

Исследование описторхоза в Днепровском очаге на основе молекулярно-генетических методов

Г.Г. Гончаренко¹, А.В. Катохин²

Были разработаны технологии ДНК-диагностики с использованием спейсера 2 (ITS2) рибосомального кластера для идентификации паразита *O. felineus* у улиток (bithynids) и рыб (cyprinids). С помощью методов ДНК-диагностики и классических методов было установлено, что инвазированность моллюсков личинками *O. felineus* колебалась от 40 до 78 %, а у рыб семейства Карповые личинки описторхид обнаружены в 23 % образцов. В результате комплексных исследований установлено, что очаг описторхоза по-прежнему сохраняется в Жлобинском районе на юге Беларуси. Рассмотрена тесная связь между Днепровским и Обь-Иртышским очагами описторхоза.

Ключевые слова: описторхоз, очаг, животные, заболевание, методы, диагностика.

Technologies of species-specific DNA diagnostics by means of amplification of genomic marker ITS2 spacer for detection parasite *O. felineus* in snails (bithynids) and fishes (cyprinids) were developed. Using the methods DNA diagnostics and classical methods of preparation and identification, it has been established that the infection of snail by *O. felineus* ranged from 40 to 78 %, whereas infection of cyprinids fishes has reached only 23 %. In result of comprehensive investigations the persistence of opisthorchiasis center in the Zhlobin region of Southern Belarus have established. Close relation between opisthorchiasis centers of the Ob' river and the Dnieper river is considered.

Keywords: opisthorhoz, center, animals, disease, methods of diagnostics.

Важнейшим направлением современных молекулярно-биологических исследований является молекулярно-генетическая паразитология. В последние годы молекулярно-генетические технологии стали успешно применяться в исследовании описторхоза, широко распространенного заболевания, охватывающего территорию от Дальнего Востока до Германии [1]–[8].

Описторхоз (*opisthorchiasis*) – опасное заболевание человека, домашних и диких хищников, вызываемое паразитированием в желчных протоках печени, желчном пузыре, поджелудочной железе половозрелых особей кошачьей двуустки – *Opisthorchis felineus*, (Rivolta, 1884). При длительном течении описторхоз вызывает хроническое заболевание печени, желчного пузыря и поджелудочной железы, способствует раку печени и желчных протоков [9]–[12].

Перед попаданием в человека и животных *O. felineus* проходит личиночные стадии развития в промежуточных хозяевах – пресноводных моллюсках *Bithynia leachii* (Shepard, 1823) и рыбах семейства карповых (Cyprinidae). На этих стадиях видовая идентификация представителей семейства Opisthorchiidae по морфологическим признакам очень трудоемка и дорогостояща, а в ряде случаев просто невозможна.

В связи со всем вышеизложенным, разработка эффективных методов видовой диагностики на основе молекулярно-генетических технологий, таких как полимеразная цепная реакция анализа фрагментов ДНК приобретает особую актуальность.

Объекты и методы исследования. Трематода *O. felineus* имеет сложный жизненный цикл. Взрослые особи (мариты), продуцирующие яйца, паразитируют в печени и желчном пузыре млекопитающих, откуда яйца вместе с желчью поступают в кишечник, а из него наружу. Развиваются только яйца, попавшие в воду, в них образуется личинка – мирацидий. Такие яйца заглатывает пресноводный жаберный моллюск – *B. leachii* (первый промежуточный хозяин).

В кишечнике моллюска мирацидий выходит из яйца и проникает в полость тела, где превращается в спороцисту, содержащую редию. Редии выходят из спороцисты, внедряются в печень моллюска, и там происходит их развитие в церкарии, имеющие хвост. Затем церкарии покидают моллюска, попадают в воду и внедряются во второго промежуточного хозяина – рыб семейства карповых: язя, карпа, линя, плотву, красноперку, густеру и др.

Церкария, попавшая в рыбу, локализуется в подкожном слое мышц. После внедрения церкарий в жировую ткань и мышцы рыбы, они окружаются соединительнотканной оболочкой и превращаются в метацеркарий, способных заразить definitivoного (окончательного) хозяина.

