

PCR ANALYSIS OF METORCHOSIS AND MIXED INVASIONS
Zyat'kov S.A.¹, Goncharenko G.G.², Kruk A.V.³, Lysenko A.N.⁴ (Republic of Belarus)
Email: Zyat'kov449@scientifictext.ru

¹Zyat'kov Sergey Aleksandrovich – Senior Lecturer;

²Goncharenko Grigori Grigor'evich – Doctor of Biological Sciences, Full Professor,
Head of Department;

³Kruk Andrey Viktorovich – Candidate of biological sciences, Associate Professor;

⁴Lysenko Anastasia Nikolaevna – Senior Lecturer,

DEPARTMENT OF ZOOLOGY, PHYSIOLOGY AND GENETICS, FACULTY OF BIOLOGY,
FRANCISK SKORINA GOMEL STATE UNIVERSITY,
GOMEL, REPUBLIC OF BELARUS

Abstract: this article provides information on the life cycle of members of the genus *Metorchis*. Interspecific relationships between *Metorchis* spp. are considered based on phylogenetic analysis using the maximum likelihood method. Phylogenetic analysis by the maximum likelihood method, as well as using nuclear (ITS2) and mitochondrial (CO1, ND1) DNA loci showed that *Metorchis* specimens, previously described as *M. albidus*, *M. bilis* and *M. crassiusculus*, represent one species – *M. bilis*. Characterized molecular genetic markers used to identify pathogens metorchosis and mixed invasions.

Keywords: metorchosis, mixed invasions, molecular genetic markers.

ПЦР-АНАЛИЗ МЕТОРХОЗА И МИКСТ-ИНВАЗИЙ
Зятыков С.А.¹, Гончаренко Г.Г.², Крук А.В.³, Лысенко А.Н.⁴ (Республика Беларусь)

¹Зятыков Сергей Александрович – старший преподаватель;

²Гончаренко Григорий Григорьевич – доктор биологических наук, профессор,
заведующий кафедрой;

³Крук Андрей Викторович – кандидат биологических наук, доцент;

⁴Лысенко Анастасия Николаевна – старший преподаватель,
кафедра зоологии, физиологии и генетики, биологический факультет,
Гомельский государственный университет им. Франциска Скорины,
г. Гомель, Республика Беларусь

Аннотация: в данной статье приведена информация по жизненному циклу представителей рода *Metorchis*. Рассмотрены межвидовые взаимоотношения между *Metorchis* spp. на основе филогенетического анализа с помощью метода максимального правдоподобия. Филогенетический анализ методом максимального правдоподобия, как и с помощью локусов ядерной (ITS2), так и митохондриальной (CO1, ND1) ДНК, показал, что особи *Metorchis*, описываемые ранее как *M. albidus*, *M. bilis* и *M. crassiusculus*, представляют собой один вид – *M. bilis*. Охарактеризованы молекулярно-генетические маркеры, используемые для идентификации возбудителей меторхоза и микст-инвазий.

Ключевые слова: меторхоз, микст-инвазии, молекулярно-генетические маркеры.

Меторхоз (Metorchosis) – также как и описторхоз является опасным паразитарным заболеванием человека и плотоядных животных, вызванное следующими представителями из класса Trematoda семейства Opisthorchiidae – *Metorchis bilis* (Braun, 1890, син. *M. albidus* Braun, 1893), *Metorchis xanthomus* (Creplin, 1846, син. *Metorchis intermedius* Heinemann, 1937) и *Metorchis orientalis* (Tanabe, 1921) [1].

Возбудители меторхоза широко распространены по всему миру. Например, *M. orientalis* встречается в регионах восточной Азии [2]. Паразитами *M. bilis* и *M. xanthomus* заражены люди не только, в республиках бывшего СССР, а также странах Восточной и Западной Европы [3-6].

