

УДК 595.121.51

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ, ЭПИЗОТОЛОГИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ КЛАССИФИКАЦИЯ *MESOCESTOIDES LINEATUS* (GOEZE, 1782), LARVAE (CESTODA: CYCLOPHYLLIDEA) В УЗБЕКИСТАНЕ

Алиев Ш.Т., Амиров О.О.

Институт зоологии Академии наук Республики Узбекистан, Ташкент,
e-mail: biocandidatlotus@gmail.com

Целью исследования было выявление морфологических, эпизоотологических и молекулярно-генетических особенностей личинок *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782), относящихся к надсемейству Cyclophyllidae. Молекулярно-генетические исследования тетратиридной стадии *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) – паразита амфибий в Узбекистане проведены впервые. Материал был собран в Сурхандарьинской и Кашкадарьинской областях Узбекистана весной и летом 2024 г. Всего было поймано и исследовано 17 экземпляров жаб *Bufotes turanensis* (Hemmer, Schmidtler & Bohme, 1978) и 11 экземпляров лягушек *Pelophylax terentievi* (Межжерин, 1992). Личинки тетратиридий *M. lineatus* (Goeze, 1782) обнаружены в полости тела 12 (42,85 %) из 28 исследованных амфибий. Согласно региональному распределению проб, наибольшая экстенсивность инвазии личинками тетратиридий наблюдалась в Сурхандарьинской области (50 %). Гельминты, обнаруженные как у видов *Pelophylax terentievi*, так и у *Bufotes turanensis*, были диагностированы как личинки *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782). Длина тела и форма личинок тетратирид *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) изменчивы: по форме – преимущественно эллипсоидные, иногда округлые; по длине – 0,52–1,37 (1,17±0,2 мм, n = 28) мм и ширине – 0,4–0,9 мм (0,56±0,17 мм, n = 28). На поверхности тела имеется множество поперечных складок. Разница между нуклеотидами участка ITS-2 рДНК образца *Mesocestoides litteratus*, полученного из базы данных NCBI, и образца *Mesocestoides lineatus* *Uzb* составила 2,6 %. Нуклеотидная последовательность вида *Mesocestoides lineatus* *Uzb* размещена в NCBI и получен номер доступа (PQ326864).

Ключевые слова: земноводные, гельминты, *Mesocestoides*, тетратиридии, молекулярно-генетическое описание, Узбекистан

MORPHOLOGICAL, EPIZOTOLOGICAL AND MOLECULAR-GENETIC CLASSIFICATION OF *MESOCESTOIDES LINEATUS* (GOEZE, 1782), LARVAE (CESTODA: CYCLOPHYLLIDEA) IN UZBEKISTAN

Aliiev Sh.T., Amirov O.O.

Institute of Zoology of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent,
e-mail: biocandidatlotus@gmail.com

The purpose of this work was to identify the morphological, epizootological, and molecular genetic characteristics of *Mesocestoides lineatus* larvae. (Goeze, 1782), belonging to the superfamily Cyclophyllidae. Molecular genetic studies of the tetrathyrid stage *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) – an amphibian parasite in Uzbekistan, conducted for the first time. The material was collected in the Surkhandarya and Kashkadarya regions of Uzbekistan in the spring and summer of 2024. A total of 17 specimens of *Bufotes turanensis* toads (Hemmer, Schmidtler & Bohme, 1978) and 11 specimens of *Pelophylax terentievi* frogs (Mezhzherin, 1992) were caught and examined. Larvae of *M. lineatus* tetrathyridium (Goeze, 1782), 12 (42.85 %) of the 28 amphibians studied were found in the body cavity. According to the regional distribution of samples, the greatest extent of invasion by tetrathyrid larvae was observed in the Surkhandarya region (50 %). The helminths found in both *Pelophylax terentievi* and *Bufotes turanensis* species were diagnosed as *Mesocestoides lineatus* larvae. (Goeze, 1782). Body length and shape of tetrathyrid larvae *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782) They are variable: mostly ellipsoid in shape, sometimes rounded; in length – 0.52–1.37 (1.17±0.2 mm, n = 28) mm and in width – 0.4–0.9 mm (0.56±0.17 mm, n = 28). There are many transverse folds on the surface of the body. The difference between the nucleotides of the ITS-2 rDNA region of the *Mesocestoides litteratus* sample obtained from the NCBI database and the *Mesocestoides lineatus* *Uzb* sample was 2.6 %. The nucleotide sequence of the *Mesocestoides lineatus* *Uzb* type is located in NCBI and the access number (PQ326864) has been obtained.