Инвазированная рыба, будучи съедена человеком или плотоядными животными (ондатрой, выдрой, собакой, кошкой), переваривается в их желудке, где метацеркарии освобождаются от цист, проникают через желчные протоки в желчный пузырь, печень и через 10–12 дней достигают половой зрелости, начиная откладывать яйца. Все этапы жизненного цикла кошачьей двуустки схематически представлены на рисунке 1.

Область распространения заболеваемости описторхозом, вызываемым кошачьей двуусткой (*O. felinus*), простирается от Дальнего Востока до Германии. В настоящее время болезнью поражено более 2 млн. и ежегодно заболевает до 90 тыс. человек. Подавляющая часть мирового ареала описторхоза сосредоточена на территории России и Украины, в трёх очагах – Обь-Иртышском, Волжском и Днепровском. Обь-Иртышский бассейн является крупнейшим эндемичным очагом описторхоза и относится к разряду «неуправляемых» паразитарных болезней в России.

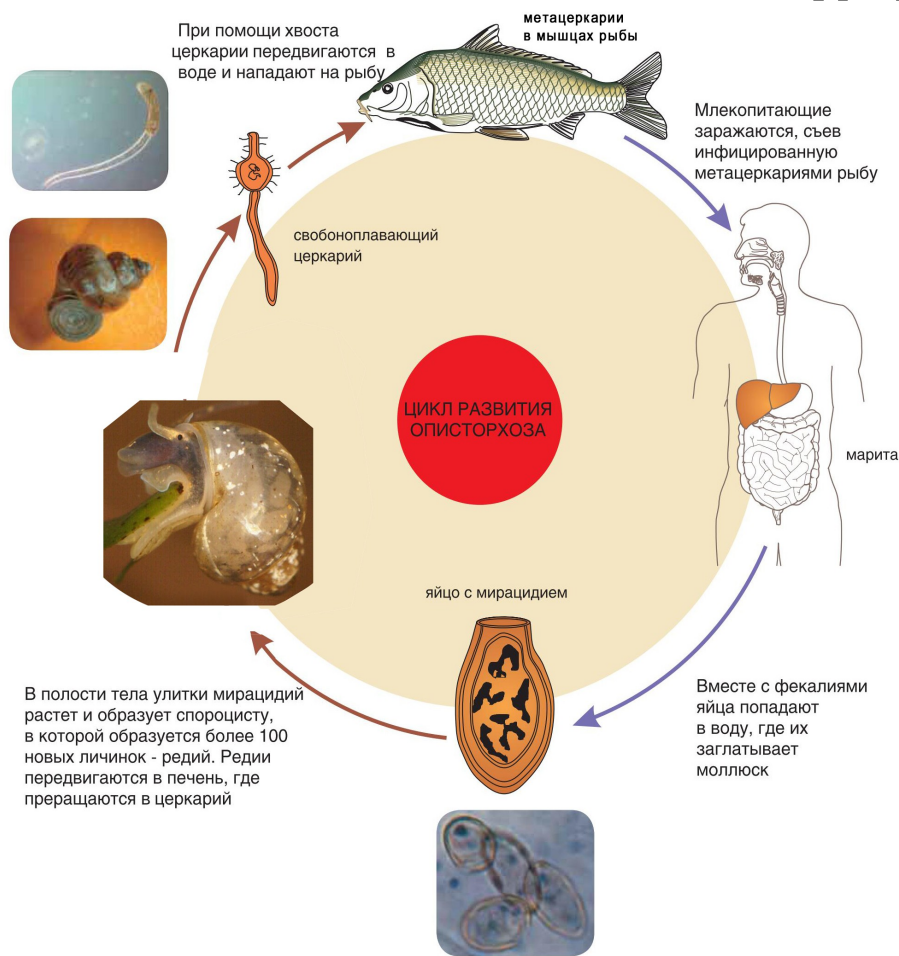


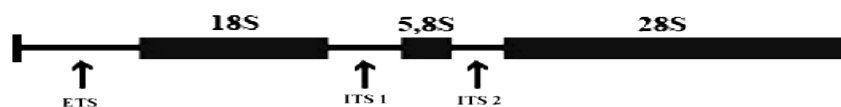
Рисунок 1 – Жизненный цикл кошачьей двуустки *O. felinus* (по [13])

О выявлении случаев заболеваний описторхозом в Беларуси сообщали Пашук и Чунов еще в 1958 г. [14]. Однако очагов возбудителя ими обнаружено не было. Позднее в 1964 г. Линник обнаружил метацеркарии у рыб в реках бассейна Днепра, что поставило вопрос о наличии местных очагов заболевания (очаги в бассейне Днепра, южнее Беларуси, уже были известны) [15].

