. Технические условия.

ГОСТ 24104–88. Весы лабораторные общего назначения и образцовые. Общие технические условия.

ГОСТ 26678–85. Холодильники и морозильники, бытовые электрические компрессионные параметрического ряда. Общие технические условия.

ГОСТ 30204–95. Приборы холодильные бытовые. Эксплуатационные характеристики и методы испытаний.

ГОСТ 57175–2016. Требования к качеству и безопасности ПЦР-наборов, проведению исследований и испытаний.

ГОСТ 7631–2008. Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Методы определения органолептических и физических показателей.

ГОСТ 7636-85. Рыба, морские млекопитающие, морские беспозвоночные и продукты их переработки. Методы анализа.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяют следующие термины с соответствующими определениями:

Амплификация – лабораторный метод, при котором создаются множество копий небольших сегментов ДНК.

Биогельминты – гельминтоз, передающийся человеку через животных, в организме которых возбудитель проходит определенный этап развития.

Ветеринарно-санитарная экспертиза рыбы – постановка диагноза на инфекционные и инвазионные заболевания, установление степени свежести и безвредности рыбы.

Дезоксирибонуклеиновая кислота, ДНК – это двухцепочечная молекула нуклеиновой кислоты, построенная из дезоксирибонуклеотидов и являющаяся носителем наследственной информации организма.

Диагностика – область медицины и ветеринарии, рассматривающая принципы, способы и этапы выявления возбудителей заболеваний либо определения специфических физиологических состояний организма.

Диапауза – состояние временной физиологической приостановки развития и снижения обмена веществ у организма, обеспечивающее его выживание при неблагоприятных условиях среды.

Дуоденальное зондирование – диагностическая процедура, заключающаяся во введении зонда в двенадцатиперстную кишку для получения и исследования желчи и дуоденального содержимого.

Зоонозы – группа инфекционных и паразитарных заболеваний, возбудители которых передаются от разных животных к позвоночным.

Иммунодиагностика – метод лабораторной диагностики, основанный на выявлении специфических антигенов или антител с использованием реакций антиген–антитело.

Канцероген – вещество или фактор, способный вызывать развитие злокачественных опухолей у организма.

Клонорхоз – паразитарное заболевание, вызываемое печеночной двуусткой *Clonorchis sinensis*, поражающей желчные протоки человека и животных.

Копровоскопия – макроскопические и микроскопические исследования для выявления яиц гельминтов в кале.

Марита – половозрелая стадия гермафродитного поколения дигенетических сосальщиков, паразитирующих в пищеварительном тракте, полостях тела и тканях позвоночных животных.

Метацеркария – стадия развития зрелой личинки трематод, следующая за этапом церкарии.

Меторхоз – гельминтоз из группы трематодозов плотоядных животных и человека, вызванный представителями рода *Metorchis*, в частности *Metorchis bilis*.

Мирацидий – свободноплавающая ресничная личиночная стадия развития трематод.

Молекулярная диагностика – выявление молекулярно-биологическими методами ДНК или белка патогенного микроорганизма, специфического вещества или измененной нуклеотидной последовательности.

Окончательный хозяин (дефинитивный хозяин) – животное, в котором обитает половозрелая стадия паразита.

Описторхоз – гепатобилиарное заболевание, вызываемое плоскими паразитическими червями рода *Opisthorchis*, в частности *Opisthorchis felinus* или *Opisthorchis viverrini*.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод амплификации, используемый для увеличения или создания множества копий специфического целевого фрагмента ДНК.

Праймер – короткая предварительно синтезированная полинуклеотидная цепь, которая комплементарна определенному фрагменту ДНК и к которой могут быть добавлены новые дезоксирибонуклеотиды посредством ДНК-полимеразы в соответствии с правилами матричного синтеза.

Природный очаг описторхоза – очаг инфекции, в котором природные факторы обеспечивают экологические условия для длительного сохранения возбудителя в природе.

Промежуточный хозяин – живой организм, в котором развивается личиночная стадия паразита.

Редия – личиночная стадия развития трематод, формирующаяся из спороцисты в организме промежуточного хозяина и дающая начало церкариям.

Секвенирование – общее название методов, которые позволяют установить последовательность нуклеотидов в молекуле ДНК.

Спороциста – личиночная стадия развития трематод, формирующаяся в организме промежуточного хозяина и служащая источником образования редий или церкариев.

Тегумент – синцитиальный эпителий без ресничек, содержащий митохондрии, эндоплазматические нити и вакуоли.

Трематоды – класс паразитических плоских червей.

Церкария – свободноплавающая личинка дигенических сосальщиков (*Trematoda*).

Цистогенные железы – железистые структуры церкария трематод, секрет которых участвует в образовании защитной оболочки при формировании метациркария.

Эксреторный пузырек – конечный отдел выделительной системы у личиночных стадий и взрослых трематод, служащий для накопления и выведения продуктов обмена веществ.

Экцистирование – процесс выхода личинки паразита из защитной цисты при переходе к следующей стадии развития

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

%	–	процент
×	–	кратность
<i>ITS</i>	–	Internal Transcribed Spacer (внутренний транскрибируемый спейсер)
°C	–	градус по Цельсию
<i>spp.</i>	–	<i>species</i> (виды)
<i>EtBr</i>	–	бромистый этидий
дН ₂ O	–	дистиллированная вода
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИИ	–	интенсивность инвазии
ИФА	–	иммуноферментный анализ
кг	–	килограмм
М	–	моль
мг/кг	–	миллиграмм на 1 килограмм массы продукта
мин	–	минут
мкг/л	–	микрограмм на 1 литр массы продукта
мкл	–	микролитр
мкм	–	микрометр
мл	–	миллилитр
млн.	–	миллион
мм	–	миллиметр
мМ	–	миллимоль
мтДНК	–	митохондриальная ДНК
НАО	–	некоммерческое акционерное общество
нг/мкл	–	нанограмм на микролитр
нм	–	нанометр
об/мин	–	количество оборотов в минуту
РФ	–	Российская Федерация
pH	–	водородный показатель
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
см	–	сантиметр
<i>COX</i>	–	cytochrome C oxidase (цитохромоксидаза C)
тыс.	–	тысяч
ЭИ	–	экстенсивность инвазии

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Инвазионные заболевания, вызываемые представителями семейства *Opisthorchiidae*, занимают 8 место по распространению среди всех паразитов, проникающих через пищу. Наиболее распространенными представителями описторхид являются *Opisthorchis felinus* (*O. felinus*), *Clonorchis sinensis* (*C. sinensis*), *Opisthorchis viverrini* (*O. viverrini*) и *Metorchis spp.* Личиночные стадии *O. felinus* и *Metorchis bilis* (*M. bilis*) обладают схожей морфологией и практически одинаковым жизненным циклом, однако на стадии развития мариты они локализуются в разных органах definitive хозяина и вызывают различные паразитарные заболевания, например, *O. felinus* 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 [1].

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. felinus* 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*.

Задачи исследований:

- 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.

Научная новизна. 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 стадий, 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*» (Приложение А);

- методические рекомендации по дифференциальной диагностике описторхоза и меторхоза (Приложение Б).

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» (Приложение В).

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*.

Апробация работы. Результаты исследований доложены и обсуждены на следующих научных конференциях и конгрессах:

- international scientific and practical internet conference «Integration of Education, Science and Business in Modern Environment: Summer Debates» (Днепр, 2021 – 11-12 августа);

- european biotechnology congress (София, 2021 – 23-25 сентября);

- международной научно-практической конференции, посвященная 130-летию С. Сейфуллина (Астана, 2024 – 10 октября);

- международной конференции «Астана Биотех 2024» (Астана, 2024 – 13 сентября).

Публикации результатов исследований. 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

Связь работы с научно-исследовательскими проектами и программами.

Научно-исследовательская работа выполнялась в рамках грантового проекта AP05131132 «ПЦР-тест для детекции и дифференциальной диагностики возбудителей описторхоза и меторхоза» на 2018-2020 гг. бюджетной программы 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований», по приоритету "Наука о жизни и здоровье", по подприоритету "Научно-инновационная биомедицина, Биотехнологии в медицине и наномедицина, прикладные исследования". Научный руководитель - PhD, профессор Киян В.С. (Приложение Г).

Определенные задачи научной работы были выполнены в рамках проекта «Провести молекулярно-генетический скрининг импортируемой рыбы и рыбной продукции на зараженность паразитами и разработать рекомендации по их обеззараживанию» бюджетной программы 267, подпрограммы 101 «Программно-целевое финансирование научных исследований и мероприятий», приоритетного направления «Устойчивое развитие агропромышленного комплекса и безопасность сельскохозяйственной продукции», научно-технической программы BR22885795 «Повышение уровня безопасности пищевых продуктов» на 2024-2026 годы (Приложение Д).

Объем и структура диссертации. 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.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биология представителей семейства *Opisthorchiidae*

Инфекционные заболевания, вызываемые представителями семейства *Opisthorchiidae*, представляют серьезную проблему для здоровья во всем мире. По оценкам, около 80 млн. человек находятся в зоне риска заражения этими паразитами [2]. Такая эпидемиологическая ситуация способствует росту числа исследований, направленных на совершенствование диагностики и лечения описторхоза. Согласно данным ФАО, исследования *Opisthorchiidae* занимает первое место среди всех трематод и составляет 88,7% от общего числа исследований [3]. Для представителей семейства *Opisthorchiidae* характерен сложный жизненный цикл с чередованием двух промежуточных и одного окончательного хозяина. Жизненный цикл описторхид представлен на рисунке 1.

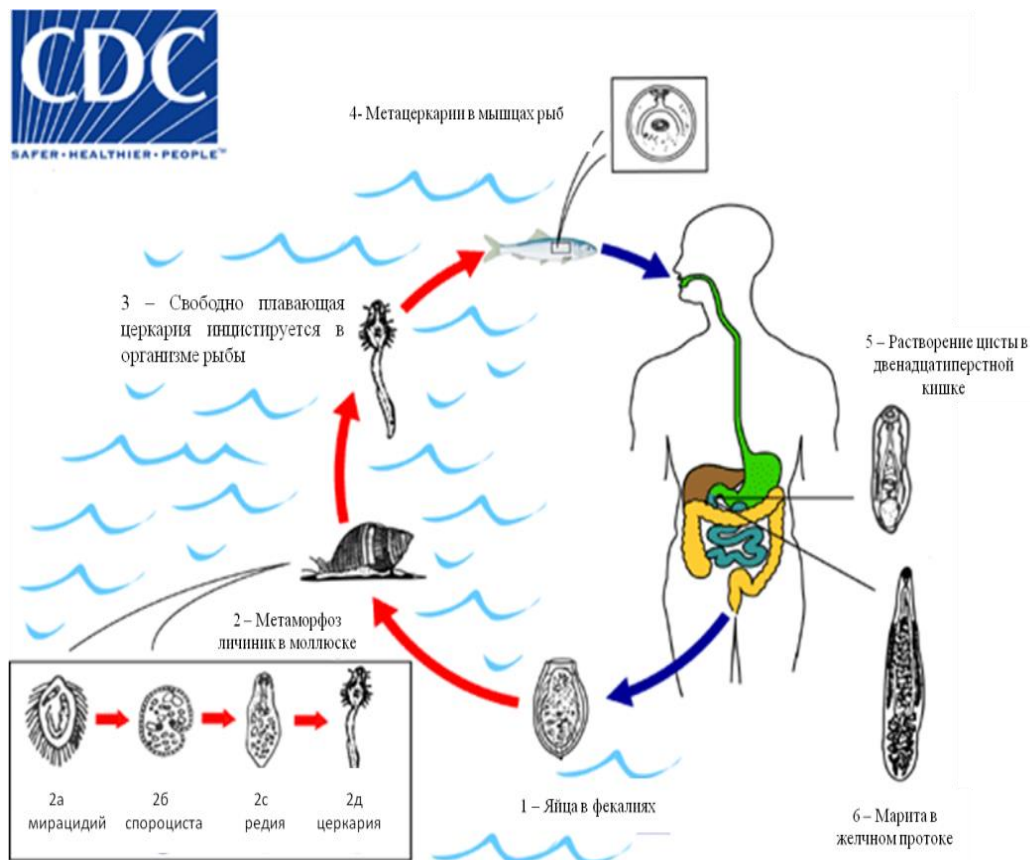


Рисунок 1 – Жизненный цикл представителей семейства *Opisthorchiidae* на примере *O. felinus*

Примечание – Составлено по источнику [4]

Яйцо или инкапсулированный эмбрион описторхидных червей является результатом половой стадии размножения [5]. Яйца попадают в воду с фекалиями definitive хозяев и оседают на водных растениях. Первые промежуточные хозяева – моллюски вместе с пищей заглатывают осевшие яйца

гельминтов. В кишечнике моллюска из яйца вылупляются подвижные эмбрионы – мирации.

Вылупление мираций происходит при химическом или механическом воздействии. При химическом воздействии основную роль играют крупные двухъядерные железы и железы вылупления. Секрет вышеупомянутых желез способствуют высвобождению мирации из яйца. При механическом вылуплении происходит деформация яйцевой оболочки.

Моллюски семейства *Bithyniidae*, *Hydrobiidae*, *Melaniidae*, *Thiaridae*, *Assimineidae* восприимчивы к описторхидам [6]. Определенные представители семейства *Opisthorchiidae* специфичны к конкретному виду моллюска, так например личинки *O. felineus* развиваются в теле моллюска *Bithynia trosschellii* (*B. trosschellii*), тогда как *M. bilis* развиваются в *Bithynia tentaculata* (*B. tentaculata*) [7].

Факторы клеточного и гуморального иммунитета моллюсков влияют на устойчивость/восприимчивость к представителям семейства *Opisthorchiidae*. Описторхиды выделяют антигены, индуцирующие иммунные реакции у первого промежуточного хозяина, что в свою очередь приводит к формированию устойчивости к заражению личинками описторхид. Скорость и интенсивность иммунного ответа зависят от возраста, степени специфичности взаимосвязи определенного вида моллюска с описторхидой и частоты контактов с разными видами описторхид. На заражение моллюсков влияют также такие абиотические факторы, как температура воды, повышение ее солености, общая минерализация, увеличение мутности и изменение pH [8].

Температура – важный фактор, влияющий на развитие личинок представителей семейства *Opisthorchiidae* у улитки-хозяина, поскольку метаболизм моллюсков зависит от температуры окружающей среды. Мирации сохраняют жизнеспособность в пресноводных моллюсках в течение 84–104 дней и могут пережить период замерзания-оттаивания воды зимой, впадая вместе с хозяином в состояние диапаузы. Диапауза приводит к исчезновению желез, покровных пластин, ресничек [9]. Так, например, моллюски *Bithynia spp.*, обитающие в Обь-Иртышском бассейне, находятся в состоянии диапаузы в течение 8,5 месяцев из-за низкой температуры воды. Оптимальная температура воды для развития битиний не меньше 15°C в период с июня по август. Далее идет следующий этап развития личинок описторхид – спороциста. Спорциста представляет собой тонкостенный мешок, заполненный зародышевыми клетками. Спорциста лишена ротового аппарата и осуществляет питание путем всасывания растворенных питательных веществ из тканей хозяина, поэтому именно этот этап развития не зависит от температуры окружающей среды. Из спорцисты развивается редия – последняя стадия развития внутри моллюска [10].

Тело редии представляет собой тонкостенный мешок с крупной глоткой, коротким кишечником и семью парами слюнных желез; развитие редий продолжается около двух месяцев. В теле редии формируются зародышевые шары, из которых развивается подвижная хвостатая личинка – церкария. Церкария коричневого цвета, овальной формы, с ротовой и брюшной

присосками и хвостом, вдвое превышающим длину тела. У представителей семейства *Opisthorchidae* в среднем насчитывается около 16 цистогенных желез, участвующих в образовании оболочки цисты, а также слизистые железы. В переднем отделе тела церкарии располагаются два глазных пятна и многочисленные сенсорные щетинки, обеспечивающие ориентацию и адаптацию личинки к условиям среды [11]. Пищеварительная система церкарии развита слабо и представлена предглоткой и глоткой, тогда как выделительная система образована протонефридиями и экскреторным пузырем. Нервная система включает головной ганглий и продольные нервные стволы, координирующие двигательную активность и поведение личинки. Покидая моллюска, церкария активно плавает в воде и сохраняет жизнеспособность до 30–50 часов [12]. После этого личинка прикрепляется к коже рыб – второго промежуточного хозяина, проникая под нее с помощью шипов и желез проникновения.

В мышцах рыбы из церкарии образуется метацеркария. У метацеркарии есть две оболочки: внутренняя оболочка состоит из цистогенных клеток и внешняя оболочка из соединительнотканной капсулы. Соединительнотканная капсула состоит из внутреннего слоя фиброзных тканей и наружного слоя метаболически активных клеток. Двойная оболочка метацеркарии способствует появлению резистентности к перепадам температуры, высокой концентрации соли и высыханию [13].

У освобожденной от капсулы метацеркарии (длина 0,44–1,36 мм, ширина 0,15–0,30 мм) хорошо различимы две присоски и экскреторный пузырек, заполненный черными гранулами [14]. В теле рыбы метацеркария локализуется в подкожно-жировой клетчатке и верхнем слое мышечной ткани (на глубине 2–4 мм) в области спины, реже – в плавниках, жабрах и стенках кишечника [15]. Через 6 недель после заражения рыба становится инвазионной, т.е. способной заражать конечного хозяина. Продолжительность периода инвазионности второго промежуточного хозяина зависит от вида рыб и температуры воды. Среди всех стадий развития описторхид только метацеркария способна приживаться в организм млекопитающих и человека [16].

Инфицирование окончательного хозяина происходит при употреблении зараженной рыбы, содержащей жизнеспособные метацеркарии [17]. В кислом содержимом желудка дефинитивного хозяина метацеркарии освобождаются от внешней оболочки, а в щелочном содержании двенадцатиперстной кишки разрушается внутренняя оболочка [18]. Затем метацеркарии мигрируют в желчные протоки и желчный пузырь, где в течение 25–30 дней дозревают до половозрелой стадии.

Гельминты паразитируют во внутрипеченочных желчных протоках млекопитающих, где созревают и вызывают воспалительные процессы [19]. Яйца паразитов накапливаются в желчи, способствуя образованию слизи и гранул билирубина. Накопление вышеупомянутых веществ приводит к формированию камней в гепатобилиарной системе рыбоядных млекопитающих.

Образовавшиеся гранулы билирубина повышают уровень непрямого билирубина в печеночной и пузырной желчи [20]. На ранней стадии инфицирования в билиарном эпителии происходит патологический процесс, где однослойный цилиндрический эпителий превращается в клетки, продуцирующие муцин, что приводит к появлению отеков.

При хронических формах заражения описторхидами наблюдаются такие симптомы, как анорексия, диспепсия, сухость и горький вкус во рту, утомляемость, тошнота, непереносимость жирной пищи и боли в правом подреберье. Указанные изменения при хронической форме вызывают острый панкреатит, желчный перитонит, абсцесс печени, холангиокарциному [21], неоплазию [22], рак желчного протока [23]. При хронической форме заражения представителями *Opisthorchiidae* часто наблюдается микст-инвазия, преимущественно с бактериальной инфекцией представителями *Escherichia coli* [24].

Животные, пораженные описторхидами, часто отстают в росте и развитии, при этом их слизистые оболочки желтушны, наблюдаются запоры и поносы. У некоторых плотоядных развивается асцит, вследствие чего живот увеличивается в объеме. В желчных протоках описторхиды выделяют пигмент гемозоин, что приводит к появлению гемозоиновых шишек [25]. Нередко больные животные гибнут.

Взрослые печеночные сосальщики могут жить в человеке от 20 до 25 лет [26], производя 1000-2500 яиц в день [27]. Эмбриональные яйца описторхид появляются в фекалиях не ранее чем через 4-12 недель после заражения окончательного хозяина. Яйца описторхид попадают в воду, и жизненный цикл представителей семейства *Opisthorchiidae* возобновляется.

В настоящее время семейство *Opisthorchiidae* насчитывает 7 родов и 28 видов [28]. Идентификацию представителей семейства *Opisthorchiidae* осуществляют на основании морфологических признаков взрослой стадии паразита: размеров тела, расположения ротовой и брюшной присосок, предглотки, глотки и пищевода, а также строения экскреторного пузыря. Ниже приведено описание основных видов семейства.

O. felineus входит в число трех эпидемиологически значимых видов печеночных сосальщиков и является главным возбудителем кошачьего описторхоза. Около 1,2 млн. человек по всему миру заражены *O. felineus*.

Немецкий ученый Рудольфи исследуя желчь кошек, обнаружил паразита и предположил, что это *Distoma conus*, который был открыт ученым Creplin в 1822 году [29].

Однако в 1831 году Gurlt в своем «Учебнике патологической анатомии домашних животных» (*Lehrbuch der pathologischen Anatomie der Haussaugethiere*) указал, что паразит, обнаруженный Рудольфи и отнесенным им к *Distoma conus* Creplin не полностью соответствует описанию этого вида. В учебнике Gurlt на основании морфологических расхождений, описанный Рудольфи выделил новую форму *Distoma conus* Gurlt [30].

O. felineus как отдельный вид паразита описал Риволта в 1884 году. Риволта при микроскопическом исследовании желчи собак и кошек в городе

Пиза (Италии) выявил *Distoma conus Gurlt*, признал его самостоятельным видом и присовил название *Distomum felineum* [31].

В 1889 году Ван Траиг обнаружил *O. felineus* паразита в желчи собак и назвал его *Distomum lanceolatum canis familiaris* [32].

В 1950 году К.И. Скрябин установил, что кошка является одним из хозяев *Distoma conus Gurlt* и дает ему название *Distomum lanceolatum felis cati* [33].

Ареал распространения описторхоза охватывает преимущественно территории Евразии и приурочен к бассейнам крупных пресноводных рек. Описторхоз представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения, и согласно разным источникам около 600-750 млн. человек по всему миру подвержены риску заражения *O. felineus* [34].

Жизненный цикл паразита проходит с чередованием двух промежуточных и одного окончательного хозяина. Размер тела взрослой формы *O. felineus* составляет 7-12 мм, длина 2-3 мм. Брюшная присоска возбудителя описторхоза расположена на передней части тела. Желточные фолликулы образуют 7-8 групп на каждой боковой стороне тела. Примерно через 1-3 месяца после заражения яйца выделяются с фекалиями [35].

Яйца *O. felineus* имеют овальную формы, желтоватую окраску и снабжены крышечкой на одном из полюсов. На месте соединения скорлупы и крышечки отмечается утолщение в виде валика. Яйца попадают в пресноводные водоемы и проглатываются первым промежуточным хозяином – улитками семейства *Bithyniidae*: *Bithynia leachii* (*B. leachii*), *B. troschelii*, *B. inflata*. Заражение моллюсков личинками описторхов носит сезонный характер: максимальный уровень инфицированности отмечается в июле и составляет 14,3% [36].

В теле улитки из яиц вылупляются мирацидии. По морфологическим признакам мирацидии имеют удлинненно-овальную форму, их тело покрыто многочисленными ресничками.

Из мирацидия развивается следующая стадия развития *O. felineus* – спороциста. Спороциста продуцирует редии, которые созревают в гепатопанкреасе улитки и развиваются в церкарии. При попадании в подкожную мышечную ткань рыб церкария сбрасывает хвост, превращается в неподвижную личинку – метацеркарий [37].

Роль второго промежуточного хозяина в жизненном цикле *O. felineus* выполняют различные пресноводные рыбы, в мышечной ткани которых развиваются именно метацеркарии. Среди них отмечаются следующие виды: язь (*Leuciscus idus*), голавль (*Squalius cephalus*), елец (*Leuciscus leuciscus*), белоглазка (*Ballerus sapa*), подуст (*Chondrostoma nasus*), красноперка (*Scardinius erythrophthalmus*), чехонь (*Pelecus cultratus*), карп (*Cyprinus carpio*), линь (*Tinca tinca*), пескарь (*Gobio gobio*), плотва (*Rutilus rutilus*), карась золотой (*Carassius carassius*), густера (*Blicca bjoerkna*), карась серебряный (*Carassius gibelio*), лещ (*Abramis brama*), синец (*Ballerus ballerus*), укляя (*Alburnus alburnus*), гольян (*Phoxinus phoxinus*), гольян Чекановского (*Rhynchocypris czekanowskii*), жерех (*Aspius aspius*), верховка (*Leucaspius delineatus*) и щиповка (*Cobitis taenia*).

Размер метацеркарии *O. felineus* варьируют от 0,17-0,21 мм до 0,34-0,43 мм, и зависит от интенсивности заражения. Оболочка цисты *O. felineus* круглой формы, двуслойная, тонкая и прозрачная. Внутренняя оболочка метацеркарии по всему периметру равномерно прилегает к наружной оболочке. Мускулатура стенки тела состоит из круговой, продольной и диагональной мышц [38].

Употребление сырого или маринованного рыбного филе, а также ненадлежащая термическая обработка рыбы приводит к заражению окончательного хозяина личинками *O. felineus*. В эндемичных районах зараженность язя метацеркариями *O. felineus* достигает до 100% [39].

Метацеркарии, попадая в организм дефинитивного хозяина, эксцистируются в двенадцатиперстной кишке под воздействием желудочного сока и секрета поджелудочной железы. Далее метацеркарии мигрируют вверх через фатерову ампулу и общий желчный проток в печеночные желчные протоки. В печеночных протоках происходит созревание взрослых особей описторха. Развитие взрослой формы *O. felineus* в организме человека занимает около одного месяца, при этом взрослые черви могут сохранять жизнеспособность на протяжении нескольких десятков лет [40].

Клинические проявления описторхоза у людей варьируют от бессимптомного до тяжелого течения. Каждый третий случай заражения описторхозом протекает бессимптомно, что в свою очередь усложняет своевременную диагностику и лечение.

Симптомы при острой стадии описторхоза проявляются лихорадкой, болью в животе, головной болью, сухим кашлем, астенией, артралгией, диареей, липотимией, запором, тошнотой, эозинофилией, кожной сыпью и повышением активности печеночных ферментов. Мужчины заражаются описторхозом два раза чаще, чем женщины. Например, в Италии среди всех пациентов от 16 до 84 лет 61,4% составил мужской пол, и только 38,6% пришлось на женский пол [41].

В период с 2003 по 2011 год в Италии 211 человек заразились описторхозом. Высокий процент инфицирования людей связан с потреблением местных жителей сырого филе пресноводной карповой рыбы. Циркуляция личинок *O. felineus* в Италии поддерживается в эндемичных по описторхозу озерах – Больсена, Браччано, Тразимено [42]. Именно из этих озер поступает лινь на прилавки и места общественного питания Италии и других стран Европейского Союза. Зафиксирован случай, когда 80 человек были заражены описторхозом и при сборе анамнеза установлено, что они употребляли маринованное филе линя в одном и том же ресторане в один и тот же день. В Италии при реализации линя коробки маркируют с предупреждением о том, что рыбу нельзя употреблять в сыром виде, если она не была предварительно заморожена [43].

Особое эпидемиологическое и медицинское значение среди описторхид имеет *O. viverrini*. Этот вид распространен в странах Юго-Восточной Азии: Таиланд, Китай, Лаос, Вьетнам, Камбодже и Мьянме. Международное агентство по изучению рака отнесло *O. viverrini* к биологическим канцерогенам человека I группы.

Яйца *O. viverrini* желтовато-коричневого цвета, имеет отчетливую крышечку, через которую выходят мирацидии. Брюшная присоска паразита располагается на передней части тела, длина которой составляет 5,4-10,2 мм, ширина 0,8-1,9 мм [44]. Поверхность яичной скорлупы шероховатая и неровная.

Первыми промежуточными хозяевами являются брюхоногие переднежаберные моллюски семейства *Hydrobiidae*, *Bithyniidae* и *Melaniidae*. Среди них наиболее восприимчивыми к личинкам *O. viverrini* являются виды *B. siamensis goniomphalos*, *B.s. funiculata*, *B.s. siamensis*. Хотя обычно наблюдается низкий уровень заражения улитки (0,14–0.86%), но этого уровня достаточно для поддержания жизненного цикла *O. viverrini* [45].

Пресноводные рыбы циклохейличтус сияя (*Cyclocheilichthys siaja*), пятнистый барбус (*Hampala dispar*), краснощекий барбус (*Puntius orphoides*), шарозуб (*P. gonionotus*), пунтиус проктозистрон (*P. proctoysron*), пунтиус виеховери (*P. viehovever*), лабиобарбус линейный (*Labiobarbus lineatus*), барбус металлический (*Esomus metallicus*). являются вторыми промежуточными хозяевами *O. viverrini*. Зараженность рыб личинками *O. viverrini* достигает 100% в сухой сезон, 44,4% – в жаркий сезон, и 75% – в дождливый сезон [46]. В качестве дефинитивных хозяев выступают рыбацкие млекопитающие (собаки, кошки, свиньи, норки, домашние крысы) и люди.

В эндемичных регионах кошки и собаки считаются главными животными-хозяевами [47]. В Китае кошек и собак редко содержат как домашних питомцев, поэтому питаются остатками сырой рыбы, попадающими в бытовые отходы. У окончательного хозяина *O. viverrini* локализуется в желчном пузыре и желчных протоках. Взрослые черви выделяют яйца, которые проходят по желчным протокам в кишечник и выводятся из организма хозяина с калом. Яйца *O. viverrini* попадают в пресноводные водоемы и заглатываются улитками. В теле улитки в течение 1-2 месяцев происходит метаморфоз и личинка *O. viverrini* превращается в церкарий. Церкарий высвобождается в воду и прикрепляется к тканям пресноводных рыб. Церкария инцистируется в мышцах рыб, превращается в метацеркарию, и становится инвазионной стадией. При попадании в организм окончательного хозяина метацеркария *O. viverrini* высвобождается из оболочки в двенадцатиперстной кишке и мигрирует по желчевыводящим путям. Продолжительность жизни *O. viverrini* в теле дефинитивного хозяина составляет примерно 10 лет.

В Таиланде первичный рак печени, при развитии которого *O. viverrini* выступает как сопутствующий фактор, занимает первое место среди мужчин и третье место среди женщин. Около 10 млн. человек поражены описторхидами вида *O. viverrini*, и еще 9 млн. человек находятся в зоне риска заражения. *O. viverrini* ежегодно вызывает 1200-1800 случаев смерти от холангиокарциномы, развившейся на фоне хронического описторхоза [48].

Правительство Таиланда ежегодно тратит около 120 миллионов долларов на борьбу с описторхидами вида *O. viverrini*. В распространении *O. viverrini* наблюдается географическая изменчивость: в северо-восточном регионе Таиланда (эндемичная часть страны) показатели заболеваемости

холангиокарциномой в 20 раз выше, чем на юге страны. Сегодня заболеваемость холангиокарциномой в северо-восточном регионе Тайланда достигает 85,5% и является самой высокой заболеваемостью раком в мире. Аналогичная тенденция распространения наблюдается в Лаосской Народно-Демократической Республике, где *O. viverrini* встречается только в южных регионах как Кхаммануан и Сараван [49]. Во Вьетнаме также южные регионы (Фуйен, Дананг, Дак Лак, Бинь, Динь) считаются эндемичными. В Камбодже *O. viverrini* распространен только в двух районах – Такео и Кратье [50]. К возбудителям *O. viverrini* восприимчивы подростки от 15 до 19 лет по сравнению с возрастной группой от 0 до 5 лет.

Аналогично, другой важный печеночный сосальщик – *C. sinensis* занимает обширные территории Восточной Азии и вызывает клонорхоз. *C. sinensis* классифицируется Международным агентством по изучению рака как канцероген 1-й группы.

Жизненный цикл *C. sinensis* проходит посредством развития личинок в телах первого и второго промежуточных хозяев и окончательного хозяина. Первый промежуточный хозяин – пресноводная улитка *Parafossarulus manchouricus*, *Parafossarulus anomalospiralis*, *B. fuchsiana*, *B. misella*, *Alocinma longicornis*, *Melanoides Tuberculata*, *Semisulcospira libertine*, *Assimineea lutea*, *Thiara granifera*. В высокоэндемичных районах по клонорхозу улитка может быть заражена всего на 0,08 %, однако этого достаточно для поддержания жизненного цикла, поскольку инфицированные улитки могут выделять в среднем 788 церкарий в день. Выделение церкарий клонорхоза происходит с мая по октябрь. Зараженность пресноводных рыб, второго промежуточного хозяина, метацеркариями *C. sinensis* в эндемичных районах достигает 100%, где 113 видов пресноводных рыб и три вида креветок восприимчивы к клонорху [51].

При употреблении недостаточно термически обработанной рыбы, клонорхи переходят на следующий этап развития, что приводит к заражению окончательного хозяина, в том числе и человека. В наши дни более 20 миллионов людей инфицированы *C. sinensis* по всему миру, где 12,5 млн. зараженных людей приходится на Китай. В Китае 32 провинции из 34 считаются эндемичными [52]. В Корее 1,5 млн. людей заражены печеночным сосальщиком [53]. Клонорхоз вызывает серьезную проблему в здравоохранении вдоль пяти крупных рек (Накдон, Сомджин, Енсан, Кым, Хан), где зараженность людей клонорхозом достигает до 40%. Такая же тенденция по распространению *C. sinensis* наблюдается во Вьетнаме, особенно в дельте Красной реки, включая Хайфон и Ханой. Во Вьетнаме 1 млн. людей заражены клонорхозом, это 26% населения страны. Распространение китайского печеночного сосальщика в странах Азии можно объяснить традиционными пищевыми предпочтениями местных жителей. Например, Корея является лидером по заболеваемости первичного раком печени, где рыбу вымачивают в уксусе, в пюре из красного перца или острую фасолевую пасту и также подают в сыром виде. В восточном Китае рыбу жарят не полностью, а на юге Китая сырую рыбу обмакивают в рисовую кашу и едят в сыром виде. В

Тайланде есть три вида традиционных блюда (*koi pla*, *pla som*, *pla ra*), основанных на сырой рыбе, которые употребляют в мероприятиях при массовом скоплении людей.

C. sinensis может продолжать жизнедеятельность до 26 лет в организме человека. При исследовании клонорхоза, выяснилось, что самая высокая частота обнаружения яиц паразита наблюдается в конкрементах желчного пузыря (69%), меньше в желчи (44%) и кале (30%). На хронических стадиях взрослые формы *C. sinensis* становятся причиной фиброза печени [54], цирроза, холангиокарциномы [55].

Род *Metorchis* входит в семейство *Opisthorchiidae* и включает 26 видов, среди которых 8 видов встречаются у млекопитающих и 18 видов паразитируют у птиц, вызывая у них меторхоз. Описаны следующие представители данного рода: *M. bilis*, *M. conjunctus*, *M. orientalis*, *M. xanthosomus*, *M. ussuriensis*, *M. taiwanensis*, *M. elegans*, *M. butoridi*, *M. kimbangensis* [56].

