

МРНТИ 34.27.29

DOI: <https://doi.org/10.26577/eb-2019-3-b15>**Киян В.С.<sup>1\*</sup>, Смагулова А.М.<sup>1</sup>, Катохин А.В.<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Научно-исследовательская платформа сельскохозяйственной биотехнологии  
АО «Казахский агротехнический университет им. С.Сейфуллина»,  
Казахстан, г. Нур-Султан, e-mail: vskiy@gmail.com

<sup>2</sup>ФБГНУ Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия, г. Новосибирск

## **МЕТОРХОЗ В СЕВЕРНОМ КАЗАХСТАНЕ: СОСТОЯНИЕ ИЗУЧЕННОСТИ И РАСПРОСТРАНЕНИЕ**

В настоящей статье авторами было проведено исследование состояния изученности и распространенности меторхоза на территории Северного Казахстана. Проанализирована отечественная и зарубежная литература, где отмечено наличие в Казахстане возбудителя меторхоза, но исследования на должном уровне не проводились. Авторами статьи проведены исследования промежуточных и окончательных хозяев возбудителей семейства *Opisthorchiidae*. Молекулярно-генетические исследования показали у одного из промежуточных хозяев – рыбы семейства карповых, наличие смешанной инфекции основными видами *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*. Полученные нуклеотидные последовательности были зарегистрированы в международной базе данных NCBI GenBank. Кроме этого, доказано наличие смешанной инфекции у одного из окончательных хозяев представителей диких плотоядных (лис). Выделены из печени мариты, проведена их морфологическая и молекулярная идентификация, в результате чего доказана их принадлежность к видам *O. felineus* и *M. bilis*. В заключительном исследовании авторами проведены биохимические и молекулярно-генетические исследования сывороток крови пациентов с диагнозом «описторхоз». Проведенное исследование показало, что уровень заболеваемости составил 6,2 % и эти показатели согласуются с официальной статистикой открытых источников. Исследование биологического материала, отобранного у пациентов с подтвержденным методом ИФА диагнозом «описторхоз», позволило также доказать микст-инвазию у людей в изучаемом регионе.

**Ключевые слова:** ПЦР, меторхоз, описторхоз, микст-инвазия.

Kiyan V.S.<sup>1\*</sup>, Smagulova A.M.<sup>1</sup>, Katokhin A.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Research Platform of Agricultural Biotechnology S. Seifullin Kazakh Agrotechnical University,  
Kazakhstan, Nur-Sultan, e-mail: vskiy@gmail.com

<sup>2</sup>Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Russian Federation, Novosibirsk

### **Methorchosis in North Kazakhstan: state of study and distribution**

In this article, the authors conducted a study of the state of knowledge and prevalence of methorchosis in the territory of Northern Kazakhstan. The domestic and foreign literature was analyzed, where the presence of the pathogen of methorchosis in Kazakhstan was noted, but studies were not conducted at the proper level. The authors of the article conducted studies of the intermediate and final hosts of the pathogens of the family *Opisthorchiidae*. Molecular genetic studies have shown in one of the intermediate hosts, fish of the cyprinid family, the presence of a mixed infection with the main species *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis*. The obtained nucleotide sequences were registered in the international NCBI GenBank database. In addition, the presence of a mixed infection in one of the final hosts of representatives of wild carnivores (foxes) was proved. Marita were isolated from the liver, their morphological and molecular identification was carried out, as a result of which they belong to the species *O. felineus* and *M. bilis*. In the final study, the authors conducted biochemical and molecular-genetic studies of the blood serum of patients with a diagnosis of opisthorchiasis. The study showed that the incidence rate was 6.2% and these indicators are consistent with official statistics from open sources. The study of biological material selected from patients with a confirmed ELISA diagnosis of «opisthorchiasis», also allowed to prove mixed invasion in people in the study region.

**Key words:** PCR, methorchosis, opisthorchiasis, mixed invasion.

Киян В.С.<sup>1\*</sup>, Смагулова А.М.<sup>1</sup>, Катохин А.В.<sup>2</sup><sup>1</sup>С. Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті, Ауылшаруашылық биотехнология ғылыми зерттеу платформа, Қазақстан, Нұр-Сұлтан қ., e-mail: vskiyangmail.com<sup>2</sup>РГА СФ Цитология және генетика институтының ФМБФМ, РФ, Новосибирск қ.**Солтүстік Қазақстандағы меторхоз: зерттелу және таралу жағдайы**

Бұл мақалада авторлар Солтүстік Қазақстан территориясындағы меторхоздың осы уақытқа дейін қаншалықты зерттелгені мен таралуы туралы зерттеу жүргізді. Отандық және шетелдік әдебиеттерге талдау жасалды, онда Қазақстанда меторхоз қоздырғышының болуы атап өтілді, бірақ зерттеулер тиісті деңгейде жүргізілмегені анықталды. Мақала авторлары *Opisthorchiidae* тұқымдасының қоздырғыштарының аралық және соңғы иелерін зерттеді. Молекулярлы-генетикалық зерттеулер аралық және соңғы иелерінің балығы, *Opisthorchis felineus* және *Metorchis bilis* негізгі түрлерімен аралас инфекцияның болуын көрсетті. Алынған нуклеотидтер тізбегі NCBI GenBank халықаралық деректер базасында тіркелді. Сонымен қатар, жабайы етқоректілердің (түлкілердің) соңғы қожайындарының бірінде аралас инфекцияның болғаны дәлелденді. Марита бауырдан бөлініп алынды, олардың морфологиялық және молекулалық идентификациясы жүргізілді, нәтижесінде олар *O. felineus* және *M. bilis* түрлеріне жататындығы анықталды. Қорытынды зерттеуде авторлар описторхоз диагнозы бар пациенттердің қан сарысуларына биохимиялық және молекулярлы-генетикалық зерттеулер жүргізді. Зерттеу көрсеткендей, сырқаттанушылық деңгейі 6,2% құрайды және бұл көрсеткіштер ашық дереккөздердің ресми статистикасына сәйкес келеді. ИФТ расталған «описторхоз» диагнозы бар пациенттерден алынған биологиялық материалдары зерттеу аймағындағы адамдарда аралас инвазияның бар екендігін дәлелдеуге мүмкіндік берді.

