

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ В ДИАГНОСТИКЕ ОПИСТОРХОЗА

А.М. Смагулова¹, м.т.н., с.н.с.

А.Б.¹Бекенова, докторант

А.В.Катохин.², к.б.н.

В.С.¹Киян, PhD, ассоциированный профессор

¹Казахский агротехнический университет им.С.Сейфуллина, пр.Жеңіс,62, г.Нур-Султан, 010011, Казахстан, vskiyan@gmail.com

²Институт цитологии и генетики РАН, РФ г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева 10

Аннотация

В статье приведены результаты исследования трех основных маркерных генов *Internal transcribed spacer 1 (ITS1)*, *Internal transcribed spacer 2 (ITS2)* и *Cytochrome oxidase (COX1)*, которые используются для молекулярно-генетической идентификации и филогенетического анализа основных возбудителей описторхозной инфекции. Показана особенность метода выделения ДНК из метацеркарий и половозрелых форм марит, а также приведены параметры постановки ПЦР анализа для трех пар праймеров. Проведено секвенирование трех маркерных генов двух видов *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*, выделенных на территории Республики Казахстан. Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в международной базе данных *GenBank*. На основе полученных последовательностей были построены филогенетические деревья близкородственных организмов семейства *Opisthorchiidae* и показаны генетические особенности изученных видов.

Ключевые слова: описторхоз, меторхоз, метацеркария, марита, диагностика, маркерный ген, секвенирование, филогенетическое дерево, праймер.

Введение

Описторхоз – это гепатобилиарное заболевание, вызываемое сосальщиками семейства *Opisthorchiidae*. Семейство занимает 8 место из 24 групп или видов, классифицированных как самые опасные паразиты людей и животных [1]. Описторхиды включают 33 рода и делятся на 13 подсемейств [2]. В цикле развития участвуют два промежуточных (моллюски рода *Bithynia* и рыбы сем. *Cyprinidae*) и один дефинитивный хозяин (амфибии, рептилии, птицы, плотоядные млекопитающие, а также человек) [3]. Заражение дефинитивных хозяев происходит при

употреблении в пищу сырой, малосоленой, вяленой, недостаточно термически обработанной рыбы, содержащей метацеркарии возбудителя, а также при несоблюдении норм обеззараживания рыбной продукции [4].

Длительная описторхозная инвазия вызывает иммунные нарушения в организме, способствует формированию желчнокаменных болезней и холангиокарциномы [5]. Паразитируя в печени, желчных протоках, желчном пузыре и поджелудочной железе, наносит значительный вред всему организму в целом. Международным агентством по изучению рака *Opisthorchis viverrini* и *Clonorchis sinensis* классифицированы как канцероген I степени [6].

Согласно разным источникам до 40 миллионов человек в настоящее время инфицированы печеночными сосальщиками и до 600-750 миллионов человек в евразийских странах составляют группу риска. Эти печеночные трематоды вызывают проблемы общественного здравоохранения в Российской Федерации, Украине, Белоруссии и Казахстане [7]. Обь-Иртышский бассейн является очагом заражения описторхоза [8], поэтому описторхоз является широко распространенным на территории РК.

В Казахстане за период с 2002-2009 гг. уровень заболеваемости людей описторхозом колебался в пределах от 17,01 тыс. человек (2002 г.) до

8,5 тыс. человек (2009 г.) на 100 тыс. населения. В период с 2009 по 2014 гг. среди населения в целом было зарегистрировано 6708 случаев заболеваемости хроническим описторхозом. При анализе динамики заболеваемости описторхозом населения РК за 2009-2014 гг. в целом установлено сохранение стабильного уровня заболеваемости в пределах 5,03 - 6,2 тыс. человек на 100 тыс. населения [9]. В 2015 году в республике зарегистрирован рост заболеваемости описторхозом на 4%, показатель при этом составил 5,8 тыс. человек на 100 тыс. населения [10]. В 2016 году этот показатель снизился на 23%, что составило 961 случай на 100 тыс. населения; в 2017 году был зарегистрирован 954 случай (-10,7%) [11]. С января по апрель 2018 года, в сравнении с аналогичным периодом 2017 года, достигнуто снижение заболеваемости описторхозом на 7,22% [12].

В настоящее время существует два основных метода, используемые для диагностики описторхоза у людей и животных-хозяев – паразитологические и иммунологические. Обнаружение яиц в фекалиях при микроскопическом исследовании считается золотым стандартом для диагностики описторхоза. Недостатком копрологической диагностики является то, что сосальщики могут быть легко пропущены при очень небольшом числе яиц при низких уровнях заражения или из-за периодов низкой яйценоскости паразитов. В

это время на первое место в диагностике выходят методы иммунологической диагностики [13]. Однако иммунологические методы менее эффективны для дифференциации возбудителя из-за однородности антигенных белков.

Развитие молекулярно-генетических методов анализа генома позволило использовать молекулярные маркеры при диагностике описторхоза. Существует три области ДНК, которые обычно используются в качестве генетических маркеров в филогенетическом исследовании метазоа: область ядерного кодирования, рибосомальная ядерная ДНК и гены в геномах митохондрий [14]. Наиболее используемыми молекулярными маркерами для филогенетических целей являются рибосомальные ядерные гены. Они сгруппированы в двух областях: большая субъединица рибосомальной ядерной ДНК (*lsrDNA*), которая содержит молекулярные маркеры 28S, 5.8S и полный фрагмент, и малая субъединица рибосомальной ядерной ДНК (*ssrDNA*), которая содержит молекулярные маркеры 18S и полный фрагмент. Рибосомальный ядерный ген 5.8S обычно используется с маркерами *ITS1* и *ITS2*, которые вместе образуют полную область транскрибируемого внутреннего спейсера. Этот регион использовался для изучения границ видов, по меньшей мере, в 19 семьях дигенетических сосальщиков. Ген 5.8S рРНК имеет уровни сохранения генов, аналогичные гену 18S РНК [15].

Внутренний *Internal transcribed spacer 1 (ITS1)* позволил характеризовать дигенетических сосальщиков на разных таксономических уровнях. Большая часть изменений в этой области обусловлена наличием тандемно повторяющихся элементов, расположенных на 5' конце спейсера. Участок *ITS1* рДНК трематод (в том числе представителей семейства *Opisthorchiidae*) более переменный, и его можно использовать для описания внутривидовой изменчивости. Внутренний *Internal transcribed spacer 2 (ITS2)* как правило, считается содержащим меньше переменных сайтов, чем *ITS1*. Он очень изменчив по длине как внутри, так и между семействами и известен своей относительно высокой сохранностью последовательности на уровне видов. Доступность является преимуществом при выборе маркеров *ITS*, поскольку фрагменты близки к консервативным генам. Следовательно, дизайн праймеров для амплификации области становится легким [16].