Одним из широко распространенных представителей рода *Metorchis* является вид *M. bilis*. Личинки меторха встречаются в Западной и Восточной Европе, в Западной Сибири. Морфологические и молекулярные данные показывают, что *M. albidus* и *M. crassiusculus* являются синонимами *M. bilis*. Географический диапазон распространения *M. bilis* перекрывается с географическим диапазоном *O. felineus*: Центральная, Восточная Европа, Западная Сибирь. Жизненный цикл меторха похож на цикл описторха и проходит со сменой двух промежуточных и одного дефинитивного хозяев. Первый промежуточный хозяин – улитки вида *B. tentaculata*. Вторым промежуточным хозяином *M. bilis* являются рыбы семейства карповых, включая язь, плотву, ельца, линя, голяна, пескаря, верховку и толстолобика. Окончательными хозяевами выступают человек, волк, орлан-белохвост, ондатра, норка, выдра и коршун [57].

Метацеркарии *M. bilis* заключены в овальных, тонкостенных, двухслойных гиалиновых цистах размером от 0,19-0,22 до 0,12-0,16 мм. Толщина их внутреннего слоя 0,002-0,003 мм, наружного – 0,007-0,008 мм. Циста метацеркарии *M. bilis* окружена соединительнотканной капсулой размером 0,22-0,26×0,19-0,23 мм. В некоторых случаях наблюдается отслоение стенок капсулы от поверхности цисты. У находящихся в цистах личинок хорошо различимы присоски, шипики на поверхности тела, экскреторный пузырь, который заполнен плохо пропускающими свет гранулами и в проходящем свете выглядит окрашенным в коричневый цвет, и ветви кишечника, заполненные доскообразными тельцами [58].

Тело мариты *M. bilis* листовидной, иногда грушевидной формы. Тело вытянуто в длину, сужено на переднем и тупо закруглено на заднем конце. Размер тела *M. bilis* составляет 1,75–3,75 мм в длину и 1,0–1,5 мм в ширину. Морфометрические параметры мариты зависят от вида хозяина, интенсивности заражения и возраста паразита. Так, при исследовании выдр в Ютландии отмечено, что в северной части острова встречались мариты крупного (средняя длина 5,962 мм, ширина 0,771 мм) и среднего размера (средняя длина 2,677 мм,

ширина 0,935 мм), тогда как в южной Ютландии выявлялись мариты мелких размеров (средняя длина 2,677 мм, ширина 0,935 мм) [22, р. 104927].

Возбудитель *M. bilis* также обнаружен в Испании. При исследовании рыжей лисицы в долине Эбро и плотоядных в Кабреризосе, Монтсени были найдены гельминты *M. bilis*. Также авторы упомянули о необходимости мониторинга первого промежуточного хозяина *B. hispanica* и *B. tentaculata* на Пиренейском полуострове для создания оптимизированных моделей распространения описторхоза и меторхоза. В Португалии встречаются единичные случаи заражения меторхозом в местности Малькате [59].

Näreaho A. (2017) и соавторы при исследовании млекопитающих прибрежных районов Финского залива на наличие трематод обнаружили *M. bilis* в гепатобилиарной системе лис. Результаты были подтверждены молекулярными методами [60].

В Республике Татарстан (г. Казань) у людей с жалобами на боли в правом подреберье обследовали дуоденальную жидкость и кал. В результате из 943 обследованных пациентов гельминты *O. felineus* были выявлены у 316 пациента, *M. bilis* обнаружен у 4 пациента. Микст-инвазии выявлены в виде сочетаний описторхоза, анкилостомидоза, тениоза, аскаридоза, лямблиоза и меторхоза, псевдамфистомоза, тениоза, аскаридоза, лямблиоза [61]. При микст-инвазии наблюдается кумуляция хрома, ртути, цезия, лантана и кобальта в тканях печени. Если учесть тот факт, что авторы данного исследования применяли традиционные методы, не исключено большее количество заражения людей меторхозом [62].

Есть авторы, которые утверждают, что зараженность рыб личинками меторхов преобладает над описторхов, так например, на реке Саргиз (Тюменская область, РФ) рыба заражена только *M. bilis* [63].

Нуклеотидный анализ митохондриальных генов *COX1* и *COX3* выявил наличие двух монофилетических клад, в рамках которых у датских выдр были выделены четыре различных гаплотипа *M. bilis*. Эти молекулярные результаты могут объяснить наличие *M. bilis* разных размеров. Выдры очень восприимчивы к *M. bilis* и действуют как резервуар в дикой природе, который способствует циркуляции меторхоза в природе [64].

M. conjunctus – один из представителей рода *Metorchis* и носит название «канадского печеночный сосальщик». Территория распространения личинок *M. conjunctus* ограничивается Канадой и США. В 1946 году в Канаде встречались бессимптомные случаи заражения меторхозом. Бессимптомный меторхоз в Канаде встречается на территории от Квебека до восточного побережья Гренландии. В 1996 году в Канаде были обнаружены клинические проявления меторхоза у 19 людей. Позже было выяснено, что эти люди употребляли белый чукучан (*Catostomus commersoni*) в сыром виде [65].

Жизненный цикл *M. conjunctus* протекает со сменой двух промежуточных и одного окончательного хозяина, что характерно для всех представителей семейства *Opisthorchiidae*. Первым промежуточным хозяином является моллюск *Amnicola limosa limosa*. В качестве второго промежуточного хозяина выступают пресноводные рыбы: белый чукучан (*Catostomus commersonii*),

чукучан (*Catostomus catostomus*), американский голец (*Salvelinus fontinalis*) и желтый окунь (*Perca flavescens*). Окончательными хозяевами служат волк, лисица, койот, енот, ондатра, норка, а также собака и кошка [66].

M. orientalis – это разновидность печеночного сосальщика, заражающая птиц и млекопитающих. Ареал распространения *M. orientalis* перекрывается с *C. sinensis* (Восточная Азия). Данный вид был открыт ученым Танабэ в 1919 году. Впервые данный вид был описан у собак и кошек из Японии, после из Маньчжурии, Китая и Формозы. Пресноводная улитка *P. man chouricus* является первым промежуточным хозяином. Второй промежуточный хозяин – рыбы рода плотва (*Pseudorasbora parvas*), японский пескарь (*Pseudogobio esocinus*), золотой карась (*C. carrassius*), обыкновенный карп (*C. carpio*) и заоо обыкновенный (*Zacco platypus*). Дефинитивные хозяева – собаки, кошки и птицы. Среди птиц утки более восприимчивы к возбудителям *M. orientalis*. Жизнедеятельность *M. orientalis* вызывает ряд патологических процессов у дефинитивного хозяина: увеличение желчного пузыря, застой сосудов, кровоизлияние во внутренние органы [67].

В Китае (река Нэньцзян) процент заражения плотвы (*Pseudorasbora parva*) метацеркариями *M. orientalis* составила 15,5%, где из 600 исследуемых образцов меторх был найден у 93 шт. рыб [68].

Метацеркарии трематод *M. xanthosomus* встречаются в странах СНГ, в Восточной и Западной Европе. Размер тела метацеркарии *M. xanthosomus*, заключенной в сферические, двухслойные цисты, диаметром 0,23-0,32 мм. Данный вид отличается от других видов толстой внутренней и наружной оболочкой. Размер внутреннего слоя цисты 0,003-0,004 мм, наружного – 0,027-0,52 мм. Длина пищевода равна диаметру ротовой присоски. Соотношение передней и задней частей тела метацеркарии 1:0,6-1:0,7. Оболочка цисты прозрачная, толщина цисты равна 1/3 внутренней цисты. Экскреторный пузырь метацеркарии *M. xanthosomus* занимает почти всю заднюю часть тела [69].

M. ussuriensis распространен в бассейне рек Большая Уссурка, юг Дальнего Востока России. Первыми промежуточными хозяевами служат пресноводные моллюски рода *Parafossarulus spiridonovi* и *Boreoelona ussuriensis*. В качестве второго промежуточного хозяина выступают пресноводные рыбы и лягушки. Окончательный хозяин – утки рода *Anas platyrhynchos dom.* В теле окончательного хозяина червь локализуется в желчном пузыре. По морфологическим признакам взрослая форма *M. ussuriensis* отличается длиной и шириной тела, соотношением брюшной и ротовой присосок; церкария отличается положением плавников в складках. Молекулярные исследования показывают, что *M. ussuriensis* отличается от *M. bilis* по триплету САГ в рибосомальном кластере ITS2 [70].

M. butoridi распространен на юге Дальнего Востока России (приток реки Уссури, бассейн реки Амур). Окончательный хозяин заражается от второго промежуточного хозяина – болотный пескарь (*Rhynchocypris percunurus mantschuricus*), амурский пескарь (*Rhynchocypris lagowskii*) и обыкновенный горчак (*Rhodeus sericeus sericeus*).

M. butoridi локализуется в желчном пузыре дефинитивного хозяина – рыбоядных птиц семейства *Ardeidae*. Взрослые особи имеют удлиненное тело с узкой передней половиной и немного более широкой задней половиной тела. Tegument с тонкими шипами. Ротовая присоска терминальная, чашевидной формы. Брюшная присоска округлая, по размеру равна или несколько меньше ротовой; располагается на границе передней и средней третей тела либо в передней части его средней трети. Префаринкс отсутствует. Глотка небольшая, шаровидная. Пищевод не выражен. Раздвоение кишечника происходит непосредственно позади глотки. Ветви кишечника огибают семенники снаружи или проходят дорсально по отношению к ним, достигая заднего конца тела, где они сближаются между собой. Желточные фолликулы состоят из двух полей, простирающихся от передней границы переднего семенника, или от середины переднего семенника, или от уровня яичника и достигающих середины переднего тела. Желточные фолликулы маленькие, удлиненные или поперечно-овальные. Фолликулы в желточных полях объединены в 5-7 полос, отделенных друг от друга. Яйца мелкие, многочисленные, эмбрионированные, с крышечкой, с шишечкой. Экскреторный пузырек Y-образной формы [71].

Трематода *Pseudamphistomum truncatum* (*P. truncatum*) распространены в пресноводных водоемах России, Поволжья, бассейнах рек, впадающих в Черное море [72]. Размер цисты *P. truncatum* от 0,39-0,45 до 0,40-0,54 мм. Экскреторный пузырь метацеркарии трематод крупный, черный и не занимает более 1/3 тела. Отсутствие пищевода у *P. truncatum* является отличительной чертой [73].

В Казахстане распространены такие представители семейства *Opisthorchiidae* как *O. felineus*, *M. bilis*, *M. xanthosomus*. В наших исследованиях мы рассматриваем только два вида описторхид, *O. felineus* и *M. bilis*, так как данные виды описторхид имеют социальное, медицинское и ветеринарное значение.

1.2 Распространение описторхоза и меторхоза на территории Республики Казахстан

Описторхоз остается важной социально-значимой проблемой для нашей страны и распространен на значительной части территории Республики Казахстан. В нашей стране описторхоз распространен неоднородно и существуют как природные, так и смешанные типы очагов [74]. Благоприятные природные и гидрологические условия Казахстана обеспечивают стабильное функционирование очагов описторхоза.

Распространение личиночной стадии описторхид – метацеркарий по Казахстану изображено на рисунке 2 [75].

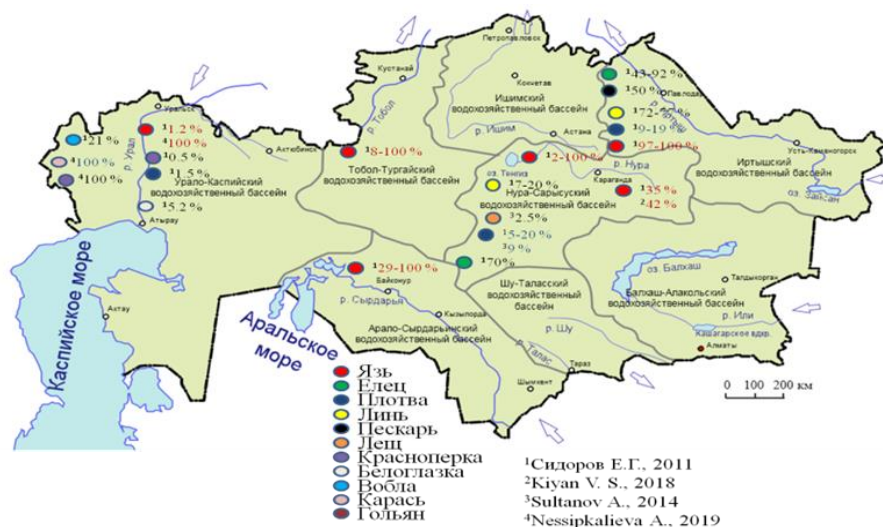


Рисунок 2 – Зараженность рыбы метацеркариями описторхид

Заболееваемость описторхозом наблюдается в западном, северном, центральном и восточном регионах страны. Расширение торговли и миграция населения способствуют распространению описторхоза за пределы эндемичных территорий. Ежегодно в Казахстане регистрируются от 570 до 760 новых случаев заболевания описторхозом, включая 3,75-4,2% детей до 14 лет [76].

В Западно-Казахстанской и Акмолинской области наблюдается высокий рост заболеваемости описторхозом среди детей. В среднем в Павлодарской области каждый год регистрируют около 200 случаев заболевания людей описторхозом [77]. Пик заболеваемости детей до 14 лет описторхозом в Павлодарской области наблюдался в 2012 году в (27%), а на берегу реки Иртыш зараженность рыб личинками описторхид остается высокой: язь – 97-100%, елец – 43-92%, плотва – 9-19%, линь – 72-77%, пескарь – 50% [78].

Повышение уровня поражения описторхозом у населения пропорционально происходило с возрасту, достигая пика в 39-летнем возрасте и оставаясь на высоком уровне вплоть до 49-летнего возраста, после чего отмечалась незначительная тенденция к снижению. Существует мнение, что ранние результаты диагностики описторхоза были связаны с тем, что более чем у половины исследуемых (70,6%) в возрасте до 30 лет обнаружались признаки инвазии. Чаще всего лабораторное подтверждение диагноза происходило в течение 1-5 лет у 61,6% больных [79].

Одним из крупных очагов распространения описторхоза является бассейн реки Нура, в которую входит территория, начиная от Карагандинского водохранилища до Коргалжинской системы озер.

Экологические условия бассейна реки Нура создают благоприятные условия для жизнедеятельности моллюсков рода *Bithynia* – первых промежуточных хозяева описторхид. В реке Нура обитают множество видов рыб, которые являются потенциальными носителями метацеркарий описторхид, что в свою очередь приводит к заражению дефинитивного хозяина.

В Коргалджинских озерах зараженность язя колеблется от 2 до 100%, линия – 7%, плотвы – 5%. В Нуринском водохранилище зараженность язя описторхами колеблется от 26 до 100%. В озере Шолак процент заражения язя

составляет 35%, линия – 20%. В реке Шидерты метацеркарии описторхид были найдены только у гольяна [80].

В Карагандинской области из общего количества больных описторхозом городские жители составляют 79%, а сельские – 21%. В данной окрестности зараженность *Leuciscus idus* (язь) составляет 42%. При исследовании мышц рыб реки Нура встречаются две группы метацеркарий, которые имеют одинаковые морфологические признаки, однако различаются по размерам и толщиной стенки цисты. При проведении работ по экспериментальному заражению сирийских хомячков рыбой из реки Нура были получены мариты *O. felineus* и *M. bilis* [24, p. 267-273].

В Костанайской области заражение описторхозом приходится на людей старше 20 лет. Показатель заражения печеночной двуусткой колеблется от 8 до 77 случаев заражения в год. В 2012 году был зарегистрирован пик заражения описторхозом – 77 человек. Наименьшее количество случаев заражения людей *O. felineus* пришлось на 2021 – 8 случаев. Высокий уровень заболеваемости описторхозом наблюдается также в Аркалыкском, Тарановском, Федоровском, Костанайской, Рудненском районах [76, p. 340-345].

Западно-Казахстанская область также является неблагополучной по описторхозу. Всего в этой области насчитывается 196 рек, где важную роль в процессе формирования промысловых ресурсов занимает река Урал. Река Урал образует Урало-Каспийский бассейн вместе с водоемами Кигач, Большой и Малый Узень, Орь, Илек, Шаган. Кармалиев Р.С. и соавторы (2023) провели работу по исследованию фекалий собак на наличие трематод в Западно-Казахстанской области. Описторхоз был обнаружен вдоль реки Большой Узень (село Дарьинск), правый берег реки Урал (село Январцево, Трекино), левый берег реки Урал (село имени Габита Мусрепова), экстенсивность инвазии (ЭИ) 96,4, 96,5, 96,6, 93,1%, соответственно. При неполном гельминтологическом вскрытий собак в поселке Дарьинск ЭИ составила 87,5%, в поселке Рубежка – 71,4%, в Январцево – 80%, в село имени Габита Мусрепова – 88,9%, в Трекино – 90%. При исследовании кошек Западно-Казахстанской области на Ириклинском и Кумакском водохранилищах заражение кошек возбудителями описторхоза составила от 2 до 200 экземпляров. В прибрежных поселках реки Урал в среднем ЭИ заражения кошек описторхозом составляет 97,9% [81].

Для Восточно-Казахстанской области характерен природный очаг распространения описторхоза. При исследовании кошек на наличие возбудителей семейства *Opisthorchiidae* личинки описторхоза были выявлены в Аксуском, Актогайском, Павловдарской, Щербактинской, Майских районах. В Павловдарской области показатель зараженности кошек в два раза выше, чем у собак. ЭИ плотоядных равна 5,7% [77, p. 01024].

Для Северо-Казахстанской области характерен природно-очаговый тип описторхоза. Максимальное количество положительных реакций на описторхоз регистрировалось с 2011 по 2014 год. Уровень заболеваемости составлял 5,2 случаев на 100 тыс. человек (данные 2020 года) [82]. В 2021 году в Северо-Казахстанской области было зарегистрировано 29 случаев заражения и с 2021 года наблюдалось снижение заражения описторхозом людей.

Высокий уровень заболеваемости описторхозом среди людей наблюдается в Шал-Акинском, Кызылжарском, Айыртауском районе, г. Петропавловск, низкий уровень заболеваемости наблюдается в Акжарском и Уалихановском районе.

Водные бассейны Акмолинской области также относятся к эндемичным по описторхозу территориям. Сидоров Е.Г. в своих исследованиях упоминает речку Камысакты в Акмолинской области как один из очагов описторхоза, где голяны были заражены на 93%, карась – на 11% метацеркариями *O. felineus* [75, с. 3-63].

Толепова Г. и соавторы (2024) при исследовании рыб озер Биртабан-Шалкар на наличие личинок описторхоза выявили высокую зараженность у леща, карася и язя. Также авторы сделали вывод, что мясо зараженной и контрольной рыбы различалось по химическому составу [83].

При исследовании собак на наличие описторхид в Акмолинской области обнаружены возбудители меторхоза и описторхоза. В данном исследовании среди 51 исследуемых образцов у двух собак были обнаружены мариты *M. bilis* [84].

Мало информации об очагах меторхоза в Казахстане. Но имеются сообщения ученых о присутствии возбудителей *M. bilis* в биологическом материале [85]. При этом, очаги заражения меторхоза описаны по всему миру. Например, при исследовании рыб на паразитов в Нижнем Иртыше, меторхи были обнаружены в плавниках, жабрах язя и в жабрах леща. ЭИ язя составила 7,7%, у леща – 33,3% [86]. При исследовании рыб водоемов Новосибирской области 22,1% верховок были инвазированными *M. bilis*. В Томске Иллиных Е.Н. и др. (2006) при изучении людей с диагнозом описторхоз на закономерность кумуляции микроэлементов обнаружили возбудителей меторхоза. В данном исследовании *M. bilis* присутствовал в 15 образцах из 22. Идентификацию трематод проводили при помощи ПЦР-анализа. Ученые отметили, что содержание тяжелых металлов, таких как хром, ртуть, цезий, лантан и кобальт в печени превышает нормы при смешанной инвазии *O. felineus* и *M. bilis* [87].

Таким образом, описторхоз сохраняет статус значимой социально-эпидемиологической проблемы для Республики Казахстан с широкой территориальной распространенностью и неоднородной структурой очагов. Высокая заболеваемость и широкий спектр природных условий, благоприятствующих жизненному циклу паразитов, обуславливают устойчивое функционирование эндемичных зон. Особое внимание следует уделять мониторингу зараженности рыб и дефинитивных хозяев, а также развитию методов ранней диагностики и профилактики заболевания. Кроме того, распространение возбудителей меторхоза, в частности *M. bilis*, указывает на необходимость комплексного подхода к контролю гельминтозов, включая учет смешанных инвазий и экологических факторов, влияющих на эпидемиологию этих паразитарных заболеваний.

1.3 Методы диагностики возбудителей *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*

Видовая диагностика описторхид на личиночной стадии трудоемкий процесс. При исследовании первого промежуточного хозяина на наличие личинок трематод, вскрывают гепатопанкреас моллюска и просматривают под микроскопом. Затем готовят препарат, фиксируют жидкостью Шаудина, окрашивают гематоксилином Бомера и водным раствором эозина. Сейчас в научной литературе встречаются работы, где мирацидиев в теле моллюска исследуют при помощи молекулярных методов.

Диагностику рыбы на наличие личинок семейства описторхид проводят компрессорным методом в соответствии с требованиями стандарта СТ РК 2779-2015 «Продукты пищевые. Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их переработки». Данный способ отличается высокой трудоемкостью и требует участия квалифицированного специалиста, поскольку морфологическая дифференциация метацеркарий *O. felineus* и *M. bilis* нередко вызывает затруднения. В связи с этим применение ПЦР-теста при исследовании карповых рыб на наличие личинок трематод представляется целесообразным и позволяет повысить точность и эффективность традиционных диагностических методов [88].

Клинические проявления описторхоза у дефинитивного хозяина отличаются разнообразием специфических признаков инвазии, поэтому необходимо проводить дифференциальную диагностику с целым рядом заболеваний. Хронический описторхоз следует дифференцировать от хронического гастрита, гастродуоденита, язвенной болезни, холангита и панкреатита [89]. Острая стадия инвазии описторхоза схожа с псевдамфиломозом и другими трематодозами, трихинеллезом, вирусным гепатитом и другими трематодозами. Крайне важно корректно проводить межвидовую и внутривидовую дифференциальную диагностику паразитарных заболеваний. Разные виды представителей семейства *Opisthochiidae* локализуются в разных органах окончательного хозяина. Если учесть тот факт, что основной акцент лечения возбудителей направлен на изгнание описторхид из гепатобилиарной системы, то важно дифференцировать видовую принадлежность описторхид для корректных работ по дегельминтизации.

В настоящее время доступны три основных подхода для диагностики описторхид у окончательного хозяина: прямая паразитологическая диагностика, иммунодиагностика и молекулярные методы диагностики.

Основные методы при прямой паразитологической диагностике описторхид – копроовоскопия и дуоденальное зондирование [90, 91]. Диагностический алгоритм описторхоза начинается от мер по определению яиц описторхид в кале – копроовоскопии, который является базовым методом диагностики во всех странах мира [92]. Есть несколько методов разновидностей копроовоскопии: Като и Миура, Като-Кац, седиментация, формалин-эфирное осаждение с применением одноразовых концентратов, флотация. Като-Кац широко используется при диагностике описторхоза в странах Юго-Восточной

Азии, седиментация преимущественно применяется в Италии. Однако копровооскопия имеет ряд недостатков, что приводит к ложноотрицательному результату. Получение ложноотрицательного результата возможно вследствие цикличности яйцепродукции гельминтов, а также из-за неравномерного распределения яиц в содержимом толстой кишки [93].

Также на практике широко используются методы выявления яиц описторхид в желчи посредством дуоденального зондирования. При дуоденальном зондировании порции «В» и «С» центрифугируются, впоследствии осадок и нативный мазок микроскопируются. При дуоденальном зондировании основная масса описторхид вместе с направлением тока желчи поступает в желчный пузырь, и только небольшое количество яиц попадает в кишечник.

Хотя вышеуказанные методы являются базовыми методами при диагностике описторхоза, следует отметить, что на конкретные виды трематод, на основе морфологии яиц ставить диагноз сложно из-за схожести морфологических признаков яиц *O. felinus* и *M. bilis*. На точность диагноза прямыми паразитологическими методами влияет тот факт, что яйца в кале у окончательного хозяина при описторхозе не появляются в течение 28 дней, в желчи после 4-12 недель заражения. Механические препятствия на пути продвижения желчи из печени также препятствуют выделению яиц паразита в кал. Также при низкой интенсивности инвазии паразитов (количество яиц на 1 грамм фекалий) вероятность обнаружения яиц описторхид не велика. Правила отбора проб, доставка в лабораторию, хранение и сбор в консервант также влияет на эффективность лабораторных исследований посредством прямых паразитологических методов [94].

Паразитарная инвазия описторхид вызывает иммунные нарушения в организме дефинитивного хозяина, поэтому одним из распространенных методов диагностики описторхид является иммунодиагностика. При инфицировании хозяина описторхидами появляется гуморальный иммунный ответ, и синтезируются антитела классов *IgG*, *IgA*, *IgE*. После лечения празиквантелом в течение года уровень вышеперечисленных иммуноглобулинов остается повышенным, что свидетельствует либо о длительной иммунной памяти, либо об остаточном материале паразита. При повторном заражении повышается уровень антитела *IgG*, однако иммунная система не может предотвратить повторное заражение описторхидами. Тегумент описторхид вызывает угнетение иммунной системы при повторном инфицировании.

Jittimane J. и соавторы (2007) исследовали экспрессию мРНК цитокинов *TGF-β*, *IL-12*, *IFN-γ*, *IL-4* и *IL-10* в селезенке, печени и мезентериальных лимфатических узлах (MLN) хомячков, которые были заражены метацеркариями *O. viverrini*. В результате было обнаружено, что уровень *TGF-β* в MLN был в 15 раз выше по сравнению с контролем. Высокий уровень *TGF-β* способствует *O. viverrini* в угнетении иммунной системы. Экспрессия *IL-12* наблюдалась на второй неделе. Повышенное содержание *IL-12* в организме хомячков привело к воспалению селезенки и печени. Уровень цитокинов *IFN-γ*

остался без изменения. Значительное увеличение экспрессии цитокинов *IL-4* и *IL-10* наблюдалось на шестой неделе [95].

Иммунологическая диагностика включает такие серологические реакции, как реакция непрямой гемагглютинации, иммуноферментный анализ (ИФА), внутрикожные тесты, определение копроантигена и антител к паразиту в биологическом материале. На практике использование ИФА преобладает среди всех вышеперечисленных методов. Красавцев Е.Л. и соавторы (2022) при исследовании распространения описторхоза среди населения Республики Беларусь использовали антитела класса *IgG* к антигенам *O. felineus* [96].

При острой форме описторхидной инвазии применяется иммуноферментный анализ, который основан на использовании антигенов и антител [97]. Однако вышеуказанный метод имеет высокую диагностическую ценность только при острой форме описторхоза, тогда как при хроническом описторхозе иммунный ответ к описторхидам возникает только в 70% случаев заражения. Основными ограничениями иммуноферментного анализа является особенность выработки иммунной реакции. Например, в очагах описторхоза у местных жителей появляется врожденная иммунологическая толерантность супрессорного типа. Чувствительность и специфичность иммунодиагностики снижает возможность связывания антигенов с секреторными иммуноглобулинами.

При перекрестной реакции антигенное сходство описторха и меторха препятствует дифференциации двух возбудителей, что приводит к ложноположительному результату [98]. Поэтому ученые заняты поиском антигена с сильным гуморальным ответом.

Также иммунологические методы диагностики описторхозов не эффективны при противопаразитарной терапии, поскольку приобретенный иммунный ответ к возбудителям остается на протяжении длительного периода времени даже после дегильментизации [99].

Развитие молекулярных методов дает возможность применить молекулярные маркеры для идентификации видов семейства *Opisthorchiidae*. Метод ПЦР-диагностики характеризуется высокой чувствительностью, даже при низком уровне инвазии и на ранних стадиях болезни, поскольку идентифицирует до 1 копии ДНК описторхид в исследуемом образце. Основа ПЦР-теста – специфичные праймеры. Праймеры, используемые в целях диагностики, ставят перед собой основную задачу – выявление специфического фрагмента ДНК в геноме. Правильно проведенный дизайн праймеров влияет на специфичность всего ПЦР-теста. При проведении работ по дизайну праймера нужно учитывать такие параметры как, оптимальная температура отжига, умеренное содержания *G* и *C*. Также нужно избегать появления вторичных структур со спаренными концевыми 3'-нуклеотидами (самодимеризация, межпраймерные димеры, шпильки).

Особое значение при разработке праймеров придают их 3'-концевым участкам, поскольку именно с этого конца *Taq*-полимеразы иницирует синтез комплементарной цепи ДНК. Недостаточная специфичность праймеров может приводить к образованию неспецифических ампликонов, которые, с одной

стороны, способны интерпретироваться как ложноположительный результат, а с другой – потребляют компоненты реакционной смеси, снижая чувствительность ПЦР. Кроме того, праймеры не должны формировать димеры и шпилечные структуры (петли), то есть устойчивые двуцепочечные участки в процессе отжига. Важным критерием при их дизайне является выбор участка связывания: область отжига должна располагаться вне зон мутаций, делеций и участков видовой либо иной вариабельности. Попадание праймера в такие регионы препятствует его эффективному связыванию с матрицей, что может привести к получению ложноотрицательного результата.

Основные этапы конструирования праймеров включают следующие шаги:

1) в базе аннотированных нуклеотидных последовательностей *GenBank National Center for Biotechnology Information (NCBI, США)* осуществляют поиск последовательностей целевых генов исследуемых организмов (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Для выявления гомологичных участков используют метод глобального попарного выравнивания (*global pairwise alignment*) с применением онлайн-сервиса *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>);

2) определение консервативных участков, общих для всех выявленных последовательностей, а также вариабельных и уникальных регионов, характерных для отдельных изолятов, проводят с использованием глобального множественного выравнивания (*global multiple alignment*). При выборе праймеров учитывают следующие параметры: предполагаемую длину ампликона, температуру отжига, нуклеотидный состав и равномерность распределения оснований по длине праймера, его протяженность, а также вероятность образования вторичных структур (шпилек) и праймер-димеров;

3) проверка отобранных праймерных последовательностей на специфичность отжига (аффинность). Несмотря на то что праймеры могут быть уникальными по отношению к определенной последовательности ДНК, существует вероятность их связывания с неспецифическими участками генома, не относящимися к целевому гену. В связи с этим необходимо убедиться, что выбранные праймеры комплементарны исключительно последовательностям исследуемого гена и не образуют неспецифических продуктов амплификации.

Видоспецифические праймеры бывают гнездовыми, полугнездовыми, амплификационно-резистентными, предназначенными для реально-временной ПЦР.

Принцип гнездовой ПЦР в одной пробирке (*nested end-point assay, one-tube*) основан на температурном разграничении последовательных этапов амплификации. В данном случае используют две пары праймеров и разную температуру отжига. Первый этап проводится при высокой температуре, где отжигаются только наружные праймеры. На втором этапе гнездовой ПЦР активируются внутренние праймеры при более низкой температуре, благодаря чему вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта, полученного на первом этапе реакции.

Подбор праймеров для гнездовой ПЦР проводился с учетом следующих критериев:

- праймеры должны располагаться в высококонсервативных участках генома;
- наружная пара праймеров ограничивать фрагмент длиной 300 п.н., что обеспечивает возможность выбора подходящей внутренней пары праймеров;
- температуры отжига наружной и внутренней пары должны существенно различаться, чтобы обеспечить разделение первого и второго этапов амплификации;
- праймеры должны демонстрировать высокую эффективность работы для максимальной чувствительности реакции.

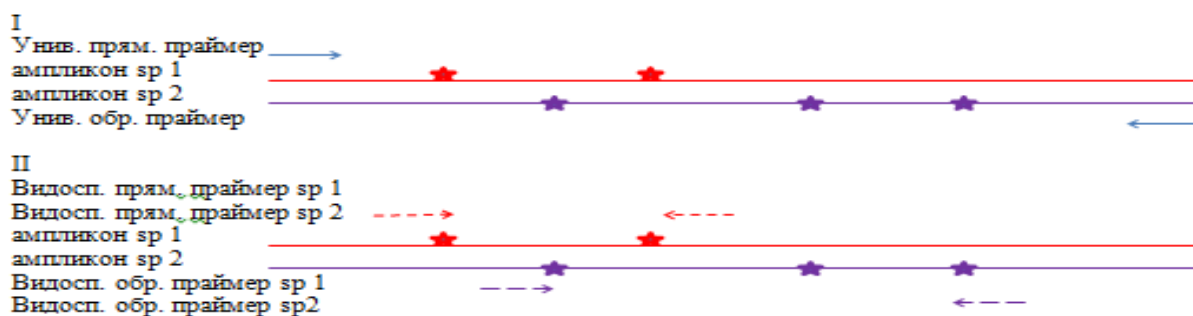


Рисунок 3 – Принцип работы гнездовых праймеров

В соответствии с рисунком 3, приведена схема работы гнездовой ПЦР.

Разработка ПЦР с применением полугнездовых праймеров (*semi-nested, end-point assay*) позволяет проводить амплификацию нуклеиновых кислот также без необходимости переноса ампликона из первой стадии ПЦР во вторую реакционную пробирку с вложенными праймерами, что снижает как вероятность загрязнения, так и время анализа (рисунок 4).

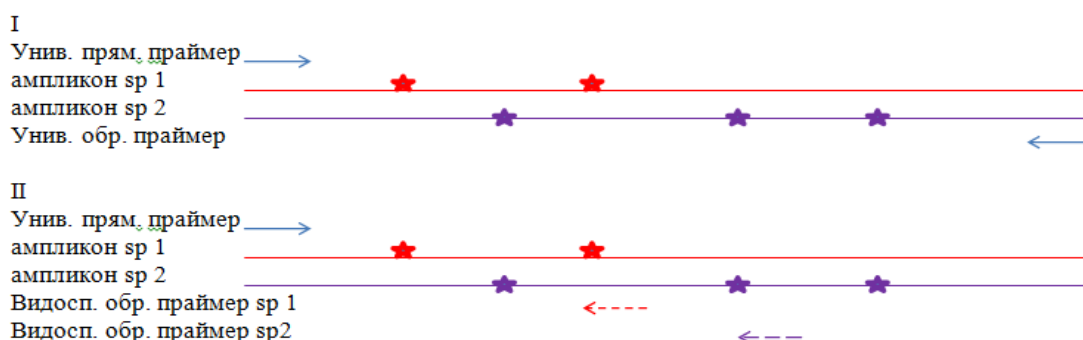


Рисунок 4 – Схема работы полугнездовых праймеров

Метод *ARMS* (*amplification refractory mutation system, end-point assay*) основан на неспособности термостабильной *Taq*-полимеразы амплифицировать участок ДНК при наличии несовпадения (*mismatch*) между матричной ДНК и 3'-концом одного из праймеров.