**Түйін сөздер:** ПТР, меторхоз, описторхоз, аралас инвазия.

**Введение**

Меторхи (лат. *Metorchis spp.*) являются гельминтами группы дигенетических трематод, относящихся к семейству *Opisthorchiidae*. Первоначально эта трематода была выделена из образцов желчных протоков красной лисицы, которая погибла в садах Британского зоологического общества в Лондоне. В роде *Metorchis* зарегистрировано 26 видов, из которых 8 видов паразитируют у млекопитающих и 18 видов у птиц [1]. Cameron в 1944 году исследовал таксономию рода *Metorchis* и предположил, что существует только три вида данного рода: *Metorchis conjunctus* в Северной Америке, *Metorchis albidus* в Европе и вокруг Средиземноморья и *Metorchis felis*, в Азии [2]. На сегодняшний день, крупными представителями данного вида являются *Metorchis bilis* (Braun, 1893, син. *Metorchis albidus*), обитающий в Сибири, *Metorchis conjunctus* (Cobbold, 1960), обитающий в Канаде, и *Metorchis orientalis* (Tanabe, 1919, син. *Metorchis felis*), обитающий в Восточной Азии [3, 4].

Как типичный представитель семейства *Opisthorchiidae*, *Metorchis bilis* имеет сложный жизненный цикл, который протекает в трех разных хозяевах: двух промежуточных и одном окончательном. Первым промежуточным хозяином *M. bilis* являются пресноводные улитки

*Bithynia tentaculata* на Европейской территории России, в Западной Сибири и Казахстане. Второй промежуточный хозяин – рыба семейства карповые (язь, плотва, елец, уклейка, карась, карп и др.). В качестве окончательного хозяина выступают плотоядные животные (волки, собаки, лисы, кошки, ондатры, выдры и норки) и человек, а также отдельные рыбацкие птицы (коршуны, луны) [5].

Сеть озер и рек Северного Казахстана относится к Обь-Иртышскому байссейну, который дальше простирается по территории Российской Федерации. Имеется достаточное количество исследований российских ученых показывающих, что основными представителями семейства *Opisthorchiidae* на территории РФ являются виды *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* [6]. При этом имеются сообщения о смешанной инфекции, когда заражение происходит двумя вышеуказанными возбудителями [7-9].

О том, что на территории Казахстана фиксируется возбудитель меторхоза, сомневаться не приходится. Ряд исследователей периодически указывают, что *Metorchis bilis* встречается на территории Республики [10, 11, 12], но исследований на должном уровне не проводилось. Ранее проведенные нами исследования позволили доказать наличие возбудителя меторхоза в Коргалдинском районе Акмолинской области у одного из промежуточных хозяев – рыб се-

мейства карповые [13]. Эти данные также подтверждаются рядом исследователей, доказавших наличие этого возбудителя в изучаемом регионе [14, 15].

Если рассматривать окончательных хозяев, то имеются, лишь незначительные ссылки на смешанную инфекцию (*O. felineus* и *M. bilis*). Например, исследования вскрытия трупа деревенских собак в эндемичном регионе выявили 37 из 51 (72%) деревенских собак, зараженных либо *O. felineus*, либо *M. bilis*. Две собаки были заражены единичными образцами *M. bilis*. Однако авторы не предоставили точных (генетических) данных о наличии 2 видов паразитов и подчеркнули, что невозможно подтвердить, был ли вызван описторхоз человека *O. felineus* или *M. bilis* [16].

При этом следует заметить, что среди населения, проживающего в бассейне Нура-Сарысу, который является одним из 8 бассейнов Казахстана, описторхоз широко распространен, но смешанные инфекции еще не зарегистрированы. Предполагается, что клинические признаки инфекции *M. bilis* аналогичны клиническим признакам инфекции *O. felineus* [17, 18], и практически невозможно провести различие между этими двумя инфекциями с помощью рутинных медицинских и паразитологических методов.

Цель настоящего исследования – провести анализ распространенности возбудителя *M. bilis* на территории Северного Казахстана и доказать наличие смешанной инфекции в данном регионе.

### Материалы и методы исследования

При проведении работы использовали следующие объекты исследования: рыба язь (*Leuciscus idus*) семейства карповых, отловленная в озере Шолак Коргалжынского района Акмолинской области; лиса обыкновенная (*Vulpes vulpes*) семейства псовых, добытая около села Малиновка Акмолинской области; дуоденальная жидкость (желчь человека) с подтвержденным диагнозом «описторхоз», предоставленная от ГККП «Городская инфекционная больница» акимата г. Нур-Султан.

Для обнаружения метацеркарий в тканях рыбы использовали компрессионный метод. Для этой цели исследовали по 5 проб мышц с подкожной клетчаткой с обеих сторон рыбы: по 3 пробы из спинной и 2 из брюшной части. Каждая проба мышц бралась с площади 1-2 см<sup>2</sup> на глубине 2-3 мм. Мышечную ткань измельчали и порциями по 1-1,5 г раскладывали в компрессио-

рий МИС-7М («Лаборкомплект», РФ). Готовые компрессионные препараты просматривали под микроскопом при увеличении в 20 раз на микроскоп ВХ 43 («Olympus», Япония).

Полное гельминтологическое вскрытие окончательных хозяев (лис) проводили по методу К.И. Скрябина [19]. Особое внимание уделяли печени и желчному пузырю животных. Желчный пузырь вскрывали и промывали его оболочку физиологическим раствором. Делали соскоб со стенок желчного пузыря и наносили на предметное стекло. Печень осматривали снаружи, после чего измельчали паренхиму и проводили отмывку водой. С помощью микроскопа исследовали желчь и печень на наличие паразитов.