В научных исследованиях используется не только нуклеотидные последовательности рибосомальных ядерных ДНК, но и митохондриальные гены. Цитохромоксидаза представляет собой сложный ферментативный комплекс оксидных редуктаз, включающая тринадцать различных субъединиц полипептида, три из которых выполняют основные

биологические функции цитохромоксидазы и кодируются тремя митохондриальными генами (*COX1*, *COX2* и *COX3*) [17]. *COX1* является наиболее часто используемым митохондриальным геном в конструировании филогении паразитов рыб. Ген характеризуется высокой вариабельностью и генетической дивергенцией среди видов [18].

В доступной литературе имеется много примеров использования различных маркерных генов для разработки молекулярных методов идентификации возбудителей семейства *Opisthorchiidae*. Так, для описания внутривидового генетического разнообразия *S. sinensis* в основном используют частичные и полные последовательности участков рибосомного кластера (*18S*, *ITS1*, *ITS2*) ядерной ДНК, а также частичную последовательность гена *COX1* митохондриальной ДНК [19]. *Gab-Man Park* и *Tai-Soon Young* в своей работе выявили высокий уровень гомологии анализируемых нуклеотидных последовательностей для образцов *S. sinensis* из Китая и Кореи на основе анализа последовательностей гена *18S*, спейсера *ITS2* рДНК и гена *COX1*. В работе этих авторов, помимо вышеперечисленных маркеров, были использованы нуклеотидные последовательности участка *ITS1* рибосомного кластера. В этот же период были получены нуклеотидные последовательности участка *ITS2* и гена *COX1* для *S. sinensis* из России и Японии.

Проведенный в данном исследовании анализ внутривидового генетического полиморфизма для образцов китайской печеночной двуустки из России, Японии, Китая и Кореи показал отсутствие изменчивости для рибосомного маркера ядерной ДНК и очень низкий уровень изменчивости (0.3%) для митохондриального маркера [20].

Для изучения генетического разнообразия рода *Mitorchis spp. Ellie Sherrard* с соавт. используют маркерные участки рибосомального и митохондриального гена для описания вариабельности по климатическим условиям и географического распространения данного паразита. *Xiodong Zhan* с соавт. исследовали эндемическое распространение *Metorchis orientalis* в Хайняньской области [21]. В данной тематике также работали ряд исследователей с целью полного описания распространения паразитов не только рода *Mitorchis spp.*, но и всего семейства *Opisthorchiidae*, при этом в качестве маркерных генов они использовали, как и рибосомальные ядерные гены, так и митохондриальные.

Маркерные гены используются не только в описанных ситуациях, но и в диагностических целях. *Pauly A.* с соавт. проводили исследование по оценке молекулярно-генетической изменчивости *O. felineus* и *M. bilis* и разработке метода ПЦР для их дифференциации с помощью видоспецифических праймеров.

Данные праймеры позволяли амплифицировать фрагменты митохондриального гена *COX1*, и различали оба вида в соответствии с электрофоретической подвижностью видоспецифических ПЦР-продуктов [22].

Müller B. с соавт. разработали специфические описторхидные праймеры для другого генетического маркера *ITS2* из ядерного рибосомного кластера и продемонстрировали возможность селективной амплификации фрагментов ДНК нескольких видов *Opisthorchiidae*: *O. felineus*, *C. sinensis*, *O. viverrini*, *M. xanthosomus* и *P. truncatum*. Аналогичный

генетический маркер был использован для проведения дифференциальной ПЦР-диагностики *O. felineus* и *M. bilis* в клинических образцах пациентов с диагнозом описторхоз и разработаны видоспецифические праймеры на основе *ITS2*. Имеются данные, когда генетический маркер *ITS2* использовался для разработки анализа ПЦР в реальном времени с помощью зонда *TaqMan* для обнаружения *O. felineus* и *M. bilis* [23].

Целью данной работы является изучить и дать результаты по молекулярным маркерам в диагностике описторхоза.

Материалы и методы исследования

В качестве материала исследования использовались геномные ДНК возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*, выделенные из метацеркарий и марит от животных, отловленных на территории Акмолинской области Республики Казахстан.

Выделение ДНК проводили фенол-хлороформным методом с предварительной инкубацией в экстрагирующем буфере, для наилучшего выхода ДНК. К образцу добавляли 200 мкл экстрагирующего буфера и протеиназы К, смесь гомогенизировали металлическим пестиком. Инкубацию проводили в термоблоке при 65°C в течение

двух часов. После инкубации выделение проводится стандартным фенол-хлороформным методом [1]. В образец добавляли равный объем фенол-хлороформ-изоамилового спирта (25:24:1). ДНК осаждали добавлением 0,4 объема изопропанола (10 мин при -20°C), затем центрифугировали в течение 3 мин при 12 000 об/мин. Полученный осадок ДНК промывали 70% этанолом, высушивали, после чего растворяли в 50 мкл 1% ТЕ буфера.

Для постановки ПЦР анализа были выбраны три пары праймеров с разных маркерных геномов *ITS1*, *ITS2*, *COX1* (таблица 1).

Таблица 1 – последовательности праймеров

№	Наименование маркерного генома	Нуклеотидная последовательность
1	<i>ITS1</i> [24]	<i>ITS1-Fw</i> 5'-GTCGTAACAAGGTTTCCGTA-3'
		<i>ITS1alRv</i> 5'-ACACGAGCCGAGTGATCC-3'

2	<i>ITS2</i> [25]	<i>ITS2exF</i> 5'-GAACATCGACATCTTGAACG-3'
		<i>ITS2exR</i> 5'-GGAACGACCTGAACACCA-3'
3	<i>COX1</i>	<i>OpiOpe2-co1 F5'</i> -TGGGGAGTTGATTTTTTGGATGTT-3'
		<i>COI-uniRv</i> 5'-AGCAATAACAAATCAAGTATCATG-3'

Амплификацию маркерных генов проводили в конечном реакционном объеме 25 мкл, содержащем 10[×]*DreamTaq buffer*, 20 mM *MgCl₂*, 1U *Dream Taq Hot Start DNA Polymerase (Thermo Scientific™)* и 2 mM *dNTP (New England BioLabs Inc.)*, 10 пмоль каждого праймера и 20 нг экстрагированной ДНК из одного образца. ПЦР проводили для праймера *ITS1* при следующих условиях термоциклирования: 95°C в течение 40 с, 56°C в течение 40 с и окончательная элонгация 50 с при 72°C. Для праймера *ITS2* проводили при следующих условиях термоциклирования: 95°C в течение 30 с, 54°C в течение 30 с и окончательная элонгация 40 с при 72°C.

Амплификацию маркерных генов для праймера *COX1* проводили в конечном реакционном объеме 25 мкл, содержащем 10[×]*Dream Taq buffer*, 20 mM *MgCl₂*, 1U *DNA Polymerase* и 0,3 mM *dNTP*, 10 пмоль каждого праймера и 20 нг экстрагированной ДНК из одного образца. ПЦР проводили при следующих условиях термоциклирования: 95°C в течение 25 с, 54°C в течение 30 с

и окончательная элонгация 40 с при 72°C.