В первом промежуточном хозяине – моллюсках сем. Bithyniidae представители из рода *Metorchis*, также как и *Opisthorchis felinus* L. паразитируют в пищеварительной железе (гепатопанкреасе). Во втором промежуточном хозяине – карповых рыбах сем. Cyprinidae (плотва, красноперка, укля, лещ, линь, густера) личинки паразитов локализуются в мускулатуре, жабрах и других тканях. И наконец, в окончательном хозяине – хищных рыбоядных птицах и млекопитающих, в том числе и человеке половозрелые мариты паразитируют в жёлчном пузыре и жёлчных ходах печени (Рис.) [7, 8].

Для большинства описторхид характерна полигостальность, то есть широкий спектр возможных окончательных хозяев, который может варьировать в пределах представителей, как различных семейств, так и различных классов [9].

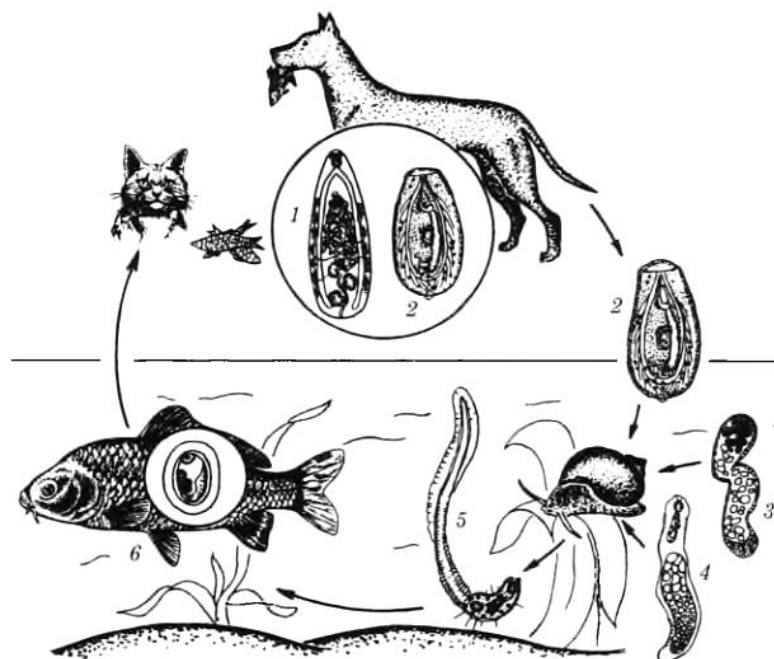


Рис. Схема развития описторхид: 1 - половозрелый паразит; 2 - яйцо; 3 - спороциста; 4 - редия; 5 - церкарий; 6 - рыба, пораженная метацеркариями [10]

Как уже отмечалось ранее, окончательным хозяином меторхов и описторхов помимо рыбоядных птиц и животных как естественного, так и антропогенного происхождения может быть и человек. Так на территории Европы естественным резервуаром *O. felineus* являются представители семейств Псовые [11, 12] и Куньи [13, 14]. Что касается территории России и восточной Европы, то там в последнее время антропогенный фактор начинает сильнее преобладать и зараженность домашних животных, таких как кошки и собаки становится более выраженной [15]. Если рассмотреть меторхов, то они в качестве окончательных хозяев, в основном, предпочитают следующих рыбоядных птиц: Большой баклан (*Phalacrocorax carbo*); Обыкновенная колпица (*Platalea leucorodia*); Могильник (*Aquila heliaca*); Канюк (*Buteo buteo*); Курганнык (*Buteo rufinus*), Орлан-белохвост (*Haliaeetus albicilla*); Хохлатая черныш (*Aythya fuligula*); Кряква (*Anas platyrhynchos*); Поганка большая (чомга) (*Podiceps cristatus*). Кроме того, *M. bilis* может встречаться у тех же хозяев, что и *O. felineus* вызывая при одновременном присутствии так называемые микст-инвазии [3]. Считается, что у более 60 % больных подтвержденным диагнозом «хронического описторхоза» фактически имеет место микст-инвазия, вызванная *O. felineus* и *M. bilis*, реже регистрируется моноинвазия *O. felineus* (30 % больных) и *M. bilis* (около 8%) [16].