Метод выделения ДНК из желчи человека с предварительной гомогенизацией. Осадок инкубировали в 1 мл 1N NaOH в течение 30 мин при 95°C. Полученную суспензию центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин. Супернатант переносили в микроцентрифужную пробирку, доводили pH до 6-7. Далее к смеси добавляли 50 мкл 5M NaCl и 5 мг СТАВ, инкубировали при 65°C в течение 1 часа. Из полученной смеси ДНК выделяли фенол-хлороформной экстракцией: первая экстракция – равным объемом фенол-хлороформ-изоамиловый спирта (25:24:1), вторая – равным объемом хлороформ-изоамилового спирта (24:1). ДНК осаждали добавлением 0,6 объема изопропанола (30 мин при +4°C) и центрифугировали в течение 3 мин при 12 000 об/мин. Полученный осадок ДНК промывали 70% этанолом, высушивали, после чего растворяли в 50 мкл 1× TE буфера [20].

Аmplификацию маркерных генов проводили в конечном реакционном объеме 25 мкл, содержащем 1× Phusion HF-буфер, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1U Phusion ДНК-полимеразу и 200 мкМ dNTP (New England BioLabs Inc.), 25 пмоль каждого праймера и 20 нг экстрагированной ДНК из одного образца. ПЦР проводили при следующих условиях термоциклирования: 95°C в течение 50 с, 65°C в течение 50 с, 68°C в течение 7 мин, и окончательная элонгация 5 мин при 72°C. Амплифицированные продукты ДНК анализировали на горизонтальном электрофорезе в 1% агарозном геле с использованием 1×TAE буферного раствора и EtBr. Параметры протекания электрофореза – 120V, 250 mA, 50W.

Непрямой вариант ИФА. Ячейки 96-луночного планшета для иммунологических реакций сенсibilизировали антигеном в разных концен-

трациях (0,0005 – 0,020 мг/мл), при 4°C в течение ночи. Для удаления несвязавшегося антигена планшет отмывали 3 раза ФСБ и 3 раза ФСБ с ФСБ-ТВ. После этого вносили антителосодержащую жидкость в количестве 0,1 мл и инкубировали при 37°C в течение 60 минут. После инкубации планшет отмывали описанным способом для удаления неспецифически связавшихся антител. Затем в лунки планшета вносили антивидовой конъюгат в объеме 0,1 мл и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Повторяли процедуру отмывки для удаления несвязанных продуктов реакции и в лунки вносили по 0,1 мл раствора субстрата фермента. Субстрат (однокомпонентный раствор тетраметилбензидина – ТМБ) вносили по 100 мкл и инкубировали планшет 10-15 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением в лунки планшета раствора 0,5М серной кислоты. Результаты ИФА учитывали с помощью спектрофотометра с вертикальным потоком света (*ASYS Expert 96*, Австрия) при длине волны 450 нм.

Для подтверждения результатов ИФА использовали коммерческий набор *Onustorx-IgG-ИФА-БЕСТ* (ЗАО «Вектор-БЕСТ», РФ). Постановку ИФА проводят в соответствии с инструкцией к применению данного набора. Перед выполнением теста выполняют предварительное разведение исследуемых сывороток путем внесения в лунки дополнительного планшета 90 мкл раствора для разведения сыворотки (РРС) и 10 мкл сыворотки. Перемешивают путем 3-4 кратного пипетирования. Далее контрольные и опытные образцы вносят в лунки планшета по 100 мкл в следующей последовательности: в лунку А1 вносится положительный контроль (К+); в лунки В1 и С1 отрицательный контроль (К-). Далее в последующие лунки иммунологического планшета вносят 10 мкл разведенной сыворотки и 90 мкл раствора для разведения образца (РРО) и тщательно перемешивают 3 – 4 кратным пипетированием. Далее следовали строго по инструкции.

### Результаты исследования и их обсуждение

Первым этапом исследовательской работы являлось обнаружение и выделение метацеркарий описторхид из мышечной ткани рыбы семейства карповых. Отлов рыб проводили в озерах Акмолинской и Карагандинской областях, многие из которых имели сообщение с рекой Нура, являющейся одним из очагов развития

трематод семейства *Opisthorchiidae*. На рисунок 1 представлен основной очаг распространения описторхоза.

На карте отмечены озера, из которых была исследована рыба семейства карповых (каarp, язь, плотва, плотва, лещ, окунь, карась), где красные точки означают очаг распространения описторхид – это озера Акмолинской области в Коргалжынском (Шолак, Шалкар, Есей, Садырбай) и Атбасарском (р. Колутон) районах, а также р. Куланотпес вблизи с. Ныгман в Карагандинской области. Синими точками отмечены водоемы, где наличие зараженной рыбы не наблюдалось: Целиноградского (оз. Майбалык, р. Нура), Аршаралинского (оз. Байдалы, водохранилище Бирсуат), Астраханского (оз. Камысты) и Коргалжынского (оз. Каражар Биртабан) районов.

Для обнаружения метацеркарий в тканях рыбы использовали компрессионный метод (рисунок 2).

В результате микроскопирования нами были отобраны метацеркарии по морфологическим признакам, соответствующие семейству *Opisthorchiidae* роду *Metorchis spp.* и *Opisthorchis spp.*, что характеризуется их морфологическим строением. Метацеркарии *Metorchis spp.* имеют овальную, округленную форму, длиной 0,23-0,63 мм и шириной 0,12-0,28 мм, темно желтого цвета, хорошо заметны ротовая и брюшная присоски, в задней части экскреторный пузырек округлой формы, заполненный гранулами черного цвета. Метацеркарии *Metorchis spp.* заключены в овальных, тонкостенных, двухслойных гиалиновых цистах. Циста окружена соединительной капсулой.

Зрелые метацеркарии *Opisthorchis spp.* представляют собой цисту овальной формы, внутри которой находится в согнутом состоянии личинка гельминта.