Суть метода *ARMS* заключается в одновременном проведении двух ПЦР: в каждой реакции одним из праймеров выступает аллель-специфическая последовательность – либо мутантная, либо нормальная. Вторым праймером

для обеих реакций выбирают один и тот же олигонуклеотид, что обеспечивает амплификацию участков ДНК одинаковой длины.

Мутантный сайт в аллель-специфических праймерах размещен ближе к 3'-концу, обычно на предпоследней позиции, а не в центре. При определенных условиях, ключевым из которых является концентрация ионов магния в растворе, наличие несовпадения в 3'-участке праймера блокирует инициацию синтеза ДНК. На рисунке 5 представлена схема работы амплификационно-резистентных праймеров.

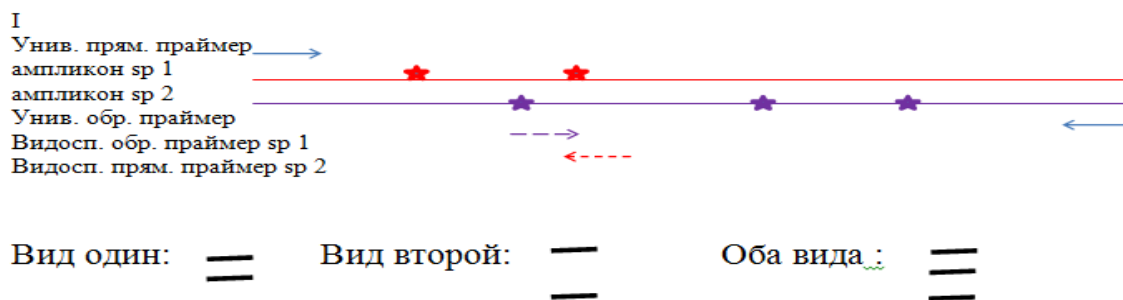


Рисунок 5 – Принцип работы амплификационно-резистентных праймеров

ПЦР в реальном времени (*real-time assay; one-tube, close-tube*) обеспечивает количественное измерение амплификационного продукта на каждом цикле реакции с использованием флуоресцентных меток. Методы *real-time* ПЦР подразделяют на две основные группы в зависимости от способа генерации сигнала репортера флюоресценции:

1) использование интеркалирующих флуоресцентных агентов, интенсивность которых существенно увеличивается при связывании с двухцепочечной ДНК. Наиболее часто в качестве интеркалирующего красителя применяют *SYBR Green*;

2) применение олигонуклеотидных зондов, меченых флуоресцентными агентами и комплементарных определенным участкам ПЦР-продукта. К числу таких протоколов относятся *TaqMan*, *Molecular Beacons* и *LightCycler*.

Программы для разработки праймеров доступны как в виде бесплатных веб-сервисов, так и в виде дистрибутивов, которые можно получить у разработчиков или загрузить с соответствующих сайтов. Некоторые из них распространяются через коммерческие источники. С увеличением объема информации о нуклеотидных последовательностях отдельных генов и целых геномов обязательным этапом подбора праймеров стала проверка их специфичности с помощью программы *BLAST*, что позволяет минимизировать риск образования неспецифических продуктов ПЦР. На данный момент имеется не так много инструментов для дизайна и анализа праймеров, которые были бы одновременно простыми в использовании и общедоступными. Одним из таких инструментов является онлайн-ресурс *Primer-BLAST (Nucleotide Blast)*. Его преимуществом являются информативность, наглядность и свободный доступ к актуальной информации баз данных.

При разработке праймеров часто используют программу *Primer Express* (*Applied Biosystems*), в которой задают температуру плавления в диапазоне 58-60°C. Однако эта программа применяет очень строгие критерии подбора, из-за чего нередко не удается найти ни одной подходящей пары для заданной последовательности. Точные результаты можно также получить с помощью программы *Vector NTI*, однако целесообразно использовать только те праймеры, которым программа присваивает максимальный рейтинг – при стандартных условиях поиска он равен 171.

При проведении ПЦР-анализа существенное значение имеет выбор молекулярного маркера. В нашем исследовании в качестве таких маркеров использовались кластеры генов рибосомальных РНК и митохондриальные гены. У эукариот гены рибосомальных РНК организованы в виде кластеров, расположенные группами на разных хромосомах. Каждый кластер включает три рибосомальных гена, которые разделены промежуточными участками, называемыми спейсерами. Структура кластера генов рРНК состоит из транскрибируемой области, внутренних транскрибируемых спейсеров и фланкирующих внешних транскрибируемых спейсеров (рисунок 6).

Некодирующая последовательность *ITS* сильно отличается у близкородственных организмов, поэтому используется для классификации паразитов на уровне рода, вида и подвида. Ядерный ген рибосомальной 5.8S РНК образует полную область транскрибируемых внутренних спейсеров вместе с молекулярными маркерами *ITS1* и *ITS2*. Данная область генома используется для изучения видов дигенетических сосальщиков [100].



Рисунок 6 – Рибосомальный кластер

Также митохондриальные гены являются одними из наиболее часто используемых маркеров при молекулярной идентификации видов семейства *Opisthorchiidae*. Преимуществом применения в исследованиях *COX1* и *COX3* является высокая степень мутирования, которая позволяет дифференцировать близкородственные виды.

Использование этих участков генома обеспечивает быструю и высокоточную идентификацию возбудителей семейства *Opisthorchiidae*, даже у особей с практически неразличимыми морфологическими стадиями, такими как яйца паразитов и метацеркарии в мышцах рыбы. В связи с этим в наших исследованиях применялись праймеры к ядерным регионам генов рибосомальных РНК *ITS1* и *ITS2*, а также к митохондриальным генам *COX1* и *COX3*.

Преимущество использования маркеров *ITS* проявляется в том, что транскрибируемая область, гены *18S* и *28S* рРНК, являются консервативными. Данное явление позволяет использовать универсальные праймеры. Также в

молекулярных маркерах *ITS* присутствует до 30000 копий, что облегчает процесс амплификации маркерного гена.

Использование генов рибосомных РНК при проведении ПЦР-анализа имеет ряд преимуществ: 1) высокая копияность в клетке (до 500 копий); 2) есть процесс изогенизации, т.е. размножение всех копий из небольшого числа копий; 3) есть высококонсервативные районы рибосомных РНК, подходящие для разработки универсальных праймеров; 4) между ними расположены более переменные участки (*ITS*), содержащие много замен, подходящих для разработки видоспецифичных праймеров. Однако есть и недостатки: в случае гомоплазии использование *ITS* последовательности в качестве молекулярного маркера являются неэффективными.

Благодаря относительно небольшой длине митохондриальные геномы стали одними из перспективных объектов исследований генетического разнообразия биологических объектов: 1) высокая копияность в клетке; 2) более высокие темпы мутирования; 3) гаплоидность (исключение – гетероплазмия). Кодированные последовательности митохондриального генома отличаются от таковых в универсальной ядерной ДНК. Например, в митохондриальном геноме кодон *AUA* кодирует метионин (в то время как в ядерной ДНК он соответствует изолейцину), а кодон *UGA* кодирует триптофан.

Чувствительность и специфичность ПЦР зависит от генетического маркера. В настоящее время при конструировании ПЦР-теста используют такие генетические маркеры, как транскрибируемый спейсер *ITS1*, *ITS2*, микросателлиты и ретропозоны. Маркерные участки *COX1* и *28S* позволяют дифференцировать возбудитель от других видов *Metorchis spp.*, в то время как при использовании последовательностей *ITS1* и *ITS2* наблюдаются перекрестные реакции между *M. ussuriensis*, *M. bilis* и *M. xanthosomus* [69, p. 23700].

Главным преимуществом ПЦР является отсутствие перекрестных реакций, возможность обнаружить микст-инвазию в одной пробирке и исследовать большое количество образцов в одно время. Также ПЦР позволяет обнаружить возбудителей описторхозов на разных стадиях развития, включая метацеркарии, обитающие в рыбах семейства карповых [101, 102]. Например, Caffara M. и соавторы (2017) разработали ПЦР-тест на основе праймеров митохондриального гена *COX1* и предложили данный метод для идентификации метацеркарий *O. felineus* на пробах из филе рыбы [42, p. 98-99]. Катохин А.В. (2023) и Сербина Е.А. (2022) в своих исследованиях использовали генетический маркер *ITS2* для дифференциации церкарий *O. felineus* и *M. bilis* [103, 104].

Молекулярные методы диагностики применяются в странах Восточной и Юго-Восточной Азии, Италии и Германии. В нашей стране ПЦР-тест используется только в научных целях, хотя внедрение ПЦР в ветеринарную и медицинскую практику улучшит диагностику описторхоза и позволит определить видовую принадлежность паразита на любой жизненной стадии [105].

Проведенный анализ современных подходов к диагностике описторхозов показывает, что традиционные паразитологические и иммунологические методы, несмотря на их широкое применение и нормативную закреплённость, обладают рядом существенных ограничений. Морфологическая диагностика личиночных стадий описторхид у промежуточных хозяев (моллюсков и рыб) является трудоёмкой, требует высокой квалификации специалиста и не всегда обеспечивает надёжную видовую дифференциацию, особенно между *O. felineus* и *M. bilis*. Аналогичные трудности возникают и при прямой паразитологической диагностике у окончательного хозяина, где схожесть морфологических признаков яиц, позднее появление яиц в биологических субстратах, низкая интенсивность инвазии и влияние условий отбора и хранения проб снижают чувствительность методов и приводят к ложноотрицательным результатам. Иммунологические методы диагностики, в частности ИФА, обладают высокой диагностической значимостью преимущественно в острой фазе инвазии, однако при хроническом описторхозе их чувствительность и специфичность существенно снижаются. В условиях указанных ограничений молекулярно-генетические методы, прежде всего ПЦР-диагностика, представляются наиболее перспективным и информативным инструментом для идентификации возбудителей семейства *Opisthorchiidae*. ПЦР характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, возможностью выявления минимальных количеств ДНК паразита, обнаружения микст-инвазий и диагностики описторхид на любых стадиях жизненного цикла, включая яйца и метацеркарии. Эффективность ПЦР-теста в значительной степени определяется правильным выбором молекулярного маркера и корректным дизайном праймеров. Использование рибосомальных маркеров (*ITS1*, *ITS2*) и митохондриальных генов (*COX1*, *COX3*) позволяет сочетать высокую чувствительность с возможностью видовой дифференциации, однако для близкородственных видов *Metorchis spp.* наибольшую диагностическую ценность имеют митохондриальные и консервативные ядерные маркеры, обеспечивающие минимизацию перекрестных реакций.

Таким образом, внедрение ПЦР-диагностики в практику ветеринарно-санитарной экспертизы и клинической диагностики описторхозов является обоснованным и необходимым этапом совершенствования системы эпизоотологического и эпидемиологического надзора. Применение молекулярных методов позволит повысить точность видовой идентификации возбудителей, оптимизировать лечебно-профилактические мероприятия и обеспечить более эффективный контроль описторхозов на всех этапах их жизненного цикла.

1.4 Состояние генетических исследований представителей семейства *Opisthorchiidae*

На сегодняшний день в базе данных *NCBI* зарегистрировано 286 белка и 390 нуклеотидных последовательностей *O. felineus*. Геном описторха расшифрован полностью, размер ядерного гена составляет 684 миллиона пар

оснований [106]. В ядерном геноме *O. felineus* насчитывается 11 455 кодирующих белков [107]. Метацеркарии *O. felineus* транскрибируют гены домашнего хозяйства такие, как рибосомные белки, белки теплового шока и убиквитин [108].

Митохондриальный геном *O. felineus* был расшифрован двумя методами: методом капиллярного электрофореза и параллельного пиросеквенирования. В базе данных *NCBI* описано 12 митохондриальных генов: *ATD6*, *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6*, *COX1*, *COX2*, *COX3*, *CYTB* [109].

Митохондриальный геном описторха представляет собой кольцевую молекулу ДНК длиной 14 277 нт с 35 генами, кодирующими 2 рРНК, 22 тРНК и 12 белков, включая 3 *COX*, семь субъединиц *NADH*-дегидрогеназы, цитохром Б и субъединицу 6 АТФ синтетазы. Нужно отметить, что среди всех трематод митохондриальный геном *O. felineus* является самым коротким, где 19 тРНК из 22 имеют типичную структуру в виде клеверного листа с четырьмя плечами. Метод параллельного пиросеквенирования выявил 45 случаев полиморфизма в митохондриальном геноме [69, р. 23700]. Исследования по экспрессии микроРНК у *O. felineus* обнаружили *MiR-281* у взрослых особей и яиц. *MiR-7* была обнаружена у метацеркарий. Данные области генома являются консервативными и экспрессия определенных микроРНК может служить маркером холангиокарциномы [110].

Была создана библиотека кДНК мариты *C. sinensis*, включающая 220 генов, распределенных по семи функциональным группам: энергетический метаболизм; экспрессия генов и метаболизм РНК; регуляторные и сигнальные компоненты; белковый метаболизм и сортировка; структура и цитоскелет; мембранные транспортеры; антигенные белки. Экспрессия генов *Cu/Zn*-супероксиддисмутаза и глутатион-S-трансфераза обеспечивают защиту клонорха от иммунных эффекторных механизмов хозяина [69, р. 23700]. При культивировании взрослых форм *C. sinensis* с эпителиальными клетками эмбриональной почки человека *HEK293* клонорхи индуцировали пролиферацию клеток *HEK293*, связанную с активацией циклина Е и фактора транскрипции *E2F1*. Кроме того, продукты *C. sinensis* усиливают фосфорилирование pRB [110, р. 111636].

В базе данных *NCBI* зарегистрировано 36 генов, 49 белков, 56 нуклеотидных последовательностей *M. bilis*. Молекулярно-генетические данные, позволяющие описать полный геном *M. bilis* ограничены. Однако есть работы, по идентификации и дифференциации видов *Metorchis*, где в качестве маркера использовали последовательности *ITS*, *COX*, ген *18S* рРНК и *NAD*.

Зятьков С.А. (2019) и соавторы для определения межвидового взаимоотношения между *Metorchis spp.* использовали ядерный локус *ITS2* и митохондриальную ДНК *COX1* и *NAD1* [74, с. 4-296].

Wang Y. и соавторы (2020) для определения видовой принадлежности паразита у черного лебедя использовал *ITS*-последовательность и выяснили, что паразит относится к *M. orientalis* [97, р. 7-11].

Pauly A. и соавторы (2003) оценивали молекулярно-генетическую изменчивость *O. felineus* и *M. bilis* и разрабатывали ПЦР-метод для их

дифференциации с помощью видоспецифических праймеров. Эти праймеры позволяли амплифицировать фрагменты митохондриального гена *COX1*, различая оба вида по электрофоретической подвижности специфических ПЦР-продуктов [111].

Ряд авторов создали специфические описторхидные праймеры для генетического маркера *ITS2* из ядерного рибосомального гена и показали возможность селективной амплификации ДНК нескольких видов *Opisthorchiidae*, включая *O. felineus*, *C. sinensis*, *O. viverrini*, *M. xanthosomus* и *P. truncatum* [112].

Есть работы, в которых маркер *ITS2* использовался для дифференциальной ПЦР-диагностики *O. felineus* и *M. bilis* в биологических образцах пациентов с описторхозом и меторхозом [113]. Кроме того, опубликованы исследования, где *ITS2* применялся для разработки ПЦР в реальном времени с использованием зонда *TaqMan* для выявления *O. felineus* и *M. bilis* [114].

Kang S. и соавторы (2008) использовали генетический маркер *ITS1* из ядерного рибосомального гена для идентификации и различия видов *O. viverrini*, *O. felineus* и *M. bilis*. На основе видоспецифических различий в структуре *ITS1* был предложен метод дифференциальной ПЦР-диагностики [115].

При исследовании митохондриальных последовательности генов *COX1* и *nad1* метацеркарий было выявлено два подвида *O. viverrini*: один обнаружен преимущественно у людей-хозяев («человеческая» популяция), а другой преимущественно у кошек («кошачья» популяция). При морфологическом исследовании метацеркарии этих двух видов у «кошачьего» вида – эллиптической формы, а «человеческой» – овальной формы [116].

Геном *O. viverrini* представлен шестью парами хромосом и характеризуется низким содержанием высокоповторяющихся последовательностью ДНК. В геноме паразита идентифицирован ген *Ov-GRN-1*, кодируемый открытой рамкой считывания – *ORF*, который обладает пролиферативной активностью и играет ключевую роль в индукции холангиокарциномы у инфицированного хозяина.

Vania A. и соавторы (2024) при исследовании митохондриальных последовательностей генов *COX1* и *NAD1* выявили две популяции *O. viverrini*. Метацеркарии *O. viverrini* из змееголовой рыбы обеспечивает еще один путь заражения для кошек и людей. При морфологическом сравнении яиц у «специфической для кошек» популяции они были узкие, а взрослые особи – короткие и широкие [117].

Małeckis A. и соавторы (2024) в своих исследованиях культивировали взрослых червей *O. viverrini* с фибробластами мышцы *NIH-3T3*. Несмотря на то, что черви и фибробласты были разделены мембраной, пролиферация фибробластов мышцы была более чем в 4 раза больше. Продукты жизнедеятельности *O. viverrini* стимулировали экспрессию фосфорилированного белка ретинобластомы (*pRB*) и циклина *D1*, ключевых

белков, ведущих клетки через точку перехода *G1/S* клеточного цикла. Это приводило к индукции перехода клеток в *S*-фазу клеточного цикла [118].

Таким образом, в настоящее время накоплен обширный массив молекулярно-генетических данных о возбудителях описторхоза и меторхоза. Это позволяет не только более точно определять видовую принадлежность паразитов с использованием специфических генетических маркеров, таких как *ITS2*, *COX1*, но и изучать их популяционную структуру, биологические особенности и молекулярные механизмы патогенеза. Разработка и внедрение современных методов ПЦР-диагностики, включая применение видоспецифических праймеров и флуоресцентных зондов, открывает новые возможности для раннего и дифференциального выявления представителей семейства *Opisthorchiidae* в клинических и природных образцах, что имеет важное значение для эпидемиологии, профилактики и лечения описторхоза и меторхоза.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнялась в Научно-исследовательской платформе сельскохозяйственной биотехнологии НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени С. Сейфуллина» в рамках проекта AP05131132 «ПЦР-тест для детекции и дифференциальной диагностики возбудителей описторхоза и меторхоза» на 2018-2020 годах, финансируемого МОН РК и проекта «Провести молекулярно-генетический скрининг импортируемой рыбы и рыбной продукции на зараженность паразитами и разработать рекомендации по их обеззараживанию» научно-технической программы BR22885795 «Повышение уровня безопасности пищевых продуктов» на 2024-2026 годы, финансируемой МСХ РК.

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования для проведения экспериментальных работ послужила рыба семейства карповых следующих видов: язь (396), лещ (134), плотва (379), карась (50), линь (10), сазан (1). Рыба была выловлена из озер и рек следующих районов: Коргалжынский район (озера Шолак, Есей, Каражар, Биртабан, Шалкар, реки Нура и Куланотпес), Аккольский район (озеро Камышное), Целиноградский район (Майбалык и Ишим), Аршалинский район (озеро Байдал), и Зерендинский район (река Чаглинка). Метацеркарии возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*, а также нуклеотидные последовательности ДНК изучаемых видов трематод.

Все научные протокола и ход исследования были одобрены на заседании Этической комиссии факультета Ветеринарии и технологии животноводства, протокол №1 от 11 сентября 2017 г.

2.1.1 Материалы исследования

- компрессории МИС-7М на 28 проб, размер 220×50×56 мм, ячейка 13x11 мм, толщина пластины 6 мм (Лаборкомплект, РФ);
- разделительная воронка грушевидной формы с поршнем PTFE (Китай);
- искусственный желудочный сок: концентрированная соляная кислота 0,5% (Снабтехмет, РФ), пепсин (*Mieto Sangyo*, Япония), натрий хлорид (Химпром, РФ);
- фенол-хлороформ-изоамиловый спирт (25:24:1) стабилизированный, насыщенный, с 1000 мМ Tris-EDTA, pH 8,05 (*UltraPure; Fisher Scientific, Ирландия*);
- экстрагирующий буфер 50 мМ Tris-HCL pH 8,0, 100 мМ NaCl, 10 мМ EDTA, 0,5% NP40;
- *Proteinase K* >600 U/mL (~20 mg/mL), 0,05 mg/mL, pH 7,5-8,0 (*Thermo Scientific, США*);
- NaCl 0,5%, 100 мл (Macklin Inc., Китай);
- изопропанол (Синтез Ацетон, РФ);
- бромистый этидий 5 г (*Millipore, Sigma-Aldrich, ФРГ*);
- маркер *GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder* (*Thermo Scientific, США*);

- Агароза (*Biotechnology Grade*, США);
- ДНК-полимераза 50 мкл, 5 ед/мкл (*AmpliTaq*, *Thermo Scientific*, США);
- *dNTP* 2 мМ (*Thermo Scientific*, США).

Буферные системы:

- щелочная фосфатаза *SAP* (*shrimp alkaline phosphatase*) 1 U/мкл, *Tris-HCl* 25 мМ, *MgCl* 5 мМ, глицерол 50%, pH 7,6 (*GRiSP*, Португалия);
- экстрагирующий буфер: *трис-HCl* (pH 7,5) – 200 мМ, *NaCl* – 250 мМ, *EDTA* – 25 мМ, лаурилсульфат или додецилсульфат натрия (*SDS*) – 0,5%;
- *EDTA* (pH 8,0) 0,5 М: H_2O – 70 мл, *EDTA* – 14,6 г. pH 8,0;
- *трис-HCl* 1 М буфер: H_2O – 70 мл, трис – 12,1 г, *HCl* конц. – 8 мл, доводим дистиллированной водой до требуемого значения pH;
- буфер TE: *трис-HCl* 1 М (pH 8,0) – 1 мл, *EDTA* 0,5 М (pH 8,0) – 20 мкл, вода бидистиллированная или *milli Q* – до 100 мл;
- TAE буфер (*Tris Acetate-EDTA buffer*) 10× concentrate, не стерильно, 0,4 *Tris Acetate*, 0,01 *EDTA*, 0,2 μм, pH 8,3 (*Thermo Scientific*, США);
- 1× буфер ПЦР-буфер: (100 мМ *Trис-HCl*, pH 8,3, 500 мМ *KCl*, 15 мМ *MgCl*₂, 0,01% (*GeneAmp*, *Thermo Scientific*, США).

Праймеры для идентификации описторхид:

- ядерная область рибосомальной ДНК *ITS1*: *Forward* 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3', *Reverse* 5'-ACACGAGCCGAGTGATCC-3' [87, p. 37-39];
- ядерная область рибосомальной ДНК *ITS2*: *ITS2exF Forward* 5'-GAACATCGACATCTTGAACG-3', *ITS2exR Reverse* 5'-GGAACGACCTGAACACCA-3' [118], p. e62453;
- митохондриальный ген *COX1*: *Forward* (5'-GGGTTTGGAATGATTAGTC-3'), *Reverse* (5'-CACAGAGGCAGAAAGAACT-3') [119];
- митохондриальный ген *COX3*: *Forward* (5'-ATATTTATGGGGATTGTGAATT-3'), *Reverse* (5'-AGCCCGAAGTATAGACAACA-3') [115, p. 191-196].

Авторские праймеры для идентификации возбудителя *O. felinus*:

- ядерная область рибосомальной ДНК *ITS1*: *OF-spec-F Forward* (5'-TGGCATGATTTCCCCACGCA-3'), *OF-spec-R Reverse* (5'-GCATTGCCAACAAGTGGAGCC-3');
- митохондриальный ген *COX1*: *CO1nOf-F Forward* (5'-TTGGAATGATTAGTCATGTTTGTACG-3'), *CO1nOf-R Reverse* (5'-CCCCACCTATAGTAAAAAGCACTAT-3').

Авторские праймеры для идентификации возбудителя *M. bilis*:

- ядерная область рибосомальной ДНК *ITS1*: *MB-spec-F* (5'-TGGCATGATTTCCCCGCACG-3'), *MB-spec-R* (5'-CGCGCACATACACAACAATAAG -3');
- митохондриальный ген *COX1*: *COInMb-F* (5'-TGTTAATATTGCCGGGGTTTG-3'), *COInMb-R* (5'-TTTATCCCAGTAGGAACACCTATAAC-3').

2.1.2 Методы исследования

Компрессорный метод

Для проведения паразитологического исследования рыбы на наличие возбудителей описторхоза и меторхоза в мышцах рыбы был применен компрессорный метод. При проведении исследования рыбы с помощью скальпеля с одного бока под спинным плавником удаляли чешую, после чего выполняли разрез кожи в двух направлениях. Первые два разреза проводили спереди и сзади спинного плавника, перпендикулярно продольной оси тела до боковой линии, а третий разрез выполняли от концов предыдущих надрезов вдоль боковой линии в сторону хвостового плавника. Край кожи поднимали пинцетом и аккуратно препарировали, оставляя подкожную клетчатку на поверхности мышц. С обеих сторон рыбы отбирали по 8 образцов из спинной и 8 из брюшной части мышц, срезая верхний слой толщиной 0,2-0,5 см. Полученные срезы размещали на нижнем стекле компрессора МИС-7М («Лаборкомплект, РФ»), накрывали верхним стеклом и фиксировали винтами. Затем все кусочки мышц одной рыбы просматривали под малым увеличением микроскопа (*Micros, Austria*) [120].

Метод переваривания в искусственном желудочном соке

Работу проводили по общепринятому методу [121]. Искусственный желудочный сок готовили следующим образом: 11 мл концентрированной соляной кислоты, 7 г пепсина и 9 г хлорида натрия растворяли в 1 литре воды. Мышечную ткань рыбы вместе с подкожной жировой клетчаткой отделяли от костей и измельчали ножом. Навески по 10 г помещали в стеклянные стаканы и заливали искусственным желудочным соком в соотношении 1:10. Образцы затем помещали на магнитную мешалку с подогревом до 36-37°C. После достижения кашеобразной консистенции материал фильтровали через разделительную воронку объемом 500 мл. Верхний слой желудочного сока удаляли, а осевшие метацеркарии переносили в чашку Петри. Подсчет личинок осуществляли с использованием инвертированного микроскопа. Для облегчения подсчета в содержимое чашки добавляли физиологический раствор.

Морфологическая идентификация метацеркарий описторхид

Для идентификации метацеркарий трематод использовали морфологические признаки, сопоставляя их с данными классических атласов и определителей, таких как «*Keys to the Trematodes*» [122], «*Atlas of Digenea developmental stages*» [123] а также региональных руководств по паразитологии. В процессе работы применялись ключи и иллюстрации из научных публикаций и электронных баз данных, что позволило провести точную морфологическую диагностику изучаемых метацеркарий.

Метацеркарии, выделенные из мышц рыб компрессорным методом и методом переваривания в искусственном желудочном соке, хранили в 70% этиловом спирте при -20°C для проведения дальнейших молекулярных исследований.

Выделение ДНК

ДНК из метацеркарий была выделена фенол-хлороформным методом, с предварительной обработкой исследуемых образцов экстрагирующим буфером

(50 mM *Tris-HCl* pH 8,0, 100 mM *NaCl*, 10 mM *EDTA*, 0,5% *NP40*) и *Proteinase K*. Инкубацию проводили в термоблоке (*BioSan*, Латвия) при 55°C в течение 2 часов. Каждые 15 минут реакционную смесь перемешивали с помощью вортекса (*BioSan*, Латвия).

Количество выделенной ДНК измеряли на спектрофотометре *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*, США) по оптической плотности раствора при длинах волн 260, 280, 235 нм.

Метод постановки ПЦР

Амплификацию экстрагированной ДНК из метацеркарий возбудителей семейства *Opisthorchiidae* проводили в реакционной смеси объемом 25 µl. Состав реакционной смеси был следующий: *Buffer* ×10, *MgCl₂* (1,5 mM), *dNTP* (10 mM), *Primer ITS1 F*, *Primer ITS1 R*, *Taq polymerase*, *MQ-water*, *Matrix DNA*. Программа постановки ПЦР: денатурация 95°C – 5 мин; отжиг 35 циклов: 95°C – 40 сек, 56°C – 40 сек, 72°C – 50 сек; элонгация 72°C – 5 мин. В качестве отрицательного контроля (К-) в реакционную смесь добавляли *MQ-water*.

Очистка ПЦР-продукта

ПЦР продукты очищали от остатков олигонуклеотидов методом дефосфолирования с помощью щелочной фосфатазы *SAP* (*shrimp alkaline phosphatase*) и эндонуклеазы. Полученную смесь добавляли к каждому ПЦР-продукту и помещали в термоциклер при условиях 37°C на 30 мин, 85°C на 15 мин, 4°C. Пробоподготовку к секвенированию проводили методом осаждения спирто-ацетатной смесью.

Секвенирование

Секвенирование ПЦР-продуктов проводили методом Сэнгера с применением набора *BigDye Terminator* (*Applied Biosystems*, *Thermo Fisher Scientific*, США) в соответствии с инструкциями производителя. Для реакции использовались те же праймеры, что и для ПЦР. 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: к пробе добавляли 28 мкл 3 М ацетата натрия (pH 5,2), закрывали плашку пленкой и выдерживали в темноте 20 минут. Затем центрифугировали при 3800 об/мин в течение 42 минут. Жидкость осторожно удаляли, не переворачивая плашку, после чего ее размещали на салфетке и центрифугировали при 200 об/мин. Далее в каждую лунку добавляли 160 мкл 70% спирта и повторно центрифугировали при 3800 об/мин 10 минут. После удаления спирта плашку снова центрифугировали при 200 об/мин 2 минуты. Очищенные ПЦР-продукты переносили в секвенатор для расшифровки ДНК, а полученные последовательности обрабатывали и сохраняли в базе данных *NCBI*.

Биоинформатический анализ, дизайн и синтез праймеров

Для поиска гомологичных последовательностей использовали программы серии *BLAST*, представленные на сервере www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. 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*. Специфичность разработанных праймеров проверяли на *Nucleotide Blast* (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). 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*.

Определение чувствительности и специфичности, разработанной тест-системы ПЦР

Для амплификации рибосомальной области гена *ITS2* была использована ДНК *O. felineus* и *M. bilis*. ДНК *O. felineus* тестировали с праймерами *OF-spec-F/R* и ДНК *M. bilis* – с праймерами *MB-spec-F/R*, чтобы исключить перекрестную реакцию между праймерами и неспецифической ДНК. Праймеры были протестированы с применением ДНК выделенного от язя, второго промежуточного хозяина описторхид, различных видов метацеркарий, обнаруженных у рыб, а также с использованием ДНК лисы (окончательный хозяин), а также разнообразных видов гельминтов, паразитирующих у рыбоядных и плотоядных животных.

Чувствительность праймеров *OF-spec-F/R* и *MB-spec-F/R* проверяли путем последующего разведения ДНК *O. felineus* и *M. bilis* в реакционном объеме 25 мкл: 20 нг, 10 нг, 8 нг, 6 нг, 4 нг, 2 нг и 1 нг. Каждое разведение тестировали с соответствующей парой праймеров.

Для проверки специфичности праймеров *CO1nOf-F/R* и *CO1nMb-F/R* праймеры тестировали с ДНК *O. felineus* и *M. bilis* вместе и по отдельности. Мультиплексная ПЦР была оптимизирована путем изменения отдельных параметров при сохранении других параметров. Условия ПЦР были оптимизированы с учетом температуры отжига праймеров (56, 58, 60, 62, 64, 66°C), концентрации *dNTP* (0,05-0,5 мМ) и активности *Taq* ДНК-полимеразы (1,0, 1,5, 2,0, 2,5 и 5,0 единиц). В 1 мкл матричной ДНК содержалось около 15 нг геномной ДНК. Чувствительность мультиплексного ПЦР-анализа оценивали также с использованием метода десятикратных серийных разведений.

Специфичность мультиплексной ПЦР проверяли на геномной ДНК распространенных паразитов кишечника человека (*Taenia spp.*, *Toxocara spp.*, *Trichinella spp.*) и на ДНК бактерий, обнаруженных в желчном пузыре (*E. coli*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*)

Статистические методы исследований

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 по формуле (1):

$$E_{ij} = \frac{R_i * C_j}{N} \quad (1)$$

где R_i – сумма признаков;

C_j – сумма количественных признаков;

N – общее число наблюдений.

Для оценки различий в уровне зараженности рыб метацеркариями между районами Акмолинской области применяли критерии сравнения качественных признаков – точный критерий Фишера. Для расчета была сформирована таблица сопряженности 2×2 (таблица 1).

Таблица 1 – Формула точного критерия Фишера

Группы	Заражено	Незаражено	Всего
1	a	b	a+b
2	c	d	c+d
Всего	a+c	b+d	n

Вероятность конкретного распределения при нулевой гипотезе рассчитывается по формуле (2):

$$P = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{a!b!c!d!n!} \quad (2)$$

где a – число зараженных в первой группе;

b – число незараженных в первой группе;

c – число зараженных во второй группе;

d – число незараженных во второй группе;

$n = a + b + c + d$.

Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$. Дополнительно рассчитывали отношение шансов (*Odds Ratio*):

$$OR = \frac{a*d}{b*c} \quad (3)$$

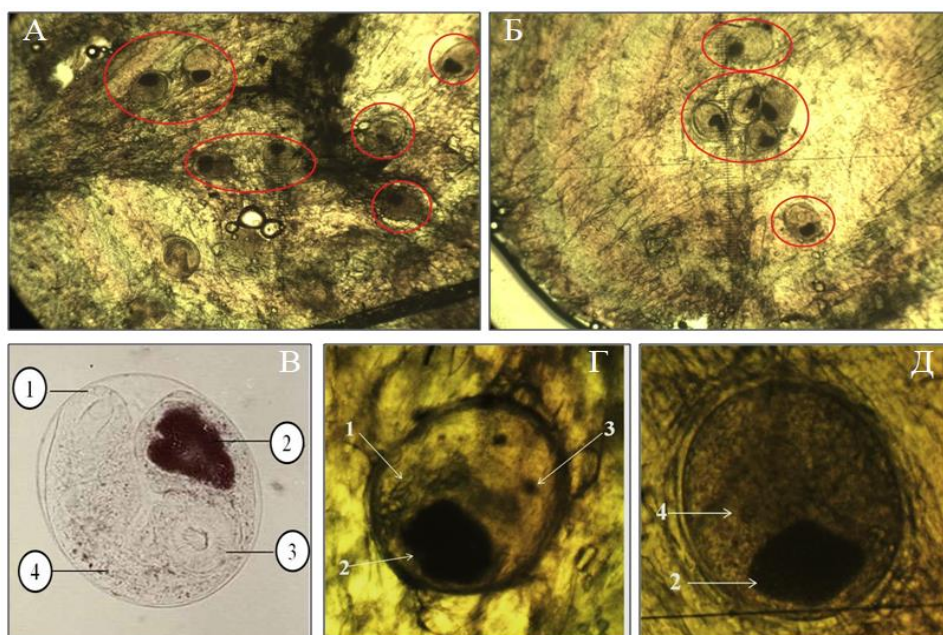
2.2 Результаты собственных исследований

2.2.1 Ветеринарно-санитарная экспертиза рыбы на наличие возбудителей семейства *Opisthorchiidae*

Исследование рыбы на наличие паразитов является неотъемлемой частью ветеринарно-санитарной экспертизы. На территории нашей республики регистрируется целый ряд паразитарных болезней, наиболее опасной среди них является описторхоз. В ходе исследований рыба из водоемов Акмолинской области (Коргалжынский, Аршалынский, Целиноградский, Астраханский и Зерендинский районы) изучалась на присутствие возбудителей семейства *Opisthorchiidae*.

