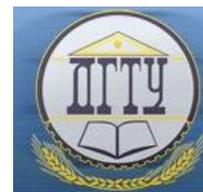


ГУМАНИТАРНЫЕ НАУКИ



УДК 577.29

Биология, распространение и молекулярно-генетические аспекты исследования личинок *eustrongylides sp*

А.Ш. Алимova^{1,2}, Е.В. Стрюкова¹

¹Донской государственный технический университет (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация)

²Азово-Черноморский филиал ФГБНУ «ВНИРО» (АзНИИРХ) (г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация)

Аннотация. Представлен комплексный анализ биологии, экологии и молекулярно-генетических методов изучения личинок *Eustrongylides sp*. Актуальность данного исследования обусловлена сложной эпизоотической ситуацией с массовыми и карантинными инвазионными болезнями рыб, в том числе с эустронгилидозом. Особое внимание уделено морфологическим и физиологическим характеристикам паразита. Проанализированы данные литературных источников по мониторингу инвазивности промежуточных хозяев. Рассмотрены современные достижения в области молекулярной биологии, позволяющие актуализировать видовой состав рода *Eustrongylides*. Определены перспективы для дальнейших молекулярно-генетических исследований, необходимых для понимания актуального видового состава паразитофауны водоемов Ростовской области.

Ключевые слова: *Eustrongylides*, эустронгилидоз, мониторинг, паразит, молекулярно-генетические маркеры, ДНК-штрихкодирование, митохондриальная ДНК

Review of Biology, Distribution and Molecular Genetic Aspects in the Study of *Eustrongylides sp*. Larvae

Aleksandra Sh. Alimova^{1,2}, Elena V. Stryukova¹

¹ Don State Technical University (Rostov-on-Don, Russian Federation)

² Azov-Black Sea Branch of FGBNU VNIRO ("AzNIIRKH") (Rostov-on-Don, Russian Federation)

Abstract. The article presents a comprehensive analysis of the biology, ecology, and molecular genetic methods in the study of *Eustrongylides sp*. larvae. The relevance of this research is determined by the complex epizootic situation concerning mass and quarantine invasive fish diseases, including eustrongyloidosis. Special attention is given to the examination of morphological and physiological characteristics of the parasite, as well as its geographical distribution in the Azov-Black Sea basin. Literature data on the monitoring of the invasiveness of intermediate hosts are summarized. Modern achievements in the field of molecular biology are considered, allowing for the updating of the species composition of the *Eustrongylides* genus. During the study, prospects for further research were identified, necessary for understanding the current state of the parasite fauna in water bodies of the Rostov region.

Keywords: *Eustrongylides*, eustrongyloidosis, monitoring, parasite, molecular genetic markers, DNA-barcoding, mitochondrial DNA

Введение. Одними из самых распространенных паразитарных заболеваний на сегодняшний день являются гельминтозы — инвазии людей и животных различными видами паразитических червей. Согласно официальной статистике, на территории Российской Федерации зарегистрировано более 70 видов гельминтов, вызывающих заболевания у 1,5 миллиона человек ежегодно. Чаще всего заражение человека происходит через пищевые продукты, не прошедшие качественную ветеринарно-санитарную экспертизу или правильную термическую обработку. Пятая часть всех заболеваний, вызванных гельминтами, возникает при участии паразитов пресноводных и морских видов рыб, а также водных животных.

К неблагоприятным по количеству выявленных инвазионных заболеваний рыб относится и Ростовская область, что обусловлено, в первую очередь, благоприятным для развития паразитов температурным режимом, а также превалированием коммерческой выгоды предприятий над проблемами реального качества заготавливаемой рыбной продукции. В Ростовской области на протяжении многих лет существует сложная эпизоотическая ситуация по массовым и карантинным инвазионным болезням рыб — диплостомозу, ботрицефалезу, дифиллоботриозу, описторхозу, анизакидозу, а также эустронгилидозу.