Для определения видовой идентификации метацеркарий, нами использован ПЦР-анализ со специфическими праймерами для маркеров *ITS1* и *ITS2*. Постановку реакции проводили согласно стандартной методике. В результате было доказано, что выделенные метацеркарии принадлежали к видам *O. felineus* и *M. bilis*. Нуклеотидные последовательности исследуемых видов были нами ранее депонированы в базе данных *NCBI GenBank* (изолят *O. felineus* 0827-AKKz01: *ITS1*, MG952283, *ITS2*, MG952281; изолят *M. bilis* 0829-AKKz02: *ITS1*, MG952284, *ITS2*, MG952282).

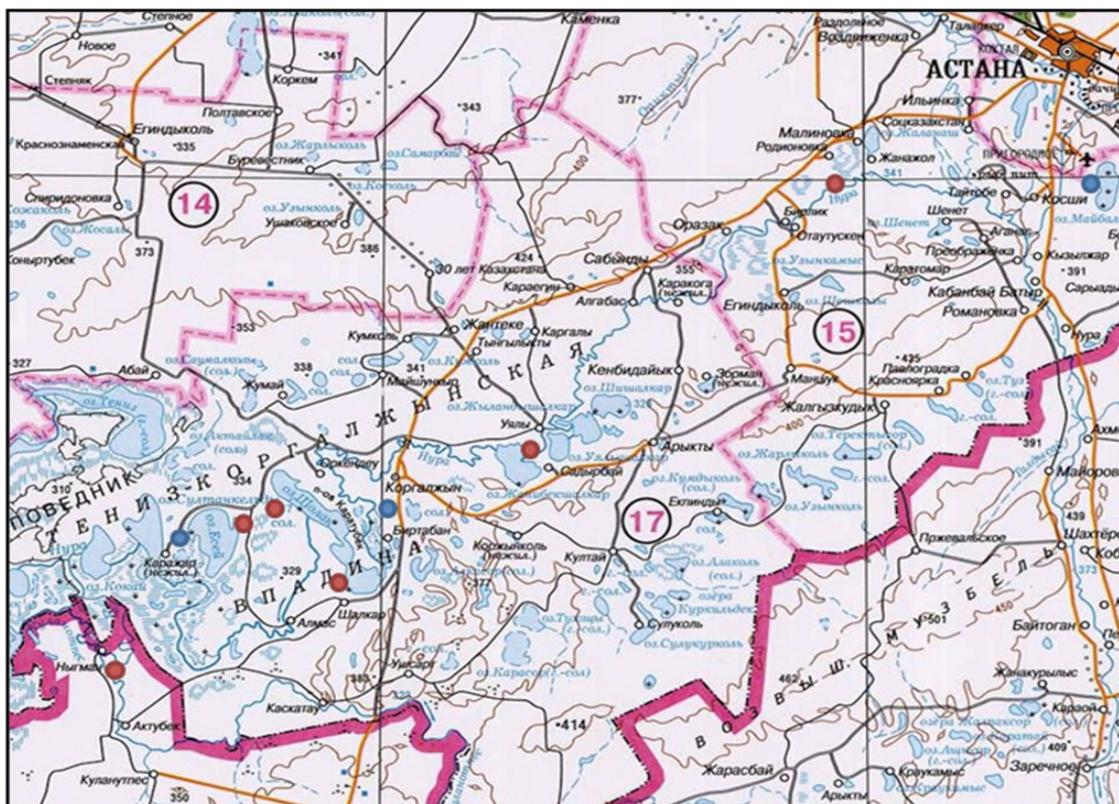
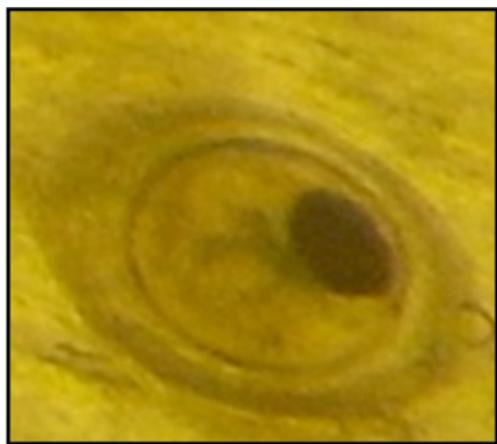
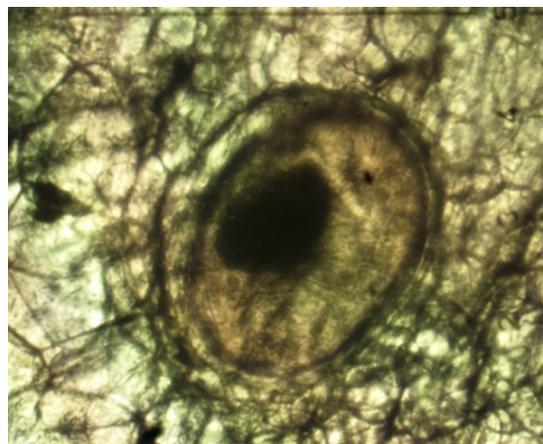


Рисунок 1 – Карта мест вылова рыбы



*Metorchis* spp.



*Opisthorchis* spp.

Рисунок 2 – Метациррии описторхид, выделенные из мышечной ткани рыбы (минимальная единица измерения масштаба – 10 мкм)

Для выявления распространения возбудителей семейства *Opisthorchiidae* у окончательных хозяев нами совместно с охотниками-промысловиками проведено исследование лис в основных очагах распространения возбудителей. В паразитологическую лабораторию были доставлены

тушки лис для полного гельминтологического вскрытия из Акмолинской и Карагандинской области РК.