Амплифицированные продукты ДНК анализировали на горизонтальном электрофорезе в 1% агарозном геле с использованием 1[×]ТАЕ буферного раствора и *EtBr*. Для определения выхода пар нуклеотидов полученных ампликонов использовали маркер *Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Scientific™)*.

Амплифицированные фрагменты ДНК секвенировали с помощью метода Сэнгера с использованием набора для определения последовательности терминатора *BigDye* в соответствии с техническими характеристиками производителя.

Последовательности праймеров использовали такие же, как и для ПЦР. По завершению секвенирования проводили очистку продуктов реакции ацетатно-спиртовой смесью. Продукты секвенирования изучали на генетическом анализаторе *SeqStudio (Thermo fisher, США)*. Анализ и редактирование хроматограммы проводили с использованием *Sequencing Analysis 5.2, Patch 2 (Applied Biosystems)*.

Результаты исследования и их обсуждение

Объектом исследования являются метацеркарии (выделенные из рыб семейства карповые) и мариты (выделенные от золотистых хомяков и лис)

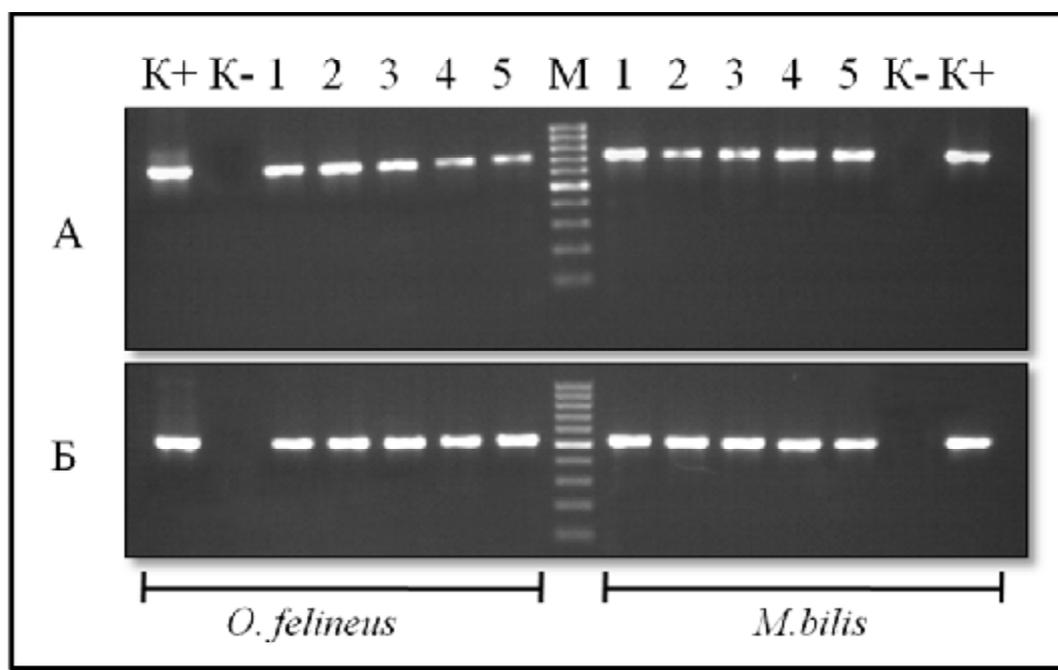
возбудителей описторха и меторха. Выделение ДНК проводили согласно методике фонол-хлороформным методом с предварительной обработкой

образцов экстрагирующим буфером и *Proteinase K*.

Количественный анализ выделенной ДНК проводили на спектрофотометре *Nano Drop 2000* (*Thermo Fisher Scientific*, США). В результате определили, что концентрация выделенной ДНК из индивидуальных метацеркарий была в пределах 6-11 нг/мкл, а концентрация ДНК выделенной из одной половозрелой мариты была в

пределах 28-35 нг/мкл. Показатели чистоты находились в соотношении 260:280 нм.

Аmplификацию рибосомальных ядерных участков *ITS1* и *ITS2* проводили согласно методике указанной в разделе материалы и методы. Для детекции результатов ПЦР анализа и визуализации ампликонов проводили электрофорез в 1% агарозном геле (рисунок 1).



К+ – положительный контроль *O. felineus*; К- – отрицательный контроль; 1 – ДНК из метацеркарии; 2-3 – ДНК из мариты, выделенной от хомяка; 4-5 – ДНК из мариты, выделенной от лисы; М – ДНК маркер (*Gene Ruler 100 bp Plus DNA Ladder*)

Рисунок 1 – Результаты ПЦР анализа с использованием праймеров *ITS1* (А) и *ITS2* (Б)

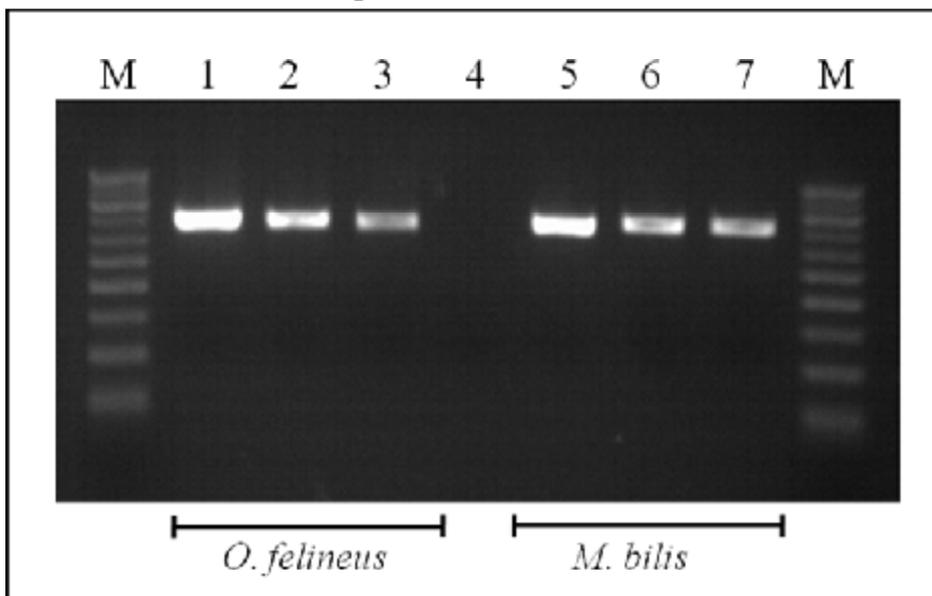
Электрофореграмма ПЦР продуктов показывает, что при использовании праймера *ITS1* (рисунок 1А), полученные ампликоны находятся на уровне 644 пар нуклеотидов (далее п.н.), а при использовании праймера *ITS2*

(рисунок 1Б), длина ампликонов составляет 525 п.н., что согласуется с литературными данными. Праймеры обладают высокой специфичностью со всеми образцами, не наблюдается образование димеров и прочих

неспецифических связываний, что соответствует основным требованиям данной реакции. Специфичность реакции также подтверждается результатами, полученными при использовании положительного и отрицательного контролей.