Eustrongylides sp., согласно нормативным документам Роспотребнадзора (СанПиН 2.3.2.1078-01), не относятся к гельминтам, являющимся опасными для здоровья человека, однако единичные случаи заражения, зафиксированные в литературных источниках, подтверждают вероятность инвазии [1]. Кроме того, паразитирование *Eustrongylides sp.* в мышечных тканях и брюшной стенке в значительной степени влияет на товарный вид потребляемой рыбы.

Актуализация видового состава эустронгилид и мониторинг зараженности в Азово-Черноморском бассейне систематически не проводятся, однако подобные уточнения и идентификация крайне необходимы для понимания современного состояния паразитофауны и общей эпидемиологической обстановки в водоемах Ростовской области. Молекулярно-генетические методы являются наиболее предпочтительным инструментом в таком исследовании, поскольку их точность позволяет идентифицировать принадлежность организма вплоть до видового таксона.

Целью настоящей работы является описание биологии, особенностей развития и эпизоотологии *Eustrongylides sp.*, а также анализ современных молекулярно-генетических методов, позволяющих качественно идентифицировать данных гельминтов.

Основная часть. Паразитические круглые черви (нематоды) рода *Eustrongylides* относятся к семейству Dictophymatidae. Класс: Chromadorea. Семейство: Dictophymatidae. Род: *Eustrongylides*. Вид: *Eustrongylides excisus* (Jägerskiöld, 1909), *Eustrongylides tubifex* (Nitzsch & Rudolphi, 1819), *Eustrongylides mergorum* (Rudolphi, 1809).

Изначально, согласно Jägerskiöld, новый род, названный *Eustrongylides*, включал в себя семь видов нематод: *E. tubifex*, *E. elegans*, *E. papillosus*, *E. africanus*, *E. excisus*, *E. ignotus*, *E. Perpapillatus*. Однако в современный период благодаря возможностям молекулярной таксономии, основанной на методах молекулярно-генетических исследований, установлено, что базовыми для рода считаются только три вида: *E. tubifex*, *E. excisus* и *E. ignotus*. Остальные являются субпопуляциями вышеперечисленных групп, развивающимися и функционирующими в определенных биотопах.

Личинки нематод рода *Eustrongylides* имеют следующие анатомо-морфологические особенности. Тело паразита расширяется к середине и сужается к концам [2]. Головной конец не вздут, на кутикуле отсутствуют шипы, ее поперечный контур становится более заметным ближе к концам. Ротовая полость окружена 12–18 ротовыми сосочками (папиллами), обычно расположенными рядами, по шесть в каждом (два латеральных и четыре субмедиальных) (рис. 1).

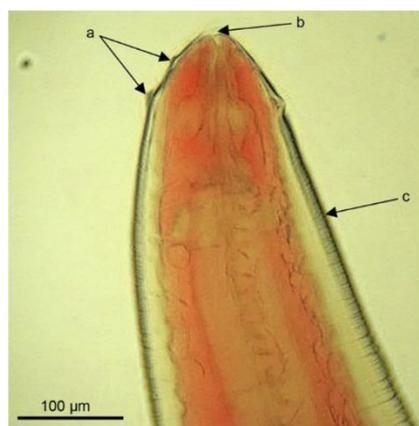


Рис. 1. Головной конец личинок *Eustrongylides excisus*: а) два ряда папилл вокруг ротового отверстия; б) ротовое отверстие; с) исчерченность кутикулы [2]

Пищевод широкий, сильнее всего развивается в задней части. Копулятивная сумка самца мускулистая, толстостенная, без реберных образований. Спикула длинная, игольчатая. Хвостовой конец тела самки тупой, без четко выраженного хвоста. Вульва прилегает к терминально расположенному анусу. Характерен половой диморфизм: узкоконечные личинки развиваются в самцов, ширококонечные — в самок.