При исследовании особое внимание уделяли печени и желчному пузырю животных. Желчный пузырь вскрывали и промывали его обо-

лочку физиологическим раствором. С помощью лупы исследовали желчь на наличие паразитов. Исследование печени проводили способом последовательного промывания и сливов жидкости с осадка до полной прозрачности промывных

вод. Осадок тщательно просматривали с помощью микроскопа. В результате, у двух особей лис, отстреленных в Карагандинской области, нами было обнаружены половозрелые формы марит *O. felineus* и *M. bilis* (рисунок 3).



Рисунок 3 – Половозрелые формы марит рода *O. felineus* и *M. bilis*

Трематода рода *Metorchis* – грушевидной формы, размеры гельминта могут достигать 2,5-3,5 мм в длину и около 1,6 мм в ширину. Диаметр ротовой присоски 0,24-0,32 мм, брюшного – 0,3 мм. Хорошо выражены два кишечных ствола, слепо заканчиваются в заднем конце тела. Два семенника расположены в задней части тела паразита. Спереди от семенников находится округлый яичник. Матка расположена в передней части тела.

*Opisthorchis* – ланцетовидный паразитический червь, имеет вытянутое тело, длина которого составляет 0,8-1,3 см, ширина – 1,2-2,5 мм. Два лопастных семенника расположены в задней части тела, наискосок друг за другом. Петли матки содержатся между кишечными ветвями в средней трети тела. Половые отверстия открываются у переднего края брюшной присоски.

Таким образом, можно сделать вывод, что лисы, обитающие на территории Карагандинской области, инфицированы двумя видами возбудителей – *O. felineus* и *M. bilis* и нами впервые доказана микс инвазия у диких плотоядных в изучаемом регионе.

Как и дикие плотоядные, к окончательному хозяину возбудителей семейства *Opisthorchiidae* относится и человек. Человек заражается, употребляя в пищу недостаточно обработанную речную рыбу. Особенно опасно употреблять копченую,

вяленую или соленую рыбу, приготовленную в домашних условиях, в этих случаях, как правило, не происходит уничтожения этого паразита. Также можно заразиться при использовании не обезвреженного после разделки рыбы инвентаря (ножи, посуда, оборудование) для приготовления блюд, не требующих термической обработки (салаты, холодные закуски) [21].

На сегодняшний день единственным достоверным диагностическим признаком возбудителей описторхид является наличие яиц паразита в желчи или фекалиях, однако в течение первого месяца наиболее выраженных клинических проявлений описторхид (боли в печени, тошнота и т.д.), яйца гельминтов в испражнениях, обнаружить не удастся, так как возбудители семейства *Opisthorchiidae* начинают яйцепродукцию после достижения половой зрелости в течение 2-3-недель. В это время на первое место в диагностике выходят методы иммунологической и молекулярной диагностики [22].

В Астане за период 2009-2014 гг. зарегистрировано 1027 человек с установленным диагнозом «описторхоз», что составило 15,31%. В последние годы отмечалось снижение заболеваемости описторхозом, эта тенденция сохранилась и в 2018 году, о чем свидетельствует снижение цифр заболеваемости за 8 месяцев 2018 года на 6,91% [23, 24].

Для подтверждения выше представленных данных, нами было исследовано 420 сывороток крови пациентов с подозрением на «описторхоз» методом ИФА на наличие антител иммуноглобулинов класса G. Все материалы и образцы были любезно предоставлены ГККП «Городская инфекционная больница» акимата г. Астаны.

По результатам расчетов, из 420 исследованных сывороток 26 образцов оказались положительными на наличие антител класса G к антигенам описторха, что в процентном соотношении составляет 6,2%. Отрицательный результат выявили у 393 пациента (93,6%) и у 1 пациента (0,2%) были сомнительные результаты. Данные представлены на рисунке 4.

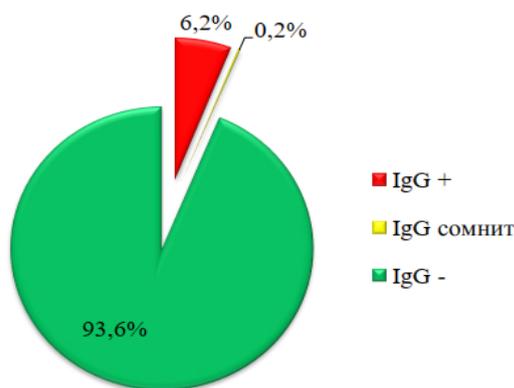


Рисунок 4 – Результаты ИФА образцов сыворотки крови на наличие IgG описторхоза

По данным РГП на ПХВ «Научно-практический центр санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга» КЗПП МНЭ РК уровень заболеваемости за 8 месяцев 2018 года составил 6,91%. Анализ заболеваемости описторхозом показывает, что в последние годы, нет тенденции к повышению показателя [25].

Проведенное нами исследование показало, что за неполный 2018 год, уровень заболеваемости составил 6,2 % и эти показатели соответствуют данным центра санитарно-эпидемиологической экспертизы и мониторинга.

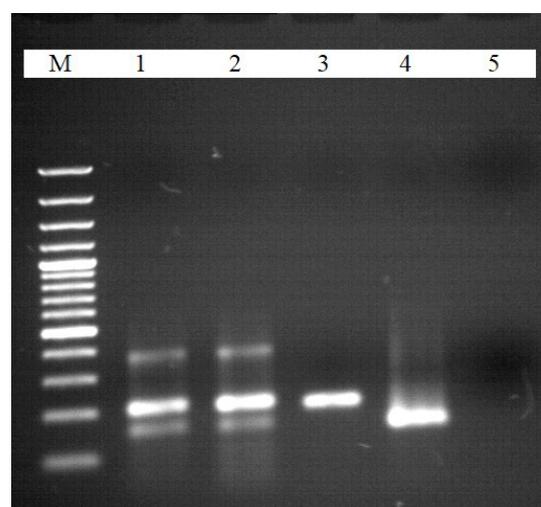
Недостатком данного метода является, то, что методом ИФА невозможно провести дифференциальную диагностику возбудителей меторхоза и описторхоза при микст-инвазии. Для этого все чаще ученые со всего мира прибегают к

молекулярно-генетическим исследованиям [26]. Учитывая ранее представленные результаты наличия микст-инвазии у рыб семейства карповые и диких плотоядных (лисы) в изучаемом регионе, нами было предположено наличие микст-инвазии и у человека, так как основной поток рыбы на рынок г. Астаны идет из основного очага распространения возбудителей семейства *Opisthorchiidae*.