Для амплификации участка митохондриального генома *COX1* изучаемых возбудителей нами была использована пара

видоспецифических праймеров *OpiOpe2-co1* и *COI-uniRv*. Реакцию проводили с использованием параметров, указанных в разделе материалы и методы. Детекцию результатов ПЦР анализа и визуализации ампликонов проводили путем проведения электрофореза в 1,5% агарозном геле (рисунок 2).



M – ДНК маркер; 1 – ДНК из метацеркарии; 2 – ДНК из мариты, выделенной от хомяка; 3 – ДНК из мариты, выделенной от лисы; K- – отрицательный контроль

Рисунок 2 – Результаты амплификации участка митохондриального генома *COX1*

По результатам электрофореграммы видно, что использование видоспецифических праймеров для амплификации участка гена *COX1* в ПЦР позволяет получать ампликоны молекулярной массы 705 п.н. При этом можно говорить о высокой специфичности данной реакции в связи с отсутствием димеров и результатом отрицательного контроля.

Полученные ампликоны трех маркерных генов (*ITS1*, *ITS2*, *COX1*) использовали для расшифровки нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сэнгеру. Перед процедурой секвенирования проводили очистку ПЦР продуктов с помощью *Exonuclease I*, для устранения остаточных примесей праймеров, *dNTP* и буферов. Полученные результаты

нуклеотидных последовательностей были обработаны с помощью программного обеспечения *CEQ System (CEQ™ 8000 Genetic Analysis System* фирмы *Beckman Coulter*) и идентифицированы путем сравнения с данными

международной базы *GenBank* (www.ncbi.com).

Полученные нуклеотидные последовательности изученных видов были депонированы в базе данных *GenBank*. Подробная информация о депонированных последовательностях представлена в таблице 2.

Таблица 2 – Нуклеотидные последовательности, депонированные в базе данных *GenBank*

№ п/п	Вид возбудителя	Название маркерного гена	Номер в базе данных <i>GenBank</i>
1	<i>O. felineus</i>	<i>ITS1</i>	MG952283
2	<i>O. felineus</i>	<i>ITS2</i>	MG952281
3	<i>O. felineus</i>	<i>COX1</i>	MT325502; MT325503
4	<i>M. bilis</i>	<i>ITS1</i>	MG952284
5	<i>M. bilis</i>	<i>ITS2</i>	MG952282
6	<i>M. bilis</i>	<i>COX1</i>	MT325504; MT325505

На основе депонированных нуклеотидных последовательностей были сконструированы филогенетические деревья с

помощью программного обеспечения *MEGA 6* по маркерным геномам *ITS1* (рисунок 3), *ITS2* (рисунок 4) и *COX1* (рисунок 5).

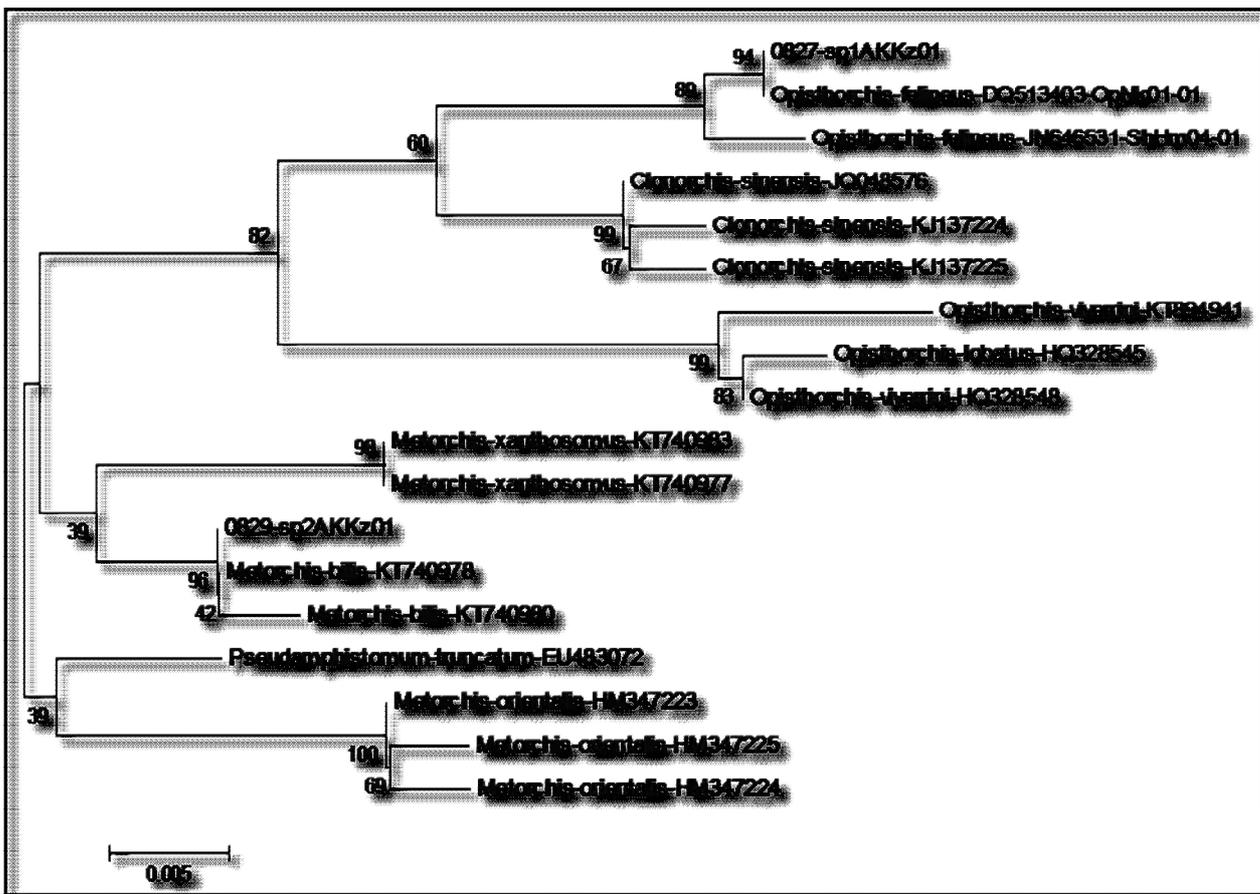


Рисунок 3 – Филогенетический анализ (дерево) с использованием праймера *ITS1*

Как видно из рисунка 3, для конструирования филогенетических деревьев были использованы гомологичные нуклеотидные последовательности, выделенные на территории Европы и Азии, что позволяет в процентном соотношении показать степень родства и наличие мутаций.

