

**ФИЗИОЛОГО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ МЕТАЦЕРКАРИЙ
Opisthorchis felineus и *Rhipidocotyle campanula***

О.Т. РУСИНЕК¹

доктор биологических наук

Ю.Л. КОНДРАТИСЛОВ²

соискатель

Р.В. РУДОВ²

аспирант

¹ Байкальский музей СО РАН,

664520, Иркутск, п. Листвянка, ул. Академическая, д. 1, e-mail: bm@irk.ru

² Иркутская межобластная ветеринарная лаборатория

Приведены результаты изучения совместной инвазии карповых рыб метацеркариями *Opisthorchis felineus* и *Rhipidocotyle campanula*. Метод переваривания в искусственном желудочном соке можно рекомендовать для использования при дифференциальной диагностике метацеркарий *O. felineus* и *R. campanula*.

Ключевые слова: метацеркария, *Opisthorchis felineus*, *Rhipidocotyle campanula*, дифференциальная диагностика.

Метацеркарии *Opisthorchis felineus* и *Rhipidocotyle campanula* по морфологическим признакам имеют определенное сходство. Размер цисты метацеркарии *O. felineus* – 0,17 x 0,21–0,25 x 0,33 мм, *R. campanula* – 0,27–0,51 x 0,27–0,37 мм [10].

Характерные отличительные морфологические признаки этих трематод (форма цисты, ротовой присоски и выделительного пузыря) можно использовать только при микроскопическом исследовании метацеркарий. Метацеркарии *O. felineus* отличаются округлой формой цисты и ротовой присоски; выделительный пузырь в проходящем свете имеет вид большого темного округлого пятна. Для метацеркарий *R. campanula* характерна циста эллипсовидной формы; ротовая присоска снабжена мышечными сосочками, выдающимися по бокам головного конца в виде «ушек» или «веера»; выделительный пузырь сравнительно длинный, темный, S-образной формы. Как известно, некоторые морфологические особенности метацеркарий (например, строение ротовой присоски) можно рассмотреть только после выделения личинки из цисты.

Существующее морфологическое сходство этих двух видов может вызывать определенные трудности при диагностике по методу компрессионной микроскопии в том случае, если оба вида заражают одного хозяина, встречаются в одном водоеме или в одном рыбопромысловом районе. Поэтому возникает необходимость в дифференциальной диагностике метацеркарий *O. felineus* от метацеркарий *R. campanula*. У исследователей, не имеющих достаточного практического опыта, дифференциация личинок описторхисов от личинок рипидокотиле вызывает затруднения и в некоторых случаях может влиять на точность результатов. В этом случае недостоверность данных паразитологического исследования карповых рыб отряда *Cypriniformes*, чаще всего, может быть выражена ошибочным определением метацеркарий рипидокотиле как личинок описторхиса. Следствием такой диагностической

ошибки может быть постановка диагноза описторхоза рыб, а не рипидокотилеза, либо также возможно завышение показателей зараженности рыб метацеркариями *O. felineus*.

Цель исследования – изучение очага описторхоза в Иркутской области. Необходимо было изучить зараженность карповых рыб *O. felineus* и *R.campanula* из реки Бирюсы и провести анализ физиолого-биохимических особенностей выживания метацеркарий *O. felineus* и гибели метацеркарий *R. campanula* в искусственном желудочном соке.

Материалы и методы

Река Бирюса, протекающая по территории Тайшетского района, Иркутской области неблагополучна по описторхозу рыб [5–7]. Согласно требований нормативной документации (МУ 3.2.1756-03) «Эпидемиологический надзор за паразитарными болезнями», мониторинг гельминтозоонозов рыб, и в частности, описторхоза, должен проводиться не реже одного раза в три года: карповую рыбу, обитающую в неблагополучном естественном рыбопромысловом водоеме, необходимо исследовать на зараженность личинками *O. felineus* [9].

При исследовании мышечной ткани рыб по методу компрессионной микроскопии за 2000–2008 гг. были получены результаты, сведенные в таблицу 1.