Для подтверждения результатов нами были проведены молекулярно-генетические исследования биологического материала, отобранного у пациентов с подтвержденным методом ИФА диагнозом «описторхоз». Для этого нами использованы видоспецифические праймеры, разработанные для фрагмента *ITS2* между генами рибосомных РНК из ядерных геномов *Metorchis bilis* и *Opisthorchis felineus*.

Нами было исследовано два образца желчи от больных описторхозом, которые дали свое согласие на проведение исследований с учетом соблюдения всех этических вопросов.

Детекцию результатов проводили в 1% агарозном геле.



М – молекулярный маркер 100 bp Gene Ruler (Thermo Scientific, США); 1 – Желчь 1-я проба; 2 – Желчь 2-я проба; 3 – К+ ДНК *O. felineus*; 4 – К+ ДНК *M. bilis*; 5 – К-

Рисунок 5 – Результаты ПЦР-анализа

Как видно на электрофореграмме, образцы желчи, проверенные со специфическими праймерами, выявил наличие в двух образцах желчи микст-инвазии.

## Заключение

Проанализировав состояние изученности и распространения меторхоза на территории Северного Казахстана, можно сделать вывод о малоизученности данной проблемы. При медицинском и паразитологическом обследовании в обычный диагноз «описторхоз» предполагается включить патологию, вызванную заражением любым из видов *Opisthorchiidae*. Проведенные нами исследования показали наличие микстинвазии (*O. felineus* и *M. bilis*) у промежуточных и окончательных хозяев на территории Северного Казахстана.

*Конфликт интересов.* Все авторы прочитали и ознакомлены с содержанием статьи и не имеют конфликта интересов.

*Работа выполнена в рамках финансирования Комитета науки МОН РК по бюджетной программе 217 «Развитие науки», подпрограмме 102 «Грантовое финансирование научных исследований» проекту ИРН AP05131132 «ПЦР-тест для детекции и дифференциальной диагностики возбудителей описторхоза и меторхоза» и частично поддержана бюджетным проектом ФБГУН ИЦиГ СО РАН № 03242-2019-0041».*

## Сокращения и обозначения

ПЦР – полимеразная цепная реакция, об/мин – оборотов в минуту, мг – миллиграмм, мин – минут, нг – нанограмм, ИФА – иммуно-ферментный анализ, ФСБ – фосфатно-солевой буфер, мл – миллилитр, р. – река, оз. – озеро, с. – село

## Литература

- 1 Lin, J.X., Cheng, Y.Z., Li, Y.S., Xu, S.L., Lin, C.X., Chen, B.J., Xiu, W.Q., Zhang, R.Y., Zhu, K., Li, L., Pan, L.X., Yao, L.Z., Ling, G.H. The discovery of natural infection of human with *Metorchis orientalis* and the investigation of its focus. // *Chin. J. Zoonoses.* – 2001. – Vol.17. – P 19-20 [In Chinese].
- 2 Cameron T.W.M. The Morphology, Taxonomy, and Life History of *Metorchis conjunctus*. // *Can J Res.* – 1944. – Vol. 22d. – P 6-16.
- 3 Sherrard-Smith E., Stanton D.W.G., Cable J., Orozco-ter-Wengel P., Simpson V.R., Elmeros M., J. van Dijk, Simonnet F., Roos A., Lemarchand C., Polednik L., Heneberg P., Chadwick E.A. 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.
- 4 Zadesenets K.S., Polyakov A.V., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Rubtsov N.B. Chromosome morphometry in opisthorchiid species (*Platyhelminthes*, *Trematoda*). // *Parasitology International.* – 2017. – Vol. 66. – P. 396-401.
- 5 Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. (2012) *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. // *Parasitol Int.* – 2012. – Vol. 61. – P 25-31.
- 6 Sitko J., Bizos J., Sherrard-Smith E., Stanton D.W., Komorová P., Heneberg P. Integrative taxonomy of European parasitic flatworms of the genus *Metorchis* Looss, 1899 (*Trematoda: Opisthorchiidae*) // *Parasitol. Int.* – 2016. – Vol. 65. – P. 258-267.
- 7 Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Sakharovskaya Z.V., Sazonov A.E., Ogorodova L.M., Fedorova O.S. et al. DNA diagnosis of mixed invasions of *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* by polymerase chain reaction. // *Med. Parazitol. (Mosk).* – 2010. – Vol. 2. – P. 10-13.
- 8 Nöckler K., Dell K., Schuster R., Voigt W.P. Indirect ELISA for the detection of antibodies against *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) in foxes. // *Vet Parasitol.* – 2003. – Vol. 110. – P. 207-215.
- 9 Iliinskih E.N., Nowisci V.V., Iliinski N.N., Lepelin A.V. Infestations *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1890) a person in different regions of the Ob-Irtysh river basin. // *Parasitology.* – 2007. – Vol. 41(1). P. 55-64.
- 10 Беэр С.А. Биология возбудителя описторхоза. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 336 с.
- 11 Сидоров Е.Г. Природная очаговость описторхоза. – Алма-Ата: Наука, 1983. – 240 с.
- 12 Yurlova N.I., Yadrenkina E.N., Rastyazhenko N.M., Serbina E.A., Glupov V.V. Opisthorchiasis in Western Siberia: Epidemiology and distribution in human, fish, snail, and animal populations // *Parasitol Int.* – 2017. – Vol. 66(4). – P. 355-364.
- 13 Kiyani V.S., Bulashev A.K., Katokhin A.V. *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* Metacercariae in Cyprinid Fish *Leuciscus idus* in Nura-Sarysu River, Kazakhstan. // *Korean J Parasitol.* – 2018. – Vol. 56 (3). – P. 267-274.
- 14 Михалева Е.В. Ветеринарно-санитарная оценка описторхозной рыбы и фармакологический эффект препарата *Sau-surea amaga* при описторхозе собак: автореф. ... канд. биол. наук: 16.00.06. – Казань: Печатный двор, 2005. – 22 с.
- 15 Кошерова Б.Н., Кусаинова А.С., Сыздыков М.С., Басешева Д.А., Алишева Г.Л. Эпидемиологическая характеристика описторхоза у рыб на примере водоемов Акмолинской области // *Медицина и экология.* – 2009. – №3 (52). – С. 29-32.
- 16 Sultanov A., Abdybekova A., Abdibaeva A., Shapiyeva Z., Yeshmuratov T., Torgerson P.R. Epidemiology of fish-borne trematodiasis in Kazakhstan // *Acta Trop.* – 2014. – Vol. 138. – P. 60-66.
- 17 Федоров К.П., Наумов В.А., Кузнецова В.Г., Белов Г.Ф. О некоторых актуальных вопросах проблемы описторхозов человека. // *Мед. Паразит. и паразитар. болезни.* – 2000. – № 3. – С. 7-9.
- 18 Kuznetsova V.G., Naumov V.A., Belov G.F. Methorchiasis in the residents of Novosibirsk area, Russia. // *Cytobios.* – 2000. – Vol. 102. – P. 33-44.