Диагностировать меторхоз, так же как и описторхоз классическими паразитологическими методами анализа достаточно сложно. Использование серологического метода анализа на антитела гельминтов имеет ряд недостатков – в их числе длительность проведения анализа, и зачастую схожесть реакций у близких видов. Выращивание личинок до половозрелых марит в лабораторных животных довольно трудоемко и также требует времени [17]. Использование маркерных генов *M. bilis* и *O. felineus* посредством современных методов специфической диагностики на основе ДНК-технологий не только меторхозов и описторхозов, но и микст-инвазий позволит различать виды паразитов, усовершенствовать методы лечения и медико-эпидемиологический мониторинг природных очагов меторхоза и описторхоза.

Несмотря на это, определение видовой принадлежности *Metorchis spp.* до настоящего времени является трудной задачей из-за высокой схожести между существующими видами. Молекулярно-генетические данные, подтверждающие таксономическое положение и позволяющие провести идентификацию *Metorchis spp.* ограничены. В 2008 г. Кэнг (Kang) и соавт. в Испании отсековировали внутренний транскрибируемый спейсер ITS1 одного экземпляра *Metorchis* (называемого *bilis*) [18]. Ай и соавт. в Китае отсековировали спейсеры ITS и митохондриальные локусы CO1 и ND1 из изолятов *M. orientalis* [19]. Шеховцов и др. предоставили частичные последовательности гена парамизоина *M. xanthosomus* [20]. Кроме перечисленных, имеется несколько последовательностей ДНК доступных в базе данных NCBI GenBank, включая недавно опубликованную полную последовательность митохондриального генома *M. orientalis* (NCBI GenBank, No. KT239342) [21]. В совокупности перечисленные выше исследования последовательностей ДНК у *Metorchis spp.* не позволяют сделать какие-либо окончательные выводы о статусе ранее предложенных европейскими учеными видов этого рода, а именно, *M. albidus*, *M. bilis*, *M. crassiusculus* и *M. xanthosomus* [3].

Пролить свет на эти вопросы и установить межвидовые взаимоотношения между *Metorchis spp.* удалось с помощью филогенетического анализа с применением метода максимального правдоподобия (Maximum likelihood analysis), который базируется на оценивании неизвестного параметра путём максимизации функции правдоподобия [3, 22].

Для филогенетического анализа были взяты данные как для локусов ядерной (18S рДНК и ITS2), так и митохондриальной (CO1 и ND1) ДНК. Полученные результаты выявили существование только двух отдельных, четко идентифицируемых видов принадлежащих к роду *Metorchis*, выделенных из различных птиц-хозяев, в том числе идентифицированных первоначально как *M. crassiusculus*. Три из протестированных локусов ДНК (ITS2, CO1 и ND1) взятых у уток (*Anas*, *Aythya*) отличались от образцов, взятых у других птиц-хозяев (*Phalacrocorax*, *Buteo*, *Aquila*); четвертый взятый локус ДНК (18S рДНК) был идентичен для всех проанализированных описторхид, в том числе и с последовательностями 18S рДНК, общедоступными в базе данных NCBI GenBank [3].

Последовательности ДНК других описторхид, например, *Euamphimerus pancreaticus*, существенно отличаются от других описторхид, включая все до сих пор отсеквенированные для *Metorchis*, *Opisthorchis* и *Clonorchis* spp.. Хорошо видно, что последовательности *M. orientalis* значительно отличаются от *M. bilis* и *M. xanthosomus*, и из различной длины ветвей для генов ND1 и CO1, можно сказать, что они не могут использоваться для классификации *M. orientalis* в пределах Opisthorchiidae. Для обеспечения убедительной реклассификации представителей этого семейства необходим анализ большего количества локусов ДНК [3].