1. Результаты многолетних исследований зараженности мышечной ткани рыб методом компрессионной микроскопии (р. Бирюса, Тайшетский район, Иркутская область)

Год исслед.	Место вылова рыбы	Вид рыбы, экз.	<i>O. felineus</i>		<i>R. campanula</i>	
			ЭИ, %	ИИ, экз.	ЭИ, %	ИИ, экз.
2000	п. Бирюсинск	Елец, 80	2,5	Единич.	92,0	4–24
2003	п. Бирюсинск	Елец, 50	0	0	90,0	3–16
2007	с. Н.Заимка	Елец, 35	8,6	1–8	31,4	2–7
	д.Тракт Ужет	Елец, 32	3,1	Единич.	25,0	2–8
	Устье р.Топорок	Елец, 49	6,1	1–3	45,0	2–34
2008	Борисовская старица	Елец, 29	10,3	2–3	31,0	2–5
		Плотва, 21	0	0	14,2	2–3
	с. Конторка	Елец, 6	16,6	5	33,3	4–6
		Плотва, 242	0,4	5	32,2	1–21
	п. Новотремино	Елец, 55	5,4	1–2	60,0	36–105
	д. Троицк	Плотва, 20	0	0	5,0	3

В мышцах карповых рыб, обитающих в р. Бирюса, кроме метацеркарий *O. felineus*, отмечены и метацеркарии *R. campanula*, которых по сравнению с личинками описторхисов регистрировали с более высокой экстенсивностью и интенсивностью инвазии.

В 2008 г. кроме метода компрессионной микроскопии, использовали метод переваривания мышечной ткани рыб в искусственном желудочном соке [3, 4]. Этот метод позволяет извлечь до 98 % метацеркарий [1]. Биохимические исследования проводили согласно методическим указаниям МУК 3.2.988–00 «Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их переработки» (2001) [8].

Результаты и обсуждение

При микроскопии осадка, полученного по методу переваривания мышечной ткани рыб в искусственном желудочном соке, обнаруживали или только метацеркарий *O. felineus*, или личинки гельминтов отсутствовали. Метацеркарии *R. campanula* не были отмечены после выдерживания мышц в желудочном соке. Подобные результаты неизменно повторялись при неоднократных биохимических исследованиях мышечной ткани рыб.

Наличие в осадке, полученном при исследовании рыбы на описторхоз по методу переваривания мышц в искусственном желудочном соке, метацеркарий *O. felineus*, было подтверждено биологической пробой, проведенной по методике МУК 3.2.988-00 [8]. В качестве подопытных животных использовали золотистых хомяков, которым вводили через рот личинки описторхисов, полученные в результате переваривания мышц рыб в искусственном желудочном соке. Через 21 сут после заражения при копрологическом исследовании фекалий подопытных животных были обнаружены яйца *O. felineus*. При вскрытии золотистых хомяков в желчных протоках печени были обнаружены половозрелые *O. felineus*.

Полученные результаты вызвали сомнения по поводу отсутствия в осадке, полученном при исследовании рыбы на зараженность трематодами по методу переваривания мышц в искусственном желудочном соке, личинок рипидокотиле. При этом, согласно результатам паразитологических исследований мышц по методу компрессионной микроскопии, карповые рыбы в р. Бирюсе значительно инвазированы метацеркариями *R. campanula* (табл. 2).

2. Показатели экстенсивности и интенсивности заражения карповых рыб метацеркариями *O. felineus* и *R. campanula* (сводные данные за 2000, 2003, 2007, 2008 гг.)

Вид рыбы	<i>O. felineus</i>		<i>la</i>	
	ЭИ, % min-max	ИИ, экз. min-max	ЭИ, % min-max	ИИ, экз. min-max
Елец	2,5-16,6	1-8	25,0-92,0	2-105
Плотва	0,4	5	5,0-14,2	2-3

Для объяснения этой ситуации обратились к данным по физиологии пищеварения второго промежуточного и окончательного хозяев *O. felineus* и *R. campanula*. Для нас было важно сопоставить искусственные условия *in vitro* при исследовании по методу переваривания мышечных тканей рыб в искусственном желудочном соке (в указанные условия помещали фарш из мышечной ткани исследуемой карповой рыбы), с естественными условиями среды в желудках дефинитивных хозяев, в жизненном цикле трематод *O. felineus* и *R. campanula* (табл. 3).

3. Условия среды в желудках человека, плотоядных животных, хищных рыб и искусственно созданные условия при исследовании рыбы на описторхоз по методу переваривания в искусственном желудочном соке

Фактор среды	Показатель среды в желудке			Показатель среды в искусственном желудочном соке
	человека	плотоядных животных	хищной рыбы	
рН	1,5-1,8	1,5-2,5	3,3-4,0	1,5
НСI %	0,3-0,5	0,4-0,5	1,5-3	0,4
Фермент	Пепсин	Пепсин	Пепсин	Пепсин
Температура	36,6	38,0-40,0	Температура окружающей среды	36-37

Для трематоды *O. felineus* основными дефинитивными хозяевами являются человек и плотоядные животные, для *R. campanula* – пресноводные хищные рыбы (щука, окунь, ерш, судак).