- 19 Скрябин К.И. Метод полных гельминтологических вскрытий позвоночных, включая человека. – Г.: Изд-во 1-го Моск. гос. ун-та, 1928. – С. 43.
- 20 Schuster R.K. Opisthorchiidosis – a review // *Infect. Disord. Drug Targets*. – 2010. – Vol. 10. – P. 402-415.
- 21 Богдашир М. Глистные инвазии // Изд-во Litres. – Москва. – 2017. – 231 с.
- 22 МКБ-10: Международная статистическая классификация болезней и проблем, связанных со здоровьем. Всемирная организация здравоохранения. – Том 1: Часть 2. – 1995. – 633 с.
- 23 Müller B., Schmidt J., Mehlhorn H. Sensitive and species-specific detection of *Clonorchis sinensis* by PCR in infected snails and fishes // *Parasitol Res.* – 2007. – Vol. 100. – P. 911-914.
- 24 Байкеева К.Т., Садыкова А.М., Сейдулаева Л.Б., Умешова Л.А., Исмаилова Б.С. Повсеместно распространенные гельминтозы. // *Вестник КазНМУ*. – 2017. – №1. – С. 101-108.
- 25 Сборник материалов «Санитарно-эпидемиологическая ситуация в Республике Казахстан за 2015 год». Комитет по защите прав потребителей МНЭ РК, РГП на ПХВ «Научно-практический центр санитарно эпидемиологической экспертизы и мониторинга» КЗПП МНЭ РК. – Астана. – 2015. – 94 с.
- 26 Schuster R., Gregor B., Heidrich J., Nockler 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. – P. 400-404.