Для исследования отбирали шесть видов рыб семейства карповых (язь, лещ, плотва, карась, сазан, линь) в общем количестве 970 экземпляров. Отловленную рыбу исследовали методом компрессии. Компрессионные

препараты рассматривали под микроскопом. В ходе исследований были обнаружены метацеркарии семейства *Opisthorchiidae*. Зрелые метацеркарии представляют собой овальные цисты, внутри которых личинка гельминта находится в согнутом положении (рисунок 7).



А, Б – метацеркарии описторхид при увеличении $\times 20$; В – внешний вид метацеркарии описторха согласно определителя атласа¹; Г, Д – исследуемые образцы описторхид при увеличении $\times 40$; 1 – кишечник, 2 – экскреторный пузырь, 3 – ротовая присоска, 4 – брюшная присоска

Рисунок 7 – Личинки описторхид, выделенные из мышц рыб

Примечание – ¹- Составлено по источнику [82, с. 53-54]

Как видно из рисунка 7, метацеркарии, выделенные из мышц рыбы Акмолинской области, имеют двуслойную, тонкую, прозрачную оболочку. Личинка находится в цисте в изогнутом положении. Внутренняя оболочка метацеркарии по всему периметру равномерно прилегает к наружной части. Экскреторный пузырь крупный, заполненный гранулами черного цвета и занимает до 1/3 длины тела личинки. Развилки кишечника расположены на равном расстоянии от переднего конца тела и брюшной присоски. Размеры метацеркарий варьировались от 0,17-0,21 мм до 0,34-0,43 мм. Указанные морфологические признаки соответствуют литературным данным [25, р. 332]. Количество исследованной рыбы приведено в таблице 1.

Таблица 2 – Видовой состав и результаты паразитологического исследования рыбы на наличие метацеркарий семейства *Opisthorchiidae*

Место вылова рыбы	Название водоема	Вид рыбы	Всего исследовано, шт.	Зараженные рыбы, шт.	ЭИ, %
Коргалжынский район	озеро Шолак	язь	160	53	33,1

		лещ	107	4	3,7
		плотва	363	22	6,06
всего			630	79	12,5
Коргалжынский район	озеро Есей	язь	41	3	7,3
		плотва	12	-	0
		карась	13	-	0
		лещ	1	-	0
всего			67	3	4,4
Коргалжынский район	озеро Каражар	язь	96	-	0
		карась	14	-	0
		лещ	10	-	0
всего			120	0	0
Коргалжынский район	озеро Биртабан	карась	6	-	0
всего			6	0	0
Коргалжынский район	Река Нура	язь	9	2	22,2
		лещ	6	-	0
		плотва	1	-	0
		карась	10	-	0
		сазан	1	-	0
всего			27	2	7,4
Коргалжынский район	озеро Шалкар	язь	10	2	20
		плотва	3	-	0
всего			13	2	15,3
Коргалжынский район	река Куланотпес	язь	4	1	25
всего			4	1	25
Аккольский район	озеро Камышное	карась	7	-	0
всего			7	0	0
Целиноградский район	озеро Майбалык	лещ	10	-	0
всего			10	0	0
Целиноградский район	Река Ишим	язь	34	-	0
всего			34	0	0
Аршалинский район	Озеро Байдал	линь	10	-	0
всего			10	0	0
Зерендинский район	Река Чаглинка	язь	42	3	7,1
всего			42	3	7,1
Итого			970	90	9,2

На прилавки рынка города Астана основная масса рыбы поступает из водоемов Коргалжынского района Акмолинской области. Всего было исследовано 867 особей рыб различных видов из озер Шолак, Есей, Каражар, Биртабан, Шалкар, Куланотпес и реки Нура.

При исследовании карповых видов рыб озера Шолак ЭИ язя составила 33,1%, леща 3,7%, плотвы 6,06%. Из озера Есей было исследовано 67 образцов

рыбы, где личинки описторхид обнаружены только у язя (ЭИ 7,3%). В мышцах карася и леща возбудителей описторхид не обнаружено.

Результаты исследования рыбы из озера Каражар (язь, карась, лещ) показали, что из 120 особей исследуемой рыбы ни у одной рыбы возбудителей описторхоза обнаружено не было. Такая же ситуация на озере Биртабан. Из озера Шалкар были отловлены язь и плотва, где только мышцы язя были поражены метацеркариями описторхид (ЭИ 15,3%). При исследовании реки Куланотпес язь также был поражен личинками семейства *Opisthorchiidae* (ЭИ 25%). Из реки Нура были отловлены язь, лещ, плотва, карась и сазан, где также только в мышцах язя были найдены описторхиды (ЭИ 22,2%).

Личинки описторхид в мышцах карася на озере Камышное Аккольского района не обнаружены.

В Целиноградском районе была исследована рыба, отловленная из озера Майбалык и реки Ишим. При исследовании язей, лещей и карасей, отловленных из Целиноградского района, метацеркарии описторхид не найдены.

В Аршалинском районе из озера Байдал был отловлен линь, в образцах которого возбудителей семейства *Opisthorchiidae* не выявлены. В Зерендинском районе из реки Чаглинка были отловлены особи язя, где в 3-х исследуемых образцах рыбы были выявлены личинки описторхид (ЭИ 7,1%).

При сравнении зараженности рыб метацеркариями между районами Акмолинской области с использованием критерия χ^2 Пирсона ($df=4$) статистически значимых различий выявлено не было ($\chi^2=6,936$; $p=0,140$), поскольку расчетное значение критерия не превышало критическое при уровне значимости $p < 0,05$ ($\chi^2_{0,05}=9,488$).

В связи с наличием нулевых значений в ряде выборок дополнительно был применен точный критерий Фишера, который выявил статистически значимые различия между Коргалжынским районом и остальными районами области ($P=0,017$).

Установлено, что уровень зараженности рыбы в Коргажинском районе статистически значимо выше по сравнению с другими районами Акмолинской области. Дополнительная оценка величины эффекта с использованием отношения шансов показала, что вероятность заражения рыбы в Коргалжынском районе была в 3,67 раза выше, чем в остальных районах области.

С целью подтверждения жизнеспособности выявленных метацеркариев и оценки их инвазионного потенциала были проведены работы по перевариванию мышц рыбы в искусственном желудочном соке (рисунок 8).



А – повреждение оболочки метацеркария; Б – миграция личинки из цисты; В – инкапсулированная личинка трематод

Рисунок 8 – Иллюстрация этапов определения жизнеспособности личиночной стадии трематод семейства *Opisthorchiidae*

На рисунке 8 представлен этап полного выхода личинки семейства *Opisthorchiidae* из метацеркария, который занимает 25-30 секунд. Процесс эксцистирования метацеркарий в искусственном желудочном соке достигал до 98%. Отсутствие двигательной активности в течение 50 минут, а также изменение цвета метацеркарии, служат признаками ее нежизнеспособности.

Таким образом, проведенные исследования подтвердили наличие жизнеспособных метацеркариев трематод семейства *Opisthorchiidae* в рыбе семейства карповых водоемов Акмолинской области, особенно в Коргалжинском районе, что указывает на высокий инвазионный потенциал и реальную угрозу для здоровья человека. В ходе работы была создана коллекция ДНК возбудителей описторхоза и меторхоза, выделенных из исследованных образцов, что представляет ценность для дальнейших молекулярно-генетических и эпизоотологических исследований. Полученные данные подчеркивают важность регулярного проведения ветеринарно-санитарной экспертизы рыбы, направленной на выявление и исключение зараженности продукции с целью профилактики описторхоза/меторхоза и обеспечения санитарной безопасности населения.

2.2.2 Создание коллекции ДНК возбудителей *O. felinus* и *M. bilis*

Схема создания коллекции ДНК состоит из 7 основных этапов, которые представлены на рисунке 9.

При проведении работ по извлечению метацеркарий из мышц рыбы было отобрано 200 экземпляров личинок описторхидозов. Из данных исследованных образцов были выделены ДНК фенол-хлороформным методом.

Концентрацию ДНК исследуемых образцов определяли с использованием спектрофотометра *NanoDrop 2000*. Коэффициент поглощения при длинах волн 260 и 280 нм был в пределах 1,8-2,0 нм, что свидетельствует об отсутствии РНК и чистоте исследуемых образцов. Концентрация ДНК варьировала от 4,7 до 10 нг/мкл.

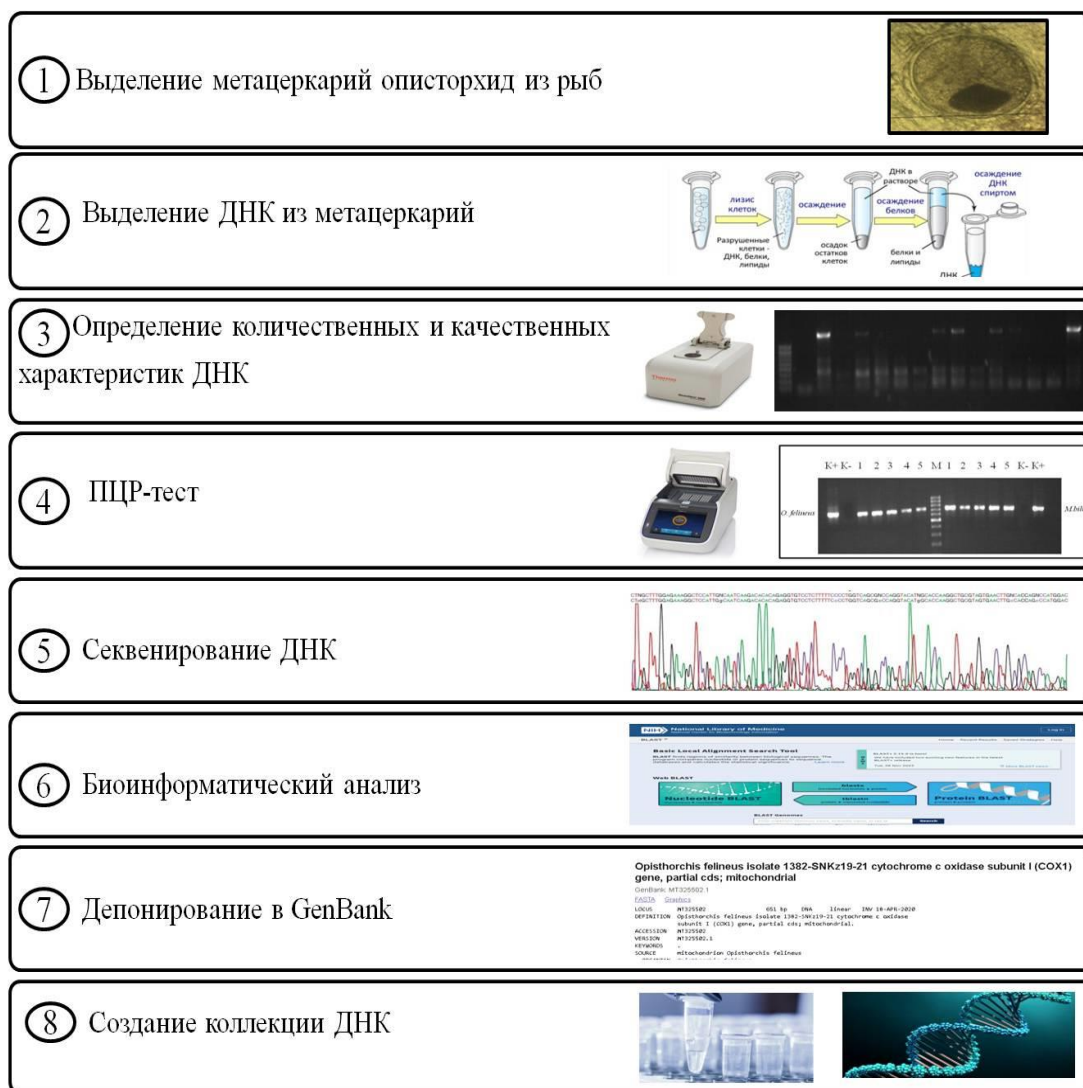
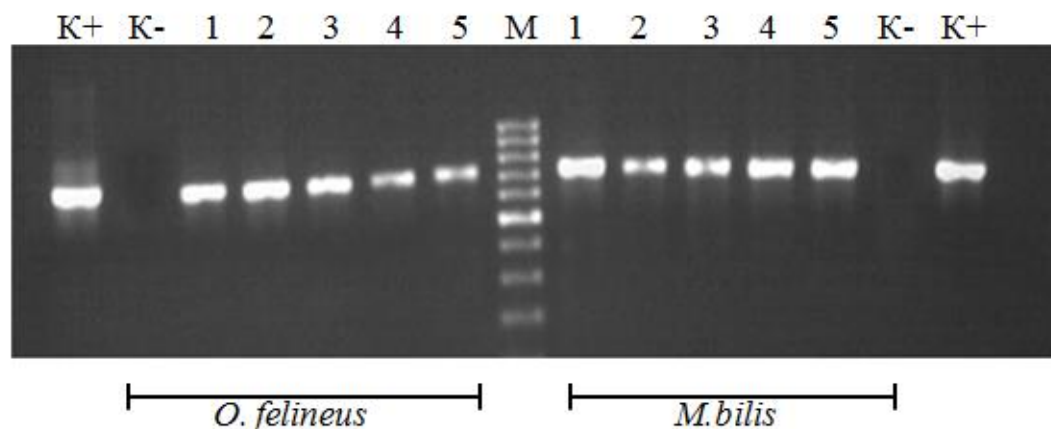


Рисунок 9 – Схема создания коллекции ДНК возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*

Из сформированной коллекции ДНК *O. felineus* и *M. bilis* для оптимизации условий ПЦР с видоспецифичными праймерами было отобрано по 5 образцов каждого вида. В работе использовали праймеры, направленные на ядерные участки рибосомной ДНК (*ITS1*, *ITS2*), а также на митохондриальные гены *COX1* и *COX3*.

Фрагменты рДНК 18S, 5.8S и 28S, включая межтранскрибируемые спейсеры *ITS*, широко применяются для дифференциации близкородственных видов. Анализ этих геномных регионов обеспечивает быструю и высокоточную идентификацию представителей семейства *Opisthorchiidae*, в том числе на морфологически сходных стадиях жизненного цикла, таких как яйца паразитов и метацеркарии, локализованные в мышечной ткани рыб.

Продукты ПЦР визуализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (EtBr). Результаты амплификации с использованием видоспецифичных праймеров к *ITS1* представлены на рисунке 10.

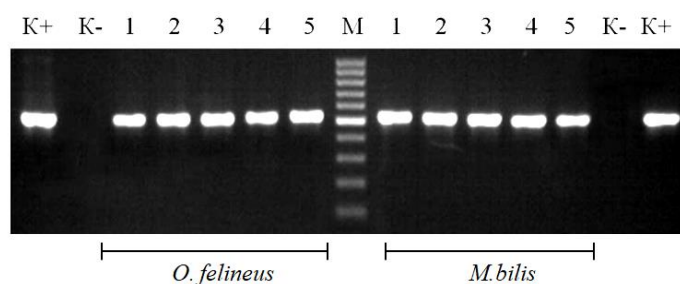


«K+» – *O.felineus*/*M. bilis*; «K-» – отрицательный контроль; «1-5» – исследуемые образцы; «M» – ДНК маркер

Рисунок 10 – Результаты амплификации ДНК метацеркарий описторхид при использовании видоспецифичного праймера *ITS1*

Электрофореграмма, представленная на рисунке 10, демонстрирует, что при амплификации с использованием праймера *ITS1* формируются продукты размером около 644 пар нуклеотидов. Во всех исследуемых образцах выявлены специфические ампликоны, сопоставимых по молекулярной массе с продуктами амплификации положительного контроля. В отрицательном контроле амплификация отсутствует, что подтверждает отсутствие контаминации.

Эксперимент был продолжен с праймером *ITS2*, результаты которого представлены на рисунке 11.

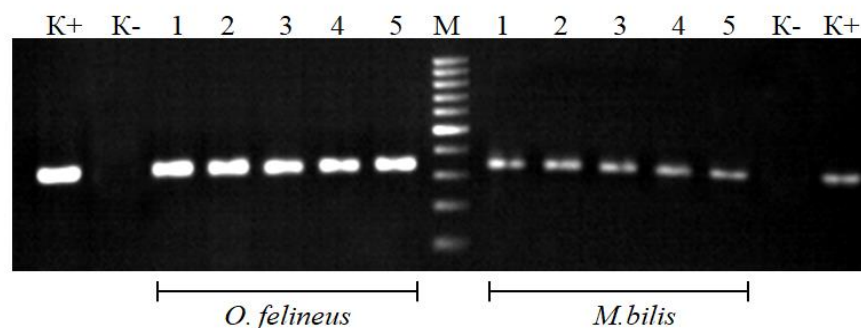


«K+» – *O.felineus*/*M. bilis*; «K-» – отрицательный контроль; «1-5» – исследуемые образцы; «M» – ДНК маркер

Рисунок 11 – Электрофоретический анализ продуктов ПЦР, полученных с использованием праймера *ITS2*

Согласно данным, представленным на рисунке 11, при использовании праймера *ITS2* в ходе ПЦР-анализа формируются ампликоны размером 525 п.н. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные образцы ДНК, выделенные из метацеркарий, принадлежат представителям семейства *Opisthorchiidae*, в частности *O. felinus* и *M. bilis*.

Фрагмент митохондриального гена *COX* широко используется в штрих-кодировании ДНК из-за высокой частоты мутаций, позволяющей различать виды. При исследовании последовательности ДНК с праймерами *COX1* были получены следующие результаты (рисунок 12).

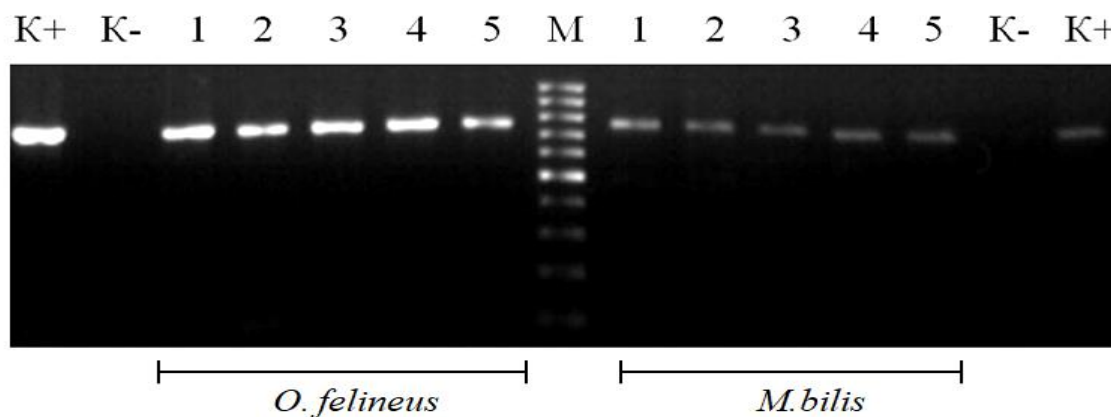


«K+» – *O. felineus*/*M. bilis*; «K-» – отрицательный контроль; «1-5» – исследуемые образцы; «M» – ДНК маркер

Рисунок 12 – Результаты ПЦР с праймером *COX1*

Проведение ПЦР с использованием праймеров к гену *COX1* обеспечило получение ампликонов размером 312 п.н., что согласуется с литературными данными [106, р. 399].

Результаты амплификации образцов с праймерами *COX3* представлены на рисунке 13.



«K+» – *O. felineus*/*M. bilis*; «K-» – отрицательный контроль; «1-5» – исследуемые образцы; «M» – ДНК маркер

Рисунок 13 – Электрофореграмма ПЦР-продуктов при применении праймера *COX3*

ПЦР с использованием праймеров к гену *COX3* обеспечила получение ампликонов размером 750 п.н., что соответствует ранее опубликованным данным [107, р. 383-389].

Таким образом, в ходе проведенных исследований были получены фрагменты ДНК возбудителей *O. felineus* и *M. bilis* с применением четырех

видоспецифичных пар праймеров. Полученные ПЦР-продукты, амплифицированные с использованием праймеров *ITS1*, *ITS2*, *COX1* и *COX3*, были направлены на определение нуклеотидной последовательностей.

Таблица 3 – Характеристика нуклеотидных последовательностей *O. felineus*, определенных по маркерам *ITS1*, *ITS2*, *COX1*, *COX3*

Название маркера	Нуклеотидная последовательность	Номер в базе <i>GenBank</i>	% соответствия
<i>ITS1</i>	AGTACACAAAGCCCAAACACCTCAGTTAATCTGAGA ATTTGGCACGGGTCGTCA TGCCCGTTGGTCTTGCAGCCTTGTCTGCCTAGGGCGG AGCGATTCTAGTTCCGTCATCTGTCTTGCAGCATTGT CTGCCTAGG GCGGAGCGATCCTAGTTCCGTCATATTCTACATGTAT AGACATACATGCTGCAGC GTTGTCTGCCTACGGTAGAGCGTTCCTAGTTCTACCA ATTCTGGCTATACCTGGCATATGTACCCAGTATGTG TGCCTACGTACAGTCGCGTTTCGGCAGGGTGCCTAC CCGTCTGATGCTCTTGGTGTGCTCGCTTCCGTTGGTG GCCAGTCCACATTGGGGGTGACGGGATGTGCTGTCA GCATGGACAGTGCTAGGCTTAATGAGTGGGCATGTG TTTCGAGCTACGGCTCACCCACCGCCCTGATGTTGTT GTTTTCAAACCGTTTTTACACTGTTAAAGTGTTTCAGG CTGGCCTGGC	PQ675621	100
<i>ITS2</i>	CTGTCCGAGGGTCGGCTTATAAACTATCACGACGCC CAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCATG ATTTCCCCACGCATTTGTGTGGGGTGCCGGATCTATG GCTTTTCCCAATGTGCCGGACGCAACCATGTCTGG GCTGACTGCCTGGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCG TGGCTCAATTGTTGTTGTTATTGTTGTGAATGTGCGC GCTCCGTTGTTGGTCCTTTGTCTTTGGTTGAGGCTCC AGTGTTGGCAATGCATTTCGATGCAAATCTGTTTTGCA CTTCGGTGCTTAACCTTTCCTGACCTCGGATCAGACGT GATTACCCGCTGAA	PQ669121	100
<i>COX1</i>	CTATTTGGTTATGGTGGTTTGGTGTAGCCATGTTTG CTATAGTTTGTTTGGGTAGTGTGGTTTGAGCTCATCA TATGTTTACTGTAGGATTAGATTTAGGGACTGCTATT TTTTTTAGTTCGGTTACTATGATCATTGGTGTACCTA CAGGGATAAAGGTTTTTTCTTGATTATACATGCTTGC CGGTACTCGAGATCGTCTTTGGGATCCGATTATGTG GTG GATAATCGGATTTATAGTGCTTTTTTACTATAGGTGGG GTTACTGGGATAGTTCTTTCTGCCTCTGTGA	PQ669120	100
<i>COX3</i>	TGACCGTTGGTCTTTTTTGTTTTAAGCT GTTTTGTTGTTGTTTTGGTGATTCGGGAGGTGGTGTT GCAACGTTTGCAGCGGCATACTTCTGCTTTTTGGTTA TTTATAAGGGGGGAGGCTCTTCTTTTTGGTAGGTTGT TTGCGGGGGTGATGTGAGGAGAGGAGTCTGGGACTG GTGTATTGGCTGACGGTTTTGAATTTCTTTTGTGTC ATGCTTTTTGCTGTTGACTTCTTCTGTGACGATGACT GTTTATCATCATTGTTAC	PQ6856 73	100

В соответствии с рисунком 3, идентификацию полученных нуклеотидных последовательностей проводили путем их сопоставления с данными базы *GenBank*.

Анализ данных, приведенных в таблице 3, позволяет заключить, что возбудитель *O. felineus*, выделенный на территории Акмолинской области, по результатам секвенирования рибосомных (*ITS1*, *ITS2*) и митохондриальных (*COX1*, *COX3*) участков генома, а также на основе сравнительного биоинформатического анализа, полностью (100 %) совпадает с соответствующими последовательностями, представленными в базе данных *GenBank*.

На основании полученных нуклеотидных последовательностей, идентифицированных путем сравнения с данными базы *GenBank* (таблица 3), был проведен филогенетический анализ. Для оценки эволюционных взаимоотношений между исследуемыми изолятами и близкородственными видами было построено филогенетическое дерево на основе последовательности гена *ITS1* (рисунок 14).

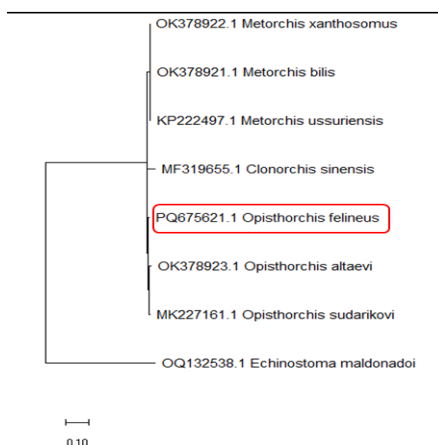


Рисунок 14 – Результат филогенетического анализа полученных последовательностей возбудителя *O. felineus* для маркера *ITS1*

Филогенетическое дерево было построено на основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *ITS1* рибосомной ДНК с целью установления эволюционных взаимоотношений между исследуемым изолятом и близкородственными видами трематод семейства *Opisthorchiidae*. В анализ были включены референтные последовательности представителей родов *Metorchis*, *Clonorchis* и *Opisthorchis*, полученные из базы данных *GenBank*. На дереве выделенный в данном исследовании изолят *O. felineus* PQ675621.1 кластеризуется с последовательностями *O. felineus*, образуя с ними общую монофилетическую кладу. Данное положение указывает на высокую степень генетического сходства исследуемого изолята с референтными образцами *O. felineus* и подтверждает его корректную видовую идентификацию.

Внутри клады *Opisthorchis* изолят PQ675621.1 располагается в непосредственной близости к другим последовательностям *O. felineus*, что

свидетельствует о минимальных нуклеотидных различиях в анализируемом участке *ITS1*.

Представители рода *Metorchis* (*M. xanthosomus*, *M. bilis*, *M. ussuriensis*) формируют отдельную кладу, четко отделенную от группы *Opisthorchis*, что отражает их более удаленные эволюционные связи. *C. sinensis* занимает промежуточное положение между родами *Metorchis* и *Opisthorchis*, подтверждая его самостоятельный таксономический статус внутри семейства. В качестве внешней группы (*outgroup*) использовалась последовательность *Echinostoma macrorchis*, что позволило корректно укоренить филогенетическое дерево и определить направление эволюционной дивергенции исследуемых таксонов.

Масштаб дерева отражает генетические расстояния между последовательностями и указывает на степень их дивергенции.

Таким образом, результаты филогенетического анализа подтверждают принадлежность выделенного изолята PQ675621.1 к виду *O. felineus* и демонстрируют его близкое филогенетическое родство с референтными последовательностями данного вида, что согласуется с данными секвенирования и сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей.

Для подтверждения видовой принадлежности исследуемых образцов был проведен филогенетический анализ на основе нуклеотидной последовательности *ITS2* рибосомальной ДНК. В анализ были включены полученные нами последовательности и референтные последовательности представителей семейства *Opisthorchiidae*, депонированные в базе данных *GenBank*. Построение филогенетического дерева позволило оценить степень генетического сходства и определить положение исследуемого изолята среди близкородственных видов.

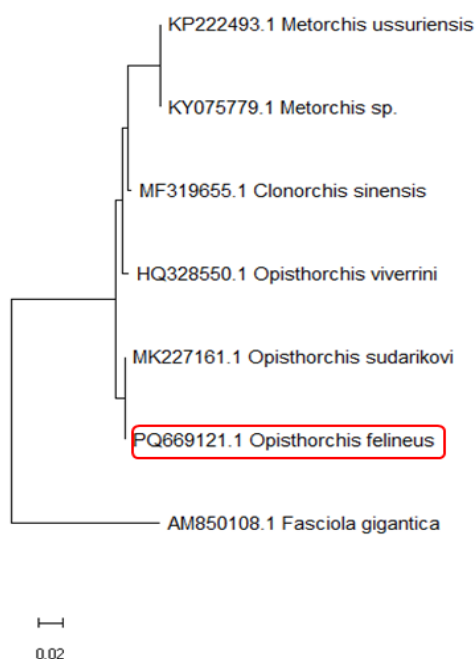


Рисунок 15 – Филогенетический анализ возбудителя *O. felineus* проведенный на основе нуклеотидной последовательности *ITS2*

На рисунке 15 приведены результаты филогенетического анализа нуклеотидной последовательности *ITS2* региона выделенного в данном исследовании изолята *O. felineus ITS2*.

В результате филогенетического анализа установлено, что выделенный в данном исследовании изолят *O. felineus* PQ669121.1 кластеризуется с референтными последовательностями *O. felineus*, представленными в базе данных *GenBank*. На филогенетическом дереве последовательность PQ669121.1 входит в состав клады *Opisthorchis* и располагается в непосредственной близости к эталонным изолятам *O. felineus*, что указывает на высокую степень их генетического сходства.

По сравнению с представителями родов *Metorchis* (*M. ussuriensis*, *Metorchis* sp.) и *C. sinensis*, образующими отдельные и более удаленные клады, последовательность PQ669121.1 демонстрирует значительно меньшие генетические расстояния и короткие длины ветвей, что отражает ее более близкое эволюционное родство с *O. felineus*. Четкое отделение последовательности PQ669121.1 от данных таксонов подтверждает ее видовую принадлежность.

Использование *Fasciola gigantica* в качестве внешней группы позволило корректно укоренить филогенетическое дерево и подтвердить устойчивое филогенетическое положение последовательности PQ669121.1 внутри семейства *Opisthorchiidae*.

Таким образом, сравнительный анализ показал, что полученная в данном исследовании последовательность PQ669121.1 относится к виду *O. felineus* и характеризуется высокой степенью сходства с референтными последовательностями данного вида, что согласуется с результатами молекулярно-генетической идентификации.

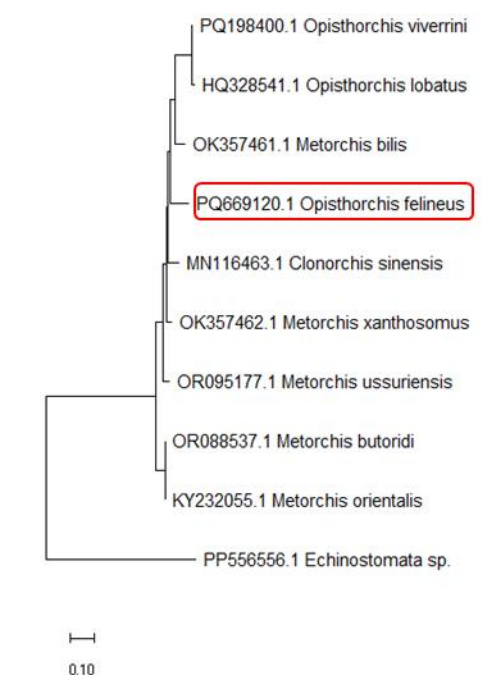


Рисунок 16 – Дерево филогенетических отношений *O. felineus* на основе маркера *COX1*

В соответствии с рисунком 16, аналогичная работа была проделана с полученными нуклеотидными последовательностями *COX1* региона.

В результате филогенетического анализа установлено, что нуклеотидная последовательность PQ669120.1, полученная в ходе секвенирования, кластеризуется с референтными последовательностями *O. felineus*, представленными в базе данных *GenBank*. На филогенетическом дереве последовательность PQ669120.1 располагается в пределах клады *O. felineus* и характеризуется короткой длиной ветви, что указывает на высокую степень генетического сходства с эталонными изолятами данного вида.

В сравнении с представителями родов *Metorchis* и *Clonorchis* последовательность PQ669120.1 демонстрирует значительно большую генетическую близость к роду *Opisthorchis*, четко отделяясь от указанных таксонов. Использование внешней группы позволило корректно укоренить дерево и подтвердить устойчивое филогенетическое положение последовательности PQ669120.1.

Таким образом, результаты сравнительного филогенетического анализа подтверждают принадлежность полученной нами последовательности PQ669120.1 к виду *O. felineus* и согласуются с данными молекулярно-генетической идентификации, полученными при анализе нуклеотидных последовательностей.

В целях подтверждения видовой принадлежности исследуемого изолята PQ685673 был проведен филогенетический анализ на основе нуклеотидной последовательности митохондриального гена *COX3* (рисунок 17).

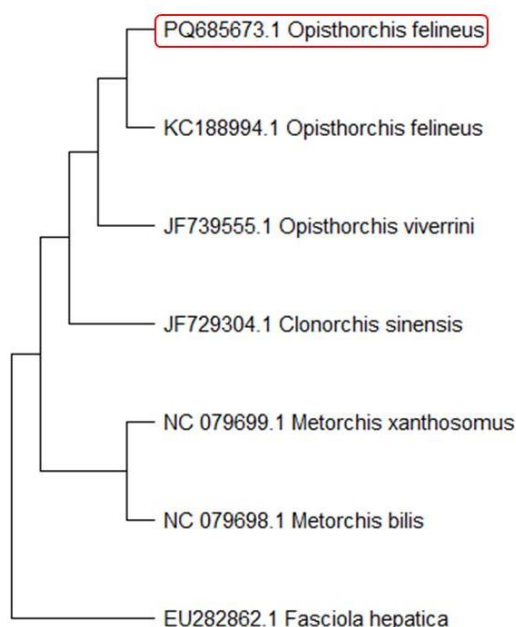


Рисунок 17 – Филогенетическое дерево *O. felineus* на основе анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COX3*

В результате филогенетического анализа, выполненного на основе нуклеотидных *COX3*, было построено дерево с включением референсных

последовательностей представителей семейства *Opisthorchiidae* из базы данных *GenBank*.