Паразитарное питание происходит путем осмоса, личинки способны получать кислород из тканей хозяина. Отмечается также, что при повышении температуры необходимость в кислороде возрастает, а потеря гликогена увеличивается [3]. Обнаруженный у личинок гемоглобин существенно отличается по биохимическим характеристикам от такового у хозяина, так как обладает способностью более эффективной фиксации кислорода даже при небольшом количестве.

У рыб Азово-Черноморского бассейна наиболее часто встречающимся представителем рода *Eustrongylides* является *E. excisus*. Однако, согласно сообщениям ихтиопатологов Ростовской области, в реке Дон и

впадающих в него водоемах также присутствуют еще два вида личинок гельминта — *E. tubifex* и *E. mergorum*. Данная информация подтверждается и литературными источниками [4].

Род *Eustrongylides* является весьма распространенным, охватывая территории Евразии, Северного Востока, Тайваня, Индии и Австралии. Зафиксировано, что паразит гораздо чаще встречается в умеренно-континентальной, тропической и субтропической климатических зонах [5]. Формирует эпизоотические очаги преимущественно в пресных и опресненных водах, намного реже — в соленых водах и эстуариях.

Заражение фиксируется на протяжении всего года, однако пик встречаемости выпадает на повышение температурного режима водоемов (с конца мая по август) [6]. В местах, где не проводятся расчистка и углубление русел водоемов, зараженность рыб возрастает. Вода в обмелевших водотоках прогревается значительно быстрее, что способствует интенсивному развитию бентосной фауны, которая является первопричиной инвазии личинками.

Личинок регистрируют, как правило, у пресноводных, полупроходных и солоноватоводных рыб следующих семейств: окуневые, щуковые, сомовые, бычковые, карповые, реже — осетровые (стерляди) [7].

Эустронгилиды — биогельминты, имеющие сложный жизненный цикл. Развитие личинки нематод происходит в водной среде и включает в себя широкий круг промежуточных, случайных и окончательных хозяев. Личинки и яйца гельминта попадают в водную среду вместе с испражнениями, отрыжкой или при гибели окончательного хозяина — рыбоядных птиц семейства Ciconiiformes. У *E. excisus* чаще упоминаются бакланы, пеликаны и чайки. Для *E. mergorum* более характерны кряквы, каравайки, гуси, гагары.

Первым промежуточным хозяином в цикле являются водные малощетинковые черви (олигохеты) семейств Tubificidae и Lumbriculidae, а также *Limnodrilus*. Личинки под действием желудочного сока выходят из яйца и перемещаются в просвет желудочно-кишечного тракта. Достигнув первой стадии, проникают в брюшной кровеносный сосуд олигохеты и с током крови переносятся в головной конец, где дважды линяют. Развитие 1–2 стадий в организме олигохет при благоприятных условиях занимает 82–85 дней. Бентосоядные рыбы становятся вторым промежуточным хозяином гельминта. Также известны случаи заражения и хищных рыб, питающихся мирными видами (бычками, например) [8]. У некоторых экземпляров рыб наблюдается смешанная инвазия разными видами эустронгилид. Личинки, попавшие в желудочно-кишечный тракт рыбы, перфорируют стенку кишечника и выходят во внекишечное пространство [9]. Затем паразиты инкапсулируются на внутренних органах, они встречаются во всей брюшной области, на мышцах брюшной стенки. Вокруг гельминта образуется капсула из тканей хозяина (рис. 2) [10]. Капсулы полупрозрачные, имеют форму широкого кольца или спирали диаметром от 3,5 до 12 мм и толщиной 1–2 мм. Чем больше время нахождения гельминта в рыбе, тем сильнее уплотнена ткань вокруг капсулы, что объясняется иммунным ответом пораженного хозяина [11]. Сами эустронгилиды меняют оттенок на более темный, плотность ткани паразита увеличивается. При вылове и последующей гибели рыбы они способны выходить из капсулы и мигрировать в окружающие полости сквозь брюшную стенку в попытках покинуть хозяина.