При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности ядерного участка генома *ITS1* возбудителя *O. felinus* казахстанского и российского происхождения (DQ513403 и JN646531) гомологичность

составляет 99%, а при сравнении этого же участка генома с азиатскими последовательностями (KT89494, Вьетнам и KJ137224, Китай), гомологичность составляет 94%.

Нуклеотидная последовательность ядерного участка генома *ITS1* возбудителя *M. bilis* в сравнении с европейскими последовательностями (KT740978, Чехия и KT740980, Словакия) была гомологична на 97%, а с азиатскими последовательностями (HM347223 и HM347224, Китай) была гомологична на 94%.

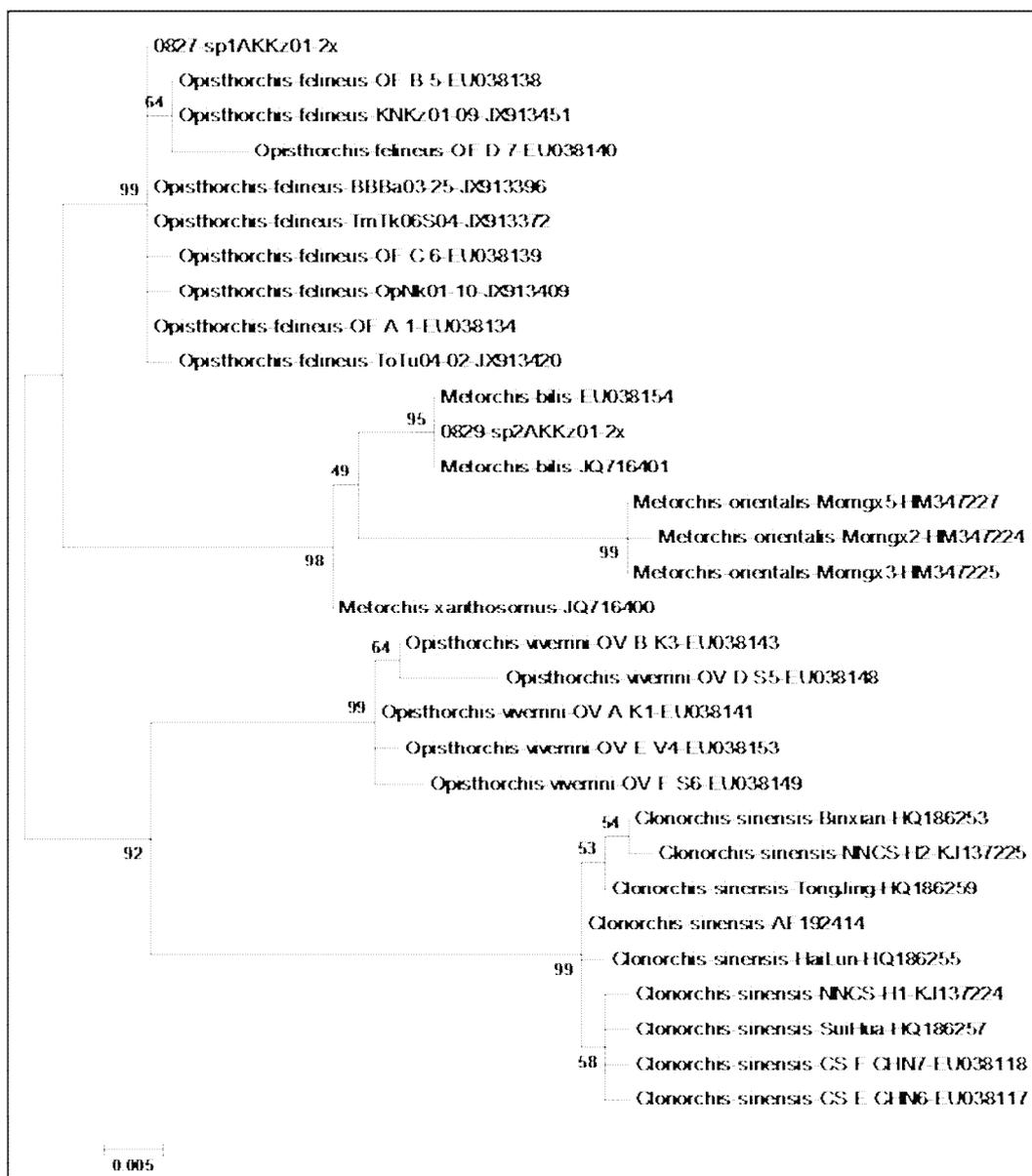


Рисунок 4 - Филогенетический анализ (дерево) с использованием праймера *ITS2*

При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности ядерного участка генома *ITS2* возбудителя *O. felineus* казахстанского и российского происхождения (EU038138 и EU038140) гомологичность составляет 99%, а при сравнении этого же участка генома с азиатскими последовательностями (EU038148, Лаос) и HQ038253, Китай), гомологичность составляет 96% и 93% соответственно.

Нуклеотидная последовательность ядерного участка генома *ITS2* возбудителя *M. bilis* в сравнении с европейскими последовательностями (EU038154, Испания и JQ716401, Германия) была гомологична на 98%, а с азиатской последовательностью (HM347227, Китай) была гомологична на 95%.