Keywords: amphibians, helminths, *Mesocestoides*, tetrathyridia, molecular genetic description, Uzbekistan

Введение

Гельминты амфибий занимают особое место в структурном уровне видовой разнообразия водных биоценозов. Паразитизм является одним из важных биотических факторов, определяющих численность видов-хозяев, и, регулируя численность хозяев, оказывает большое влияние на структуру и деятельность всей экосистемы [1, с. 98–106].

Род *Mesocestoides* включает множество неизученных паразитов с уникальными характеристиками во многих аспектах их биологии. В настоящее время проводится множество исследований по изучению гельминтофауны земноводных. Виды рода *Mesocestoides* широко распространены по всему миру, зарегистрировано три вида цестод, принадлежащих к этому роду.

На этапах развития представителям этого рода требуется два промежуточных хозяина. Орибатионные клещи и копрофаги заражаются при поедании яиц. Они очень важны как первые промежуточные хозяева онкосферной (6-петлевой личинки) и финной (цистицеркоидной) стадий развития гельминта. Вторыми промежуточными хозяевами, питающимися зараженными членистоногими, являются амфибии, рептилии, птицы (*Galliformes*, *Passeriformes*) и млекопитающие (*Rodentia*) [2; 3]. На этой стадии они превращаются из цистицеркоидов в личинки тетратиридий. Личинки тетратиридий созревают в тонком кишечнике хозяина. Позже яйца гельминта вместе с испражнениями и проглотидами хозяина выделяются во внешнюю среду.

M. lineatus (Goeze, 1782) паразитирует у птиц и млекопитающих во взрослых формах, вызывая мезоцестидоз. Иногда человек также может заразиться видами рода *Mesocostoides*, второй промежуточный вариант; заражение происходит при употреблении в пищу недоваренных или сырых органов хозяина (например, сырой печени змеи или куриных потрохов). Зараженные собаки и кошки не представляют прямого зоонозного риска для человека [4, с. 1455–1484].

Видами рода *Mesocostoides*, поражающими человека, являются *M. litteratus*, *M. lineatus* (Goeze, 1782) и *M. variabilis* (Mueller, 1928). Передача инвазии от человека зарегистрирована в странах Восточной Азии, включая Японию, Китай, Корею и США. *M. variabilis* является распространенным видом в Северной Америке, тогда как *M. litteratus* и *M. lineatus* более распространены в странах Европы и Азии [5, с. 566–567].

При идентификации видов этого рода достоверность определяется по морфологическим признакам их взрослых особей, но на личиночных стадиях развития трудно их идентифицировать по морфологическим признакам. При определении личиночных стадий вида используют молекулярно-генетические методы на основе нуклеотидной последовательности их митохондриального гена цитохрома оксидазы 1 (Cox-1), рибосомальных генов 18S, 12S, 28S и ITS-2 [6, с. 246–253].

Впервые в Узбекистане личинки *M. lineatus* (Goeze, 1782) были обнаружены у лягушки *B. viridis*, а позднее у *B. turanensis* и *B. pewzowi* [2; 7; 8]. Однако во всех этих исследованиях на основании морфологического анализа был выделен вид *M. lineatus* (Goeze, 1782).

Цель настоящей работы – морфологическая, эпизоотологическая и молеку-

лярно-генетическая классификация личинок *M. lineatus* (Goeze, 1782), относящихся к роду *Mesocostoides*.

Материалы и методы исследования

Морфологический анализ

Для проведения исследований в Сурхандарьинской и Кашкадарьинской областях весной и летом 2024 г. собрано 17 экземпляров жаб *B. turanensis* (Hemmer, Schmidtler & Bohme, 1978) и 11 экземпляров лягушек *P. terentievi* (Межжерин, 1992). При этом задние лапки собранных амфибий были пронумерованы с помощью специальной бирки. Для проведения гельминтологических исследований амфибии внутрибрюшинно вводили 20 % бензокаин гидрохлорид, используя руководство AVMA (AVMA Guidelines for the Euthanasia, 2020) по эвтаназии.