Филогенетический анализ методом максимального правдоподобия, как и с помощью локусов ядерной (ITS2), так и митохондриальной (CO1, ND1) ДНК показал, что экземпляры *Metorchis*, описываемые ранее как *M. albidus*, *M. bilis* и *M. crassiusculus*, представляют собой один вид. Исходя из приоритета публикации, *M. albidus* (Braun, 1893) Loos, 1899 и *M. crassiusculus* (Rudolphi, 1809) Loos, 1899 признаны младшими субъективными синонимами *M. bilis* (Braun, 1790) Odening, 1962. Помимо этого имеется еще морфологическое сходство подтверждающее результаты, полученные на основе ДНК-анализа [3, 23].

Комбинированный генетический и морфологический анализ выявил существование только двух отдельных, четко идентифицируемых видов среди представителей рода *Metorchis*, выделенных из различных птиц и млекопитающих, собранных по всей Европе. Существует значительная генетическая изменчивость как у *M. bilis*, так и у *M. albidus*, но каких-либо специфических для конкретного вида или региона хозяина закономерностей наблюдаемой внутривидовой изменчивости обнаружено не было [3, 24].

Как уже отмечалось ранее, описторхоз является значимым природно-очаговым заболеванием не только на территории России, но и стран СНГ. Под диагнозом описторхоз могут скрываться несколько заболеваний – описторхоз, меторхоз и клонорхоз - биогельминтозы, которые вызываются различными представителями семейства Opisthorchiidae – *Opisthorchis felineus/O.viverrini*, *M. bilis* и *Clonorchis sinensis*, соответственно. Стандартным методом клинической диагностики описторхоза является копроовоскопия. Однако яйца у описторхид практически не различимы между собой, поэтому этот метод не позволяет корректно определить вид возбудителя [25]. Разработанные относительно недавно серологические методы диагностики оказались также не способными достоверно различать эти виды описторхид из-за большого количества гомологичных белков [26]. В связи с этим актуальным становится подход к диагностике описторхид с применением методов идентификации ДНК, позволяющий дифференцировать паразитозы, вызываемые *O.felineus* и *M.bilis*. В качестве диагностического маркера используется фрагмент генного кластера рибосомальных РНК, включающий ITS2 (Internal Transcribed Spacer 2). Система диагностики разработана в виде мультиплексного ПЦР-анализа и позволяет по результатам единственной ПЦР не только четко детектировать меторхоз или описторхоз, но и дифференцировать паразитов, вызывающих данное заболевание [27, 28].

При апробации данного метода показано, что в исследованной группе пациентов выявляется около 10% микст-инвазий. Другие исследователи, использующие иммунологические методы диагностики, показывали значительно более высокую встречаемость микст-инвазий [25, 26]. Возможно, это связано с тем, что при меторхозе, в отличие от описторхоза, существует другая цикличность (с более длительными перерывами) в яйцепродукции паразита, или длительность инвазии существенно короче серологической реакции пациентов. Решение этих вопросов может быть существенно ускорено при использовании разработанной видоспецифической диагностики описторхозов – описторхоза и меторхоза. Кроме того, предложенный метод представляется пригодным для использования в практике с целью выявления микст-инвазий *O. felineus* и *M. bilis*.

Таким образом, в данной статье представлены данные по жизненному циклу представителей рода *Metorchis*. Рассмотрены межвидовые взаимоотношения между *Metorchis* spp. на основе филогенетического анализа с помощью метода максимального правдоподобия. Филогенетический анализ методом максимального правдоподобия, как и с помощью локусов ядерной (ITS2), так и митохондриальной (CO1, ND1) ДНК показал, что экземпляры *Metorchis*, описываемые ранее как *M. albidus*, *M. bilis* и *M. crassiusculus*, представляют собой один вид – *M. bilis*. Охарактеризованы молекулярно-генетические маркеры, используемые для идентификации возбудителей меторхоза и микст-инвазий.

Кроме описанных выше список используемых для видовой идентификации молекулярно-генетических маркеров в последнее время пополняется за счет микросателлит (STR) [29, 30], SNP [31] и ISSR [32].