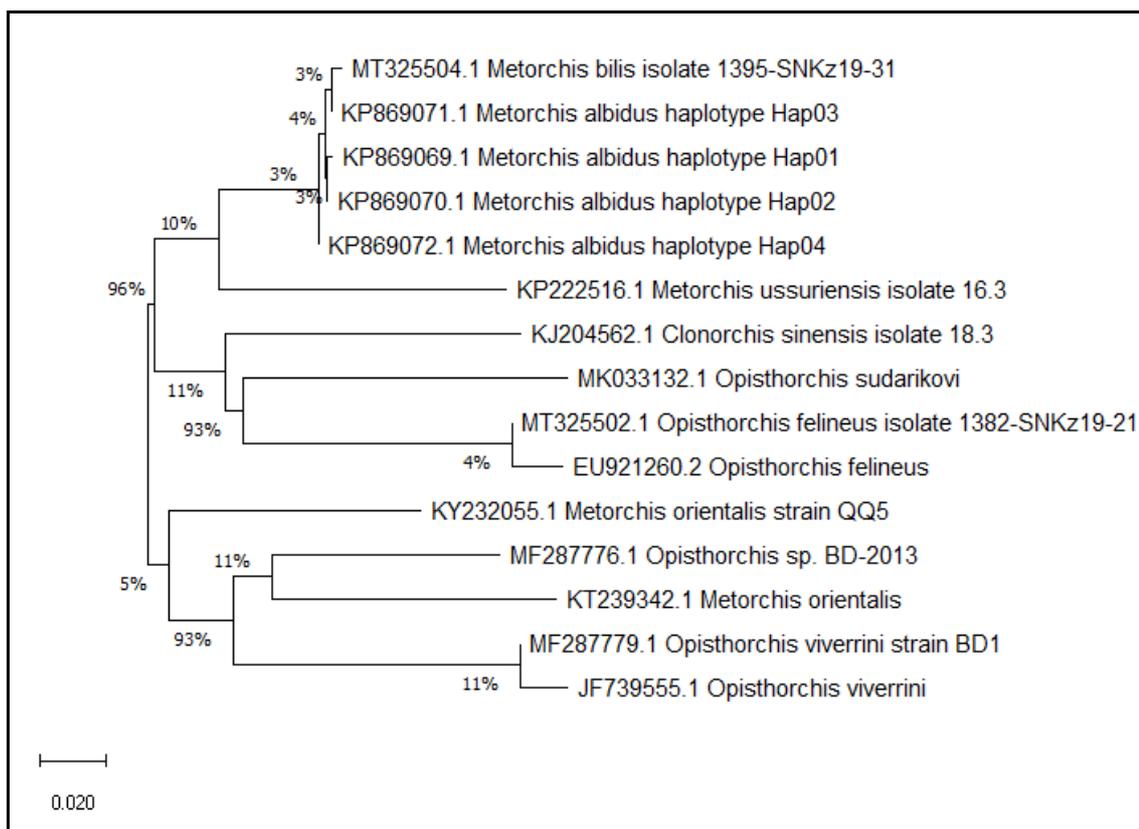


Рисунок 5 - Филогенетический анализ (дерево) с использованием праймера *COX1*

Проведя сравнительный анализ нуклеотидной последовательности маркерного гена *COX1* можно сделать вывод, что по данному участку наблюдается самая сильная мутация у возбудителей *O. felineus* и *M. bilis*. Так например, нуклеотидная последовательность *O. felineus* в сравнении с российской последовательностью EU921260 (Россия) гомологичная на 97%, а с другими представителями данного рода, вне зависимости от страны выделения, составляет от 90% и ниже. То же самое мы можем наблюдать при

Заключение

Для первичной идентификации метацеркарий и марит *O. felineus* и *M. bilis* авторы

анализе нуклеотидной последовательности участка генома *COX1* возбудителя *M. bilis*.

Таким образом, по результатам проведенных исследований, нами были изучены нуклеотидные последовательности возбудителей описторхид *O. felineus* и *M. bilis*, выделенные на территории Акмолинской области. Данные последовательности в дальнейшем будут использованы при разработке видоспецифических праймеров, используемых для конструирования молекулярно-генетических методов диагностики на основе ПЦР.

данной статьи рекомендуют использовать широко применяемые участки трех маркерных генов

ITS1, *ITS2* и *COX1*. Для трех пар праймеров были даны оптимальные параметры постановки ПЦР анализа, с дальнейшей очисткой и проведения секвенирования. По расшифрованным геномам было проведено депонирование нуклеотидных последовательностей в международной базе данных *GenBank*

В дальнейшем по результатам расшифровки нуклеотидных последовательностей, которые не

во всех маркерных геномах дали 100% совпадения, будут разработаны видоспецифические праймеры для выделенных на территории Акмолинской области возбудителей.

Данная работа выполняется при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан в рамках проекта AP05131132 «ПЦР-тест для детекции и дифференциальной диагностики возбудителей описторхоза и меторхоза» на 2018-2020 гг.

Список литературы

1. Kokova D., Verhoeven A., Perina E. A., Ivanov V. V., Knyazeva E. M., Saltykova I. V., Mayboroda O. A. Plasma metabolomics of the time resolved response to *Opisthorchis felinus* infection in an animal model (golden hamster, *Mesocricetus auratus*) // *LOS Neglected Tropical Diseases*. – 2020. - № 14(1). – С. 15.
2. Saijuntha W., Sithithaworn P., Kiatsopit N., Andrews R.H., Petney T.N. Liver Flukes: *Clonorchis* and *Opisthorchis* // In: Toledo R., Fried B. (eds) *Digenetic Trematodes. Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2019. - vol 1154. – P. 139-180
3. Zadesenets K.S., Polyakov A.V., Katokhin A.V., Mordinov V.A., Rubtsov N.V. Chromosome morphometry in opisthorchiid species (*Platyhelminthes*, *Trematoda*) // *Parasitology International*. – 2017. - Volume 66, Issue 4. – P. 396-401.
4. Vale N., Gouveia M.J., Gärtner F. et al. Oxysterols of helminth parasites and pathogenesis of foodborne hepatic trematodiasis caused by *Opisthorchis* and *Fasciola* species // *Parasitology Research*. – 2020. – P.11
5. Байкова О.А., Николаева Н.Н., Грищенко Е.Г., Николаева Л.В. Лечение описторхоза и клонорхоза: современные подходы, проблемные аспекты и перспективы // *The Journal of scientific articles “Health and Education Millennium”*. - 2017. - Vol. 19. No 6. – С.14-25.
6. Sripa B., Seubwai W., Vaeteewoottacharn K., Sawanyawisuth K., Silsirivanit A., Kaewkong W., ... Chamgramol Y. Functional and genetic characterization of three cell lines derived from a single tumor of an *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma patient // *Human Cell*. – 2020. – P. 14
7. Fedorova O. S., Fedotova M. M., Sokolova T. S., Golovach E. A., Kovshirina Y. V., Ageeva T. S., Odermatt P. *Opisthorchis felinus* infection

prevalence in Western Siberia: A review of Russian literature // *ActaTropica*. – 2018. – P. 178

8. 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. – С. 25–31.

9. Бейсенбиева Н.Е. Клинико-эпидемиологическая характеристика хронического описторхоза и новые подходы этиотропной терапии: дис. ...докт.мед.наук / «Медицинский университет Астана» – Астана, – 2016. – 11-14 с.

10. Байекеева К.Т., Садыкова А.М., Сейдулаева Л.Б., Умешова Л.А., Исмаилова Б.С. Повсеместно распространенные гельминтозы // *Вестник КазНМУ*. – 2017. №1. – С. 111-114

11. «Санитарно-эпидемиологическая ситуация в Республике Казахстан за 2018 год» – Астана. Комитет по защите прав потребителей МНЭ РК, РГП на ПХВ «Научно-практический центр санитарноэпидемиологической экспертизы и мониторинга» КЗПП МНЭ РК 2018

12. Шабдарбаева Г.С., Шалменов М.Ш., Токбан С.С., Хусаинов Д.М., Шапиева Ж.Ж., Турганбаева Г.Е., Ибажанова А.С., Балгимбаева А.И., Жантелиева Л.О. Атлас регионализации территории Казахстана по зоонозным гельминтозам (Набор ГИС-карт)//Рекомендации. Издание 2-е переработанное и дополненное. Изд. «PrintMaster». - Алматы, 2018. 59 с.