На данный момент главным помощником ученых-паразитологов и врачей-лаборантов, диагностирующих заболевание по наличию яиц описторха, остается обычный световой микро-

скоп. Точность подобной видовой диагностики достигается лишь в результате многолетнего опыта.

В последние годы для целей видовой диагностики учеными с успехом используются рибосомальные гены, поскольку их спейсерные участки очень изменчивы по длине и нуклеотидному составу. У эукариотических организмов рибосомальные гены представлены в виде кластеров, расположенных группами на разных хромосомах. В каждый кластер входит три – 18S, 5,8S и 28S рибосомальных гена, разделенных участками – так называемыми спейсерами (рисунок 2). Такая конструкция в геноме *O. felineus* повторена более сотни раз.



ETS – внешний спейсер и ITS – внутренние спейсеры

Рисунок 2 – Схема строения рибосомального кластера

В настоящее время, одним из наиболее удобных маркеров видовой диагностики, является внутренний транскрибируемый спейсер-2 (ITS2) из ядерного рибосомального кластера размером около 300 н.п.

Результаты и их обсуждение. Первоочередной задачей нашего исследования было получить простую систему ПЦР-детекции, которая позволила бы распознавать всех описторхид, используя только одно испытание, и в то же время отличать их от других видов *Digenea*, особенно от представителей так называемых минорных плоских червей, которые паразитируют в кишечнике человека.

Для конструирования праймеров использовалась информация о нуклеотидных последовательностях видов, *O. felineus*, *O. viverrini*, *Clonorchis sinensis* и *Metorchis xanthosomus*, взятых нами из GenBank.

Последовательность нуклеотидов ДНК спейсерного участка ITS2 (выделен черным) и 38 нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28S рибосомальных генов у *O. felineus* представлена ниже (www./GenBank ID: EF688132.1).

```

1 5'ccacgcctgt ccgagggtcg gcttataaac tatcacgacg cccaaaaagt cgtggcttgg gtcttgccag
71 ctggcatgat tccccacgc atttgtgtgg ggtgccggat ctatggcttt tcccaatgt gccggacgca
141 accatgtctg ggctgactgc ctggatgagg gggtggcggc ggagtcgtgg ctcaattgtt gttgtattg
211 ttgtgaatgt gcgcgctcgg ttgttggtcc ttgtctttg gttgaggctc cagtgggtgc aatgcattcg
281 atgcaaatct gttttgcact tcggtgctta acttctctga cctcggatc 3'

```

В результате нами была сконструирована оптимальная пара праймеров: прямой OF1 5'-CGAGGGTTCGGCTTATAAAC-3' и обратный, OF2 5'-AGCCTCAACCAAAGACAAAG-3', (уточненные по (2,3)), позволяющие амплифицировать «горячий» фрагмент спейсерного участка ДНК размером в 248 нуклеотидов.

Процесс ПЦР-амплификации проводили на амплификаторе Терцик. После серии экспериментов были установлены оптимальные термопрофили, позволяющие амплифицировать фрагмент ДНК *O. felineus*, содержащий ITS2 участок и прилегающие к нему области 5,8 и 28S рибосомальных генов. Параметры оптимальных термопрофилей приведены ниже в таблице 1.

Таблица 1 – Параметры оптимальных термопрофилей

1 цикл	940°C3 мин
30 циклов	940°C45 с
	580°C30 с
	720°C60 с
1 цикл	720°C5 мин
Хранение	100°C∞

Выявление ампликонов проводили с помощью электрофореза в агарозном геле ($t = 25$ минут при $V = 240$ В).