Работа проводилась в рамках темы «Разработка видоспецифичных ДНК-диагностических систем для выявления возбудителей меторхоза и микст-инвазий в промежуточных и дефинитивных хозяевах юга Беларуси» (ГПНИ «Биотехнологии»).

1. Судариков, В.Е. Метациркарии трематод – паразиты пресноводных гидробионтов Центральной России. М.: Наука, 2002. 298 с.
2. Lin J., Chen Y., Li Y. The discovery of natural infection of human with *Metorchis orientalis* and the investigation of its focus // Chin. J. Zoonoses, 2001. Vol. 17. P. 38-53.
3. Sitko J. Integrative taxonomy of European parasitic flatworms of the genus *Metorchis* Looss, 1899 (Trematoda: Opisthorchiidae) // Parasitology International, 2016. Vol. 65. P. 258-267.
4. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia // Parasitol. Int., 2012. Vol. 6., № 1. P. 25-31.
5. Pozio E., Armignacco O., Ferri F., Morales M.A.G. *Opisthorchis felinus*, an emerging infection in Italy and its implication for the European Union // Acta Trop, 2013. Vol. 126. № 1. P. 54-62.
6. Armignacco O., Caterini L., Marucci G., Ferri F., Bernardini G., Raponi G., Natalini L., Alessandra B., Morales T., Gomez M.A., Pozio E. Human illnesses caused by *Opisthorchis felinus* flukes, Italy // Emerg. Infect. Dis., 2008. Vol. 14. № 12. P. 1902-1905.
7. Petney T.N., Andrews R.H., Saijuntha W., Wenz-Mücke A., Sithithaworn P. The zoonotic, fish-borne liver flukes *Clonorchis sinensis*, *Opisthorchis felinus* and *Opisthorchis viverrini* // Int. J. Parasitol., 2013. Vol. 43, № 12-13. – P. 1031-1046.
8. Chen D., Chen J., Huang J., Chen X., Feng D., Liang B., Che Y., Liu X., Zhu C. Epidemiological investigation of *Clonorchis sinensis* infection in freshwater fishes in the Pearl River Delta // Parasitol. Res., 2010. Vol. 107. № 4. P. 835-839.
9. Сидоров Е.Г. Природная очаговость описторхоза. Алма-Ата: Наука, 1983. 240 с.
10. Ятусевич А.И. Руководство по ветеринарной паразитологии. Минск: ИВЦ Минфина, 2015. 496 с.
11. Schuster R., Gregor B., Heidrich J., Nöckler K., Kyule M., Wittstatt U. A sero-epidemiological survey on the occurrence of opisthorchiid liver flukes in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Berlin, Germany // Parasitol. Res., 2003. Vol. 90. № 5. P. 400-404.
12. Schuster R., Bonin J., Staubach C., Heidrich R. Liver fluke (Opisthorchiidae) findings in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the eastern part of the Federal State Brandenburg, Germany – a contribution to the epidemiology of opisthorchiidosis // Parasitol. Res., 1999. Vol. 85. № 2. P. 142-146.
13. Shimalov V.V., Shimalov V.T., Shimalov A.V. Helminth fauna of otter (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie // Parasitol. Res., 2000. Vol. 86. № 6. P. 528.
14. Shimalov V. Helminth fauna of the stoat (*Mustela erminea* Linnaeus, 1758) and the weasel (*M. nivalis* Linnaeus, 1758) in Belorussian Polesie // Parasitol. Res., 2001. Vol. 87. № 8. P. 680-681.
15. Mordvinov V.A., Furman D.P. The Digenea parasite *Opisthorchis felinus*: a target for the discovery and development of novel drugs // Infect. Disord. Drug Targets., 2010. Vol. 10. № 5. P. 385-401.
16. Ильинских Е.Н., Шилов Б.В. Экология и эпидемиология описторхид (*Opisthorchis felinus* и *Metorchis bilis*) // Сборник научных трудов «Актуальные проблемы биологии, медицины и экологии», 2004. Вып. 1. С. 80.