13. Lovis L., Mak T.K., Phongluxa K., Soukhathammavong P., Sayasone S., Akkhavong K., Odermatt P., Keiser J., Felger I. PCR diagnosis of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchistaichui* infections in a Lao community in an area of endemicity and comparison of diagnostic methods for parasitological field surveys // *J. Clin. Microbiol.* – 2009. - №47. – P. 1517-1523.

14. Avise J.C. Introduction. Molecular markers, natural history and evolution // *Chapman and Hall*. - 1994. – P. 3-15

15. Ризевский С.В., Акимова Л.Н., Курченко В.П. Молекулярно-генетические особенности личинок трематод семейства Schistosomatidae // *Труды БГУ*. – Минск, 2008. – № 3 (1). – 3 с.

16. Luton K., Walker D., Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea) // *Molecular and Biochemical Parasitology*. – 1992. – Vol.56(2). – P 323-327.

17. Subbotin S.A., Waeyenberge L., Moens M. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP // *Nematology*. – 2000. – № 2. – P. 153-164.

18. Kress W. J., Erickson D. L. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol.105(8). – P 2761-2762.

19. Nilsson R.H., Tedersoo L., Abarenkov K., Ryberg M., Kristiansson E. Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences // *Mycology Keys*. – 2012. – P. 37-63.

20. Татонина Ю.В. Генетическое разнообразие патогенной для человека и животных трематоды – китайской печеночной двуустки *Clonorchis sinensis*: автореф. дисс. ... к.б.н. – Владивосток. – 2015. – 45 с.

21. Xiao-Dong Zhan, Chao-Pin Li, Bang-He Yang, Yu-Xia Zhu, Ye Tian, Jing Shen and Jin-Hong Zhao. Investigation on the zoonotic trematode species and their natural infection status in Huainan areas of China // *Nutr Hosp.* – 2017. – Vol. 34(1). – P 175-179.

22. Pauly A., Schuster R., Steuber S. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction // *Parasitol Res.* – 2003. – Vol. 90. – P 409-414.

23. Ogorodova L.M., Petrova I.V., Sazonov A.E., Cherevko N.A., Sakharovskaia Z.V. Genetic diagnostic technique for opisthorchiasis // *Klin Lab Diagn.* – 2009. – Vol. 7. – P. 37-39.

24. Müller B, Schmidt J, Mehlhorn H. Sensitive and species-specific detection of *Clonorchis sinensis* by PCR in infected snails and fishes. *Parasitol Res* 2007;100: 911-914.

25. 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 и паразитарные болезни*, – 2010, – №.2. С. 10-13.

References

1. Kokova D., Verhoeven A., Perina E. A., Ivanov V. V., Knyazeva E. M., Saltykova I. V., Mayboroda O. A. Plasma metabolomics of the time resolved response to *Opisthorchis felinus* infection in an animal model (golden hamster, *Mesocricetus auratus*) // *LOS Neglected Tropical Diseases.* – 2020. - № 14(1). – P. 15.

2. Saijuntha W., Sithithaworn P., Kiatsopit N., Andrews R.H., Petney T.N. Liver Flukes: *Clonorchis* and *Opisthorchis* // In: Toledo R., Fried B. (eds) *Digenetic Trematodes. Advances in Experimental Medicine and Biology.* – 2019. - vol 1154. – P. 139-180

3. Zadesenets K.S., Polyakov A.V., Katokhin A.V., Mordinov V.A., Rubtsov N.V. Chromosome morphometry in opisthorchiid species (Platyhelminthes, Trematoda) // *Parasitology International.* – 2017. – P. 396-401.

4. Vale N., Gouveia M.J., Gärtner F. et al. Oxysterols of helminth parasites and pathogenesis of foodborne hepatic trematodiasis caused by *Opisthorchis* and *Fasciola* species // *Parasitology Research.* – 2020. – P.11

5. Bajkova O.A., Nikolaeva N.N., Grishchenko E.G., Nikolaeva L.V. Lechenie opistorhoza i klonorhoza: sovremennye podhody, problemnye aspekty i perspektivy // *The Journal of scientific articles “Health and Education Millennium”.* - 2017. - Vol. 19. No 6. – P.14-25.

6. Sripa B., Seubwai W., Vaeteewoottacharn K., Sawanyawisuth K., Silsirivanit A., Kaewkong W., ... Chamgramol Y. Functional and genetic

characterization of three cell lines derived from a single tumor of an *Opisthorchis viverrini*-associated cholangiocarcinoma patient // *Human Cell*. – 2020. – P. 14

7. Fedorova O. S., Fedotova M. M., Sokolova T. S., Golovach E. A., Kovshirina Y. V., Ageeva T. S., Odermatt P. *Opisthorchis felinus* infection prevalence in Western Siberia: A review of Russian literature // *Acta Tropica*. – 2018. – P. 178

8. 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. – P. 25–31.

9. Bejsenbieva N.E. Kliniko-epidemiologicheskaya harakteristika hronicheskogo opistorhoza i novye podhody etiotropnoj terapii: dis. ...dokt.med.nauk / «Medicinskij universitet Astana» – Astana. – 2016. – P. 11-14

10. Bajekееva K.T., Sadykova A.M., Sejdulaeva L.B., Umeshova L.A., Ismajlova B.S. Povsemestno rasprostranennye gel'mintozy // *Vestnik KazNMU*. – 2017. №1. – P. 111-114

11. «Sanitarno-epidemiologicheskaya situaciya v Respublike Kazahstan za 2018 god» – Astana. Komitet po zashchite prav potrebitelej MNE RK, RGP na PHV «Nauchno-prakticheskij centr sanitarnoepidemiologicheskoy ekspertizy i monitoringa» KZPP MNE RK 2018

12. Shabdarbaeva G.S., Shalmenov M.SH., Tokban S.S., Husainov D.M., Shapieva Zh.Zh., Turganbaeva G.E., Ibazhanova A.S., Balgimbaeva A.I., Zhanteliyeva L.O. Atlas regionalizacii territorii Kazahstana po zoonoznym gel'mintozam (Nabor GIS-kart)//Rekomendacii. Izdanie 2-e pererabotannoe i dopolnennoe. Izd. «PrintMaster». - Almaty, 2018. – P. 59

13. Lovis L., Mak T.K., Phongluxa K., Soukhathammavong P., Sayasone S., Akkhavong K., Odermatt P., Keiser J., Felger I. PCR diagnosis of *Opisthorchis viverrini* and *Haplorchistaichui* infections in a Lao community in an area of endemicity and comparison of diagnostic methods for parasitological field surveys // *J. Clin. Microbiol*. – 2009. - №47. – P. 1517-1523.