Как видно на рисунке, исследуемый изолят (PQ685673.1), выделенный красным цветом, формирует общий кластер с референсной последовательностью *O. felineus* (KC188994.1). Их объединение в одну ветвь свидетельствует о высокой степени генетического сходства и подтверждает видовую принадлежность исследуемого образца к *O. felineus*.

Последовательности *O. viverrini* и *C. sinensis* образуют отдельные ветви в пределах клады *Opisthorchiidae*, тогда как *M. xanthosomus* и *M. bilis* формируют самостоятельную кладу. В качестве аутгруппы использована *Fasciola hepatica*, что обеспечивает корректную укорененность дерева.

Таким образом, положение исследуемого изолята на филогенетическом дереве достоверно подтверждает его идентификацию как *O. felineus*.

Таблица 4 – Характеристика нуклеотидных последовательностей *M. bilis* по маркерам *ITS1*, *ITS2*, *COX1* и *COX3*

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Номер в базе <i>GenBank</i>	% соответствия
1	2	3	4
<i>ITS1</i>	TTGGTCTTGCAGCCTTGACTGCCTAGGGCGGAGCGATTCTAGTTCCGTCATCTATCTTGCAGCATTTGTCTGCCTAGGGCGGAGCGATTATAGTTCCGTCATTTTCCACATGTATAGCCATACATGCTGCAGCGTGGTCTGCCTACGGTGGAGCGTTCCTAGTTCTACCAATTCCTGGCTGTACCTGGCATGTGTACCCAGTATGTGTGCCTACGTACAGTCGCGTTTCGGCAGGGTGCCTACCCGTCTGATGCTCTCGGTGTGCTCGCTTCCGTTGGTGGCCAGTCCACATTGGGGGTGACGGGATGTGCTGTCAGGATGGACAGTGCTAGGCTTAATGAGTGGGCATATGTTTAGAGCTACGGCTCACCCACCGCCCTGATGTTGTGTTTTCAAACCGTTTTACACTGTAAAGTGTTTCAGGCTGGCCTGGCTGGCTTGTCTCACTGCCCCGACATGCACCCGGTGTCTACACTGGACTGCATGTGCAGTCGCCCCGGCGGTGCCTTATCCCGGGTACGACTGATAACGCCTCTTTCATCTG	PQ675620	100
<i>ITS2</i>	CGAGGGTCGGCTTATAAACTATCACGACGCCCCAAAAAGTCGTGGCTTGGGTCTTGCCAGCTGGCATGATTTCCCCGCACGTTTGTGTGGGGTGCCGGA TCTGTGGCTTTTCCCCAATGTGCCGGACGCAACCATGTCTGGGCTGACTGCCTAGATGAGGGGGTGGCGGCGGAGTCGTGGCTCAATTGTTCTTATTGTTGTGTATGTGCGCGCTCCGTTGTTGTTTCCTTTGTCTTTGGTTGAAGCTCCAGTAGTGGCAATGCATTTCGATGC	PQ727653	100

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4
<i>COX1</i>	ACTGGGAAAGATTCTTTATTCGGTTATGGGGGT TTGGTGTTAGCTATGTTTGCTATAGTTTGTGG GTAGCGTGGT TTGGGCGCACCATGTTTACTGTTGGGCTGGA TTTGGGCACTGCTGTTTTTTTTTAGTTCTGTA ACTATGGTTATAGGTGTTCCCTACTGGTATAAAG GTTTTTTCTTGGTTGTATATGCTTGCTGGTACT CGTGATCGTTTTTGAGACCCGATTATGTGGTGG ATAATAGGGTTTGTAGTGCTTTTTACTATAGGG GGGGTTACTGGTATAGTTTTATCTGCTTCTGTG ATTGATGC	PQ669125	100
<i>COX3</i>	ATTGTTGTGGCTGCTCGGGAGGTGGTATTGCAG CGTCTACAGCGGCATATATCTGCTTTTTGACTA TTTCTTGGTGGTGAGGTATTCTTTTTGTTACTC TCTTCTCTGTGGTTACGTGGGGGGAGGAGTCTG GTATTGGTATTGTAGCGGATGGGTCTGAGCTTC CGCTTGTTTCTTGTTTTTTTGCTATTAACCTCT TCTTTG ACCATTAATACTATTTATCATCATAGTTATGGG TTGTATTTTTGGTCGGTTTTTTCTTTGTTTGTCT ATGATTTTAGGATTCCTTTTTATTGTTGTTTCA GGTGTGTGAGTTTTATGGTTCTGGGACGGATTCT TTATCTGTTCTTATTT	PQ685674	100

В соответствии с таблицей 4, нами был проведен аналогичный биоинформатический и филогенетический анализ для выделенного нами возбудителя *M. bilis*, включающий расшифровку и сопоставление ДНК с использованием маркеров *ITS1*, *ITS2*, *COX1*, *COX3*.

Согласно информации, представленной в таблице 4, возбудитель *M. bilis*, выделенный в ходе исследования, по результатам секвенирования рибосомных (*ITS1*, *ITS2*) и митохондриальных (*COX1*, *COX3*) геномных участков и сравнительного биоинформатического анализа полностью совпадает с референсными последовательностями базы данных *GenBank*. Полученные нуклеотидные последовательности были внесены в базу *NCBI*; сведения о регистрационных номерах приведены в (Приложении Д, Е).

На основе этих данных был проведен филогенетический анализ, в ходе которого построено дерево эволюционных взаимоотношений между изучаемыми изолятами и близкородственными видами на основе последовательности гена *ITS1*, представленное на рисунке 18.

В результате филогенетического анализа, проведенного на основе последовательностей маркера *ITS1* с использованием референтных данных *GenBank*, установлено, что полученная в данном исследовании нуклеотидная последовательность PQ657620 кластеризуется с представителями рода *Metorchis*, в частности с референтной последовательностью *M. bilis*. Положение

последовательности PQ657620 на филогенетическом дереве свидетельствует о ее высокой генетической близости к данному виду.

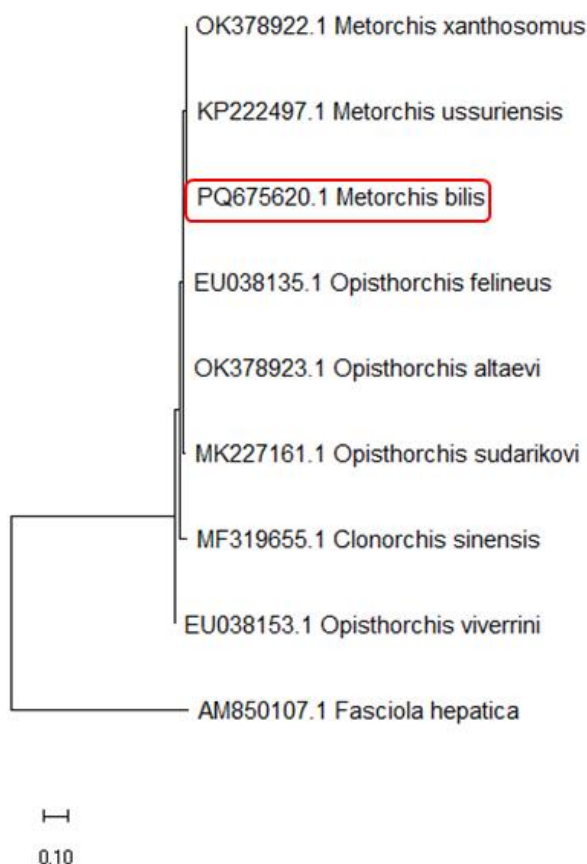


Рисунок 18 – Филогенетический анализ последовательностей *ITS1* региона возбудителя *M. bilis* и близкородственных видов

Последовательность *M. bilis* PQ657620 располагается в одной кладе с изолятами *M. xanthosomus* и *M. ussuriensis*, что указывает на близкие эволюционные взаимоотношения внутри рода *Metorchis*. При этом клада *Metorchis* четко отделена от представителей рода *Opisthorchis* (*O. felineus*, *O. alascensis*, *O. sudarikovi*) и *C. sinensis*, что подтверждает корректность таксономического разделения исследуемых групп.

Использование *Fasciola hepatica* в качестве внешней группы позволило корректно укоренить филогенетическое дерево и определить направление эволюционной дивергенции анализируемых таксонов. Небольшие генетические расстояния между последовательностью PQ657620 и референтными изолятами рода *Metorchis* указывают на низкий уровень нуклеотидной дивергенции в анализируемом участке *ITS1*. Таким образом, результаты филогенетического анализа подтверждают принадлежность полученной нуклеотидной последовательности PQ657620 к роду *Metorchis* и ее близкое родство с видом *M. bilis*, что согласуется с данными секвенирования и сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей.

Также была проведена работа с нуклеотидными последовательностями *M. bilis* с использованием маркеров *ITS2* (рисунок 19).

В результате филогенетического анализа, проведенного на основе нуклеотидных последовательностей маркера *ITS2*, установлено, что полученная в данном исследовании нуклеотидная последовательность *M. bilis* PQ727653 кластеризуется с референтными последовательностями *M. bilis*, представленными в базе данных *GenBank*. На филогенетическом дереве последовательность PQ727653 образует общую кладу с эталонными изолятами данного вида и четко отделяется от представителей родов *Opisthorchis* и *Clonorchis*.

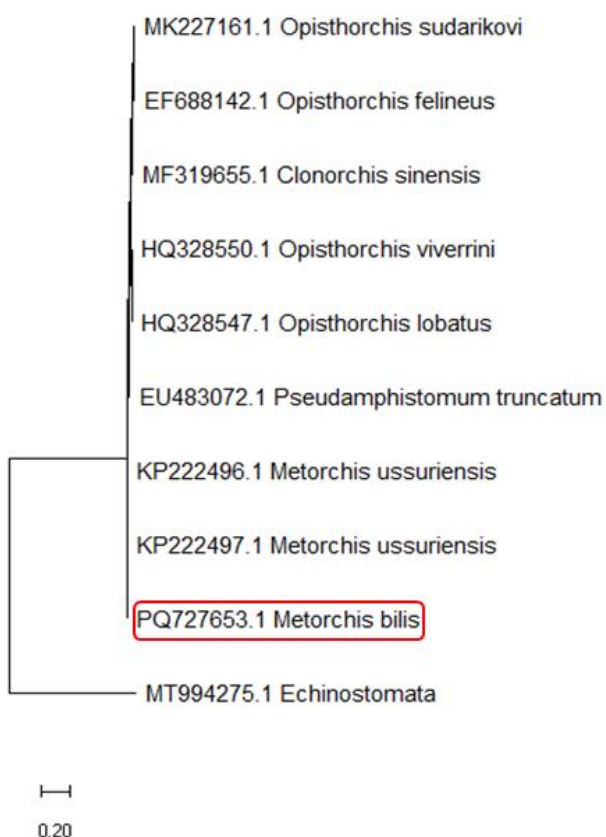


Рисунок 19 – Дерево филогенетических связей видов семейства *Opisthorchiidae* на основе маркера *ITS2*

По сравнению с референтными последовательностями *M. bilis*, последовательность PQ727653 демонстрирует высокую степень генетического сходства, что отражается в минимальных генетических расстояниях и короткой длине ветвей на дереве. В то же время, по отношению к последовательностям *M. ussuriensis* и *M. xanthosomus* наблюдается более выраженная дивергенция, что подтверждает видовую специфичность анализируемого изолята. Использование последовательности *Echinostoma* sp. в качестве внешней группы позволило корректно укоренить филогенетическое дерево и уточнить эволюционные взаимоотношения внутри семейства *Opisthorchiidae*.

Таким образом, результаты филогенетического анализа подтверждают принадлежность полученной нами нуклеотидной последовательности PQ727653 к виду *M. bilis*, что согласуется с данными молекулярно-генетической идентификации и сравнительного анализа с базой данных

GenBank. Ниже приведено филогенетическое дерево с использованием участка гена *COX1* для *M. bilis* (рисунок 20).

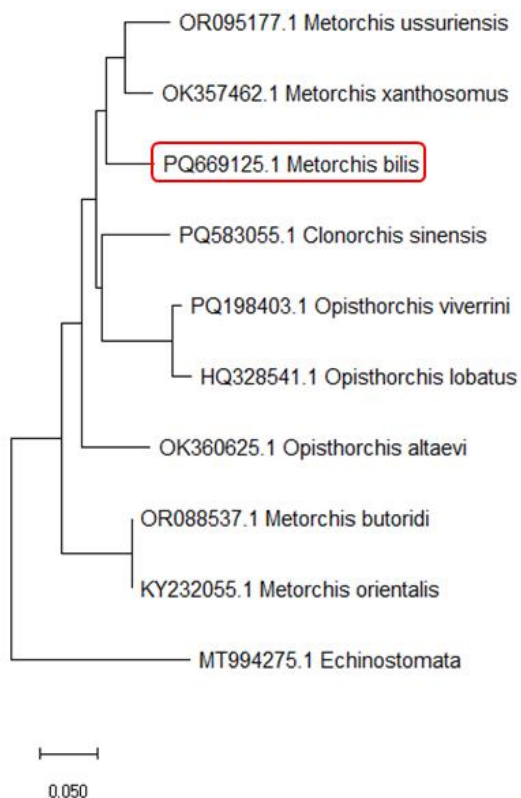


Рисунок 20 – Филогенетическое дерево *M. bilis* с использованием нуклеотидных последовательностей участка *COX1*

Филогенетическое дерево построено на основе нуклеотидных последовательностей представителей семейств *Opisthorchiidae* и *Echinostomatidae*. В качестве внешней группы (*outgroup*) использована последовательность *Echinostomata* (MT994275.1), что позволило корректно укоренить дерево и оценить эволюционные взаимоотношения исследуемых таксонов.

Полученная в данном исследовании нуклеотидная последовательность PQ669125.1, идентифицированная как *M. bilis*, формирует кластер с другими представителями рода *Metorchis*, включая *M. ussuriensis* (OR095177.1) и *M. xanthosomus* (OK357462.1). Близкое расположение этих последовательностей на дереве указывает на высокую степень генетического сходства и подтверждает их принадлежность к одному роду.

Клада *Metorchis* отделена от представителей родов *Opisthorchis* (*O. viverrini*, *O. lobatus*, *O. altaevi*) и *C. sinensis*, что свидетельствует о выраженной межродовой дивергенции. Последовательности *Opisthorchis* образуют самостоятельную ветвь, внутри которой наблюдается близкое родство между *O. viverrini* и *O. lobatus*.

Таким образом, положение полученной нами нуклеотидной последовательности PQ669125.1 на филогенетическом дереве подтверждает ее таксономическую принадлежность к виду *M. bilis* и согласуется с

современными представлениями о филогенетических связях трематод семейства *Opisthorchiidae*. Масштабная линейка (0,05 замен на сайт) отражает уровень нуклеотидных различий между анализируемыми последовательностями.

Результаты филогенетического анализа подтверждают принадлежность исследуемой нуклеотидной последовательности PQ669125.1 к роду *Metorchis* и демонстрируют ее близкое филогенетическое родство с представителями данной группы, что согласуется с результатами молекулярно-генетической идентификации.

Подтверждение видовой принадлежности исследуемого образца PQ685674 был проведен путем проведения филогенетического анализа (рисунок 21).

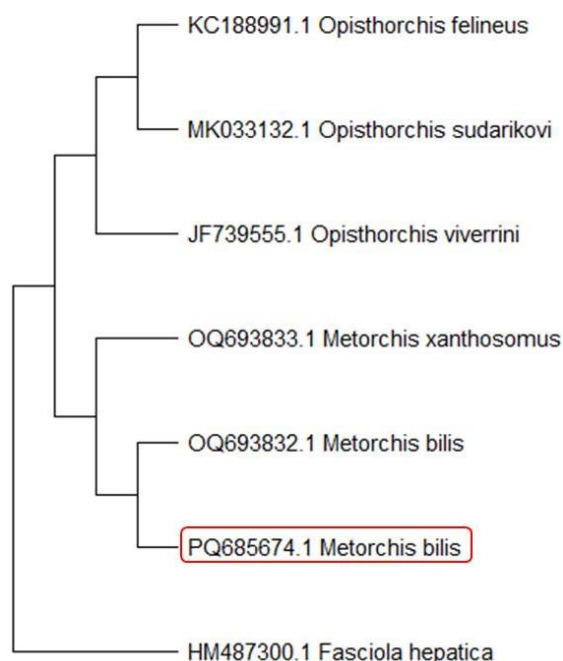


Рисунок 21 – Филогенетическое дерево *M. bilis* по результатам анализа нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COX3*

В результате филогенетического анализа, выполненного на основе нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COX3*, было построено дерево с включением референсных последовательностей представителей семейства *Opisthorchiidae* из базы данных GenBank.

Как видно на рисунке, исследуемый изолят (PQ685674.1), выделенный красным цветом, группируется в одной кладе с референсной последовательностью *M. bilis* (OQ693832.1). Их объединение в общий кластер свидетельствует о высокой степени нуклеотидного сходства и подтверждает видовую принадлежность исследуемого образца к *M. bilis*.

Последовательности *M. xanthosomus* формируют близкородственную, но отдельную ветвь, тогда как представители рода *Opisthorchis* (*O. felineus*, *O. sudarikovi*, *O. viverrini*) образуют самостоятельную кладу. В качестве внешней группы использована *Fasciola hepatica*, что обеспечивает корректную

укорененность филогенетического дерева. Топология дерева подтверждает молекулярную идентификацию исследуемого изолята как *M. bilis*.

Таким образом, в результате проведенных молекулярно-генетических исследований была создана коллекция ДНК возбудителей *O. felineus* и *M. bilis* в количестве 186 штук (110 ДНК *O. felineus* и 76 ДНК *M. bilis*), изолированных из метацеркарий рыб Акмолинской области. Использование фенол-хлороформного метода позволило выделить ДНК высокого качества, что подтвердили спектрофотометрические показатели. Применение видоспецифичных праймеров к ядерным и митохондриальным генам (*ITS1*, *ITS2*, *COX1*, *COX3*) обеспечило успешную амплификацию и последующую идентификацию возбудителей. Секвенирование ПЦР-продуктов и биоинформатический анализ с использованием базы данных *GenBank* подтвердили 100%-ное совпадение нуклеотидных последовательностей с эталонными образцами *O. felineus* и *M. bilis*. Филогенетический анализ на основе нескольких геномных маркеров продемонстрировал четкое таксономическое разделение видов и подтвердил правильность видовой идентификации исследуемых изолятов. Полученные данные создают надежную основу для дальнейших молекулярных исследований и эпидемиологического мониторинга паразитов семейства *Opisthorchiidae* в регионе.

2.2.3 Видоспецифический ПЦР-тест на основе праймеров рибосомального кластера

Дизайн и синтез праймеров

Для проведения сравнительного анализа использовались как последовательности ДНК из базы данных *NCBI*, так и ранее секвенированные образцы. На участках нуклеотидных последовательностей, содержащих вариации, был выполнен дизайн праймеров. Нуклеотиды выделяли различными цветами и проводили визуальное сравнение геномных фрагментов. На рисунке 22 представлен дизайн праймера для рибосомного кластера *ITS2* с сопоставлением *O. felineus* и представителей *Metorchis spp.*

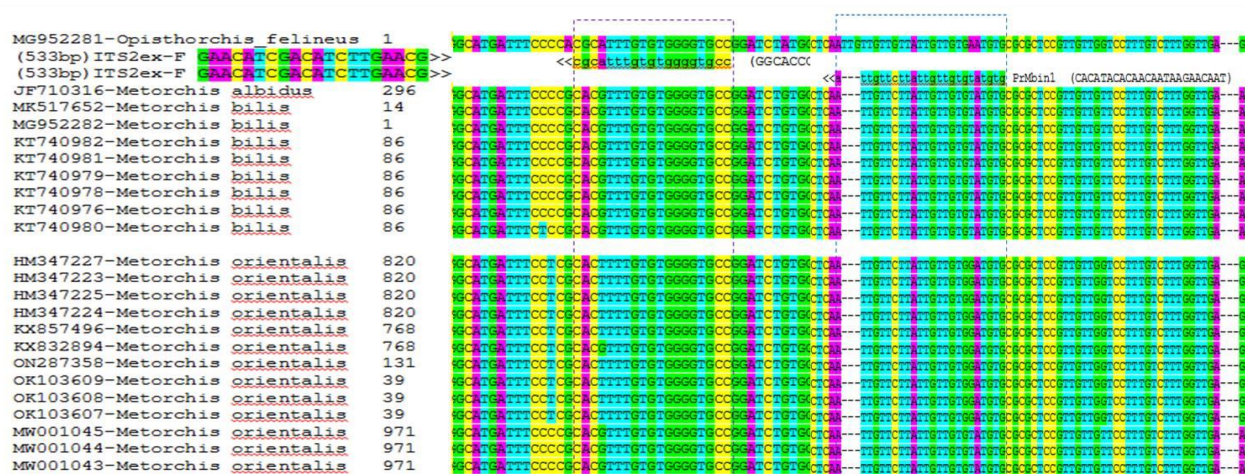


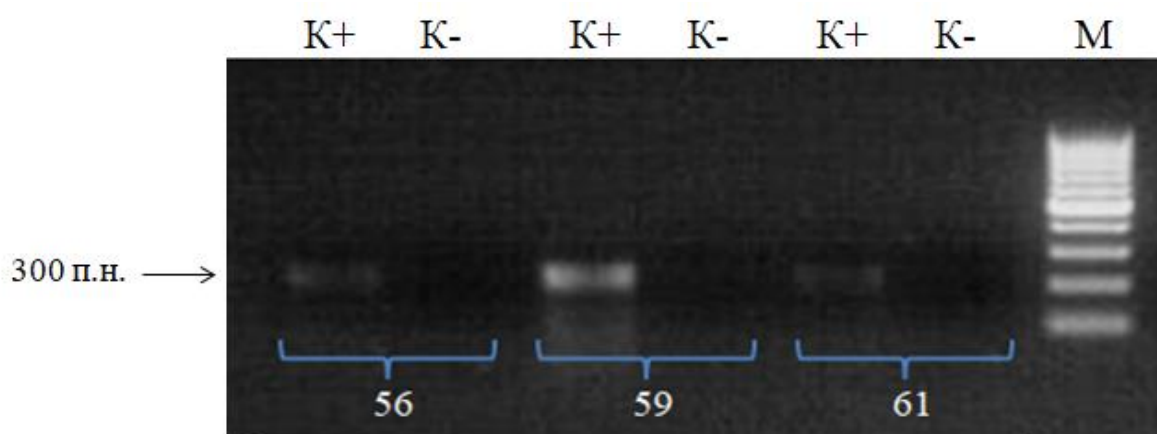
Рисунок 22 – Дизайн праймера, разработанного на основе маркерного участка рибосомного кластера *ITS2*

На основе разработанного дизайна синтезированы праймеры для перспективных участков рибосомного гена *ITS2*. Видоспецифичные последовательности праймеров для идентификации возбудителя *O. felineus* составляют: *OF-Spec-F* TGGCATGATTTCCCCACGCA и *OF-Spec-R* GCATTGCCAATACTGGAGCC; для идентификации *M. bilis*: *MB-Spec-F* TGGCATGATTTCCCCGCACG и *MB-Spec-R* CGCGCACATACACAACAATAAG. Оптимальная температура плавления праймеров для амплификации ДНК *O. felineus* и *M. bilis* составила 56°C для прямого праймера и 61°C для обратного.

Таким образом, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ДНК, полученных из базы данных *NCBI* и ранее секвенированных образцов, позволил выявить видоспецифические вариабельные участки рибосомного гена *ITS2*. На основе этих различий был разработан дизайн праймеров и осуществлен их синтез, обеспечивающий специфичную амплификацию ДНК *O. felineus* и представителей рода *Metorchis*. Подобранные праймеры обладают оптимальными температурами плавления (56°C для прямых и 61°C для обратных), что создает предпосылки для их эффективного применения в молекулярно-генетической диагностике и дифференциации указанных видов трематод.

Отработка параметров ПЦР-теста

Параметры проведения ПЦР были оптимизированы по температурному режиму, а также по концентрациям *dNTP* и *MgCl*. Температурная оптимизация амплификации учитывала различия в температуре отжига праймеров: 56°C для *O. felineus* и 61°C для *M. bilis*. Реакции ПЦР выполняли в градиентном режиме при температурах 56°C, 59°C и 61°C. Амплификационные продукты анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия (рисунок 23).



«K+» – *O. felineus*; «K-» – отрицательный контроль; «M» – ДНК маркер

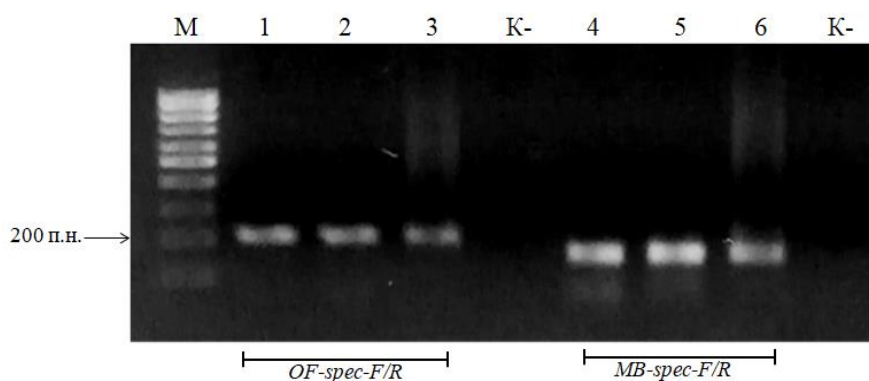
Рисунок 23 – Электрофореграмма продуктов ПЦР, полученных при различных температурах отжига праймеров *ITS2* для амплификации ДНК *O. felineus*

Оптимальная температура отжига для реакции с видоспецифическими праймерами ITS2 составила 59°C. Оптимизацию концентрации MgCl₂ проводили при значениях 1,2 мМ, 1,5 мМ и 2,0 мМ; наилучшие результаты амплификации были получены при концентрации 1,5 мМ. Для подбора концентрации dNTP тестировали варианты 1 мМ, 1,5 мМ и 2 мМ, при этом оптимальной оказалась концентрация 2 мМ.

Таким образом, в результате поэтапной оптимизации условий ПЦР были подобраны оптимальные параметры реакции: температура отжига праймеров ITS2 составила 59°C, концентрация MgCl – 1,5 мМ, а концентрация dNTP – 2,0 мМ. Установленные условия обеспечивают получение четких и воспроизводимых продуктов амплификации и могут быть рекомендованы для дальнейшего использования в видоспецифической ПЦР-диагностике *O. felineus* и *M. bilis*.

Тестирование видоспецифического ПЦР-теста

Чувствительность сконструированных праймеров была подтверждена с использованием ДНК *O. felineus* и *M. bilis*. В исследование были включены образцы, выделенные как от промежуточных, так и от дефинитивных хозяев. Это позволило оценить эффективность праймеров при работе с различным биологическим материалом. Амплификацию осуществляли с использованием видоспецифичных пар праймеров для каждого вида (*OF-с-pec-F/R*, *MB-с-pec-F/R*). Полученные ПЦР-продукты были подвергнуты электрофоретическому анализу в агарозном геле. Результаты разделения ампликонов представлены на рисунке 24.

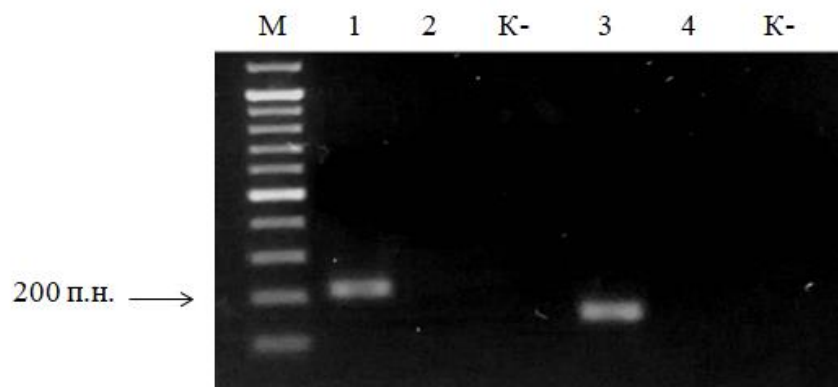


1 – *O. felineus* (язы); 2 – *O. felineus* (золотой хомячек); 3 – *O. felineus* (лиса); 4 – *M. bilis* (язы); 5 – *M. bilis* (золотистый хомячок); 6 – *M. bilis* (лиса); «К-» – отрицательный контроль; «М» – ДНК маркер

Рисунок 24 – Электрофоретический анализ ПЦР-продукта с праймерами ITS2 *O. felineus* и *M. bilis*, выделенных от промежуточных и дефинитивных хозяев

В результатах, представленных на рисунке 24, выявлены специфические продукты амплификации в дорожках 1-3 и 4-6 при использовании праймеров *OF-с-pec-F/R* и *MB-с-pec-F/R*. В отрицательном контроле (К-) амплификация отсутствует. Полученные результаты подтверждают чувствительность и специфичность сконструированных праймеров.

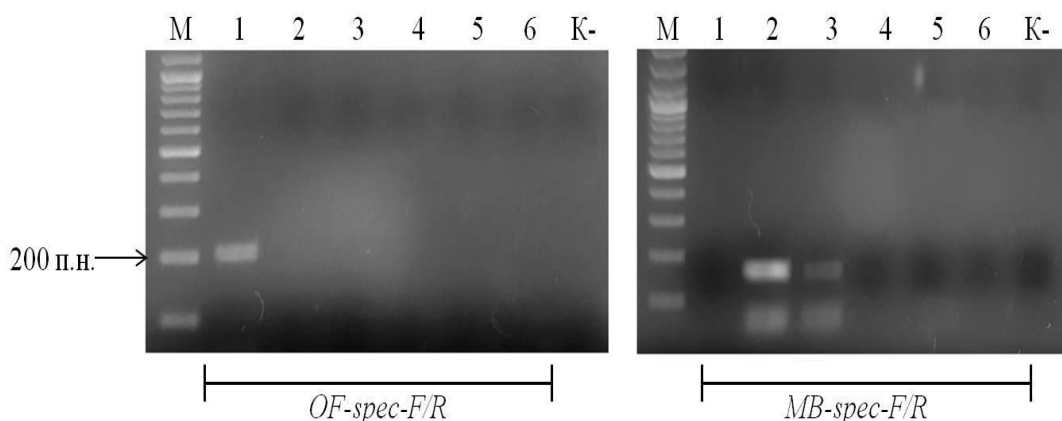
При проверке перекрестной реакции образцы ДНК *O. felineus* тестировали с праймерами *MB-спеc-F/R*, а образцы ДНК *M. bilis* с праймерами *OF-спеc-F/R* (рисунок 25).



М – маркер; 1 – праймер *OF-спеc-F/R* с ДНК *O. felineus*; 2 – праймер *OF-спеc-F/R* с ДНК *M. bilis*; 3 – праймер *MB-спеc-F/R* с ДНК *M. bilis*; 4 – праймер *MB-спеc-F/R* с ДНК *O. felineus*; «К-» – отрицательный контроль

Рисунок 25 – Результаты перекрестной реакции

При тестировании специфичности разработанных праймеров, проводили перекрестное тестирование ДНК и праймеров: брали ДНК метацеркарий возбудителя *O. felineus* и тестировали с праймерами *MB-спеc-F/R*, ДНК возбудителя *M. bilis* с праймерами *OF-спеc-F/R*. Перекрестной реакции не наблюдали. Для оценки специфичности методов идентификации также проведена перекрестная реакция с использованием ДНК наиболее часто встречающихся метацеркарий паразитов и промежуточного хозяина (рыбы). Результаты данного анализа представлены на рисунок 26.

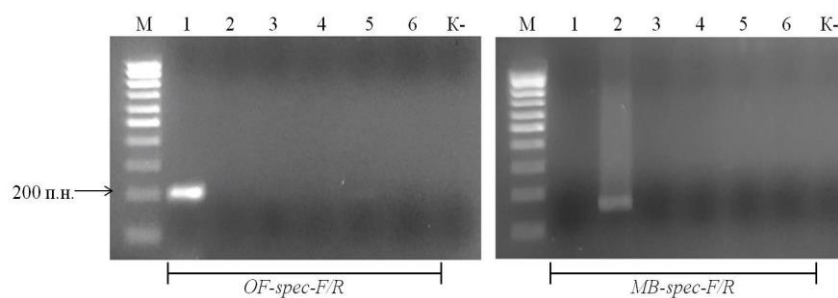


1 – ДНК *O. felineus*; 2 – ДНК *M. bilis*; 3 – ДНК *M. xanthosomus*; 4 – ДНК *H. dubinini*; 5 – ДНК *P. cuticola*; 6 – ДНК язь (*Leuciscus idus*); М – ДНК маркер; «К-» – отрицательный контроль

Рисунок 26 – Электрофореграмма результатов перекрестной реакции ПЦР с использованием видоспецифических праймеров на ДНК метацеркарий паразитов и биологического материала рыбы

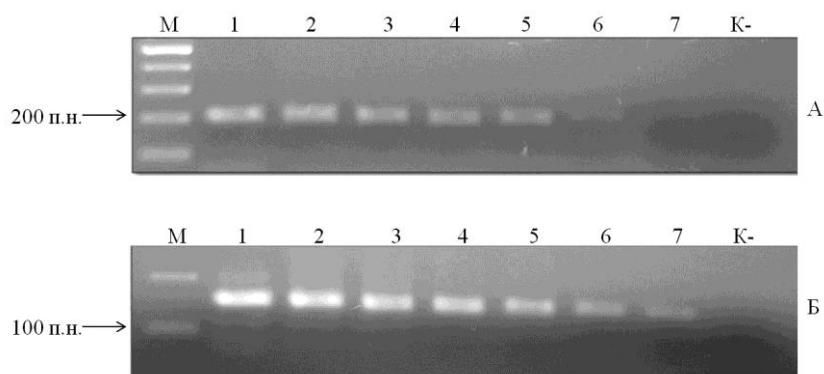
При использовании праймеров *OF-spec-F/R* специфический ампликон размером около 200 п.н. выявлен только в пробе с ДНК *O. felineus*. При постановке реакции с праймерами *MB-spec-F/R* амплификация наблюдалась исключительно в образце с ДНК *M. bilis*. В остальных пробах, включая ДНК других видов трематод и рыбы, специфических продуктов амплификации не выявлено. В отрицательном контроле амплификация отсутствовала. В результате перекрестной реакции с видоспецифическими праймерами *MB-spec-F/R* положительная амплификация была выявлена для ДНК *M. bilis* и *M. xanthosomus*, что объясняется принадлежностью этих двух видов к одному роду.

Для подтверждения аналитической специфичности разработанных праймеров, синтезированных на основе маркерного гена ITS2, была проведена оценка возможной перекрестной реакции с ДНК паразитов, наиболее часто встречающихся у одного из окончательных хозяев – лисицы, а также с ДНК самого животного. В качестве тест-объектов использовали ДНК *O. felineus* и *M. bilis*, а также гетерологичные образцы – *Trichinella spiralis* (*T. spiralis*), *Toxocara canis* (*T. canis*) и *Taenia hydatigena* (*T. hydatigena*). Результаты перекрестной реакции представлены на рисунке 27.