### References

1. Bayekeeveva K.T., Sadyikova A.M., Seydulaeva L.B., Umeshova L.A., Ismaylova B.S. (2017) Povsemestno rasprostraneniye gelmintozyi [Ubiquitous helminthiasis]. . *Vestnik KazNMU*. – #1. – S. 101-108. ISBN: 2524-0684.
2. Beer S.A. (2005) *Biologiya vzbuditelya opistorhoza* [Biology of the pathogen opisthorchiasis]. – M.: Tovarischestvo nauchnyih izdaniy KMK. – 336 s. ISBN 5-87317-204-8.
3. Bogdashir M. (2017) *Glistnyie invazii* [Helminthic infestations]. . *Izd-vo Litres*. – Moskva. – 231 s.
4. Brusentsov I.I., Katokhin A.V., Sakharovskaya Z.V., Sazonov A.E., Ogorodova L.M., Fedorova O.S. et al. (2010) DNA diagnosis of mixed invasions of *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* by polymerase chain reaction. . *Med. Parazitol. (Mosk)*. – Vol. 2. – P. 10-13. ISBN 0025-8326.
5. Cameron T.W.M. (1944) The Morphology, Taxonomy, and Life History of *Metorchis conjunctus*. . *Can J Res.* – Vol. 22d. – P 6-16.
6. Fedorov K.P., Naumov V.A., Kuznetsova V.G., Belov G.F. (2000) O nekotoryih aktualnyih voprosah problemy opistorhidozov cheloveka [On some topical issues of the problem of human opisthorchidiasis]. . *Med. Parazit. i parazit. bolezni*. – # 3. – S. 7-9. ISBN 0025-8326.
7. Iliinskih E.N., Nowisci V.V., Iliinski N.N., Lepchin A.V. (2007) Infestations *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1890) a person in different regions of the Ob-Irtysh river basin. . *Parasitology*. – Vol. 41(1). P. 55-64. ISSN:0031-1847
8. Kiyani V.S., Bulashev A.K., Katokhin A.V. (2018) *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* Metacercariae in Cyprinid Fish *Leuciscus idus* in Nura-Sarysu River, Kazakhstan. . *Korean J Parasitol*. – Vol. 56 (3). – P. 267-274. doi: 10.3347/kjp.2018.56.3.267.
9. Kosherova B.N., Kusainova A.S., Syzdykov M.S., Baesheva D.A., Alisheva G.L. (2009) Epidemiologicheskaya harakteristika opistorhoza u rybi na primere vodoemov Akmolinskoy oblasti [Epidemiological characteristics of opisthorchiasis in fish on the example of water bodies in Akmola region]. . *Meditsina i ekologiya*. – #3 (52). – S. 29-32. ISBN 2305-6045.
10. Kuznetsova V.G., Naumov V.A., Belov G.F. (2000) Methorchiasis in the residents of Novosibirsk area, Russia. . *Cytobios*. – Vol. 102. – P. 33-44. ISBN : 0011-4529
11. Lin, J.X., Cheng, Y.Z., Li, Y.S., Xu, S.L., Lin, C.X., Chen, B.J., Xiu, W.Q., Zhang, R.Y., Zhu, K., Li, L., Pan, L.X., Yao, L.Z., Ling, G.H. (2001) The discovery of natural infection of human with *Metorchis orientalis* and the investigation of its focus. . *Chin. J. Zoonoses*. – Vol.17. – P 19-20 [In Chinese]. ISBN 0007-4845.
12. Mihaleva E.V. (2005) Veterinarno-sanitarnaya otsenka opistorhoznoy ryiby i farmakologicheskiiy effekt preparata *Sausurea amara* pri opistorhoze sobak [Veterinary and sanitary assessment of opisthorchiasis fish and pharmacological effect of *Sausurea amara* in dogs opisthorchiasis]: avtoref. ... kand. biol. nauk: 16.00.06. – Kazan: Pechatnyiy dvor. – 22 s.
13. МКБ-10: Mezhdunarodnaya statisticheskaya klassifikatsiya bolezney i problem, svyazannyih so zdorovem. (1995) *Vsemi-mnaya organizatsiya zdavoohraneniya* [International Statistical Classification of Diseases and Health Problems. World Health Organization]. – Tom 1: Chast 2. – 633 s. ISBN 5225032680 2.
14. Mordvinov V.A., Yurlova N.I., Ogorodova L.M., Katokhin A.V. (2012) *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* are the main agents of liver fluke infection of humans in Russia. . *Parasitol Int*. – Vol. 61. – P 25-31. doi: 10.1016/j.parint.2011.07.021.
15. Müller B., Schmidt J., Mehlhorn H. (2007) Sensitive and species-specific detection of *Clonorchis sinensis* by PCR in infected snails and fishes // *Parasitol Res.* – Vol. 100. – P. 911-914. DOI: 10.1007/s00436-006-0322-9.
16. Nöckler K., Dell K., Schuster R., Voigt W.P. (2003) Indirect ELISA for the detection of antibodies against *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) in foxes. . *Vet Parasitol*. – Vol. 110. – P. 207-215.
17. Sbornik materialov «Sanitarно-epidemiologicheskaya situatsiya v Respublike Kazahstan za 2015 god». (2015) Komitet po zaschite prav potrebitel'ev MNE RK, RGP na PHV «Nauchno-prakticheskiiy tsentr sanitarno epidemiologicheskoy ekspertizy i monitoringa» KZPP MNE RK [Collection of materials «Sanitary and epidemiological situation in the Republic of Kazakhstan for 2015»]. – Astana. – 94 s.
18. Schuster R.K. Opisthorchiidosis – a review . *Infect. Disord. Drug Targets*. – 2010. – Vol. 10. – P. 402-415. ISBN: 1871-5265.

19. Schuster R., Gregor B., Heidrich J., Nockler K., Kyule M. Wittstatt U. (2003) A sero-epidemiological survey on the occurrence of opisthorchiid liver flukes in red foxes (*Vulpes vulpes*) in Berlin, Germany . *Parasitol Res.* – Vol. 90. – P. 400-404. DOI: 10.1007/s00436-003-0868-8.
20. Sherrard-Smith E., Stanton D.W.G., Cable J., Orozco-ter-Wengel P., Simpson V.R., Elmeros M., J. van Dijk, Simonnet F., Roos A., Lemarchand C., Poledník L., Heneberg P., Chadwick E.A. (2016) Distribution and molecular phylogeny of biliary trematodes (Opisthorchiidae) infecting native *Lutra lutra* and alien *Neovison vison* across Europe . *Parasitol. Int.* – Vol. 65. – P. 163-170. doi: 10.1016/j.parint.2015.11.007.
21. Sitko J., Bizos J., Sherrard-Smith E., Stanton D.W., Komorová P., Heneberg P. (2016) Integrative taxonomy of European parasitic flatworms of the genus *Metorchis* Looss, 1899 (Trematoda: Opisthorchiidae) . *Parasitol. Int.* – Vol. 65. – P. 258-267. doi: 10.1016/j.parint.2016.01.011.
22. Sidorov E.G. (1983) Prirodnaya ochagovost opistorhoza [Natural foci of opisthorchiasis]. – Alma-Ata: Nauka. – 240 s. ISBN 0031-1847.
23. Skryabin K.I. (1928) Metod polnyih gelmintologicheskikh vskryitiy pozvonochnyih, vklyuchaya cheloveka [Method for complete helminthological dissections of vertebrates, including humans]. – G.: Izd-vo I-go Mosk. gos. un-ta. – S. 43.
24. Sultanov A., Abdybekova A., Abdibaeva A., Shapiyeva Z., Yeshmuratov T., Torgerson P.R. (2014) Epidemiology of fish-borne trematodiasis in Kazakhstan . *Acta Trop.* – Vol. 138. – P. 60-66. doi: 10.1016/j.actatropica.2014.04.030.
25. Yurlova N.I., Yadrenkina E.N., Rastyazhenko N.M., Serbina E.A., Glupov V.V. (2017) Opisthorchiasis in Western Siberia: Epidemiology and distribution in human, fish, snail, and animal populations . *Parasitol. Int.* – Vol. 66(4). – P. 355-364. doi: 10.1016/j.parint.2016.11.017.
26. Zadesenets K.S., Polyakov A.V., Katokhin A.V., Mordvinov V.A., Rubtsov N.B. (2017) Chromosome morphometry in opisthorchiid species (Platyhelminthes, Trematoda) . *Parasitology International.* – Vol. 66. – P. 396-401. doi: 10.1016/j.parint.2016.07.004.