17. Сербина Е.Н., Юрлова Н.И. Участие *Codiella troscheli* (Mollusca: Prosobranchia) в жизненном цикле *Metorchis albidus* (Trematoda: Opisthorchiidae) // Мед. паразитол. и паразитар. бол., 2002. № 3. С. 21-23.
18. Kang S. Molecular identification and phylogenetic analysis of nuclear rDNA sequences among three opisthorchiid liver fluke species (Opisthorchiidae: Trematoda) // Parasitol. Int., 2008. Vol. 57. P. 191-197.
19. Ai L. Sequences of internal transcribed spacers and two mitochondrial genes: effective genetic markers for *Metorchis orientalis* // J. Anim. Vet. Adv., 2010. Vol. 9. P. 2371-2376.
20. Shekhovtsov S.V. A novel nuclear marker, Pm-int9, for phylogenetic studies of *Opisthorchis felinus*, *Opisthorchis viverrini*, and *Clonorchis sinensis* (Opisthorchiidae, Trematoda) // Parasitol. Res., 2009. Vol. 106. P. 293-297.
21. Lu Na. The complete mitochondrial genome of *Metorchis orientalis* (Trematoda: Opisthorchiidae): Comparison with other closely related species and phylogenetic implications // Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases, 2016. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.01.010.
22. Řezáč M. Integrative taxonomy and evolutionary history of a newly revealed spider *Dysdera ninnii* complex (Araneae: Dysderidae) // Zool. J. Linnean Soc., 2014. Vol. 172. P. 451-474.
23. Sherrard-Smith E. Distribution and molecular phylogeny of biliary trematodes (Opisthorchiidae) infecting native *Lutra lutra* and alien *Neovison vison* across Europe // Parasitol. Int., 2016. Vol. 65. P. 163-170.
24. Mongeau N. Hepatic distomatosis and infectious canine hepatitis in northern Manitoba // Can. Vet. J., 1961. Vol. 2. P. 33-38.
25. Бэзр С.А. Биология возбудителя описторхоза. М.: Тов-во науч. изд-й КМК, 2005. 336 с.
26. Choi M.H. Specific and common antigens of *Clonorchis sinensis* and *Opisthorchis viverrini* (Opisthorchiidae, Trematoda) // Korean J. Parasitol., 2003. Vol. 41(3). P. 155.
27. Брусенцов И.И., Катохин А.В., Сахаровская З.В., Сазонов А.Э., Огородова Л.М., Федорова О.С., Колчанов Н.А., Мордвинов В.А. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felinus* и *Metorchis bilis* с помощью метода ПЦР // Медицинская паразитология, 2010. № 2. С. 10-13.
28. Brusentsov I., Katokhin A., Shekhovtsov S., Borovikov S., Goncharenko G. Low Genetic Diversity in Wide-

- Spread Eurasian Liver Fluke *Opisthorchis felineus* // PLoS ONE, 2013. Vol. 8 (4). P. 1-12.
29. Гончаренко Г.Г., Зятков С.А. Микросателлитные ДНК-маркеры в генетической дактилоскопии особей *Felis catus* и родственных видов семейства Кошачьи // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, 2016. № 3. С. 21-25.
30. Гончаренко Г.Г., Зятков С.А., Крук А.В. STR-маркеры в ДНК дактилоскопии домашних собак *Canis familiaris* L. // Известия Гомельского государственного университета имени Ф. Скорины, 2017. № 3 (102). С. 25-30.
31. Зятков С.А., Курако И.В. Молекулярно-генетическая дактилоскопия особей *Felis catus* акромеланистических окрасов // Ростовский научный журнал, 2017. № 12. С. 362-366.
32. Козел А.В., Зятков С.А. ISSR-метод в идентификации особей *Elephas maximus* // Academy, 2019. № 12 (51). С. 7-9.