На рисунке 3 представлена электрофореграмма спектра фрагментов ДНК, полученных после амплификации с праймерами OF1/OF2, позволяющими амплифицировать участок ДНК только спейсера ITS2 размером около 250 н.п.

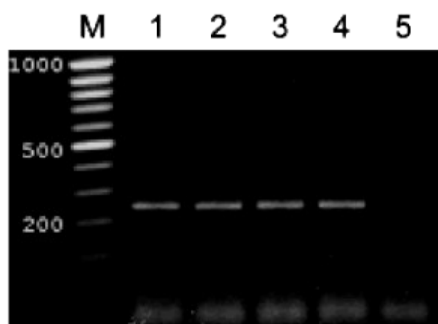


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *O. felineus* с праймерами OF1/OF2

Однако существует проблема внутривидовой изменчивости *O. felineus*, относительно нуклеотидной последовательности в спейсере ITS2, что требует использования для праймирования высококонсервативных участков ДНК – 5,8 и 28S рибосомальных генов. Ниже приведена последовательность спейсерного участка ITS2 (выделен черным) и нуклеотидов прилегающих 5,8 и 28S рибосомальных генов у *O. felineus*.

```

1 5'getttgaaca tcgacatctt gaacgcatat tgcggccatg ggtttgectg tggccacgcc tgtccgaggg
71 tcggcttata aactatcacg acgcccacaa agtcgtggtt tgggtcttgc cagctggcat gatttcccca
141 cgcatttgtg tggggtgccg gatctatggc ttctcccaa tgtgccggac gcaaccatgt ctgggctgac
211 tgcttgatg agggggtggc ggccgagtcg tggctcaatt gttgtgtta ttgtgtgaa tgtgcgcgt
281 cegttgttgg tctttgtct ttggtgagg ctccagtgtt ggcaatgcat tcatgcaaa tctgttttgc
351 acttcggtgc ttaacttcc tgacctcgga tcagacgtga ttaccgctg aatttaagca taccactaag
421 cggaggaaaa gaaactaaca aggatccct cagtaacggc gactgaacag ggaaaagccc agcaccgaag
491 cctgtggcca attggtcact aggcaatgtg gtgttcaggt cgttccatag aggt 3'
  
```

На основе этих данных российскими генетиками были построены праймеры – прямой ITS2exFw 5'-GAACATCGACATCTTGAACG-3' и обратный ITS2exRv 5'-GGAACGACCTGAACACCA-3', позволяющие амплифицировать фрагмент ДНК (531 нуклеотид), включающий весь спейсерный участок и прилегающие последовательности 5,8 и 28 S рибосомальных генов (4).

В ходе исследования материала гепатопанкреасов, выделенных из моллюсков-битинид, обитающих в водоемах Гомельщины на предмет их зараженности описторхидами *O. Felineus*, нами была использована пара праймеров ITS2exFw/ITS2exRv. Электрофоретический спектр продуктов амплификации гепатопанкреасов, выделенных из 6 моллюсков-битинид представлен ниже (рисунок 4).

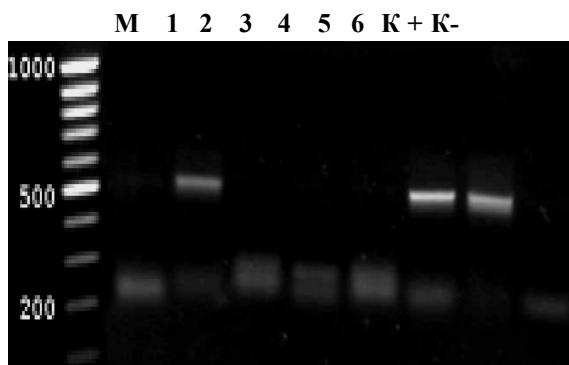


Рисунок 4 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК *O. felineus* из материала моллюсков

с праймерами ITS2exFw/ITS2exRv

Из электрофореграммы на рисунке 4 хорошо видно, что заражены только моллюски – битинии, образцы которых электрофорезированы на дорожках 2 и 6. Причем битинии заражены именно описторхидами вида *O. felineus*, поскольку величина выявленных фракций ДНК составляет около 530 н.п. Исходя из полученных на электрофореграмме данных, зараженность битиний описторхидами вида кошачья двуустка составила около 33 %.