Гельминтологический материал собирали от земноводных методом полного гельминтологического вскрытия (Скрябин, 1928) и фиксировали 70 % этанолом. Для морфологической идентификации видов в лабораторных условиях приготовлено более 20 постоянных и временных препаратов. При морфологическом уточнении видов сравнивали с данными зарубежных и местных исследователей [2; 3; 9]. Получение оригинальных фотографий видов в приготовленном препарате осуществляли с помощью микроскопов ML-2000- (Meiji Techno CO., LTD, Япония), NSZ-818 (Nexscope, Китай), имеющихся в лаборатории молекулярной зоологии Института зоологии АН РУз. Идентификация видов гельминтов проводилась с использованием веб-сайта Global Biodiversity Information Facility (<https://www.gbif.org/>).

Эпизоотологический анализ

Для проведения данных исследований было собрано из Кашкадарьинской области 8 особей *P. terentievi* и 6 особей *B. turanensis*, а из Сурхандарьинской области – 3 особи *P. terentievi* и 11 особей *B. turanensis*.

Для характеристики зараженности гельминтами земноводных Сурхандарьинской и Кашкадарьинской областей использованы следующие паразитологические показатели:

Экстенсивность инвазии (ЭИ):

$$ЭИ = \frac{N_{\text{инф}}}{N_{\text{провер}}} \times 100 \%,$$

где $N_{\text{инф}}$ – количество инфицированных хостов;

$N_{\text{провер}}$ – количество проверенных владельцев.

Интенсивность инвазии (ИИ):

$$\text{ИИ} = \frac{N_{\text{гельминтов}}}{N_{\text{зараженных}}},$$

где $N_{\text{гельминтов}}$ – количество обнаруженных гельминтов;

$N_{\text{зараженных}}$ – количество хозяев, зараженных данным гельминтом.

Индекс доминирования (ИД):

$$\text{ИД} = \frac{N_{\text{гельминтов}}}{N_{\text{провер}}},$$

где $N_{\text{гельминтов}}$ – количество обнаруженных гельминтов;

$N_{\text{провер}}$ – количество проверенных владельцев.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения Statistics Excel 2003 и BioStat.

Молекулярно-генетический анализ

Для выделения геномной ДНК из *M. lineatus* (Goeze, 1782) использовался набор реагентов GeneJET Genomic DNA Purification Column. Концентрацию каждой ДНК определяли с помощью спектрофотометра Thermo Fisher Scientific (Китай). Экстрагированный образец геномной ДНК хранили при -20°C до использования для ДНК-полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Процедура ПЦР

При проведении ПЦР использовались праймеры для считывания нуклеотидов, принадлежащих участку ITS1+5.8S+ITS2 рибосомальной ДНК (рДНК), который широко используется при молекулярно-генетической идентификации цестод.

Состав реакционной смеси: вода – 16,1 мкл, 10-кратный ПЦР-буфер – 2 мкл, dNTP – 0,4 мкл.

Праймеры:

Прямой праймер TW81:

2 мкл (5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3').

Обратный праймер AB28:

2 мкл (5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3').

Общий объем смеси: 20 мкл.

Условия ПЦР:

1. 94°C – 3 мин (инициация).

2. 94°C – 45 с (денатурация).

3. 72°C – 10 мин (аннелирование и элонгация).

4. Заключительный этап: 72°C – 5 мин [10, с. 10–18].

Наличие ДНК в продуктах ПЦР определяли методом электрофореза на 2,0 % агарозном геле при 100 V. После окончания электрофореза гель просматривали под лучами ультрафиолетового трансиллюминатора, делали снимок и записывали результаты.

Экстракция и секвенирование ДНК

Для амплификации и экстракции ДНК из геля использовали набор реагентов производства ООО «Silex М» (Москва, Россия). Секвенирование ДНК проводили с использованием набора реагентов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1, а продукты реакции секвенировали в GATC Biotech AG.

Анализ полученной нуклеотидной последовательности проводили с использованием следующих программ: Bioedit, Clustal W2, DNASTAR™ и PAUP 4.0b10.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты морфологического исследования

При рассмотрении под микроскопом временных препаратов личинки тетратирид *Mesocostoides lineatus* (Goeze, 1782) было установлено, что личинки имеют преимущественно эллипсовидную форму, а иногда округлую. Длина составляет 0,52–1,37 мм (в среднем $1,17 \pm 0,2$ мм, $n = 28$), ширина – 0,4–0,9 мм (в среднем $0,56 \pm 0,17$ мм, $n = 28$). На поверхности тела наблюдается множество поперечных складок. На переднем конце тела имеется воронкообразная перетяжка, образованная сколексом. Тело личинок тетратиридий цельное и не разделено на членики. Удлиненный задний конец тела сужен, на нем видна осморегуляторная система, то есть разделительные поры.