Рис.2. Инкапсулированный *Eustrongylides sp.* на пилорических придатках окуня

В рыбе эустронгилиды развиваются до четвертой стадии, являющейся инвазионной для окончательного хозяина. Попав в организм рыбоядной птицы, личинки внедряются в стенку железистого желудка или кишечника. Спустя 10–17 дней гельминты достигают половозрелой стадии, после чего размножаются, запуская тем самым жизненный цикл с начала.

Эустронгилидоз впервые был зафиксирован именно в Азовском бассейне у карповых видов рыб, в частности — у леща [12]. В 1940 году доля зараженных лещей составляла 13 %, к 1998 году было поражено уже 50 % рыб. Отметим, что эустронгилиды довольно редко встречаются у искусственно культивируемых рыб, однако в промысловых видах, обитающих в естественной среде, их можно зафиксировать повсеместно.

Наивысший пик зараженности был зарегистрирован в 1998 году на нижнем Дону. Исследования 2013–2015 годов в тех же районах нижнего Дона выявили зараженность судаков в пределах 30 % (около трех нематод в одном экземпляре рыбы) [13]. У донской сельди и леща в 2013–2016 годах гельминты не были обнаружены совсем.

Основным вторым промежуточным хозяином в Азовском бассейне и, в частности, в Таганрогском заливе, считаются бычковые. Массовым промысловым видом среди азовских бычков является бычок-кругляк, находящийся под постоянным эпизоотическим контролем. Его зараженность в восточной части Таганрогского залива в 2014 году колебалась от 9 до 36 %, в 2015 году — от 13 до 67 %. В хамсе, тарани и пиленгасе Таганрогского залива вплоть до 2016 года эустронгилиды обнаружены не были. Судаки Ейского и Бейсугского лимана также оказались не зараженными, за исключением одной особи в 2015 году [14].

Несмотря на кажущееся благополучие необходимо обратить внимание на давность проведенных исследований. По сообщениям рыбаков и ихтиологов постов мониторинга Азовского района, в последнее время неоднократно фиксировались судаки, окуни, щуки и бычки катастрофического уровня зараженности эустронгилидами. Наиболее часто зараженная рыба встречается в низовьях Дона, в районе хутора Рогожкино, в реке Койсуг.

Стандартные методики полного и неполного паразитологического исследования являются достоверным инструментом в оценке эпизоотической обстановки конкретных водоемов, но при этом они требуют больших затрат человеческих ресурсов и времени. Мелкие организмы, такие как нематоды, вносят существенный вклад в биоразнообразие планеты, однако их идентификация особенно сложна и часто возможна только таксономическими экспертами [15].

Методы же молекулярной биологии и, в частности, генетики в значительной степени облегчают решение задачи по идентификации всевозможных паразитов при наличии видоспецифичных праймеров. Кроме того, ПЦР-диагностика позволяет обнаружить вариабельные сайты близкородственных организмов (на уровне видов и родов), тем самым давая возможность оценить генетический полиморфизм и разграничить их на таксономическом уровне. Анализ генетического полиморфизма возможен как по ядерным, так и по цитоплазматическим маркерам.

Баркодирование ДНК, или же ДНК-штрихкодирование — один из самых популярных методов молекулярной биологии в контексте идентификации и определения таксономического положения организмов.

Наиболее часто используемым маркером в этом контексте является участок гена цитохромксидазы I (COI). Ген COI представляет собой высококонсервативный митохондриальный ген, кодирующий белок дыхательной цепи переноса электронов, который восстанавливает молекулярный кислород до воды. Частота применения обусловлена тем, что ген COI присутствует во всех клетках, при этом обладая высокой межвидовой и низкой внутривидовой генетической изменчивостью [16].

Успешным в отношении идентификации эустронгилид на основании последовательности гена COI оказалось исследование Pekmezci and Bolukbas. При помощи двух праймеров цитохромксидазы, а именно H7005 (5'-ACNACRTAR TANGTRTCRTG-3') и L6625 (5'-TGRTTYTTYGGN-CAУСС-3') были отсекуены первые качественные последовательности *Eustrongylides excisus*, которые затем были загружены в GenBank NCBI [17].