1 – ДНК *O. felineus*; 2 – ДНК *M. bilis*; 3 – ДНК *T. spiralis*; 4 – ДНК *T. canis*; 5 – ДНК *T. hydatigena*; 6 – ДНК лисы; М – ДНК маркер; «К-» – отрицательный контроль

Рисунок 27 – Результаты перекрестной реакции с использованием ДНК самого окончательного хозяина и наиболее часто встречаемых паразитов



А – *O. felineus*; Б – *M. bilis*: 1 – 20 нг; 2 – 10 нг; 3 – 8 нг; 4 – 6 нг; 5 – 4 нг; 6 – 2 нг; 7 – 1 нг; «К-» – отрицательный контроль

Рисунок 28 – Результаты теста на чувствительность ПЦР-теста с видоспецифическими праймерами

В соответствии с рисунком 28, чувствительность ПЦР-теста определяли посредством разбавления матричной ДНК от 20 до 1 нг).

Чувствительность ПЦР-теста с праймерами *OF-Spec-F/R* для амплификации ДНК *O. felinus* была определена как получение ПЦР-продукта при концентрации ДНК 2 нг, тогда как для ДНК *M. bilis* продуктивная амплификация достигалась при уровне 1 нг.

Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность разработанных видоспецифических праймеров, позволяя надежно выявлять ДНК *O. felinus* и *M. bilis* в материалах, полученных как от промежуточных, так и от дефинитивных хозяев. Перекрестные реакции с гетерологичными видами трематод и нематод не выявлены, за исключением ожидаемой амплификации ДНК *M. xanthosomus* праймерами *MB-spec-F/R*, что обусловлено принадлежностью данных видов к одному роду *Metorchis*. Установлено, что предел чувствительности ПЦР-теста составляет 2 нг ДНК для *O. felinus* и 1 нг ДНК для *M. bilis*, что свидетельствует о возможности эффективного применения разработанного теста для дифференциальной молекулярно-генетической диагностики данных паразитов.

2.2.4 Мультиплексный ПЦР-тест на основе праймеров для митохондриального гена *COX1*

Дизайн и синтез праймеров

Дизайн праймеров на основе генетического маркера *COX1* проводили путем сравнения нуклеотидных последовательностей *O. felinus* с *M. bilis*, *M. orientalis*, *M. xanthosomus*. При визуальном сравнении нуклеотидных последовательностей, измененные участки генома отмечали рамками и разрабатывали дизайн праймера (рисунок 29).

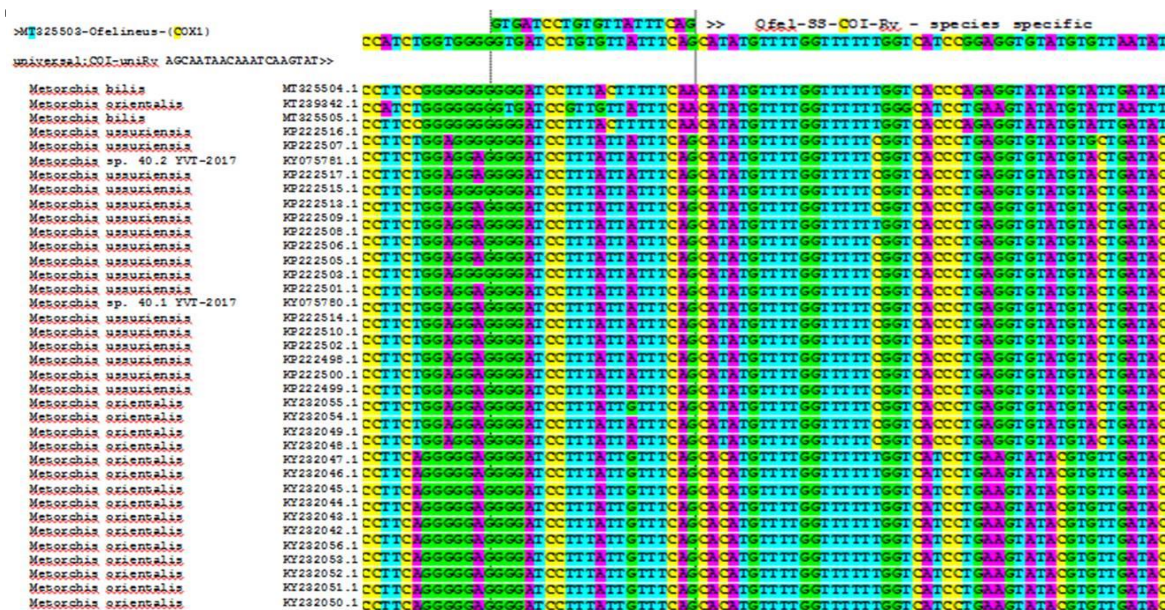


Рисунок 29 – Дизайн праймера на основе маркерного митохондриального гена *COX1*

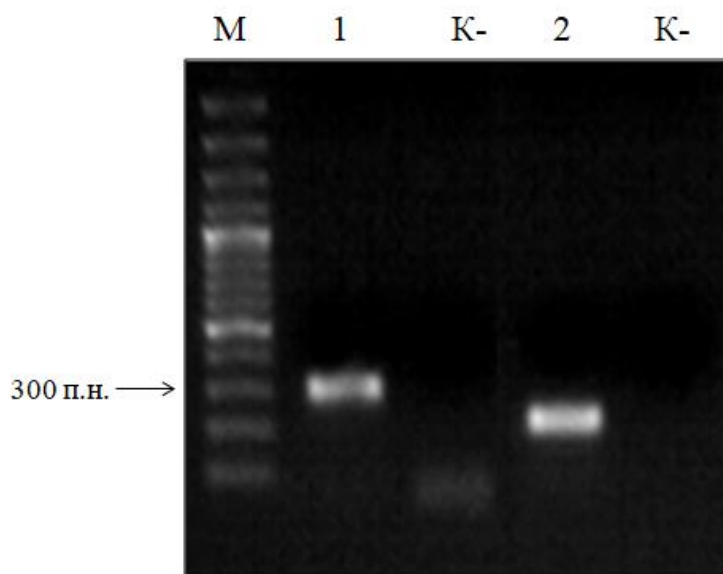
На основе данного дизайна были сконструированы уникальные праймеры *CO1nOf-F* TTGGAATGATTAGTCATGTTTGTACG и *CO1nOf-R* CCCCACSTATAGTAAAAAGCACTAT, способные дифференцировать возбудители *O. felineus* и *M. bilis*.

Таким образом, сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей митохондриального гена *COX1* позволил выявить участки генома, характерные для конкретного вида. На основе этих различий были разработаны праймеры *CO1nOf-F* и *CO1nOf-R*, обеспечивающие специфическую амплификацию ДНК *O. felineus*.

Отработка параметров постановки ПЦР-анализа

Отработка параметров постановки ПЦР анализа с видоспецифических праймерами полученные на основе маркерного гена *COX1*, проводили по стандартной схеме: отработка температурного режима, концентрации *dNTP*, концентрации *Taq-Polymerase*.

Для подтверждения специфичности разработанных праймеров реакцию ПЦР выполняли с использованием стандартных контрольных образцов ДНК (рисунок 30).



1 – *O. felineus*; 2 – *M. bilis*; «K-» – отрицательный контроль; «M» – ДНК маркер

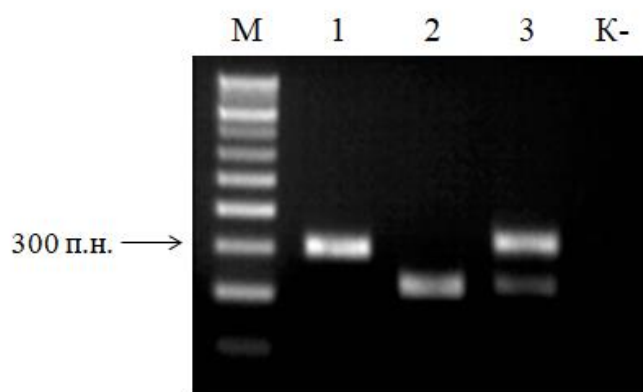
Рисунок 30 – Постановка ПЦР в стандартных условиях

Для получения нужного количества ампликонов для проведения молекулярного анализа концентрация *dNTP* и *MgCl₂* были отработаны по различным параметрам.

Оптимизацию концентрации *MgCl₂* проводили при значениях 1,2 мМ, 1,5 мМ и 2,0 мМ; наибольшая эффективность амплификации специфических ампликонов была достигнута при концентрации 1,5 мМ. Аналогично, при подборе концентрации *dNTP* тестировали уровни 1 мМ, 1,5 мМ и 2 мМ, при этом оптимальной оказалась концентрация 2 мМ.

Таким образом, в ходе оптимизации условий ПЦР-диагностики описторхоза и меторхоза были установлены универсальные и воспроизводимые параметры реакции. Показано, что оптимальная концентрация $MgCl_2$ составляет 1,5 мМ, а концентрация $dNTP$ – 2 мМ, что обеспечивает получение достаточного количества специфичных ампликонов без признаков неспецифического связывания и ложноположительных результатов. Подтвержденная специфичность амплификации на контрольных образцах ДНК и стабильное получение целевых ПЦР-продуктов свидетельствуют о пригодности разработанного протокола для молекулярно-генетической детекции ДНК *O. felineus* и *M. bilis* в биологическом материале (Приложение В).

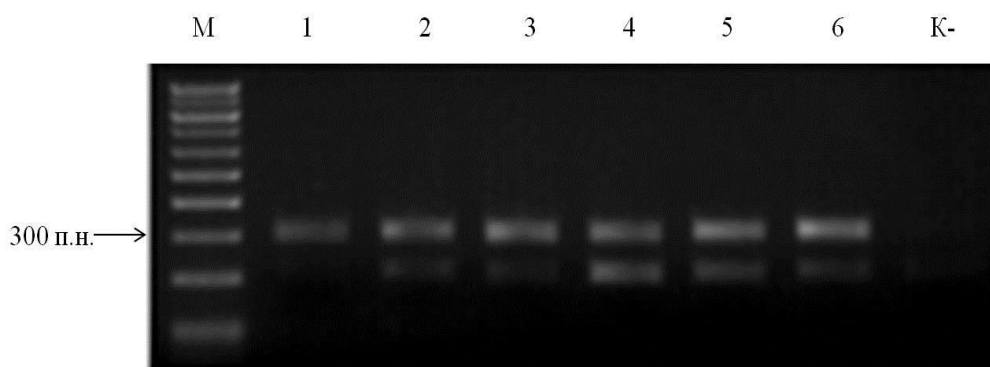
Праймеры на основе митохондриального гена *COX1* позволяют одновременно амплифицировать две и более последовательностей в одной пробе (рисунок 31).



М – ДНК маркер; 1 – праймеры *CO1nOf-F/R*; 2 – праймеры *COInMb-F/R*; 3 – праймеры *CO1nOf-F/R* и *COInMb-F/R*; «К-» – отрицательный контроль; «М» – ДНК маркер

Рисунок 31 – Электрофореграмма ПЦР с ДНК *O. felineus* и *M. bilis*

При оптимизации условий ПЦР с праймерами *CO1nOf-F/R* и *COInMb-F/R* для улучшения параметров реакции ПЦР, направленной на дифференциальную диагностику возбудителей описторхоза и меторхоза, была проведена серия экспериментов с варьированием температуры отжига праймеров. Это позволило определить оптимальные условия, обеспечивающие специфичное и эффективное связывание праймеров с целевой ДНК. При амплификации ДНК *O. felineus* и *M. bilis* с каждой конкретной парой праймеров *CO1nOf-F/R* и *COInMb-F/R* были получены ПЦР-продукты размером 307 и 252 п.н., соответственно. Наличие двух отчетливых полос на геле указывает на возможное присутствие микст-инвазии у исследуемых образцов, что имеет важное значение для клинической диагностики и выбора терапевтической стратегии. Такие результаты подтверждают эффективность выбранных праймеров и оптимизированных условий ПЦР для дифференциации видов трематод и могут быть использованы в дальнейшем для массового скрининга (рисунок 32).

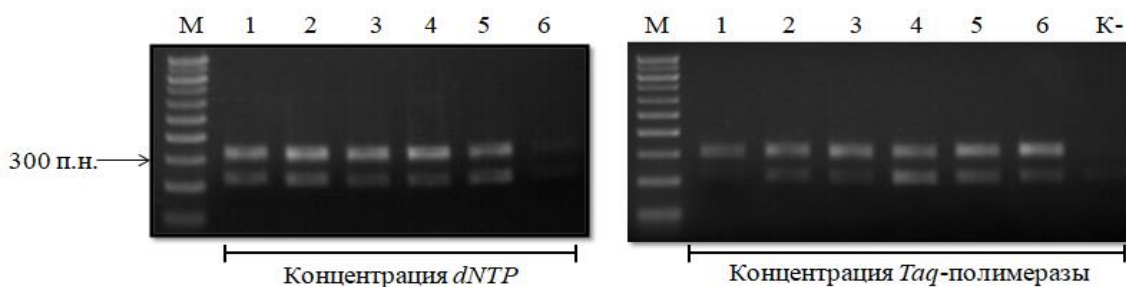


1 – 56°C; 2 – 58°C; 3 – 60°C; 4 – 62°C; 5 – 64°C; 6 – 66°C; «К-» – отрицательный контроль; М – ДНК маркер

Рисунок 32 – Электрофореграмма мультиплексной ПЦР при разных температурах отжига праймеров

Во всех опытных пробах наблюдается формирование специфических ампликонов размером около 300 п.н., при этом наибольшая четкость и интенсивность полос отмечается в диапазоне температур 60-66°C. Для мультиплексной реакции ПЦР оптимальной температурой отжига установлено 62°C. В отрицательном контроле амплификация отсутствует, что свидетельствует об отсутствии контаминации. Полученные результаты позволили определить оптимальный температурный режим отжига праймеров для проведения мультиплексной ПЦР.

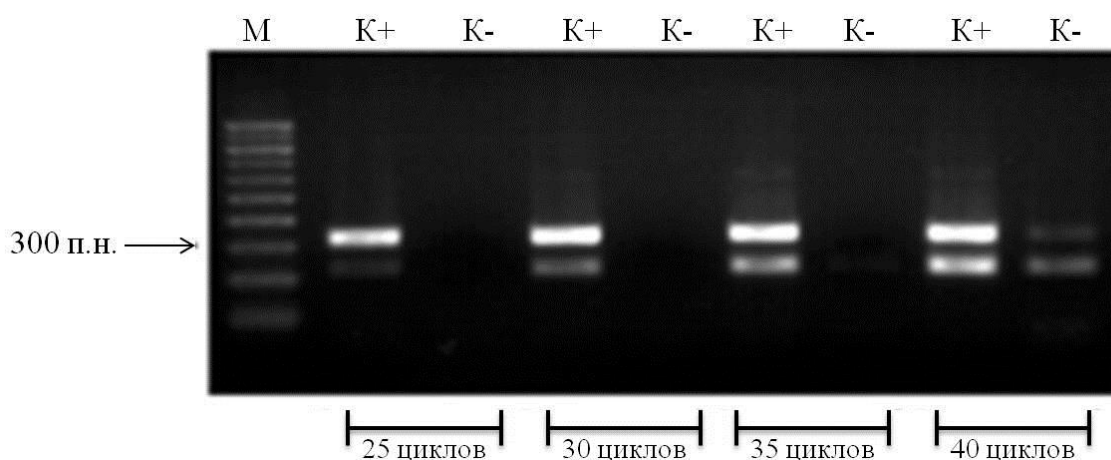
Для оптимизации условий мультиплексной ПЦР были исследованы различные концентрации *dNTP* и *Taq*-полимеразы: 0,05 мМ, 0,1 мМ, 0,2 мМ, 0,3 мМ, 0,4 мМ и 0,5 мМ. В ходе экспериментов оценивали влияние этих параметров на эффективность амплификации и качество получаемых ампликонов. Анализ электрофореграмм показал, что наилучшие результаты достигаются при концентрации *dNTP* 0,3 мМ и *Taq*-полимеразы 1,5 ед. Эти условия обеспечивают стабильное и специфичное образование ампликонов для всех исследуемых образцов. Таким образом, оптимизированные параметры реакции создают предпосылки для надежного применения мультиплексной ПЦР в идентификации ДНК исследуемых трематод. Результаты оптимизации представлены на рисунке 33.



1 – 0,05 мМ; 2 – 0,1 мМ; 3 – 0,2 мМ; 4 – 0,3 мМ; 5 – 0,4 мМ; 6 – 0,5 мМ; «К-» – отрицательный контроль; «М» – ДНК маркер

Рисунок 33 – Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР

Количество циклов в значительной степени определяет требуемую общую продолжительность мультиплексной ПЦР. Число циклов, обеспечивающее эффективную амплификацию в мультиплексной ПЦР, составило 35, что соответствует стандартной практике (рисунок 34).



«K+» – положительный контроль; «K-» – отрицательный контроль; М – ДНК маркер

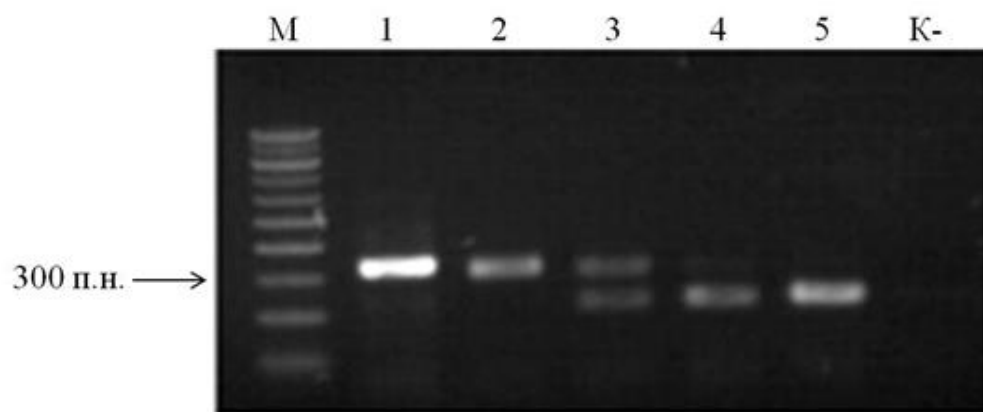
Рисунок 34 – Электрофореграмма продуктов мультиплексной ПЦР в условиях оптимизации циклов ПЦР

Помимо этого, была проведена оптимизация концентраций каждой пары праймеров, в результате которой установлено, что оптимальная концентрация каждого олигонуклеотидного праймера составляет 0,1 мкМ

Таким образом, разработанные праймеры на основе митохондриального гена *COX1* обеспечивают возможность одновременной амплификации ДНК *O. felineus* и *M. bilis* в одной реакционной пробирке, что подтверждает эффективность мультиплексной ПЦР для выявления как моно-, так и микст-инвазий. Установлено, что в ходе мультиплексной амплификации формируются специфичные ПЦР-продукты размером 307 и 252 п.н., соответствующие целевым видам. Оптимальные условия реакции включали температуру отжига праймеров в диапазоне 60-62 °С, концентрацию *dNTP* 0,3 мМ, активность *Taq*-полимеразы 1,5 ед., количество циклов – 35, а также концентрацию каждой пары праймеров 0,1 мкМ. Подобранные параметры обеспечивают высокую специфичность и воспроизводимость реакции и позволяют рекомендовать разработанный мультиплексный ПЦР-тест для молекулярной диагностики описторхоза и меторхоза.

2.2.5 Тестирование чувствительности и специфичности мультиплексного ПЦР-теста

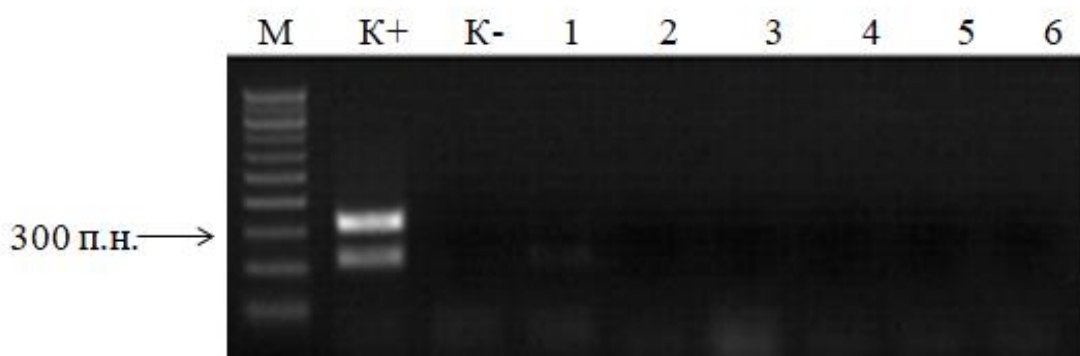
Чувствительность предложенного метода мультиплексной ПЦР определялась минимальной концентрацией ДНК, способной к амплификации. Для этого применяли стандарты ДНК, разведенные в диапазоне от 10 нг до 1 пг, при этом предел обнаружения для *O. felineus* и *M. bilis* составил 100 пг (рисунок 35).



1–10 нг/1 пг *O. felineus* / *M. bilis*; 2 – 1 нг/10 пг *O. felineus* / *M. bilis*; 3 – 100 пг / 100 пг *O. felineus* / *M. bilis*; 4 – 10 пг / 1 нг *O. felineus* / *M. bilis*; 5 – 1 пг / 10 нг *O. felineus* / *M. bilis*; «К-» – отрицательный контроль; «М» – ДНК маркер

Рисунок 35 – Определение чувствительности мультиплексной ПЦР

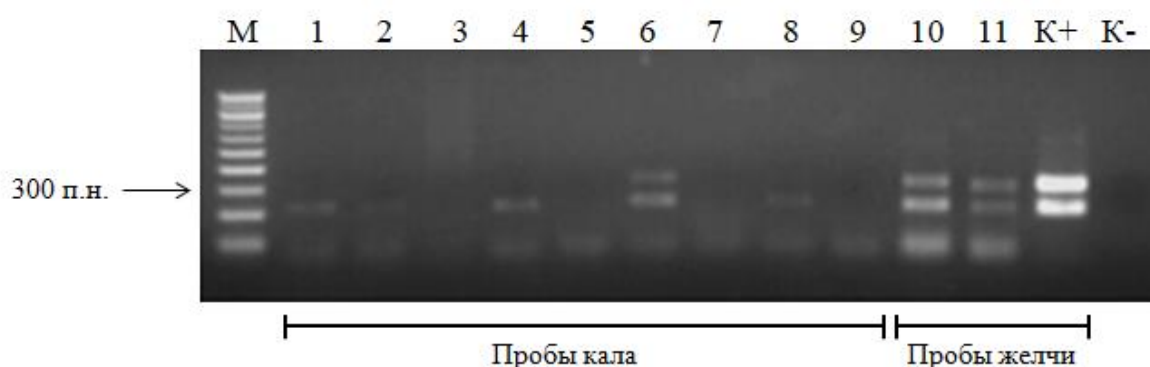
Для оценки специфичности мультиплексной ПЦР в качестве ДНК-матрицы использовали геномы трех видов паразитов (*Taenia* spp., *Toxocara* spp., *Trichinella* spp.) и трех видов бактерий (*Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp.) при проведении реакции в оптимизированных условиях (рисунок 36).



1 - *Taenia* spp.; 2 - *Toxocara* spp.; 3 - *Trichinella* spp.; 4 - *E. coli*; 5 - *Pseudomonas* spp.; 6 - *Bacillus* spp.; «К+» – положительный контроль; «К» – отрицательный контроль; «М» – ДНК маркер

Рисунок 36 – Тест на специфичность анализа мультиплексной ПЦР

С помощью разработанного метода мультиплексной ПЦР было протестировано 9 образцов фекалий и 2 образца желчи человека (рисунок 37).

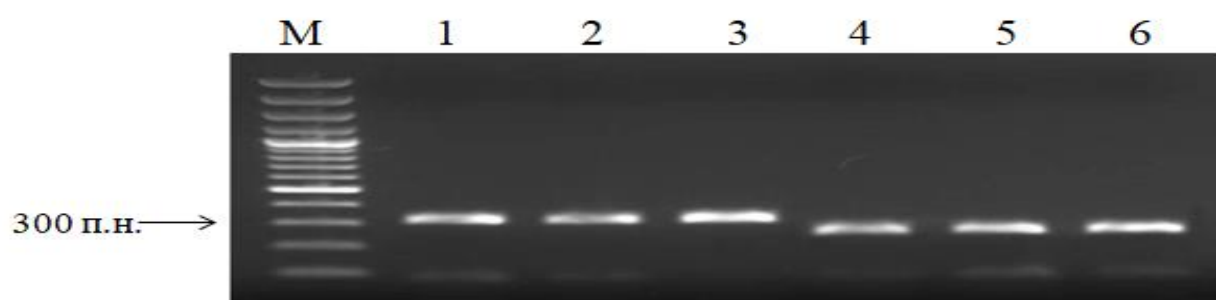


1-9 – пробы кала; 10-11 – образцы желчи; K+» – положительный контроль; «K-» – отрицательный контроль; «М» – ДНК маркер

Рисунок 37 – Результаты амплификации ДНК, полученной из фекалий и желчи человека

Четыре образца фекалий оказались положительными, размер фрагмента ПЦР продукта был около 252 п.н., идентифицированными как *M. bilis*. Один образец кала показал двойную полосу с размером фрагмента примерно 252 и 307 п.н., показывающую микст-инвазию *O. felineus* и *M. bilis*. Четыре пробы кала показали отрицательный результат. Два образца желчи показали двойную полосу, указывающую на микст-инвазию *O. felineus* и *M. bilis*.

Для подтверждения ветеринарно-санитарной экспертизы рыб на наличие возбудителей описторхоза и меторхоза в образцах рыбы была проведена ПЦР-диагностика. На рисунке 38 представлены результаты амплификации ДНК, свидетельствующие о выявлении паразитов в исследованных пробах.



1-3 – *O. felineus* (1 – язь, озеро Шолак; 2 – лещ, озеро Шолак; 3 – плотва, озеро Шолак); 4-6 – *M. bilis* (язь, озеро Шолак); «М» – ДНК маркер

Рисунок 38 – Применение ПЦР-анализа для ветеринарно-санитарной экспертизы рыб на наличие возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*

Таким образом, разработанный метод мультиплексной ПЦР характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью при одновременном выявлении ДНК *O. felineus* и *M. bilis*. Установлено, что предел обнаружения метода составляет 100 пг ДНК для обоих возбудителей, что обеспечивает надежную детекцию даже при низкой концентрации

генетического материала. Отсутствие амплификации при использовании ДНК других гельминтов и бактериальных патогенов подтверждает высокую аналитическую специфичность предложенного подхода. Применение метода на клинических образцах фекалий и желчи человека продемонстрировало его практическую значимость, позволив выявить как моноинвазии *M. bilis*, так и микст-инвазии *O. felineus* и *M. bilis*. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности разработанного мультиплексного ПЦР-теста для использования в лабораторной диагностике описторхоза и меторхоза.

2.2.6 Определение экономической эффективности разработанного теста

Базовыми компонентами, необходимыми для создания ПЦР-теста для выявления описторхид *O. felineus* и *M. bilis* в биологическом материале, являются:

- химические реактивы, входящие в состав реакционной смеси;
- специфические праймеры для идентификации видов;
- расходные материалы в виде планшета для проведения реакции.

Ниже представлен расчет себестоимости реагентов и материалов, необходимых для проведения 96 реакций (таблица 5).

Таблица 5 – Себестоимость реагентов и материалов ПЦР-теста

Материалы	Ед. изм.	Стоимость за ед., тенге	Расход в ед. на 1 реакцию	Общая себестоимость, тенге
ПЦР реакционная смесь (10 ^x Bui fer + MgCl ₂ + Taq полимераза)	уп. (100 реакций)	84 331	0,1	843,3
2 мМ dNTP	уп. (100 мМоль, 2000 мкл)	136 944	3 мкл	205,4
Специфические праймеры на основе рибосомального класетар (<i>ITS2</i>)				
Праймер <i>OF-срес-F Forward</i> (20 букв, 40 нМоль)	мкл (2 500 мкл)	3 660	1 мкл	1,5
Праймер <i>OF-срес-R Forward</i> (20 букв, 40 нМоль)	мкл (2 500 мкл)	3 660	1 мкл	1,5
Праймер <i>MB-срес-F Forward</i> (20 букв, 40 нМоль)	мкл (2 500 мкл)	3 660	1 мкл	1,5
Праймер <i>MB -срес-F Forward</i> (20 букв, 40 нМоль)	мкл (2 500 мкл)	3 660	1 мкл	1,5
Праймеры на основе митохондриального кластера (<i>COX1</i>)				
<i>CO1nOf-F Forward</i> (26 букв, 40 нМоль)	мкл (2 500 мкл)	4 758	1 мкл	1,9
<i>CO1nOf-R Reverse</i> (25 букв, 40 нМоль)	мкл (2 500 мкл)	4 575	1 мкл	1,8
<i>COInMb-F</i> (21 букв, 40 нМоль)	мкл (2 500 мкл)	3 843	1 мкл	1,5
<i>COInMb-R</i> (26 букв, 40 нМоль)	мкл (2 500 мкл)	4 758	1 мкл	1,9
96-луночный планшет	шт.	2 088	1 лунка	21,8

Так как нами были разработаны и отработаны параметры постановки ПЦР реакции на основе рибосомального и митохондриального участков генома возбудителей описторхид и их дифференцировки, проведены вычисления стоимости ПЦР-теста для выявления отдельных возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*, а также дифференциального теста (таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительная стоимость различных вариантов ПЦР-теста

Вариант тест-системы	Себестоимость 1 пробы, тенге	Себестоимость набора (96 проб), тенге
ПЦР-тест система на основе <i>ITS2</i> региона для выявления возбудителя <i>O. felineus</i>	1 073,5	103 056
ПЦР-тест система на основе <i>ITS2</i> региона для выявления возбудителя <i>M. bilis</i>	1 073,5	103 056
Мультиплексная ПЦР-тест система на основе <i>COX1</i> региона для выявления и дифференциальной идентификации возбудителей <i>O. felineus</i> и <i>M. bilis</i>	1 077,6	103 449,6
Коммерческая ПЦР-тест система. Качественное определение <i>Opisthorchis felineus</i> (Описторхоз), [Real-Time PCR] в кале. https://e-m-l.ru/analysis/parazitarnye-zabolevaniya/	5 103,4 (790 руб × 6,46. Курс на 16.02.2026)	489 926,4
Коммерческая ПЦР-тест система. Скрининговое ПЦР-исследование ДНК возбудителей гельминтозов (описторхоза, аскаридоза, дифиллоботриоза, тениоза, энтеробиоза). https://invitro.kz/analizes/for-doctors/irgeli/599/24245/	16 270	-
Коммерческая ИФА-тест система. Антитела класса IgG к антигенам кошачьей двуустки (<i>Opisthorchis felineus</i>). https://invitro.kz/analizes/for-doctors/irgeli/607/150412/	9 990	-

Экономический анализ показал, что моноплексные ПЦР-тест-системы на основе *ITS2*-региона для выявления *O. felineus* и *M. bilis* имеют одинаковую себестоимость – 1 073,5 тенге на одну реакцию (103 056 тенге на 96 проб). Мультиплексная ПЦР-система на основе *COX1*-региона характеризуется незначительно большей себестоимостью – 1 077,6 тенге на пробу (103 449,6 тенге на 96 проб), что выше всего на 4,1 тенге (0,38%). Таким образом, при сопоставлении стоимости одной реакции различия между вариантами минимальны и статистически незначимы.

Однако при необходимости одновременного исследования одной пробы на два возбудителя экономическая картина принципиально меняется. Использование двух моноплексных тестов требует проведения двух независимых реакций, что увеличивает себестоимость до 2 147 тенге на образец. В то же время мультиплексная система позволяет выявлять оба

патогена в одной пробирке в рамках одной реакции при себестоимости 1 077,6 тенге. Экономия составляет 1 069,4 тенге на одну пробу, то есть снижение затрат достигает почти 50%. При исследовании серии из 96 образцов суммарная экономия превышает 102 тыс. тенге.

Дополнительно мультиплексный формат обеспечивает сокращение расхода реагентов, времени работы амплификатора, количества расходных материалов и трудозатрат персонала, а также повышает пропускную способность лаборатории. Таким образом, при необходимости дифференциальной диагностики *O. felineus* и *M. bilis* мультиплексная ПЦР-тест-система является наиболее экономически обоснованным и технологически рациональным решением.

В свою очередь коммерческая ПЦР-тест-система, представленная на рынке Российской Федерации и предназначенная для качественного выявления лишь одного возбудителя (описторхоза), имеет себестоимость около 5 103 тенге на пробу (489 926 тенге на 96 проб), что в 4,7 раза дороже по сравнению с нашими разработками. Это высокзатратное решение, несмотря на заявленное обнаружение до пяти видов паразитов в рамках скрининга, фактически менее экономично при рутинной диагностике изучаемых трематод. Более того, этот коммерческий тест сейчас не представлен на рынке Казахстана, что ограничивает его доступность.

Аналогично коммерческие ИФА-тесты (например, определение антител IgG к *O. felineus*) демонстрируют более высокую себестоимость – порядка 9 990 тенге на пробу, что также значительно превышает затраты на наши ПЦР-системы. При этом чувствительность и специфичность ИФА-методов, особенно при косвенных серологических маркерах, обычно ниже, чем у молекулярных ПЦР-тестов, что снижает их диагностическую ценность в задачах раннего и точного выявления инфекции. Таким образом, разработанные ПЦР-системы представляют наилучшее сочетание чувствительности, дифференциации возбудителей и экономичности, особенно в условиях казахстанского рынка диагностики.

2.2.7 Обсуждение результатов исследований

Диагностика описторхоза, основанная исключительно на клинических симптомах, затруднена из-за отсутствия признаков и синдромов, специфичных для этого заболевания [124]. Для точной диагностики, а также качественной и количественной оценки инфекции необходим комплексный подход, включающий различные методы. Клинические проявления описторхоза разнообразны и зависят как от длительности и интенсивности инвазии, так и от индивидуальных особенностей организма-хозяина [125].

В ветеринарной и медицинской практике при постановке диагноза описторхоз применяют стандартный метод – копровоскопия и дуоденальное зондирование. Данные методы основаны на микроскопировании биологического материала на наличие яиц возбудителей. Однако из-за цикличности яйцекладки гельминтов и неоднородного распределения яиц в

содержимом толстой кишки могут возникать ложноотрицательные результаты [126].