Таким образом, в результате проведенных исследований нами были разработаны и апробированы технологии видоспецифичной ДНК диагностики для выявления описторхид в моллюсках-битиниях речных водоемов Гомельщины, позволяющие четко идентифицировать описторхид в исследуемом материале.

В ходе наших исследований с помощью методов ДНК-диагностики и классических методов идентификации было установлено, что инвазированность моллюсков личинками *O. felineus* колебалась в среднем от 40 до 78 %, а у рыб семейства карповые личинки описторхиса обнаружены в 23 % исследованных образцов. Наиболее подвержены заражению среди карповых рыб язь, густера и плотва.

Комплексные исследования у дефинитивных хозяев (рыбоядные дикие и домашние млекопитающие, включающие собаку, кошку и человека) показали, что очаг описторхоза по-прежнему сохраняется в Жлобинском районе. За период 2010–2012 гг. у населения зарегистрировано 94 случая заражения. Установлено, что основной источник заражения – рыба семейства карповые местного улова (р. Днепр).

На следующем этапе исследований было проведено секвенирование, полученных образцов, выделенных из метацеркарий, взятых из мышц карповых рыб. Нуклеотидные последовательности полученных ампликонов расшифровывали в Институте цитологии и генетики СО РАН. В результате проведенного секвенирования ITS2 спейсера и прилегающих участков величиной 426 н.п. (после выравнивания) оказалось, что у метацеркарий *O. felineus* в карповых рыбах Днепра и Березины имеются два аллеля – ITS2H1 и ITS2H2. Нуклеотидная последовательность наиболее частого аллеля H1 (приведена ниже) отличается от аллеля H2 инсерцией и двумя нуклеотидными замещениями (GenBank DQ513403, DQ513404).

```
1  cggatgatca ctggtctgt gtgtgatga agagcgcagc caactgtgtg aattaatgcg aactgcatac
71  tgctttgaac atcgacatct tgaacgcata ttgcggccat gggtttgcct gtggccacgc ctgtccgagg
141  gtcggcttat aaactatcac gacgccc aaa agtcgtggc ttgggtcttg ccagctggca tgattcccc
211  acgcatttgt gtggggtgce gcatctatgg ctttcccca atgtgccgga cgcaaccatg tctgggctga
281  ctgcctggat gagggggtgg cggcggagtc gtggctcaat tgtgtgtgt attgtgtga atgtgcgcgc
351  tccgttgttg gtcctttgtc ttgggtgag gctccagtgg tggcaatgca ttcgatgcaa atctgttttg cactt
```

Необходимо отметить, что нуклеотидные последовательности аллелей H1 и H2, обнаруженные у метацеркарий *O. Felineus*, паразитирующих в карповых рыбах Днепра и Березины, совпадают с таковыми, найденными ранее в районах Обь-Иртышского очага, что указывает на генетическую связь между двумя очагами описторхоза.

Таким образом, в ходе проведенных исследований были разработаны методы ДНК-диагностики с использованием спейсера 2 (ITS2) рибосомального кластера для идентификации кошачьей двуустки (*O. felineus*), вызывающей заболевание описторхоз у животных и человека. С помощью методов ДНК-диагностики и классических методов было установлено, что инвазированность моллюсков личинками *O. felineus* колебалась от 40 до 78 %, а у рыб семейства карповые личинки описторхид обнаружены в 23 % образцов. Комплексные исследования у дефинитивных хозяев показали, что очаг описторхоза по-прежнему сохраняется в Жлобинском районе, а основной источник заражения – рыба местного улова (р. Днепр). Данные анализа нуклеотидных последовательностей спейсера ITS2 *O. felineus* указывает на генетическую связь между Днепровским и Обь-Иртышским очагами описторхоза.

Работа проводилась в рамках тем ГПНИ 16-14 и ГПНИ 16-32, при выполнении Государственных программ «Биотехнологии» и «Природопользование и экология».