Еще одним широко распространенным молекулярно-генетическим маркером при изучении взаимоотношений на уровне видов и родов являются внутренние транскрибируемые спейсеры (ITS) ядерных генов рибосомной РНК. рДНК представляет собой tandemно расположенные многократно повторяющиеся копии, которые подвергаются периодической гомогенизации (согласованной эволюции). При проявлении согласованной эволюции вновь возникшие мутации могут либо быстро удаляться из генома, либо же, наоборот, распространяться по всем копиям благодаря неравному кроссинговеру.

На основании отсекуенных данных ITS были успешно идентифицированы *Eustrongylides excisus* в Китае [18]. Авторы отмечают, что участок рибосомной ITS рДНК особенно полезен для точной идентификации на видовом уровне как для личинок, так и для взрослых особей.

С помощью приведенных стратегий образец ДНК неопознанного вида сравнивается с идентифицированными последовательностями, присутствующими в эталонной библиотеке штрих-кодов ДНК (GenBank NCBI). Сравнение и выравнивание последовательностей позволяют выявить различия между исследуемыми образцами на основании вариабельных участков (делеций, замен и вставок).

Заключение. Таким образом, в результате комплексного анализа биологии и эпизоотологии рода *Eustrongylides sp.* можно сделать вывод о необходимости проведения актуального исследования, основанного как на морфологических идентификационных ключах, так и на современных молекулярно-генетических маркерах. Данная необходимость связана с давностью последних мониторинговых мероприятий, а также с малым количеством исследований молекулярной филогении *Eustrongylides sp.* в целом. Отработанная методика идентификации позволит пересмотреть видовой состав паразитофауны Ростовской области, определить конкретные различия генетического полиморфизма.