В качестве дополнительного метода диагностики описторхоза применяют иммунодиагностику. Однако данный метод имеет высокую диагностическую ценность только при острой форме описторхоза. Также антигенное сходство описторха и меторха приводит к ложноположительному результату при микстинвазии [125, р. 20].

Исследование рыб на наличие возбудителей описторхид проводили как стандартным методом – путем микроскопирования спинных мышц карповых рыб, так и посредством молекулярного метода – ПЦР. Экскреторный пузырь крупный, заполненный гранулами черного цвета и занимает до 1/3 части тела личинки. Развилки кишечника лежит на ровном расстоянии от переднего конца тела и брюшной присоски. Размер метацеркарий варьировал от 0,17-0,21 мм до 0,34-0,43 мм. Данный метод является трудоемким и требует высококвалифицированного специалиста. Также дифференциация возбудителей *O. felineus* и *M. bilis* вызывает затруднения из-за схожести морфологических признаков.

Проведенные исследования показали, что возбудители трематод семейства *Opisthorchiidae* продолжают активно циркулировать в водоемах Акмолинской области, формируя устойчивые природные очаги инвазии. Выявление жизнеспособных метацеркариев в мышцах карповых рыб подтверждает эпидемиологическую значимость данного региона и согласуется с литературными данными о ведущей роли представителей семейства *Cyprinidae* в поддержании жизненного цикла описторхид [127].

Полученные результаты свидетельствуют о выраженной видовой избирательности заражения: наибольшая экстенсивность инвазии зарегистрирована у язя, что подтверждает его статус основного хозяина личиночных стадий *Opisthorchiidae*. Более низкие показатели зараженности плотвы и леща, а также отсутствие метацеркариев у карася, сазана и линя согласуются с данными других исследователей, указывающих на различия в трофическом поведении, биотопической приуроченности и интенсивности контакта рыб с церкариями паразита.

Наибольшая зараженность рыб была выявлена в водоемах Коргалжинского района, что, вероятно, обусловлено совокупностью природно-экологических факторов, включая гидрологический режим водоемов, высокую численность промежуточных хозяев (пресноводных моллюсков), а также благоприятные условия для развития свободноживущих стадий паразита. Статистически значимые различия, подтвержденные точным критерием Фишера и значением отношения шансов ($OR = 3,67$), указывают на существенно более высокий риск зараженности рыб именно в этом районе по сравнению с другими территориями области.

Отсутствие выявленных метацеркариев в ряде водоемов (озера Каражар, Биртабан, Майбалык, Камышное, а также река Ишим) может быть связано как с реальными различиями в эпизоотологической ситуации, так и с локальными особенностями экосистем, ограничивающими замыкание жизненного цикла

паразита. Вместе с тем наличие нулевых значений в отдельных выборках подчеркивает мозаичный характер распространения описторхоза и необходимость комплексного подхода к мониторингу водоемов.

Высокий процент эксцистирования метацеркариев в условиях искусственного желудочного сока (до 98%) подтверждает их биологическую полноценность и высокий инвазионный потенциал. Быстрый выход личинки из цисты и сохранение активной двигательной функции свидетельствуют о реальной угрозе заражения человека при употреблении недостаточно термически обработанной рыбы. Эти данные согласуются с представлениями о высокой устойчивости личиночных стадий описторхид к внешним воздействиям и объясняют сохраняющуюся актуальность описторхоза как социально значимого гельминтоза.

Результаты проведенных молекулярно-генетических исследований свидетельствуют о высокой информативности и надежности выбранного комплекса ядерных и митохондриальных маркеров (*ITS1*, *ITS2*, *COX1*, *COX3*) для идентификации и дифференциации возбудителей семейства *Opisthorchiidae*. Формирование коллекции ДНК *O. felineus* и *M. bilis*, выделенной непосредственно из метацеркариев рыб Акмолинской области, является ключевым этапом создания региональной молекулярной базы данных, отражающей циркуляцию возбудителей в природных очагах.

Применение фенол–хлороформного метода экстракции позволило получить ДНК высокого качества, что подтверждается оптимальными значениями оптического соотношения A_{260}/A_{280} и достаточными концентрациями ДНК для проведения ПЦР и последующего секвенирования. Это согласуется с литературными данными, указывающими на высокую эффективность данного метода при работе с тканями паразитов и личиночными стадиями гельминтов.

Результаты ПЦР-анализа показали стабильную амплификацию фрагментов ожидаемой длины для всех использованных маркеров, что подтверждает специфичность примененных праймеров. Отсутствие амплификации в отрицательных контролях исключает контаминацию и свидетельствует о корректности постановки реакций. Полученные размеры ампликонов соответствуют данным ранее опубликованных исследований, что дополнительно подтверждает воспроизводимость и корректность методического подхода.

Секвенирование ПЦР-продуктов и последующий сравнительный анализ с базой данных *GenBank* показали 100%-ное совпадение нуклеотидных последовательностей исследуемых изолятов *O. felineus* и *M. bilis* с референсными образцами. Депонирование полученных последовательностей в базе *NCBI* имеет важное значение для расширения доступных данных о генетическом разнообразии описторхид в Центральной Азии и повышает репрезентативность глобальных молекулярных баз.

Филогенетический анализ, выполненный на основе как ядерных, так и митохондриальных маркеров, подтвердил корректность видовой идентификации исследуемых изолятов. Для *O. felineus* последовательности

устойчиво формировали монофилетическую кладу с эталонными изолятами данного вида, характеризуясь минимальными генетическими расстояниями и короткими длинами ветвей. Аналогичная картина была получена для *M. bilis*, где исследуемые последовательности четко кластеризовались с референсными представителями рода *Metorchis*, достоверно отделяясь от родов *Opisthorchis* и *Clonorchis*.

Использование различных маркеров позволило проследить как внутривидовые, так и межродовые эволюционные взаимоотношения. Ядерные области *ITS1* и *ITS2* продемонстрировали высокую консервативность внутри вида и хорошую разрешающую способность при разделении близкородственных таксонов. В свою очередь, митохондриальные маркеры *COX1* и *COX3* обеспечили дополнительную информативность за счет более высокой скорости накопления мутаций, что особенно важно для уточнения филогенетических связей и молекулярного «штрих-кодирования» видов.

Выявленные филогенетические различия между представителями родов *Opisthorchis* и *Metorchis* подтверждают их самостоятельный эволюционный путь и согласуются с современными представлениями о систематике семейства *Opisthorchiidae*. Четкое разделение клад и устойчивое положение исследуемых изолятов внутри соответствующих таксонов свидетельствуют о высокой диагностической ценности примененного молекулярного подхода, особенно в условиях морфологической схожести личиночных стадий паразитов.

Таким образом, полученные результаты подтверждают эффективность комплексного использования ПЦР, секвенирования и филогенетического анализа для точной идентификации возбудителей описторхоза и меторхоза. Созданная коллекция ДНК *O. felineus* и *M. bilis* может служить надежной основой для разработки и валидации диагностических тест-систем, проведения популяционно-генетических исследований и организации молекулярного эпидемиологического мониторинга описторхид в Акмолинской области и сопредельных регионах.

Сравнение разработанных нами ПЦР тест-систем и коммерческих тест-систем показывает явное преимущество наших решений как с экономической, так и с диагностической точки зрения. Разработанная нами моноплексная ПЦР и мультиплексная ПЦР на *COX1*-региона имеют себестоимость порядка 1 073-1 078 тенге на пробу (103–103,5 тыс. тенге на 96 проб). При этом мультиплексная система позволяет определять сразу двух возбудителей – *O. felineus* и *M. bilis* в одной реакционной пробирке, что экономит ресурсы и сокращает время анализа до одной реакции вместо двух моноплексных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщение полученных результатов экспериментальных исследований привели к следующим **выводам**:

1. Проведенная ветеринарно-санитарная экспертиза рыбы из водоемов Акмолинской области показала широкую циркуляцию трематод семейства *Opisthorchiidae* в природных очагах региона и их реальную эпидемиологическую опасность. При исследовании 970 экземпляров карповых установлено, что язь наиболее воспричив к описторхидам, тогда как у других видов рыб зараженность значительно ниже или отсутствует. Наиболее неблагополучным оказался Коргалжынский район, откуда поступает основная масса рыбы на рынки Астаны: экстенсивность инвазии у язя достигала 33,1% ($p=0,017$; $OR=3,67$). Выявленные метацеркарии морфологически соответствовали представителям *Opisthorchiidae* и отличались высокой жизнеспособностью (до 98%), что подтверждает их высокий инвазионный потенциал.

2. Были выделены метацеркарии из мышц рыб по морфологическим признакам, соответствующие семейству *Opisthorchiidae*. С использованием молекулярных методов создана коллекция ДНК возбудителей *O. felineus* и *M. bilis* в количестве 186 образцов, из которых 110 метацеркариев принадлежат *O. felineus* и 76 – *M. bilis*. Концентрация ДНК образцов варьировала от 4,7 до 10 нг/мкл.

3. Были проанализированы генетические маркеры генома *O. felineus* и *M. bilis* для выявления мутаций, в результате чего определены специфические участки ДНК, использованные для разработки видоспецифических праймеров. Полученные нуклеотидные последовательности депонированы в базе данных NCBI.

4. Осуществлены подбор и синтез видоспецифических праймеров для амплификации фрагментов *ITS2* региона возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*. Размер амплифицированных ПЦР-продуктов составил 207 п.н. для *O. felineus* и 307 п.н. для *M. bilis*. Синтезированы следующие последовательности праймеров: *OF-Spec-F* TGGCATGATTTCCCCACGCA; *OF-Spec-R* GCATTGCCAATACTGGAGCC; *MB-Spec-F* TGGCATGATTTCCCCGCACG; *MB-Spec-R* CGCGCACATACACAACAATAAG.

5. Осуществлены подбор и синтез видоспецифических праймеров для амплификации фрагментов митохондриального гена *COX1* возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*. Размер амплифицированных ПЦР-продуктов составил 307 п.н. для *O. felineus* и 252 п.н. для *M. bilis*. Синтезированы следующие последовательности праймеров: *CO1nOf-F* TTGGAATGATTAGTCATGTTTGTAC-G; *CO1nOf-R* CCCCACSTATAGTAAAAAGCACTAT; *COX1*: *COIn-Fw* TGTTAATATTGCCGGGGTTTG; *COInMb-R* TTTATCCCAGTAGGAACACC-TATAAC.

6. Проведена отработка и определены оптимальные параметры протокола постановки ПЦР-анализа. Оптимальные параметры ПЦР-теста на основе

рибосомального кластера *ITS2* были следующие: 10 пмоль каждого праймера, 100 нг геномной ДНК в качестве матрицы, 1 Ед. ДНК-полимеразы, 1,5 mM MgCl, 2,0 mM dNTP. Режимы амплификации: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, далее 35 циклов, включающих денатурацию при 95°C в течение 15 сек и отжиг при 59°C в течение 25 сек, элонгация при 72°C в течение 30 сек, с заключительной элонгацией при 72°C в течение 5 мин.

Для мультиплексного ПЦР-теста на основе праймеров митохондриального гена *COX1*: 10 пмоль каждого праймера, 100 нг геномной ДНК в качестве матрицы, 1 Ед. ДНК-полимеразы, 1,5 mM MgCl, 2,0 mM dNTP. Режимы амплификации: начальная денатурация при 95°C в течение 5 мин, далее 35 циклов, включающих денатурацию при 95°C в течение 15 сек и отжиг при 62°C в течение 25 сек, элонгация при 72°C в течение 30 сек, с последним этапом элонгации - 72°C в течение 5 мин.

7. ПЦР-тест был протестирован на биологических образцах, показав высокую специфичность и чувствительность. Предел обнаружения мультиплексной ПЦР для *O. felineus* и *M. bilis* составил 100 пг.

8. Мультиплексный ПЦР-тест на основе *COX1* для одновременного выявления *O. felineus* и *M. bilis* при увеличении себестоимости всего на 0,38% по сравнению с моноплексными тестами позволяет при диагностике двух возбудителей снизить затраты почти на 50% и более чем в 4 раза дешевле коммерческих ПЦР-наборов, обеспечивая при этом более рациональное использование реагентов и лабораторных ресурсов.

Предложения производству выводы

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

2. Разработанная "ПЦР-тест система для детекции и дифференциальной диагностики *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*" имеет коммерческий потенциал, при успешной регистрации и серийном производстве может быть использована в диагностических лабораториях страны с дальнейшим выходом на диагностический рынок стран Центральной Азии.

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

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- 1 Phupiewkham W., Sadaow L., Sanpool O. et al. Comparative assessment of iM M unochromatographic test kits using somatic antigens from adult *Opisthorchis viverrini* and IgG and IgG4 conjugates for serodiagnosis of human opisthorchiasis // *Parasitology Research*. – 2021. – Vol. 120, №8. – P. 2839-2846.
- 2 Simakova A.V., Babkina I.B., Chitnis N. et al. The role of non-commercial cyprinids in maintenance and spread of the opisthorchiasis focus in the middle Ob River basin (Tomsk region, Russia) // *Food and Waterborne Parasitology*. – 2022. – Vol. 26, №136. – P. e00146.
- 3 Tidman R., Kanankege K.S.T., Bangert M. et al. Global prevalence of 4 neglected foodborne trematodes targeted for control by WHO: a scoping review to highlight the gaps // *PLoS Negl Trop Dis*. – 2023. – Vol. 17, №3. – P. e0011073.
- 4 Centers for Disease Control and Prevention // <https://www.cdc.gov/>. 12.01.2026.
- 5 Besprozvannykh V.V., Tatonova Y.V., Shumenko P.G. Life cycle, morphology of developmental stages of *Metorchis ussuriensis* sp. nov. (Trematoda: Opisthorchiidae), and phylogenetic relationships with other opisthorchiids // *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. – 2018. – Vol. 57, №1. – P. 12230.
- 6 Kulsantiwong J., Thitapakorn V., Sathavornmanee T. et al. Susceptibility patterns of *Bithynia siamensis siamensis* and *Bithynia funiculata* to *Opisthorchis viverrini* infection: an indication of the risk of opisthorchiasis transmission in non-endemic areas // *Parasitology Research*. – 2022. – Vol. 121, №12. – P. 3495-3501.
- 7 Катохин А.В., Шеховцов С.В., Конков С. и др. Оценка генетических отличий *Opisthorchis felinus* от *O. viverrini* и *Clonorchis sinensis* по последовательностям ITS2 и CO1 // *Докл. Биохим.* – 2008. – №421. – С. 214-217.
- 8 Бээр С. А. Биология возбудителя описторхоза. – М. : РАН, 2005. – 336 с.
- 9 Маюрова А.С., Кустакова М.А. Исследование влияния паводков и некоторых биотических факторов на распространение моллюсков семейства *Bithyniidae* – промежуточных хозяев возбудителей описторхоза // *Биосфера*. – 2019. – Т. 11, №1. – С. 28-35.
- 10 Ponomareva N.M., Orlova T.V., Vlasenko P.G. et al. Temperature dependence of *Opisthorchis felinus* infection in the first intermediate host snail, *Bithynia troschelii* // *Acta Tropica*. – 2024. – Vol. 253. – P. 107166.
- 11 Rachprakhon P., Purivirojkul W. Very low prevalence of *Opisthorchis viverrini* s.l. cercariae in *Bithynia siamensis siamensis* snails from the canal network system in the Bangkok Metropolitan Region, Thailand // *Parasite*. – 2021. – Vol. 28. – P. 2.
- 12 Park G.M. Genetic comparison of liver flukes, *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*, based on rDNA and mtDNA gene sequences // *Parasitology Research*. – 2006. – Vol. 100, №2. – P. 351-357.
- 13 Garcia L.S. *Diagnostic Medical Parasitology*. – Ed. 5th ed. – Washington: ASM Press, 2007. – 1236 p.
- 14 Sohn W.M., Jung B.K., Lee K.H. et al. Identification of an *Opisthorchis*

viverrini-like liver fluke from Myanmar: metacercariae recovered from snakehead fish and adults from an experimentally infected hamster // *Parasites Hosts & Diseases*. – 2025. – Vol. 63, №2. – P. 174-181.

15 Zadenesents K.S., Polyakova A.V., Katokhin A.V. et al. Chromosome or phometry in opisthorchiid species (Platyhelminthes, Trematoda) // *Parasitology International*. – 2017. – Vol. 66, №4. – P. 396-401.

16 Keys to Trematoda / ed. A. Jones, R.A. Bray, D.I. Gibson. – Wallingford; London, 2005. – Vol. 2. – 768 p.

17 Ponomarev D., Lvova M., Mordvinov V. et al. Anti-*Opisthorchis felinus* effects of artemisinin derivatives: an in vitro study // *Acta Trop.* – 2024. – Vol. 254. – P. 107196.

18 Sithithaworn P. et al. *Opisthorchis viverrini* and *Opisthorchis felinus* // *Encyclopedia of Food Safety*. – 2024. – Vol. 1-4. – P. 673-685.

19 Binh T.T., Linh Nguyen D., Isabelle J. et al. Identification, recombinant protein production, and functional analysis of a M60-like metallopeptidase, secreted by the liver fluke *Opisthorchis viverrini* // *Parasitology International*. – 2020. – Vol. 75. – P. 102050.

20 Wendo W.D., Thongrin T., Tangkawattana P. et al. Goblet cell metaplasia and mucin alterations in biliary epithelial cells during *Opisthorchis viverrini* infection in rodent models: insights into host susceptibility and defense mechanisms // *Veterinary World*. – 2025. – Vol. 18, №3. – P. 534-546.

21 Sithithaworn P., Andrews R.H., Mordvinov V.A. et al. *Opisthorchis viverrini* and *Opisthorchis felinus* // In book: *Reference Module in Food Science*. – Amsterdam: Elsevier, 2024. – P. 673-685.

22 Pakharukova M.Y., Savina E., Ponomarev D.V. et al. Proteomic characterization of *Opisthorchis felinus* exosome-like vesicles and their uptake by human cholangiocytes // *J Proteomics*. – 2023. – Vol. 283-284. – P. 104927.

23 Khuntikeo N., Thinkhamrop B., Bundhamcharoen K. et al. The socioeconomic burden of cholangiocarcinoma associated with *Opisthorchis viverrini* sensu lato infection in Northeast Thailand: a preliminary analysis // *Advances in Parasitology*. – 2018. – №102. – P. 141-163.

24 Kiyan V.S., Bulashev A.K., Katokhin A.V. *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* metacercariae in cyprinid fish *Leuciscus idus* in Nura-Sarysu River, Kazakhstan // *The Korean J of Parasitology*. – 2018. – Vol. 56, №3. – P. 267-274.

25 Saltykova I.V., Ittiprasert W., Nevskaya K.V. et al. Hemozoin from the liver fluke, *Opisthorchis felinus*, modulates dendritic cell responses in bronchial asthma patients // *Frontiers in Veterinary Science*. – 2019. – Vol. 6. – P. 332.

26 Пельгунов А.Н. Проблемы описторхоза и дифиллоботриоза в нижнем течении Иртыша // *Российский паразитологический журнал*. – 2012. – №3. – С. 68-73.

27 Chai J.-Y. Digenetic trematodes // In book: *Epidemiology of trematode infections*. – NY., 2014. – P. 241-292.

28 Voronova A.N., Chelomina G.N. The SSU rRNA secondary structures of the Plagiorchiida species (Digenea), its applications in systematics and evolutionary inferences // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2019. – Vol. 78. – P. 104042.

- 29 Rudolphi C.A. Entozoorum synopsis cui accedunt mantissa duplex et indices locupletissimi. – Berlin, 1819. – 811 p.
- 30 Gurlt E.F. Lehrbuch der pathologischen Anatomie der Haussäugethiere. – Berlin: Verlag von G. Reimer, 1831. – 580 p.
- 31 Gurlt E.F. Lehrbuch der pathologischen Anatomie der Haussäugethiere. – Berlin: Verlag von G. Reimer, 2013. – 424 p.
- 32 Proceedings of the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences // <https://colab.ws/journals/28222>. 10.10.2025.
- 33 Скрябин К.И. Трематоды животных и человека: основы трематодологии. – М., 1947. – Т. 1. – 516 с.
- 34 Chai J.-Y., Jung B.-K. General overview of the current status of human foodborne trematodiasis // *Parasitology*. – 2022. – Vol. 149, №10. – P. 1262-1285.
- 35 Pakharukova M.Y., Mordvinov V.A. Similarities and differences among the *Opisthorchiidae* liver flukes: insights from *Opisthorchis felinus* // *Parasitology*. – 2022. – Vol. 149, №10. – P. 1306-1318.
- 36 Симакова А.В., Бабкина И.Б., Катохин А.В. и др. Зараженность моллюсков рода *Bithynia* церкариями трематод семейства *Opisthorchiidae* в водоемах бассейна реки Обь (Томская область, Россия) // *Вестник Томского государственного университета*. – 2023. – №62. – С. 79-93.
- 37 Keiser J., Utzinger J. Food-borne trematodiasis // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2009. – Vol. 22, №3. – P. 466-483.
- 38 Terenina N.B., Kreshchenko N.D., Mochalпова N.V. et al. The new data on the serotonin and FMRFamide localization in the nervous system of *Opisthorchis felinus* metacercaria // *Acta Parasitologica*. – 2020. – Vol. 65, №2. – P. 361-374.
- 39 Simakova A.V., Chitnis N., Babkina I.B. et al. Abundance of *Opisthorchis felinus* metacercariae in cyprinid fish in the middle Ob River basin (Tomsk region, Russia) // *Food and Waterborne Parasitology*. – 2021. – Vol. 22. – P. e00113.
- 40 Yossepowitch O., Gotesman T., Assous M. et al. Opisthorchiasis from imported raw fish // *Emerg Infect Dis*. – 2004. – Vol. 10, №12. – P. 2122-2126.
- 41 Pozio E., Armignacco O., Ferri F. et al. *Opisthorchis felinus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union // *Acta Tropica*. – 2013. – Vol. 126, №1. – P. 54-62.
- 42 Caffara M., Serracca L., Gustinelli A. et al. Development and validation of species-specific molecular diagnostic tool for *Opisthorchis felinus* (Digenea, *Opisthorchiidae*) metacercaria // *International Journal of Food Microbiology*. – 2017. – Vol. 242. – P. 98-100.
- 43 Cacciò S.M., Chalmers R.M., Dorny P. et al. Foodborne parasites: outbreaks and outbreak investigations. A meeting report from the European network for foodborne parasites (Euro-FBP) // *Food and Waterborne Parasitology*. – 2018. – Vol. 10. – P. 1-5.
- 44 Muthukumar R., Suttiprapa S., Mairiang E. et al. Effects of *Opisthorchis viverrini* infection on glucose and lipid profiles in human hosts: a cross-sectional and prospective follow-up study from Thailand // *Parasitology Int*. – 2020. – Vol. 75. – P. 102000.

- 45 Dao H.T.T., Dermauw V., Gabriël S. et al. *Opisthorchis viverrini* infection in the snail and fish intermediate hosts in Central Vietnam // *Acta Tropica*. – 2017. – Vol. 170. – P. 120-125.
- 46 Namsanor J., Sithithaworn P., Kopolrat K. et al. Seasonal transmission of *Opisthorchis viverrini* sensu lato and a lecithodendriid trematode species in *Bithynia siamensis* goniomphalos snails in northeast Thailand // *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. – 2015. – Vol. 93, №1. – P. 87-93.
- 47 Alok K.D., Pooja D., Manigandan L. et al. Parasites of Liver and Pancreas // In book: *Organ-specific Parasitic Diseases of Dogs and Cats*. – Cambridge: Academic Press, 2023. – P. 239-264.
- 48 Labony S.S., Alim Md.A., Hasan M.M. et al. Zoonotic human liver flukes, a type 1 biocarcinogen, in freshwater fishes: genetic analysis and confirmation of molluscan vectors and reservoir hosts in Bangladesh // *Infectious Diseases of Poverty*. – 2024. – Vol. 13. – P. 40.
- 49 Prum S., Plumworaswat S., Chaiyadet S. et al. Characterization and in vitro functional analysis of thioredoxin glutathione reductase from the liver fluke *Opisthorchis viverrini* // *Acta Tropica*. – 2020. – Vol. 210. – P. 105621.
- 50 Chai J.-Y., Jung B.-K. Epidemiology of trematode infections: an update // *Adv Exp Med Biol*. – 2019. – Vol. 1154. – P. 359-409.
- 51 Shao Y., Lu L., Wang X. et al. Spatio-temporal disparities of *Clonorchis sinensis* infection in animal hosts in China // *Infectious Diseases of Poverty*. – 2023. – Vol. 12. – P. 46.
- 52 Zhang F., Wang J., Li J. et al. The selectivity for the second intermediate host (fish) of *Clonorchis sinensis* in the Jialing River basin, China – from the perspective of fish ecological viewpoint // *Biologia*. – 2021. – Vol. 76, №1. – P. 91-100.
- 53 Pak J.H., Lee J.-Y., Jeon B.Y. et al. Cytokine production in cholangiocarcinoma cells in response to *Clonorchis sinensis* excretory-secretory products and their putative protein components // *The Korean Journal of Parasitology*. – 2019. – Vol. 57, №4. – P. 379-387.
- 54 Kovner A.V., Kapushchak Y.K., Zaparina O. et al. Hepatic vascular changes associated with *Opisthorchis felinus* infection in Syrian hamsters and humans // *Acta Tropica*. – 2024. – Vol. 250. – P. 107100.
- 55 Qian M.-B., Keiser J., Utzinger J. et al. Clonorchiasis and opisthorchiasis: epidemiology, transmission, clinical features, morbidity, diagnosis, treatment, and control // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2024. – Vol. 37, №1. – P. e0000923.
- 56 Caffara M., Gustinelli A., Mazzone A. et al. Multiplex PCR for simultaneous identification of the most common European Opisthorchiid and Heterophyid in fish or fish products // *Food and Waterborne Parasitol*. – 2020. – Vol. 19. – P. e00081.
- 57 Sitko J., Bizos J., Sherrard-Smith E. et al. Integrative taxonomy of European parasitic flatworms of the genus *Metorchis* Looss, 1899 (Trematoda: *Opisthorchiidae*) // *Parasitology International*. – 2016. – Vol. 65, №3. – P. 258-267.
- 58 Caffara M., Gustinelli A., Mazzone A. et al. Materials and methods // Multiplex PCR for simultaneous identification of the most common European

opisthorchiid and heterophyid in fish or fish products // Food and Waterborne Parasitology. – 2020. – Vol. 19. – P. e00081.

59 Sebastià J., Alberto M. Iberian distribution of the freshwater snail genus *Bithynia* Leach, 1818 (Mollusca: *Truncatelloidea*), vector of opisthorchiasis and metorchiasis // Acta Parasitologica. – 2021. – Vol. 66, №4. – P. 1251-1266.

60 Näreaho A., Eriksson-Kallio A.M., Heikkinen P. et al. High prevalence of zoonotic trematodes in roach (*Rutilus rutilus*) in the Gulf of Finland // Acta Veterinaria Scandinavica. – 2017. – Vol. 59, №1. – P. 75.

61 Хамидуллин А.Р., Каюмова В.А., Султанаева Э.Г. и др. Лечение описторхоза // Казанский медицинский жур. – 2006. – Т. 87, №6. – С. 483-484.

62 Литвина Л.А., Соусь С.М., Стрижак В.М. Медико-биологические аспекты проблемы меторхоза и описторхоза в Западной Сибири // Фундаментальные исследования. – 2004. – №2. – С. 64-66.

63 Федеров К.П., Анаумов В.А., Кузнецова В.Г. и др. О некоторых актуальных вопросах проблемы описторхозов человека // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. – 2002. – №3. – С. 7-9.

64 Bekenova A.B., Katokhin A.V., Muratbekova K.B. et al. Molecular differentiation of *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* in cyprinid fish from Northern Kazakhstan: epidemiological insights and diagnostic advances // Veterinary World. – 2025. – Vol. 18, №10. – P. 3197-3207.

65 MacLean J.D., Arthur J.R., Ward B.J. et al. Common on source outbreak of acute infection due to the North American liver fluke *Metorchis conjunctus* // The Lancet. – 1996. – Vol. 347, №8995. – P. 154-158.

66. Mathison B.A., Pritt B.S. A systematic overview of zoonotic helminth infections in North America // Laboratory Med. – 2018. – Vol. 49, №4. – P. 61-93.

67 Gao L., Lv C., Mao Y. et al. Integrative Transcriptomics and Proteomics Analyses to Reveal the Developmental Regulation of *Metorchis orientalis*: A Neglected Trematode With Potential Carcinogenic Implications // International Journal for Parasitology. – 2021. – Vol. 11. – P. 783662.

68 Zhang F., Liu L., Zhang J., Zhang H. Prevalence of trematode metacercariae in *Pseudorasbora parva* and species identification in Qiqihar area // Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases. – 2023. – P. 112-116.

69 Mata-Marcano C., Stöck M., Knopf K. Morphological and molecular assessment of muscle metacercariae infecting tench *Tinca tinca* from fish farms and wild populations in Germany // Scientific Reports. – 2025. – Vol. 15. – P. 23700.

70 Sokolov S., Kalmykov A., Frolov E., Atopkin D. Taxonomic myths and phylogenetic realities in the systematics of the *Opisthorchiidae* (Trematoda) // Zoologica Scripta. – 2022. – Vol. 51. – P. 232-245.

71 Solodovnik D.A., Tatonova Y.V., Besprozvannykh V.V. Morpho-molecular features and phylogenetic relationships of *Metorchis butoridi* Oschmarin, 1963 (Trematoda: *Opisthorchiidae*) from East Asia // Animals. – 2024. – Vol. 14. – P. 124.

72 Sherrard-Smith E., Perkins S.E., Chadwick E.A. et al. Spatial and seasonal factors are key determinants in the aggregation of helminths in their definitive hosts: *Pseudamphistomum truncatum* in otters (*Lutra lutra*) // International Journal for

Parasitology. – 2015. – Vol. 45, №1. – P. 75-83.

73 Neimanis A.S., Moraes C., Bergman A. et al. Emergence of the zoonotic biliary trematode *Pseudamphistomum truncatum* in grey seals (*Halichoerus grypus*) in the Baltic Sea // Plos One. – 2016. – Vol. 11, №10. – P. 1371.

74 Зятьков С.А. Метациркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России. – М.: Наука, 2002. – 298 с.

75 Сидоров Е.Г. Очаги описторхоза в Казахстане и профилактика заболевания. – Алматы, 2011. – 64 с.

76 Aubakirov M.Z., Abdybekova A.M., Khassanova M.A. et al. Epizootology and epidemiology of opisthorchiasis in northern Kazakhstan // Online Journal of Biological Sciences. – 2022. – Vol. 22. – P. 340-346.

77 Proskurina L., Koltun G., Simakova M. et al. Prevalence of opisthorchiasis in the Pavlodar region of the Republic of Kazakhstan // E3S Web of Conferences: art. in the conf. proceed. – Blagoveshchensk, 2020. – P. 01024.

78 Уразаева С.Т., Мурзагалиева А.Ж., Таскалиева Д.С. и др. Описторхоз эпидемиологиясы // Медицинский журнал Западного Казахстана. – 2012. – №3(35). – С. 251.

79 Григорьева И.Н. Клинико-эпидемиологическая характеристика описторхоза // Эпидемиология и инфекционные болезни. актуальные вопросы. – 2012. – №4. – С. 39-43.

80 Tleulesov R.B. et al. Veterinary sanitary examination and helminthosis comparative monitoring of fish of water sources of Korgalzyn district, Akmola Region // Herald of Science of S. Seifullin Kazakh Agrotechnical Research University: Veterinary Sciences. – 2023. – №1(001). – P. 43-51.

81 Кармалиев Р.С., Сидихов Б.М., Жубантаев И.Н. Описторхоз плотоядных в условиях Западно-Казахстанской области // Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями: сб. науч. тр. – М., 2023. – С. 204-208.

82 Мажитова Г.З., Пашков С.В. Районирование территории Северо-Казахстанской области по степени потенциальной опасности проявления природно-очаговых заболеваний // Региональные геосистемы. – 2021. – Т. 45, №1. – С. 51-62.

83 Tolepova G., Zhumageldiyev A., Abdybekova A., Miciński J., Ussenbayev A., Witkowska-Dąbrowska M., Sobotka W. The influence of *Opisthorchis felinus* on the nutritional quality and processing factors of fish meat // Journal of Elementology. – 2024. – P. 73-85.

84 Киян В.С., Смагулова А.М., Катохин А.В. Меторхоз в Северном Казахстане: состояние изученности и распространение // Вестник КазНУ. – 2019. – Т. 80, №3. – С. 170-179.

85 Sultanov A., Addybekova A., Abdibaeva A., Shapiyeva Z., Yeshmuratov T., Torgerson P. R. Epidemiology of fishborne trematodiasis in Kazakhstan // Acta Tropica. – 2014. – P. 60-66.

86 Liberman E. Trematodes of cyprinid fish of the Lower Irtysh // Earth and Environmental Science. – 2020. – Vol. 539. – P. 012196.

87 Il'inskikh E.N., Novitskii V.V., Il'inskikh N.N. et al. Accumulation of some

toxic microelements in liver tissue and helminths obtained from patients with *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* invasion // Meditsinskaya Parazitologiya i Parazitarnye Bolezni. – 2006. – №4. – P. 37-40.

88 Pitaksakulrat O., Sithithaworn P., Laoprom N. et al. Cross-sectional study on the potential transmission of the carcinogenic liver fluke *Opisthorchis viverrini* and other fishborne zoonotic trematodes by aquaculture fish // Foodborne Pathogens and Disease. – 2013. – Vol. 10. – P. 35-40.

89 Завойкин В.А. Описторхоз: клиника, диагностика, лечение // Доктор.Ру. – 2017. – №3. – С. 50-52.

90 Sithithaworn P., Yongvanit P., Tesana S., Pairojkul C. Foodborne parasitic zoonoses. Fish-and plant-borne parasites // In book: World Class Parasites. – NY.: Springer, 2007. – P. 3-52.

91 Ai L., Dong S.J., Zhang W.Y. Specific PCR-based assays for the identification of *Fasciola* species: development, evaluation and potential usefulness in prevalence surveys // Annals of Tropical Medicine and Parasitology. – 2010. – Vol. 104. – P. 65-72.

92 Momcilovic S., Cantacessi C., Arsic-Arsenijevic V. et al. Rapid diagnosis of parasitic diseases: current scenario and future needs // Clinical Microbiology and Infection. – 2019. – Vol. 25, №3. – P. 290-309.

93 Байкова О.А., Николаева Н.Н., Грищенко Е.Г. и др. Трематодозы печени – описторхоз и клонорхоз: актуальность проблемы и принципы диагностики в современной клинической практике // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2016. – №6(112). – С. 182-190.

94 Sithithaworn P., Sripa B., Kaewkes S., Haswell-Elkins M. Foodborne trematodes // In book: Manson's tropical diseases. – London, 2009. – P. 1461-1476.