Личинки тетратиридий имеют выпяченный сколекс с четырьмя присосками и часто окружены тонкой стенкой кисты. Эти присоски служат для прочного прикрепления к стенке кишечника вторичных промежуточных хозяев (рис. 1).

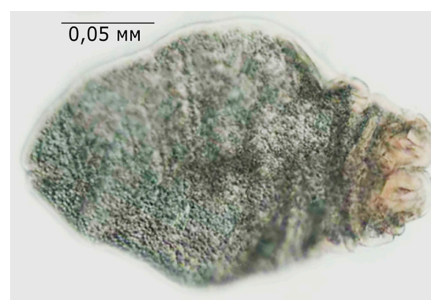


Рис. 1. Общий вид личинки тетратиридий *Mesocostoides lineatus* (Goeze, 1782), larvae

Результаты эпизоотологического исследования

По результатам проведенных гельминтологических исследований из 11 обследованных лягушек *P. terentievi* 4 были заражены личинками *Mesocostoides lineatus* (Goeze, 1782).

Зараженность земноводных *Mesocestoides lineatus*
(Goeze, 1782), larvae тетратиридиями

№	Области	Виды амфибий						Итого		
		<i>P. terentievi</i>			<i>B. turanensis</i>					
		Количество обследованных	Из них заражены, (ЭИ) %	(ИИ) (экз.)	Количество обследованных	Из них заражены, (ЭИ) %	(ИИ) (экз.)	Количество обследованных	Из них заражены, (ЭИ) %	(ИИ) (экз.)
1	Кашкадарьинская	8	3, (37,5)	1–4	6	2, (33,3)	1–3	14	5, (35,7)	1–4
2	Сурхандарьинская	3	1, (33,3)	3	11	6, (54,5)	1–5	14	7, (50)	1–5
Общий		11	4, (36,36)	1–4	17	8, (47)	1–5	28	12, (42,85)	1–5

Экстенсивность инвазии составила 36,36 %, интенсивность инвазии – 1–4 экз. Из 17 жаб *B. turanensis* 8 были заражены личинками *Mesocestoides lineatus* (Goeze, 1782). Экстенсивность инвазии составила 47 %, а интенсивность инвазии – 1–5 экз. (таблица).

По данным таблицы, в 5 из 14 (35,7 %) обследованных амфибий в Кашкадарьинской области и в 7 из 14 (50 %) в Сурхандарьинской области, а также в 12 из 28 (42,85 %) от общего числа обследованных земноводных обнаружены личинки тетратиридий. Зараженные земноводные указывают на серьезный риск для диких животных и людей в этих областях.

Результаты молекулярно-генетической
идентификации

В последние годы результаты молекулярно-генетических исследований, ос-

нованных на изучении нуклеотидов области ITS1+5.8S+ITS2 рибосомальной ДНК (рДНК), позволяют идентифицировать виды. Эти методы широко используются для точной идентификации цестод и решения нерешенных таксономических задач в сочетании с морфологическими и молекулярно-генетическими подходами, а также при определении спорных видов и фенотипических изменений.

По результатам проведенных молекулярно-генетических исследований была выделена нуклеотидная последовательность длиной 264 пары оснований, принадлежащая ITS-2-региону рДНК вида *M. lineatus* (Goeze, 1782). Кроме того, для сравнения этих видов были использованы данные о *M. litteratus* (номер доступа: MN 936660), также принадлежащем к этому роду, из базы данных NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