Известно, что соляная кислота способствует набуханию пищи, растворяет кости, кальцинированные кожные образования – чешую, жучки, панцирь моллюсков и хитиновые образования других беспозвоночных, а также участвует в регуляции процесса эвакуации желудочного содержимого в кишечник.

В результате сравнительного анализа условий среды в желудках дефинитивных хозяев *O. felineus* и *R. campanula*, а также искусственно созданных условий *in vitro*, при исследовании рыбы по методу переваривания мышц, были получены следующие данные:

- естественные показатели среды в желудках дефинитивных хозяев трематоды *O. felineus* и показатели искусственного желудочного сока в условиях *in vitro* очень близки между собой;

- естественные показатели среды в желудках дефинитивных хозяев трематоды *R. campanula* и искусственного желудочного сока в условиях *in vitro*, существенно отличаются по значениям pH: в среднем, выше на 1,8 и температуры, в среднем, ниже на 12 °С (если учесть что наиболее высокая температура воды в естественных рыбопромысловых водоемах средней полосы России и Сибири в летний период составляет 20–25 °С).

У животных основное пищеварение и всасывание пищевых веществ происходит в кишечнике. В желудке осуществляется частичное переваривание белков, которое завершается в кишечнике. Важно понимать, что пищеварение в желудке – это сложный процесс, который кроме адаптационных механизмов, регулируется составом пищи и пищеварительными соками. Выработка HCl также определяется качеством пищи [11].

В желудочных железах костистых рыб выявлен только один тип секреторных клеток, которые выделяют пепсин и соляную кислоту [12].

Гидролиз белков при участии пепсина относится к внеклеточному дистантному (или полостному) типу пищеварения [12]. Гидролиз белков пепсином осуществляется при pH 1,5–2,5 и температуре 40–50 °С [13]. Эти условия очень близки к таковым среды в желудках дефинитивных хозяев *O. felineus*, а также к условиям среды, созданным *in vitro*, по методу переваривания мышц в искусственном желудочном соке и существенно отличаются от условий среды в желудках дефинитивных хозяев *R. campanula*.

Соединительно-тканная капсула метацеркарий *O. felineus* сравнительно тонкая. Она имеет типичное строение и состоит из наружного и внутреннего слоев [1]. Учитывая то, что ткани метацеркарий описторхиса и рипидокотиле, в основном, состоят из белка, можно предположить, что, попав в искусственно созданные условия среды *in vitro*, (при исследовании рыбы по методу переваривания в искусственном желудочном соке), которые близки к условиям в желудках дефинитивных хозяев *O. felineus* и оптимальны для гидролиза белка пепсином, метацеркарии рипидокотиле не выдерживают воздействия таких условий искусственной среды и гидролизуются, а у метацеркарий описторхиса гидролизуются только оболочки цист, сами метацеркарии остаются неповрежденными и сохраняют свою структуру, жизнеспособность и инвазионность.

Различную устойчивость метацеркарий *O. felineus* и *R. campanula* к условиям среды, близкой к оптимальным для гидролиза белка пепсином, вероятно можно объяснить приспособительными особенностями этих гельминтов.

Циклы развития *O. felineus* и *R. campanula* относятся к триксенным [2]. Только у первого паразита окончательный хозяин – плотоядные млекопитающие и человек, а у второго – хищные рыбы.

Биологический цикл развития *O. felineus* характеризуется тем, что для дальнейшего развития паразита до половозрелой стадии необходимо, чтобы второй промежуточный хозяин (карповая рыба), в мышечной ткани которого

локализуется метацеркария, попал в пищеварительный тракт дефинитивного хозяина - плотоядного животного или человека. В желудках указанных дефинитивных хозяев среда близка к оптимальной для гидролиза белка пепсином. К таким условиям приспособлена метацеркария описторхиса, к ним она устойчива и сохраняет свою структуру и жизнеспособность. В желудке дефинитивного хозяина метацеркария освобождается от цисты и через желчные протоки проникает в желчный пузырь печени, где развивается до половозрелой стадии (при попадании в органы пищеварения хищных рыб описторхис погибает).

Биологический цикл *R. campanula* характеризуется тем, что для дальнейшего развития паразита до половозрелой стадии необходимо, чтобы промежуточный хозяин (карповая рыба), в мышечной ткани которого локализуется метацеркария, попал в пищеварительный тракт дефинитивного хозяина – хищной пресноводной рыбы (щука, окунь, ерш, судак). В желудке хищных рыб среда отличается значительной реакционностью и сравнительно низкой температурой. Метацеркария репидокотиле в желудке окончательного хозяина под воздействием пепсина и соляной кислоты теряет оболочку цисты, мигрирует в кишечник и заканчивает там свое развитие (при попадании в органы пищеварения плотоядных животных и человека репидокотиле погибает в несвойственной для него среде обитания).