95 Jittimanee J., Sermswan R.W., Puapairoj A. et al. Cytokine expression in hamsters experimentally infected with *Opisthorchis viverrini* // Parasite Immunology. – 2007. – Vol. 29, №3. – P. 159-167.

96 Красавцев Е.Л., Коноваленко М.А., Гаркуша А.В. Частота выявления антител к антигенам *Opisthorchis felinus* в Республике Беларусь // Клиническая медицина. – 2022. – №1(84). – С. 5-7.

97 Wang Y., Li X., Sun Q. et al. First case report of *Metorchis orientalis* from black swan // International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife. – 2020. – Vol. 13. – P. 7-12.

98 Starkova T.V., Poletaeva O.G., Kovrova E.A. et al. The efficiency of the enzyme immunoassay test system opisthorchiasis-CIC-EIA-best to detect circulating immune complexes containing opisthorchis antigens in the serum of patients with opisthorchiasis// Med Parazitol Parazitarnye Bolezni. – 2011. – №3. – P. 44-45.

99 Jittiyawadee S., Brindley P., Sripa B. Evaluation of liver fluke recombinant cathepsin B-1 protease as a serodiagnostic antigen for human opisthorchiasis // Parasitology International. – 2012. – Vol. 61. – P. 191-195.

100 Pumpa S., Phadungsil W., Grams R. et al. Improvement of a PCR-based method for detection of *Opisthorchis viverrini* eggs in human stool samples // Journal of Parasitic Diseases. – 2021. – Vol. 45, №2. – P. 474-478.

101 Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в реальном

времени. – М., 2011. – 223 с.

102 Le T.H., Van De N., Blair D. et al. *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini*: development of a mitochondrial-based multiplex PCR for identification // *Experimental Parasitology*. – 2006. – Vol. 112. – P. 109-114.

103 Katokhin A.V., Serbina E.A. Molecular genetic species definition of *Opisthorchiidae*-like cercariae from *Bithyniidae* snails of Chany Lake (South-Western Siberia, Russia) // *Parasitology Res.* – 2023. – Vol. 122, №1. – P. 341-345.

104 Serbina E.A. Bithyniid snails as hosts of *Opisthorchiidae* and *Notocotylidae* in the south of Western Siberia, Russia // *Parasitology Research*. – 2022. – Vol. 121, №8. – P. 2367-2377.

105 Брюсенцев И.И., Катохин А.В., Сахаровская З.В. и др. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felinus* и *Metorchis bilis* методом ПЦР // *Медицинская паразитология и паразитарные болезни*. – 2010. – №2. – С. 10-13.

106 Ershov N.I., Mordvinov V.A., Prokhortchouk E.B. et al. New insights from *Opisthorchis felinus* genome // *BMC Genomics*. – 2019. – Vol. 20. – P. 399.

107 Mordvinov V.A., Ershov N.I., Zaparina O.G. et al. Genomics and proteomics of the liver fluke *Opisthorchis felinus* // *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. – 2020. – Vol. 24, №4. – P. 383-390.

108 Mordvinov V.A., Mardanov A.V., Ravian N.V. et al. Complete mitochondrial genome of *Opisthorchis felinus* // *Acta Naturae*. – 2009. – Vol. 1, №1. – P. 99-104.

109 Shekhovtsov S.V., Katokhin A.V., Kolchanov N.A. et al. Complete mitochondrial genomes of *Opisthorchis felinus* and *Clonorchis sinensis* // *Parasitology International*. – 2010. – Vol. 59, №1. – P. 100-103.

110 Xiang L., Jian D., Xiaoli Z. et al. MicroRNAs in opisthorchiids and their definitive hosts: current status and perspectives // *Mol Biochem Parasitol.* – 2024. – Vol. 260. – P. 111636.

111 Pauly A., Schuster R., Steuber S. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes using PCR // *Parasitology Research*. – 2003. – Vol. 90. – P. 409-414.

112 Müller B., Schmidt J., Mehlhorn H. PCR diagnosis of infections with different species of *Opisthorchiidae* using a rapid clean-up procedure for stool samples and specific primers // *Parasitology Research*. – 2007. – Vol. 100. – P. 905-909.

113 Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Brusentsova I.V. et al. Low genetic diversity in *Opisthorchis felinus* // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8, №4. – P. e62453.

114 Banoo S. et al. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles // *Nat Rev Microbiol.* – 2006. – Vol. 4. – P. S20-32.

115 Kang S., Sultana T., Loktev V.B. et al. Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among opisthorchiid liver flukes // *Parasitology International*. – 2008. – Vol. 57. – P. 191-197.

116 Sota P., Suttiaprapa S., Tangkawattana S. et al. Circulation of *Opisthorchis viverrini* between humans and domestic cats // *Parasitology*. – 2022. – Vol. 149, №10. – P. 1334-1338.

117 Vania A., Prasert S., Thewarach L. et al. Exploring the second intermediate hosts and morphology of human- and cat-specific *Opisthorchis viverrini*-like populations // International Journal for Parasitology. – 2024. – Vol. 54. – P. 497-506.

118 Maļeckis A., Cvetinska M., Kirjušina M. et al. A Comparative study of new fluorescent anthraquinone and benzanthrone α -aminophosphonates: synthesis, spectroscopy, toxicology, x-ray crystallography, and microscopy of *opisthorchis felineus* // Molecules. – 2024. – Vol. 29. – P. 1143.

119 Smagulova A., Katokhin A., Mambetpayeva B. et al. Multiplex PCR assay for differential detection of *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* // Georgian Medical News. – 2021. – №310. – P. 176-182.

120 Скрябин К.И. Трематоды животных и человека: основы трематодологии. – М., 1950. – Т. 4. – 495 с.

121 Методы санитарно-паразитологических исследований: метод. указ. / Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России. – М., 2000. – 67 с.

122 Scholz T., Horák P. D.I. Gibson, A. Jones, R.A. Bray (Eds.): Keys to the Trematoda. Volume I. // Folia Parasitologica. – 2003. – Vol. 50. – P. 56.

123 Cichy A., Żbikowska E. Atlas of Digenea developmental stages: The morphological characteristics and spread within the populations of freshwater snails from the Brodnickie Lakeland, Poland. – Torun, 2016. – 217 p.

124 Lvova M., Orlovskaya I., Goiman E. et al. Effect of artesunate and artemether against *Opisthorchis felineus* in rodent model // Acta Tropica. – 2026. – Vol. 274. – P. 107966.

125 Kulmer L.M., Unterköfler M.S., Vali Y. et al. First autochthonous case of *Opisthorchis felineus* in Austria // Parasites & Vectors. – 2025. – Vol. 18. – P. 20.

126 Зятков С.А., Гончаренко Г.Г., Крук А.В. и др. ПЦР-анализ меторхоза и микст-инвазий // European Science. – 2019. – №7(49). – P. 7-12.

127 Михалева Е.В. Ветеринарно-санитарная оценка описторхозной рыбы и фармакологический эффект препарата *Saussurea Amaga* при описторхозе собак: автореф. дис. на соиск. учен. степ. канд. биол. наук / Е.В. Михалева. – Казань, 2005. – 24 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Лабораторный регламент

Для служебного пользования. Экз. N ____

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РЕСПУБЛИКИ КАЗАХСТАН**
НАО «Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина»

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Председателя Правления
по науке, инновационной деятельности
и международным связям НАО
«Казахский агротехнический
университет им. С. Сейфуллина»

И.Т. Токибергенов

« 30 » 12 2020 г.



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

производства «ПЦР-тест система для детекции и дифференциальной
диагностики *Opisthorchis felinus* и *Metorchis bilis*»

Нур-Султан, 2020

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Методические рекомендации



ПРИЛОЖЕНИЕ В

Акт о внедрении в учебный процесс

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан
НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени
Сакена Сейфуллина»



о внедрении результатов научной работы в учебный процесс

1. Наименование результатов научной и (или) научно-технической деятельности

- **Методические рекомендации** / Подгот. Бекенова А.Б., Киян В.С./ ТОО «Национальный центр биотехнологии», МЗ РК. – Астана, 2024. – 16 с.

- **Патент РК № 35353 на изобретение А61К 10/00 (2006.01):** Специфические праймеры для мультиплексной ПЦР-диагностики возбудителей семейства *Opisthorchiidae* / Мукамбаев А., Капанов А.Ж., Бекенова А.Б., Киян В.С., заявитель и патентообладатель «Казахский агротехнический университет имени Сакена Сейфуллина» (KZ) – заявл. 07.08.2020; опублик. 05.11.2021. – Бюл. №44. – 7 с.

2. Краткая аннотация

Методические рекомендации подготовлены на основе результатов, полученных в ходе реализации грантового проекта АР05113132 «ПЦР-тест для детекции и дифференциальной диагностики возбудителей описторхоза и меторхоза», финансируемого Министерством образования и науки Республики Казахстан.

Методические рекомендации предназначены для научных сотрудников лабораторий медицинского и ветеринарного профиля, а также для студентов, магистрантов и докторантов, проводящих исследования в области возбудителей описторхоза и меторхоза.

Изобретение (Патент РК № 35353) относится к области биотехнологии, в частности к молекулярной генетике, и может быть использовано в медицине и ветеринарии при разработке ПЦР-тестов для мультиплексной диагностики возбудителей семейства *Opisthorchiidae*, в том числе *Opisthorchis felinus* и *Metorchis bilis*.

Сущность изобретения заключается в разработке видоспецифических праймеров на основе фрагментов митохондриального участка гена COX1 для мультиплексной диагностической тест-системы, использующей методы идентификации ДНК возбудителей семейства *Opisthorchiidae* в виде мультиплексного ПЦР-анализа, позволяющего обнаруживать микст-инвазии в одной реакции ПЦР.

3. Место внедрения:

Институт науки о животных и ветеринарии, группа образовательных программ «Животноводство и биологические науки», образовательные программы: 6B05102 – «Биотехнология».

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Отчет по НИР в рамках ГФ и ПЦФ

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан

НАО «КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. С. СЕЙФУЛЛИНА»
(НАО КАТУ им. С.СЕЙФУЛЛИНА)

Индекс УДК 675.22:616-098

Reg. № 0118PK00647

Reg. № ИКРБС _____

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Председателя Правления
по науке, инновационной деятельности
и международным связям

НАО «КАТУ» им. С. Сейфуллина»
Токбергенов И.Т.
2020 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ПЦР-ТЕСТ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ
ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПИСТОРХОЗА И МЕТОРХОЗА
(заключительный)

Программа 217 «Развитие науки»

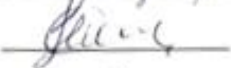
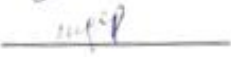
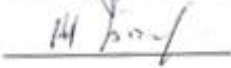
Научный руководитель НИР



В.С. Киян

Нур-Султан 2020

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель темы, PhD		Киян В.С. (введение, раздел 1.3.4, 1.3.5, 1.3.9, заключение)
Исполнители темы:		
Ведущий научный сотрудник, д.б.н., доцент		Кухар Е.В. (раздел 1.3.3, 1.3.4.)
Научный сотрудник, к.в.н., доцент		Сураншиев Ж.А. (раздел 1.3.3, 1.3.4.)
Научный сотрудник, к.в.н., доцент		Лидер Л.А. (раздел 1.3.2, 1.3.3, 1.3.4)
Старший научный сотрудник, м.т.н.		Смагулова А.М. (раздел 1.3.1, 1.3.2, 1.3.3, 1.3.6, 1.3.7, 1.3.8)
Научный сотрудник, м.с\х.н.		Байболин Ж.К. (раздел 1.3.1, 1.3.2.1.3.5)
Младший научный сотрудник, м.т.н, докторант		Бекенова А.Б. (раздел 1.3.2, 1.3.3, 1.3.5, 1.3.6)
Нормоконтролер, специалист отдела наук		Жарылгасынов С.С.

Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан
НАО «КАЗАХСКИЙ АГРОТЕХНИЧЕСКИЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. С. СЕЙФУЛЛИНА»
(НАО «КАТИУ им. С. Сейфуллина»)

МРНТИ: 68.41.31; 68.41.35; 68.41.63
УДК: 035.63/64:006.015(047.3)
№госрегист. 0124РК01095

УТВЕРЖДАЮ



Член Правления – проректор по научной и
инновационной деятельности НАО
«Казахский агротехнический
исследовательский университет им.
С. Сейфуллина» к. ф-м. н.

« 11 » _____ Е.О. Сыргалиев
2024 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ПОВЫШЕНИЕ УРОВНЯ БЕЗОПАСНОСТИ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ
(промежуточный)
Шифр программы О.1294

Программно-целевое финансирование по научной, научно-технической программе
на 2024-2026 годы

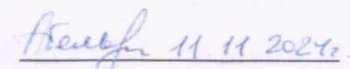
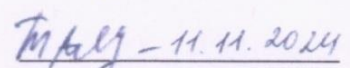
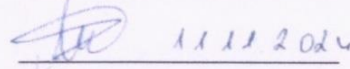
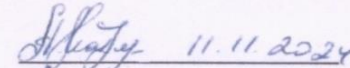
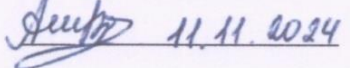
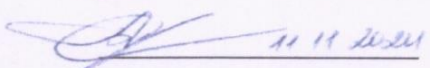
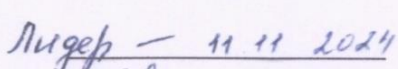
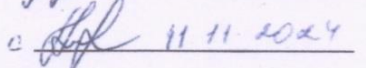
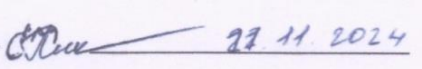
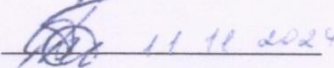
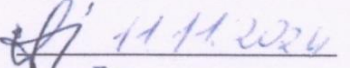
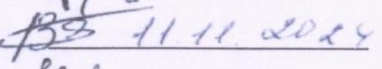
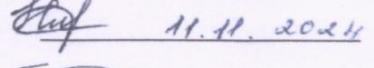
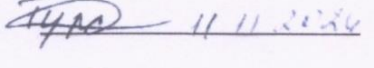
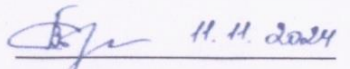
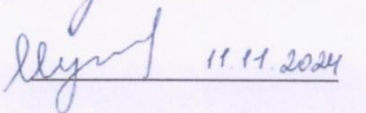
Руководитель НИР,
профессор кафедры микробиологии
и биотехнологии, д.в.н.

А.К. Булашев

Астана 2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

НАО «Казахский агротехнический исследовательский университет имени Сакена Сейфуллина»

Руководитель НИР, профессор микробиологии и биотехнологии, докт. вет. наук	кафедры	 11.11.2024	А.К. Булашев (введение, заключение)
Гл. науч. сотр., преподаватель, PhD	старший	 11.11.2024	С.К. Абельденов (раздел 1)
Ст. науч. сотр., PhD		 11.11.2024	А.М. Тургимбаева (раздел 1)
Мл. науч. сотр., PhD-докторант		 11.11.2024	М.Ж. Аманжолова (раздел 1)
Мл. науч. сотр., PhD-докторант		 11.11.2024	А.М. Шайзадинова (раздел 1)
Лаборант, магистрант		 11.11.2024	А.У. Акимбекова (раздел 1)
Гл. науч. сотр., PhD, ассоц. проф.		 11.11.2024	В.С. Киян. (раздел 7)
Вед. науч. сотр., канд.вет.наук		 11.11.2024	Л.А. Лидер (раздел 7)
Вед. науч. сотр., канд.биол.наук		 11.11.2024	А.М. Смагулова (раздел 7)
Науч. сотр., магистр техн. наук.		 22.11.2024	Р.С. Уахит (раздел 7)
Науч. сотр., магистр естеств.наук		 11.11.2024	К.Т. Джазина (раздел 7)
Науч. сотр., магистр тех. наук		 11.11.2024	А.Б. Бекенова (раздел 7)
Мл. науч. сотр., магистрант		 11.11.2024	Д.М. Валеева (раздел 7)
Мл. науч. сотр., магистрант		 11.11.2024	Н.С. Манапов (раздел 7)
Мл. науч. сотр., магистрант		 11.11.2024	Т.А. Тұрсынбек (раздел 7)
Гл. науч. сотр., канд. биол. наук, и.о.проф.		 11.11.2024	С.Н. Боровиков (раздел 5)
Вед.науч.сотр., зав. лабораторией, докт. биол. наук		 11.11.2024	К.Н. Мукантаев (раздел 5)

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Регистрационные номера нуклеотидных последовательностей, депонированных
в базе данных *GenBank*

Metorchis bilis isolate Mb_ITS1_Kz internal transcribed spacer 1, partial sequence

GenBank: PQ675620.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☐

LOCUS PQ675620 493 bp DNA linear INV 08-DEC-2024
DEFINITION Metorchis bilis isolate Mb_ITS1_Kz internal transcribed spacer 1,
partial sequence.
ACCESSION PQ675620
VERSION PQ675620.1
KEYWORDS .
SOURCE Metorchis bilis
ORGANISM [Metorchis bilis](#)
Eukaryota; Metazoa; Spiralia; Lophotrochozoa; Platyhelminthes;
Trematoda; Digenea; Opisthorchiida; Opisthorchiata;
Opisthorchiidae; Metorchis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 493)
AUTHORS Bekenova,A.B., Kiyan,V.S. and Smagulova,A.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-DEC-2024) Laboratory of Biodiversity and Genetic
Resources, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye
road, Astana 010000, Kazakhstan
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..493
/organism="Metorchis bilis"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Mb_ITS1_Kz"
/isolation_source="metacercariae"
/host="Leuciscus idus"
/db_xref="taxon:475399"
/geo_loc_name="Kazakhstan"
/collection_date="Jul-2022"
misc RNA <1..>493
/product="internal transcribed spacer 1"
ORIGIN
1 tatcttgcag cattgtctgc ctaggcgga gcgattatag ttccgtcatt ttccacatgt
61 atagccatac atgctgcagc gtggtctgcc tacggtggag cgttcctagt tctaccaatt
121 cctggctgta cctggcatgt gtaccagta tgtgtgccta cgtacagtcg cgtttcggca
181 gggcgctac cgtctgatg ctctcggtgt gctcgcttc gttggtggcc agtccacatt
241 gggggtagc ggaatgtctg tcaggatgga cagtgcagg cttaatgagt gggcatatgt
301 tttagagctac ggctcaccca ccgcccgtat gttgttgttt tcaaacggtt ttactactgtt
361 aaagtgtttc aggcctggcct ggctggcctt tctcactgcc ccgacatgca cccggtgttc
421 tacactggac tgcattgtga gtcgcccggc ggtgccttat cccgggtacg actgataacg
481 cctctttcat ctg

Metorchis bilis isolate Mb_ITS2_Kz 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence

GenBank: PQ727653.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: 

LOCUS PQ727653 270 bp DNA linear INV 15-DEC-2024
DEFINITION Metorchis bilis isolate Mb_ITS2_Kz 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, partial sequence.
ACCESSION PQ727653
VERSION PQ727653.1
KEYWORDS .
SOURCE Metorchis bilis
ORGANISM [Metorchis bilis](#)
Eukaryota; Metazoa; Spinalia; Lophotrochozoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea; Opisthorchiida; Opisthorchiata; Opisthorchiidae; Metorchis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 270)
AUTHORS Bekenova,A.B., Kiyan,V.S. and Smagulova,A.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (09-DEC-2024) Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 13/5, Kungaizhynskoye road, Astana 010000, Kazakhstan
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..270
/organism="Metorchis bilis"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Mb_ITS2_Kz"
/host="Leuciscus idus"
/db_xref="taxon:475399"
/dev_stage="metacercariae"
/geo_loc_name="Kazakhstan"
/collection_date="Jul-2022"
misc RNA <1..>270
/note="contains 5.8S ribosomal RNA and internal transcribed spacer 2"
ORIGIN
1 cgagggtcgg cttataaact atcacgacgc ccaaaaaagtc gtggcttggg tcttgccagc
61 tggcatgatt tccccgcacg tttgtgtggg gtgcccggatc tgtggctttt ccccaatgtg
121 ccggacgcaa ccattgtctg gctgactgcc tagatgaggg ggtggcggcg gactcgtggc
181 tcaattgttc ttattgttgt gtatgtgcgc gctccgttgt tgttcctttg tctttggttg
241 aagctccagt agtggcaatg cattcgatgc

Metorchis bilis isolate Mb_COX1_Kz cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: PQ669125.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: 

LOCUS PQ669125 314 bp DNA linear INV 08-DEC-2024
DEFINITION Metorchis bilis isolate Mb_COX1_Kz cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial.
ACCESSION PQ669125
VERSION PQ669125.1
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion Metorchis bilis
ORGANISM *Metorchis bilis*
Eukaryota; Metazoa; Spinalia; Lophotrochozoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea; Opisthorchiida; Opisthorchiata; Opisthorchiidae; Metorchis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 314)
AUTHORS Bekenova,A.B., Kiyan,V.S. and Smagulova,A.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-DEC-2024) Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 13/5, Kung'alzhynskoye road, Astana 010000, Kazakhstan
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
Location/Qualifiers
source 1..314
/organism="Metorchis bilis"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Mb_COX1_Kz"
/isolation_source="metacercariae"
/host="Leuciscus idus"
/db_xref="taxon:475399"
/geo_loc_name="Kazakhstan"
/collection_date="Jul-2022"
gene <1..314
/gene="COX1"
CDS <1..314
/gene="COX1"
/codon_start=1
/transl_table=9
/product="cytochrome c oxidase subunit I"
/protein_id="XXV26902.1"
/translation="TGNDSLFGYGGVLAMFAIVCLGSSVVAHHMFTVGLDLGTAVFF
SSVTMVGVPVGIVKVFSLYMLAGTRDRFNDPIIMMIIGFVVLFTIGVGTGIVLSASV
IDA"
ORIGIN
1 actgggaaag attctttatt cggttatggg ggtttggtgt tagctatggt tgctatagtt
61 tgtttgggta gcgtggtttg ggcgcaccac atgtttactg ttgggctgga ttggggcact
121 gctgtttttt ttagttctgt aactatggtt ataggtgttc ctactggtat aaagggtttt
181 tcttggttgt atatgcttgc tgggtactgt gatcgtttt gagaccgat tatgtggtgg
241 ataatagggt ttgtatgct ttttactata ggggggggta ctggtatagt tttatctgct
301 tctgtgattg atgc
..

Metorchis bilis clone Mb_COX3_Kz cytochrome c oxidase subunit 3 (cox3) gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: PQ685674.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: 

LOCUS PQ685674 350 bp DNA linear INV 11-JAN-2025
DEFINITION Metorchis bilis clone Mb_COX3_Kz cytochrome c oxidase subunit 3 (cox3) gene, partial cds; mitochondrial.
ACCESSION PQ685674
VERSION PQ685674.1
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion Metorchis bilis
ORGANISM Metorchis bilis
Eukaryota; Metazoa; Spiralia; Lophotrochozoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea; Opisthorchiida; Opisthorchiata; Opisthorchiidae; Metorchis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 350)
AUTHORS Bekenova,A.B., Kiyan,V.S. and Smagulova,A.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (04-DEC-2024) Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Astana 010000, Republic of Kazakhstan
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..350
/organism="Metorchis bilis"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/isolation_source="metacercariae"
/host="Leuciscus idus"
/db_xref="taxon:475399"
/clone="Mb_COX3_Kz"
/geo_loc_name="Kazakhstan"
/collection_date="Jul-2022"
gene <1..>350
/gene="cox3"
CDS <1..>350
/gene="cox3"
/codon_start=1
/transl_table=9
/product="cytochrome c oxidase subunit 3"
/protein_id="XLZ85571.1"
/translation="IVVAAREVVLQRLQRHISAFWFLGGEVILFVTLFSVVTNGEES
GIGIVADGSELPLVSCFLLLTSSLTITIVHHSYGLYFGRFFLCLSMILGFLFIVVQVC
EFYGSSTDSLYCSY"

ORIGIN

```
1 attgttgtagg ctgctcggga ggtggtattg cagcgtctac agcggcatat atctgctttt
61 tgactatttc ttggtggtga ggttattctt tttgttactc tcttctctgt ggttacgtgg
121 ggggaggagt ctggtattgg tattgtagcg gatgggtctg agcttcgcgt tgtttcttgt
181 tttttgctat taacttcttc tttgaccatt actatttata atcatagtta tggggtgtat
241 tttggtcggg tttttctttg tttgtctatg attttaggat tcctttttat tgtgtttcag
301 gtgtgtgagt tttatggttc tgggacggat tctttatact gttcttattt
```

Opisthorchis felineus isolate Of_ITS1_Kz internal transcribed spacer 1, partial sequence

GenBank: PQ675621.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) ☐

LOCUS PQ675621 495 bp DNA linear INV 08-DEC-2024
DEFINITION Opisthorchis felineus isolate Of_ITS1_Kz internal transcribed spacer 1, partial sequence.
ACCESSION PQ675621
VERSION PQ675621.1
KEYWORDS .
SOURCE Opisthorchis felineus
ORGANISM [Opisthorchis felineus](#)
Eukaryota; Metazoa; Spinalia; Lophotrochozoa; Platyhelminthes;
Trematoda; Digenea; Opisthorchiida; Opisthorchiata;
Opisthorchiidae; Opisthorchis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 495)
AUTHORS Bekenova,A.B., Kiyan,V.S. and Smagulova,A.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (08-DEC-2024) Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye road, Astana 010000, Kazakhstan
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES
source Location/Qualifiers
1..495
/organism="Opisthorchis felineus"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Of_ITS1_Kz"
/isolation_source="metacercariae"
/host="Leuciscus idus"
/db_xref="taxon:147828"
/geo_loc_name="Kazakhstan"
/collection_date="Jul-2022"
misc_RNA
.....
<1..495
/product="internal transcribed spacer 1"
ORIGIN
1 agtacacaaa gcccaaacac ctacagtaast ctgagaattt ggcacgggtc gtcacgccc
61 ttggtcttgc agccttgtct gcctagggcg gacgattct agttccgtca tctgtcttgc
121 agcattgtct gcctagggcg gacgattct agttccgtca tattctacat gtatagacat
181 acatgctgca gcgttgtctg cctacggtag agcgttcta gttctacaa ttctggcta
241 tacctggcat atgtacccag tatgtgtgcc tacgtacagt cgcgtttcgg cagggtgcct
301 accgctctga tgccttgggt gtgctcgtt ccgttggtgg ccagtcacaa ttgggggtga
361 cgggatgtgc tgcacgcatg gacagtgcta ggcttaata gtgggcatgt gtttcgagct
421 acggctcacc caccgcccgt atgttgttgt tttcaaacg ttttacactg ttaaagtgtt
481 tcaggctggc ctggc
..

Opisthorchis felineus isolate Of_ITS2_Kz internal transcribed spacer 2 and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: PQ669121.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Go to:](#) 

LOCUS PQ669121 343 bp DNA linear INV 08-DEC-2024

DEFINITION Opisthorchis felineus isolate Of_ITS2_Kz internal transcribed spacer 2 and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION PQ669121

VERSION PQ669121.1

KEYWORDS .

SOURCE Opisthorchis felineus

ORGANISM [Opisthorchis felineus](#)

Eukaryota; Metazoa; Spiralia; Lophotrochozoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea; Opisthorchiida; Opisthorchiata; Opisthorchiidae; Opisthorchis.

REFERENCE 1 (bases 1 to 343)

AUTHORS Bekenova,A.B., Kiyan,V.S. and Smagulova,A.M.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (03-DEC-2024) Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 13/5, Kung'alzhynskoye road, Astana 010000, Kazakhstan

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source

1..343

/organism="Opisthorchis felineus"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="Of_ITS2_Kz"

/isolation_source="metacercariae"

/host="Leuciscus idus"

/db_xref="taxon:147828"

/geo_loc_name="Kazakhstan"

/collection_date="Jul-2022"

[misc RNA](#)

<1..>343

/note="contains internal transcribed spacer 2 and large subunit ribosomal RNA"

ORIGIN

```
1 ctgtccgagg gtcggcttat aaactatcac gacgcccaga aagtcgtggc ttgggtcttg
61 ccagctggca tgatttcccc acgcatttgt gtgggtggcc ggatctatgg cttttcccca
121 atgtgccgga cgcaaccatg tctgggtgga ctgcctggat ggggggtggc cggcggagtc
181 gtggctcaat tggtgtgtgt attgtgtgga atgtgcgggc tccgttggtg gtcctttgtc
241 tttggttgag gctccagtgt tggcaatgca ttcatgcaa atctgttttg cacttcggtg
301 ctttaacttc ctgacctcgg atcagacgtg attaccgct gaa
```


Opisthorchis felineus isolate Of_COX1_Kz cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: PQ669120.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to: ☐

LOCUS PQ669120 292 bp DNA linear INV 08-DEC-2024
DEFINITION Opisthorchis felineus isolate Of_COX1_Kz cytochrome c oxidase subunit I (COX1) gene, partial cds; mitochondrial.
ACCESSION PQ669120
VERSION PQ669120.1
KEYWORDS .
SOURCE mitochondrion Opisthorchis felineus
ORGANISM [Opisthorchis felineus](#)
Eukaryota; Metazoa; Spiralia; Lophotrochozoa; Platyhelminthes; Trematoda; Digenea; Opisthorchiida; Opisthorchiata; Opisthorchiidae; Opisthorchis.
REFERENCE 1 (bases 1 to 292)
AUTHORS Bekenova,A.B., Kiyan,V.S. and Smagulova,A.M.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (03-DEC-2024) Laboratory of Biodiversity and Genetic Resources, National Center for Biotechnology, 13/5, Kung'alzhynskoye road, Astana 010000, Kazakhstan
COMMENT ##Assembly-Data-START##
Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
##Assembly-Data-END##
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..292
/organism="Opisthorchis felineus"
/organelle="mitochondrion"
/mol_type="genomic DNA"
/isolate="Of_COX1_Kz"
/isolation_source="metacercariae"
/host="Leuciscus idus"
/db_xref="taxon:147828"
/geo_loc_name="Kazakhstan"
/collection_date="Jul-2022"
gene <1..292
/gene="COX1"
CDS <1..292
/gene="COX1"
/codon_start=1
/transl_table=0
/product="cytochrome c oxidase subunit I"
/protein_id="XKV26901.1"
/translation="LFGYGGGLVLAHFAIVCLGSVVAHHHFTVGLDLGTAIFFSSVTNIIQVPTGIKVFSLYHLAGTRDRLDPIHMMIIGFIVLFTIGGVGTGIVLSASV"
ORIGIN
1 ctatttggtt atggttggtt ggtgttagcc atgtttgcta tagtttggtt gggtagtggt
61 gtttgagctc atcatatggt tactgttaga ttagatttag ggaactgctat ttttttagt
121 tcggttacta tgatcattgg tgtacctaca gggataaagg tttttcttg attatacatg
181 cttgccggtc ctccgagatc tctttgggat ccgattatgt ggtggataat cggatttata
241 gtgcttttta ctataggtgg ggttactggg atagttcttt ctgcctctgt ga

Opisthorchis felineus clone Of_COX3_Kz cytochrome c oxidase subunit 3 (cox3) gene, partial cds; mitochondrial

GenBank: PQ685673.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

[Goto:](#) [🔍](#)

```
LOCUS      PQ685673          267 bp    DNA        linear    INV 11-JAN-2025
DEFINITION Opisthorchis felineus clone Of_COX3_Kz cytochrome c oxidase subunit
            3 (cox3) gene, partial cds; mitochondrial.
ACCESSION  PQ685673
VERSION    PQ685673.1
KEYWORDS   .
SOURCE     mitochondrion Opisthorchis felineus
  ORGANISM Opisthorchis felineus
            Eukaryota; Metazoa; Spiralia; Lophotrochozoa; Platyhelminthes;
            Trematoda; Digenea; Opisthorchiida; Opisthorchiata;
            Opisthorchiidae; Opisthorchis.
REFERENCE  1 (bases 1 to 267)
  AUTHORS  Bekenova,A.B., Kiyan,V.S. and Smagulova,A.M.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (04-DEC-2024) Laboratory of Biodiversity and Genetic
            Resources, National Center for Biotechnology, 13/5, Kurgalzhynskoye
            road, Astana 010000, Republic of Kazakhstan
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES             Location/Qualifiers
     source            1..267
                       /organism="Opisthorchis felineus"
                       /organelle="mitochondrion"
                       /mol_type="genomic DNA"
                       /isolation_source="metacercariae"
                       /host="Leuciscus idus"
                       /db_xref="taxon:147828"
                       /clone="Of_COX3_Kz"
                       /geo_loc_name="Kazakhstan"
                       /collection_date="Jul-2022"
     gene              <1..>267
                       /gene="cox3"
     CDS               <1..>267
                       /gene="cox3"
                       /codon_start=1
                       /transl_table=9
                       /product="cytochrome c oxidase subunit 3"
                       /protein_id="XUZ85570.1"
                       /translation="MPLVFFVLSCFVVVLVIREVVLQRLQRHTSAFWLFIISGEALLFG
                       SLFAGVWNGEESGTGVLDGFEFPFVSCFLLLTSSVTMTVYHHCY"
ORIGIN
      1 tgaccgttgg tcttttttgt ttttagctgt tttgttgtg ttttgtgat tggggagggtg
      61 gtgttgcaac gtttgcagcg gcatacttct gcttttttgt tatttataag gggggagggt
     121 cttctttttt gtaggttgtt tgcgggggtg atgtgaggag aggaagtctg gactggtgta
     181 ttggctgacg gttttgaatt tctttttgtg tcatgctttt tctgttgac tttctctgtg
     241 acgatgactg tttatcatca ttgttac
//
```

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Патент на изобретение

КАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 35353

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION



(21) 2020/0534.1

(22) 07.08.2020

(45) 05.11.2021

(54) Оришторчидас түрінің қоздырғыштарына баулуға арналған мультимплексті праймерлер
Specific primers for multiplex diagnostic of Oriothorichidae family pathogens

(73) «Сәкен Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті» коммерциялық емес акционерлік қоғамы (KZ)
Некоммерческое акционерное общество «Казахский агротехнический университет имени Сәкен Сейфуллина» (KZ)
«Saken Seifullin Kazakh Agrotechnical University» Joint-Stock Company (KZ)

(72) Смагулова Айнура Муратовна (KZ) Smagulova Ainura Muratovna (KZ)
Католхин Алексей Вадимович (RU) Katokhin Alexey Vadimovich (RU)
Бекенова Айганыш Бексидаровна (KZ) Bekonova Aiganym Beksidarovna (KZ)
Киуан Владимир Сергеевич (KZ) Kiyan Vladimir Sergeyevich (KZ)



ӘІПҚ қол қойып
Подписано ӘІПҚ
Signed with EDS

Е. Кузнецов
Е. Кузнецов
Y. Kuznetsov

«Ұлттық интеллектуалдық меншік институты» РМҚК директоры
Директор РИП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE