

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. xanthosomus* 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 felineus* L. паразитируют в пищеварительной железе (гепатопанкреасе). Во втором промежуточном хозяине – карповых рыбах сем. Сyprinidae (плотва, красноперка, укляя, лещ, линь, густера) личинки паразитов локализируются в мускулатуре, жабрах и других тканях. И наконец, в окончательном хозяине – хищных рыбаобразных 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].

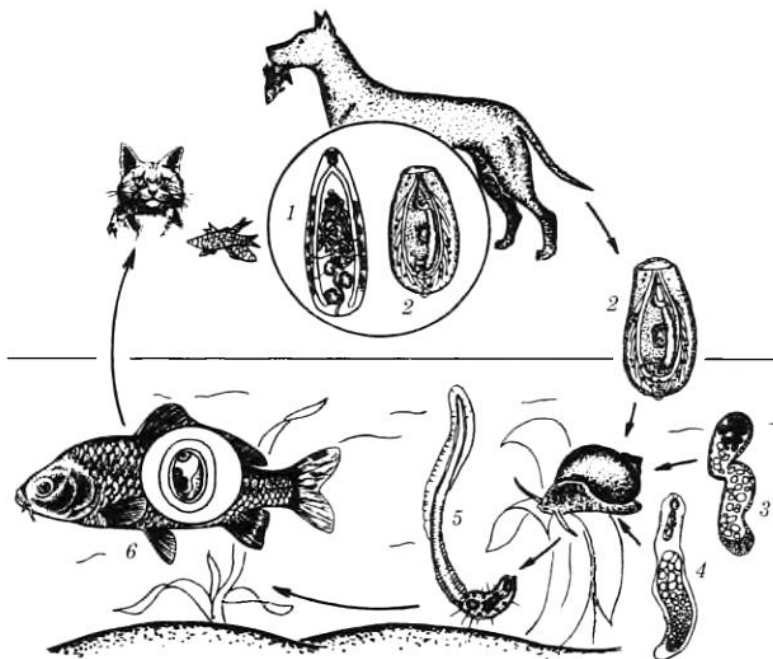


Рис. Схема развития описторхид: 1 - половозрелый паразит; 2 - яйцо; 3 - спороциста; 4 - церкарий; 5 - метациркарий; 6 - рыба, пораженная метациркариями [10]

Как уже отмечалось ранее, окончательным хозяином меторхов и описторхов помимо рыбаобразных 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 рыбаобразных 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 подтверждённым 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 отсекувенировали внутренний транскрибируемый спейсер ITS1 одного экземпляра *Metorchis* (называемого *bilis*) [18]. Ай и соавт. в Китае отсекувенировали спейсеры ITS и митохондриальные локусы CO1 и ND1 из изолятов *M. orientalis* [19]. Шеховцов и др. предоставили частичные последовательности гена парамиозина *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 отсекувенированные 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-очаговых заболеваний 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 описторхидозов – 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 definitive хозяевах юга Беларуси» (ГПНИ «Биотехнологии»).

Список литературы / References

1. *Судариков, В.Е.* Метациркуляции 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 opisthorchid 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 felineus*, *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. *Безр 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 felineus* 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.