Библиографический список

1. Guerin P.F., Marapendi S., Grail S.L. Intestinal perforation caused by larval *Eustrongylides* – Maryland. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1982;31(28):383–384.
2. Карманова Е.М. *Диоктофимидеи животных и человека и вызываемые ими болезни.* Москва: Наука; 1968. 383 с.
3. Brand Th.V. Factors influencing the oxygen consumption of larval *Eustrongylides*. *J. Parasitol.* 1942;(28):6–12.
4. Гаевская А.В. *Паразиты и болезни рыб Черного и Азовского морей: II — полупроходные и пресноводные рыбы.* Севастополь: ЭКОСИ-Гидрофизика; 2013. 354 с.
5. Barros L.A., Mateus L.A.F., Braun D.T., Bonaldo J. Ecological aspects of endoparasites in red piranha (*Pygocentrus nattereri* Kner, 1860) from Cuiabá river, Mato Grosso. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010;(62):228.
6. Moshu A. Helminths of fish from reservoirs of the Dniester-Prut interfluvium, potentially hazardous to human health. *Eco-TIRAS.* 2014;(67):88.
7. Bjelić-Čabrilo O., Novakov N., Ćirković M., Kostić D., Popović E., Aleksić N. et al. The first determination of *Eustrongylides excisus* Jägerskiöld, 1909 — larvae (Nematoda: Dioctophymatidae) in the pike-perch *Sander lucioperca* in Vojvodina (Serbia). *Helminthologia.* 2013;50(4):291–294. <https://doi.org/10.2478/s11687-013-0143-1>
8. Sloboda M., Mihalca A.D., Falka I., Petrželková K.J., Carlsson M., Ghira I. et al. Are gobiid fish more susceptible to predation if parasitized by *Eustrongylides excisus*? An answer from robbed snakes. *Ecological Research.* 2010;(5):469–473. <https://doi.org/10.1007/s11284-009-0676-4>
9. Melo F.T., Melo C.S., Nascimento L.C., Giese E.G., Furtado A.P., Dos Santos J.N. Morphological characterization of *Eustrongylides* ssp. Larvae (Nematoda, Dioctophymatoidea) parasite of *Rhinella marina* (Amphibia: Bufonidae) from Eastern Amazonia. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2016;(25):235–239. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016024>
10. Goncharov S.L. Distribution of nematode larvae *Eustrongylides excisus* Jägerskiöld, 1909 (Nematoda: Dioctophymatidae) in the body of predatory fish. *Science and technology bulletin of SRC for biosafety and environmental control of agro-industrial complex.* 2017;5(3):5–9.
11. Feist S.W., Longshaw M. Histopathology of fish parasite infections – importance. *Journal of Fish Biology.* 2008;73:2143–2160. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2008.02060.x>
12. Быховская-Павловская И.Е., Быховский Б.Е. Паразитофауна рыб Ахтаринских лиманов (Азовское море, дельта р. Кубани). *Паразитол. сб. зоол. ин-та АН СССР.* 1940. С.131–161.
13. Бортников Е.С., Стрижакова Т.В., Шевкоплясова Н.Н. *Данные по зараженности промысловых рыб Азовского бассейна нематодой *Eustrongylides excisus*.* В: Сборник трудов международной научной конференции молодых ученых «Современные вопросы экологического мониторинга водных и наземных экосистем». Ростов-на-Дону; 2015. С. 20–26.
14. Бортников Е.С., Стрижакова Т.В., Шевкоплясова Н.Н. *Состояние паразитофауны основных промысловых рыб Азовского и Черного морей в 2016 году.* В: Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 75-летию рыбохозяйственного образования на Камчатке «Природные ресурсы, их современное состояние, охрана, промысловое и техническое использование». Петропавловск-Камчатский; 2017. С. 46–49.
15. Geiger M.F., Astrin J.J., Borsch T., Burkhardt U., Grobe P., Hand R., et al. How to tackle the molecular species inventory for an industrialized nation- lessons from the first phase of the German Barcode of Life initiative GBOL (2012–2015). *Genome.* 2016;(78):564–570. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0185>
16. Derycke S., Vanaverbeke J., Rigaux A., Backeljau T., Moens T. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (COI) for DNA barcoding of free-living marine nematodes. *PLoS ONE.* 2010;5(10):e13716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013716>
17. Pekmezci G.Z., Bolukbas C.S. Morphological and molecular characterization of *Eustrongylides excisus* larvae (Nematoda: Dioctophymatidae) in *Sander lucioperca* (L.) from Northern Turkey. *Parasitol Res* 2021;120(6):2269–2274. <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07187-8>

18. Fan Xiong, Wen X. Li, Shan G. Wu, Hong Zou, Gui T. Wang. Molecular Phylogeny and Host Specificity of the Larval Eustrongylides (Nematoda: Dioctophmidae) From Freshwater Fish in China. *Journal of Parasitology*. 2012;99(1):137–144. <https://doi.org/10.1645/GE-3163.1>

Об авторах:

Алимова Александра Шамилевна, магистрант кафедры «Биология и общая патология» Донского государственного технического университета, ведущий специалист сектора генетический исследований Азовского филиала ФГБНУ «ВНИРО» (АзНИИРХ) (344002, РФ, г. Ростов-на-Дону, ул. Береговая, 21в), sasha1501221000@gmail.com

Стрюкова Елена Викторовна, доцент кафедры «Биология и общая патология» Донского государственного технического университета (344003, РФ, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, 1), кандидат ветеринарных наук, доцент

About the Authors:

Aleksandra Sh. Alimova, Master's degree student of the Biology and General Pathology Department, Don State Technical University, leading specialist of the Genetic Research Sector, Azov-Black Sea Branch of Russian Federal Research Institute Of Fisheries and Oceanography (VNIRO) Azov-Black Sea branch of the VNIRO (“AzNIIRKH”) (21B, Beregovaya St., Rostov-on-Don, 344002, RF). sasha1501221000@gmail.com

Elena V. Stryukova, associate professor of the Biology and General Pathology Department, Don State Technical University (1, Gagarin Sq., Rostov-on-Don, 344003, RF), Cand. Sci. (Vet.), associate professor