Литература

1. Ando, K. Nucleotide sequence of mitochondrial CO I and ribosomal ITS II genes of *Opisthorchis viverrini* in northeast Thailand / K. Ando, P. Sithithaworn, C. Nuchjungreed [et al.] // Southeast Asian J Trop Med Public Health. – 2001. – Vol. 32 (Suppl 2). – P. 17–22.
2. Müller, B. PCR diagnosis of infections with different species of Opisthorchiidae using a rapid clean-up procedure for stool samples and specific primers / B. Müller, J. Schmidt, H. Mehlhorn // Parasitol Res. – 2007. – V. 100. – P. 905–909.
3. Müller, B. Sensitive and species-specific detection of *Clonorchis sinensis* by PCR in infected snails and fishes / B. Müller, J. Schmidt, H. Mehlhorn // Parasitol Res. – 2007. – V. 100. – P. 911–914.
4. Катохин, А.В. Оценка генетических отличий *Opisthorchis felinus* от *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* по ITS2- и CO1-последовательностям / А.В. Катохин, С.В. Шеховцов [и др.] // Доклады академии наук. – 2008. – Т. 421, № 4. – С. 549–552.
5. Мордвинов В.А. Определение полной нуклеотидной последовательности митохондриального генома возбудителя описторхоза, *Opisthorchis felinus* / В.А. Мордвинов, А.В. Марданов, Н.В. Равин, С.В. Шеховцов, С.А. Демаков, А.В. Катохин, Н.А. Колчанов, К.Г. Скрябин // Acta Naturae. – 2009. – № 1. – С. 99–104.
6. Брусенцов, И.И. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felinus* и *Metorchis bilis* с помощью метода ПЦР / И.И. Брусенцов, А.В. Катохин, З.В. Сахаровская, А.Э. Сазонов, Л.М. Огородова, О.С. Федорова, Н.А. Колчанов, В.А. Мордвинов // Медицинская паразитология. – 2010. – № 2. – С. 10–13.
7. Гончаренко, Г.Г. ДНК-диагностика *Opisthorchis felinus* по ITS2 последовательностям в промежуточных хозяевах – моллюсках-битиниях / Г.Г. Гончаренко, А.Н. Лысенко, А.В. Катохин // Вестник МГПУ им. И.П. Шамякина. – 2012. – № 1. – С. 30–36.
8. Brusentsov, I. Low Genetic Diversity in Wide-Spread Eurasian Liver Fluke *Opisthorchis felinus* Suggest Special Demographic History of Trematode Species / I. Brusentsov, A. Katokhin, S. Shechovtsov, S. Borovikov, G. Goncharenko, L. Lider, B. Romashov, A. Evtushenko, V. Mordvinov // PLoS ONE, 2013. – 8(4):e62453. doi:10.1371.
9. King, S. Trematodes of the family Opisthorchiidae: a minireview / S. King, T. Scholz // The Korean Journal of Parasitology. – 2001. – Т. 201. – С. 209–221.
10. Савицкий, Б.П. Природные очаги болезней человека в национальных парках Беларуси / Б.П. Савицкий, Л.С. Цвирко, Н.П. Мишаева. – Минск : Бит «Хата», 2002. – С. 262–267.
11. Паразитология и инвазионные болезни животных : метод. указания / М.Ш. Акбаев [и др.]. – М. : МГАВМиБ им. К.И. Скрябина, 2002. – 61 с.
12. Бээр, С.А. Биология возбудителя описторхоза / С.А. Бээр. – М. : Тов-во науч. изданий КМК, 2005. – 336 с.
13. Юрлова, Н.И. Обская болезнь / Н.И. Юрлова, В.В. Глухов // Описторхоз через призму генома. – Новосибирск, 2008. – 32 с.
14. Пашук, В.П. К вопросу о гельминтофауне человека и сельскохозяйственных животных в БССР / В.П. Пашук, М.Н. Чуносков // Первая зоол. конф. Белорус. ССР : Материалы. – Мн., 1958. – С. 272–274.
15. Линник, В.Я. Гельминтозоозы рыб в бассейне реки Днепра на территории Беларуси / В.Я. Линник // Вестн. АН БССР. Сер. с.-х. наук. – 1964. – № 2. – С. 120–122.

¹Гомельский государственный университет им. Ф. Скорины

²Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Поступила в редакцию 12.07.2016