На основании вышеизложенного можно сделать следующие заключения:

- метацеркарии *R. campanula* не выдерживают условий, созданных *in vitro*, при исследовании карповой рыбы на *O. felineus* по методу переваривания в искусственном желудочном соке; в этих условиях они полностью гидролизуются;

- метацеркарии *O. felineus* сохраняются в условиях *in vitro* при исследовании карповой рыбы на описторхоз по методу переваривания мышц в искусственном желудочном соке. В этой среде метацеркарии описторхиса освобождаются от цист, сохраняют свою структуру и жизнеспособность в физрастворе в течение 10–24 ч при комнатной температуре и могут служить материалом для заражения лабораторных животных с целью постановки биологической пробы;

- метод переваривания в искусственном желудочном соке можно рекомендовать для использования при дифференциальной диагностике метацеркарий *O. felineus* и *R. campanula* (возможно и метацеркарий других трематод, паразитирующих в мышечной ткани карповых рыб, в биологических циклах развития которых дефинитивными хозяевами являются хищные рыбы, а не млекопитающие животные и человек).

Работа выполнена при поддержке программы СО РАН «Геномика, протеомика, биоинформатика», госконтракта Роснауки № 02.512.11.2332 и гранта РФФИ 09-04-12209-офи_м.

Авторы выражают свою благодарность сотрудникам ветеринарной службы ОГУ Тайшетская СББЖ Д.В. Демину и И.В. Пустыньскому и Тайшетскому межрайонному отделу контроля, надзора и рыбоохраны Ангаро-Байкальского территориального управления Федерального агентства по рыболовству за оказание практической помощи в сборе материала для исследований и главному государственному инспектору В.И. Бахарь и госинспектору Н.Н. Сапелкиной.

Литература

1. Беэр С.А. Биология возбудителя описторхоза. – М: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 336 с.

2. Галактионов К.В., Добровольский А.А. Происхождение и эволюция жизненных циклов трематод. – Санкт-Петербург: Наука, 1998. – 404 с.

3. Глазков Г.А. К методике выделения метацеркарий сибирской двуустки из мышечной ткани пораженной рыбы // Проблема описторхоза в Западной Сибири. – Л., 1977. – С. 53–54.
4. Глазков Г.А. Выделение метацеркарий некоторых трематод из пораженной ткани рыб методом переваривания в искусственном желудочном соке // Болезни и паразиты рыб Ледовитоморской провинции (в пределах СССР). – Томск, 1979. – С. 72–82.
5. Клебановский В.А., Журина Т.А., Житницкая Э.А. и др. Новые данные об ареале описторхоза в Центральной Сибири // Мед. паразитол. и паразит. бол. – 1984. – № 3. – С. 7–11.
6. Колокольцев М.М., Казакова А.А., Житницкая Э.А. Описторхоз в Тайшетском районе Иркутской области // Гигиена и здоровье человека. – Иркутск, 1982. – С. 48–49.
7. Колокольцев М.М., Афраков В.Ф., Колокольцева И.А. Описторхоз у домашних кошек Тайшетского района Иркутской области // Мед. паразитол. и паразит. бол. – 1984. – № 3. – С. 82.
8. Методы санитарно-паразитологической экспертизы рыбы, моллюсков, ракообразных, земноводных, пресмыкающихся и продуктов их переработки (МУК 3.2.988–00). – М.: Минздрав России, 2001. – 69 с.
9. Методические указания. МУ 3.2.1756-03 «Эпидемиологический надзор за паразитарными болезнями. – М., 2005. – 83 с.
10. Определитель паразитов пресноводных рыб фауны СССР. Паразитические многоклеточные. – Л.: Наука, 1987. – Т. 2, Ч. 2. – 583 с.
11. Сорвачев К.Ф. Основы биохимии питания рыб. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. – 247 с.
12. Уголев А.М., Кузьмина В.В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. – Санкт-Петербург: Гидрометеиздат, 1993. – 238 с.
13. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии. – М.: Высшая школа, 1969. – 595 с.

**Physiological-biochemical bases of differential identification of metacercaria
Opisthorchis felineus and *Rhipidocotyle campanula***

O.T. Rusinek, Yu.L. Kondratistov, R.V. Rudov

The results of studying of combined infection of cyprinid fish by metacercaria of *Opisthorchis felineus* and *Rhipidocotyle campanula* are given. The method of digestion in artificial gastric juice can be recommended for use at differential diagnostics of metacercaria *O. felineus* and *R. campanula*.

Keywords: metacercaria, *Opisthorchis felineus*, *Rhipidocotyle campanula*, differential diagnostics.