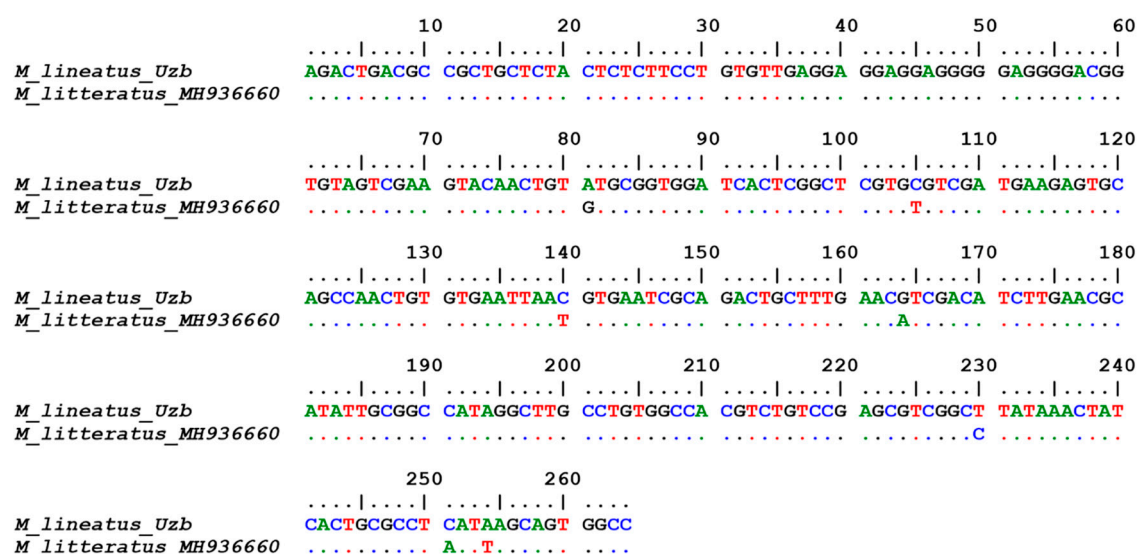


Рис. 2. Сравнение нуклеотидных последовательностей области ITS-2 рДНК видов, принадлежащих к роду *Mesocestoides* Vaillant, 1863 на основе материала секвенирования

Как видно из рис. 2, между нуклеотидами выборки *M. lineatus* *Uzb*, принадлежащей к роду *Mesocestoides* Vaillant, 1863, собранной из южных районов Республики Узбекистан, и выборки *M. litteratus*, полученной из базы данных NCBI, имеется разница в 7 нуклеотидов. Эти различия заключаются в А-аденине в образце *M. lineatus* *Uzb* по 81-му нуклеотиду, Г-гуанине в образце *M. litteratus* в образце из базы данных NCBI, С-цитозин в 105-м, 140-м нуклеотиде в образце *M. lineatus* *Uzb*, Т-тимин в образце *M. litteratus* в образце из базы данных NCBI, Г-гуанин в образце *M. lineatus* *Uzb* по 164-му нуклеотиду, А-аденин в образце *M. litteratus* в образце из базы данных NCBI, Т-тимин у видов *M. lineatus* *Uzb* по 230-му нуклеотиду, С-цитозин у видов *M. litteratus*, полученный из базы данных NCBI, С-цитозин у видов *M. lineatus* *Uzb* по 251-му нуклеотиду, А-аденин у видов *M. litteratus*, полученный из базы данных NCBI, по 254-му нуклеотиду у типа *M. lineatus* *Uzb* был заменен А-аденин, а у типа *M. litteratus* заменены Т-тиминовые нуклеотиды, полученные из базы данных NCBI, причем разница между нуклеотидами в участке ITS-2 рДНК составила 2,6 %.

В связи с высокой изменчивостью представителей рода *Mesocestoides* даже у взрослых особей определение видового состава по морфологическим признакам является затруднительным. Все предыдущие исследования основывались на морфологическом описании личинок *M. lineatus* (Goeze, 1782) в Узбекистане.

Насколько авторам данной статьи известно, это первое молекулярно-генетическое описание личиночной стадии *M. lineatus* (Goeze, 1782) у амфибий Узбекистана. Соответственно, гельминты, обнаруженные у ранее упомянутых видов *P. terentievi* (Межжерин, 1992) и *B. turanensis* (Hemmer, Schmidtler & Böhme, 1978), были диагностированы как личиночная стадия *M. lineatus* (Goeze, 1782).