14. Avise J.C. Introduction. Molecular markers, natural history and evolution // Chapman and Hall. - 1994. – P. 3-15

15. Rizevskij S.V., Akimova L.N., Kurchenko V.P. Molekulyarno-geneticheskie osobennosti lichinok trematod semejstva Schistosomatidae // *Trudy BGU*. – Minsk, 2008. – № 3 (1). – P. 3

16. Luton K., Walker D., Blair D. Comparisons of ribosomal internal transcribed spacers from two congeneric species of flukes (Platyhelminthes: Trematoda: Digenea) // *Molecular and Biochemical Parasitology*. – 1992. – Vol.56(2). – P 323-327.

17. Subbotin S.A., Waeyenberge L., Moens M. Identification of cyst forming nematodes of the genus *Heterodera* (Nematoda: Heteroderidae) based on the ribosomal DNA-RFLP // *Nematology*. – 2000. – № 2. – P. 153-164.

18. Kress W. J., Erickson D. L. DNA barcodes: genes, genomics, and bioinformatics // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Vol.105(8). – P 2761-2762.

19. Nilsson R.H., Tedersoo L., Abarenkov K., Ryberg M., Kristiansson E. Five simple guidelines for establishing basic authenticity and reliability of newly generated fungal ITS sequences // *Mycology Keys*. – 2012. – P. 37-63.
20. Tatonova YU.V. Geneticheskoe raznoobrazie patogennoj dlya cheloveka i zhivotnyh trematody – kitajskoj pechenochnoj dvouustki *Clonorchis sinensis*: avtoref. diss. ... k.b.n. – Vladivostok. – 2015. – P 45
21. Xiao-Dong Zhan, Chao-Pin Li1, Bang-He Yang, Yu-Xia Zhu, Ye Tian, Jing Shen and Jin-Hong Zhao. Investigation on the zoonotic trematode species and their natural infection status in Huainan areas of China // *Nutr Hosp*. – 2017. – Vol. 34(1). – P 175-179.
22. Pauly A., Schuster R., Steuber S. Molecular characterization and differentiation of opisthorchiid trematodes of the species *Opisthorchis felinus* (Rivolta, 1884) and *Metorchis bilis* (Braun, 1790) using polymerase chain reaction // *Parasitol Res*. – 2003. – Vol. 90. – P 409-414.
23. Ogorodova L.M., Petrova I.V., Sazonov A.E., Cherevko N.A., Sakharovskaia Z.V. Genetic diagnostic technique for opisthorchiasis // *Klin Lab Diagn*. – 2009. – Vol. 7. – P. 37-39.
24. Müller B, Schmidt J, Mehlhorn H. Sensitive and species-specific detection of *Clonorchis sinensis* by PCR in infected snails and fishes. *Parasitol Res* 2007;100: 911-914.
25. Brusencov I.I., Katohin A.V., Saharovskaya Z.V. , Sazonov A.E., Ogorodova L.M., Fedorova O.S., Kolchanov N.A., Mordvinov V.A. DNK-diagnostika mikst-invazij *Opisthorchis felinus* i *Metorchis bilis* s pomoshch'yu metoda PCR // *Medicinskaya parazitologiya i parazitarnye bolezni*, – 2010, – №.2. С. 10-13.

ОПИСТОРХОЗ ДИАГНОСТИКАСЫНДАҒЫ МОЛЕКУЛАЛЫҚ МАРКЕРЛЕР

А.М. Смагулова.¹, т.ғ.м., а.ғ.қ.

А.Б. Бекенова.¹, докторант

А.В. Катохин.², б.ғ.к.

В.С. Киян.¹, PhD, қауымдастырылған профессор (доцент)

С.Сейфуллин атындағы Қазақ агротехникалық университеті,

Жеңіс даңғылы, 62, Нұр-Сұлтан қаласы

010011, Қазақстан Республикасы, vskiy@yandex.ru

²РФА Цитология және генетика институты,

Ресей Федерациясы, Новосибирск, Академик Лаврентьев даңғылы, 10

Түйін

Мақалада описторхоз инфекциясының негізгі қоздырғыштарын молекулалық-генетикалық идентификация және филогенетикалық анализ жасау үшін қолданылатын негізгі үш маркерлік ген *Internal transcribed spacer 1 (ITS1)*, *Internal transcribed spacer 2 (ITS2)* и *Cytochrome oxidase (COXI)* бойынша зерттеу нәтижелері көрсетіледі. Метацерариялар мен мариталардың

жыныстық жетілген формаларынан ДНҚ алу әдісінің ерекшелігі және үш праймерлер үшін ПТР анализ қоюдың негізгі параметрлері көрсетіледі. Қазақстан Республикасының аумағында бөлініп алынған екі түрдің – *O. felineus* және *M. bilis* – үш маркерлік гендері секвенделді. Алынған нуклеотид тізбектер халықаралық *GenBank* мәліметтер базасына орналастырылды. Алынған нуклеотид тізбегі негізінде *Opisthorchiidae* тұқымдасына жататын тығыз байланысты организмдердің филогенетикалық ағаштары құрастырылды және зерттелінген түрлердің генетикалық ерекшеліктері көрсетілді.

Түйінді сөздер: описторхоз, метархоз, диагностика, метацеркария, марита, маркер гені, секвенирлеу, филогенетикалық ағаш, праймер

MOLECULAR MARKERS IN THE DIAGNOSTICS OF OPISTORCHOSIS

*A.M.Smagulova*¹, *Master of Engineering, Senior Researcher*

*A.B. Bekenova*¹, *doctoral student*

*A.V. Katokhin*², *candidate of biological sciences*

*V.S. Kiyani*¹, *PhD, associate professor*

¹*S.Seifullin Kazakh Agrotechnical University, Zhenis avenue, 62
010011, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan, vskiyani@gmail.com*

²*Institute of Cytology and Genetics RAS, Russian Federation, Novosibirsk
Academician Lavrentiev Avenue 10*

Summary

The authors of this article present the results of a study on the main three marker genes *Internal transcribed spacer 1 (ITS1)*, *Internal transcribed spacer 2 (ITS2)* и *Cytochrome oxidase (COX1)* used in molecular genetic studies and the creation of diagnostic PCR tests. The peculiarity of the method of DNA extraction from metacercariae and sexually mature forms of maritas is shown. A careful selection of primers was carried out and the main parameters of PCR formulation were worked out. The nucleotide sequences of the *O. felineus* and *M. bilis* pathogens obtained by sequencing were deposited in the international *GenBank* database. Based on the obtained nucleotide sequences, phylogenetic trees of closely related organisms of the *Opisthorchiidae* family were constructed and genetic characteristics of the studied species isolated on the territory of the Republic of Kazakhstan were shown.

Key words: opisthorchiasis, metrorchosis, diagnostics, metatserkaria, marita, marker gene, sequencing, phylogenetic tree, primer