Заключение

До сих пор личиночную стадию *M. lineatus* (Goeze, 1782) часто идентифицировали в Узбекистане по морфологическим особенностям. Изучение морфологии этого вида показало, что форма преимущественно эллипсовидная, иногда округлая. Длина варьирует от 0,52 до 1,37 мм (в среднем $1,17 \pm 0,2$ мм, $n = 28$), ширина – от 0,4 до 0,9 мм (в среднем $0,56 \pm 0,17$ мм, $n = 28$). Эпизоотологический анализ показал, что из 28 исследованных земноводных 12 (42,85 %) были заражены паразитами. Анализ регионального распределения образцов показал, что наибольшая экстенсивность инвазии наблюдается в Сурхандарьинской области

(50 %). Данная работа представляет первое молекулярно-генетическое описание личиночной стадии *M. lineatus* (Goeze, 1782), обнаруженной у *P. terentievi* (Межжерин, 1992) и *B. turanensis* (Hemmer, Schmidtler & Böhme, 1978). Различие в нуклеотидной последовательности участка ITS-2 рДНК между образцом *M. lineatus* *Uzb* и данными из NCBI (*M. lineatus*) составило 2,6 %. Нуклеотидная последовательность *M. lineatus* *Uzb* загружена в базу данных NCBI и получила номер доступа PQ 326864.

Молекулярно-генетический и филогенетический анализ показал, что личиночная стадия *M. lineatus* (Goeze, 1782) лишь незначительно отличается от популяций этого вида из других регионов. Настоящее исследование демонстрирует преимущество метода ПЦР-секвенирования для определения видового состава гельминтов независимо от стадии их развития.

Результаты настоящего исследования способствуют более глубокому пониманию видового состава и филогенетических взаимоотношений представителей рода *Mesocestoides* в промежуточных и основных хозяевах в разных географических регионах, а также для будущих молекулярно-генетических и морфологических исследований.

Список литературы

1. Икромов Э.Ф., Икромов Э.Э. Гельминты амфибий Узбекистана // Научный вестник НамГУ. 2020. № 1. С. 98–106.
2. Ikromov E.E., Ikromov E.F., Yildirimhan H.S., Azimov D.A., Amirov O.O. Biodiversity of Helminths in genera of *Bufo* and *Pelophylax*, Uzbekistan // Biharean Biologist. 2023. № 17 (1). P. 22–38. URL: <http://biozoojournals.ro/bihbiol/index.html> (дата обращения: 14.01.2025).
3. Padgett K.A., Boyce W.M. Life-history studies on two molecular strains of *Mesocestoides* (Cestode: Mesocestoididae): Identification of sylvatic hosts and infectivity of immature life stages // Parasitol. 2004. № 90 (1). P. 108–113. DOI: 10.1645/GE-100R1.
4. Jane E. Sykes Greene's Infectious Diseases of the Dog and Cat // Tapeworms-ScienceDirect. 2021. P. 1455–1484. DOI: 10.1016/B978-0-323-50934-3.00115-4.
5. Fuentes M.V., Galán-Puchades M.T., Malone J.B. Short report: a new case report of human *Mesocestoides* infection in the United States // Am J Trop Med Hyg. 2003. № 68 (5). P. 566–567. DOI: 10.4269/ajtmh.2003.68.566.
6. McAllister C.T., Tkach V.V., Conn D.B. Morphological and molecular characterization of post-larval pre-tetrahidrid of *Mesocestoides* sp. (Cestode: Cyclophyllidae) from ground skink, *Scincella litteratus* (Sauria: Scincidae), from southeastern Oklahoma, USA // Parasitol. 2018 № 104 (3). P. 246–253. DOI: 10.1645/17-178.
7. Ikromov E.F., Azimov D.A., Cho M.R. The Helminth fauna of Lake frog *Rana ridibunda* Pallas, 1777 in Fergana valley of Uzbekistan // Journal of Asia-Pacific Entomology. 2004. № 7 (2). P. 137–141.
8. Ikromov E.F., Akmuradova L.G., Ikromov E.E., Aliyev Sh.T. Helminth Fauna Of Pevtsov's Toad *Bufo* *Pewzowi* (BED-RIAGA, 1898) In Uzbekistan // International scientific and practical conference "Modern trends in teaching natural sciences: practice and innovation". Pavlodar. 2024. P. 296–297.
9. Imkongwapang R., Jyrwa D.B., Lal P. and Tandoncorresponding V.A. Checklist of helminth parasite fauna in anuran Amphibia (frogs) of Nagaland, Northeast India // Parasit Dis. 2014. № 38 (1). P. 85–100.
10. Kuchboyev A.E. Amaliy Molekulyar Zoologiya // Uslobiy qo'llanma: Toshkent, 2023. 10 b.