

Научная статья

УДК 619:616.995.122:636.7.8

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-4-381-387>

Апробация усовершенствованной методики окраски марит трематод при проведении паразитологических исследований у домашних плотоядных в Липецкой области

Бахтина Анастасия Владимировна¹, Голубцов Андрей Васильевич²,
Михайлов Евгений Владимирович³

^{1,2} Воронежский Государственный Аграрный университет имени императора Петра I, Воронеж, Россия

^{2,3} ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт патологии, фармакологии и терапии», Воронеж, Россия

¹ bahtinaanastasiavet@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-9043-6120>

² golubtsovav@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6484-7276>

³ voronezh81@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5457-1325>

Аннотация

Цель исследования – апробация оптимизированного протокола диагностики трематодозов, вызываемых представителями семейства Opisthorchidae, с использованием усовершенствованной методики окрашивания, а также оценка его эффективности на примере изучения зараженности дефинитивных хозяев в очаге описторхозов на территории Липецкой области.

Материалы и методы. Исследованы образцы печени 10 кошек и 5 собак, павших вблизи реки Сосна (Липецкая область), где ранее был обнаружен очаг описторхозов. Гельминтологическое вскрытие проводили по методу К. И. Скрябина. Выделенные мариты трематод окрашивали по усовершенствованной, ранее запатентованной, методике, основанной на методе Б. В. Ромашова с соавт. (2003) с использованием тиглей Гуча для повышения качества и удобства окрашивания. Проведены морфометрические исследования и идентификация видовой принадлежности трематод. Для оценки уровня зараженности использовали индексы обилия, интенсивности и экстенсивности инвазии.

Результаты и обсуждение. У кошек выявлена более высокая экстенсивность инвазии (60%) по сравнению с собаками (20%). Среди кошек доминировал вид *Pseudamphistomum truncatum* (интенсивность инвазии 20,1 экз.); также обнаружены *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis*. У зараженной собаки зарегистрированы *P. truncatum* (интенсивность инвазии 60 экз.) и *O. felineus*. Усовершенствованная методика окрашивания позволила сократить время исследования и повысить качество визуализации морфологии трематод. Результаты свидетельствуют о широком распространении *P. truncatum* среди животных в Липецкой области и подчеркивают важную роль домашних кошек, как ключевого резервуара инвазии.

Ключевые слова: диагностика, окрашивание, трематоды, методика, идентификация, псевдамфистомоз, Липецкая область

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Для цитирования: Бахтина А. В., Голубцов А. В., Михайлов Е. В. Апробация усовершенствованной методики окраски марит трематод при проведении паразитологических исследований у домашних плотоядных в Липецкой области // Российский паразитологический журнал. 2024. Т. 18. № 4. С. 381–387.

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-4-381-387>

© Бахтина А. В., Голубцов А. В., Михайлов Е. В., 2024



Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0 License.
The content is available under Creative Commons Attribution 4.0 License.

Original article

Approbation of the improved staining technique for trematode maritas during parasitological studies in domestic carnivores in the Lipetsk region

Anastasia V. Bakhtina¹, Andrey V. Golubtsov², Evgeny V. Mikhailov³

^{1,2}Voronezh State Agrarian University named after Emperor Peter I, Voronezh, Russia

^{2,3}Federal State Budgetary Scientific Institution «All-Russian Scientific Research Veterinary Institute of Pathology, Pharmacology, and Therapy», Voronezh, Russia

¹bahtinaanastasiavet@gmail.com, <https://orcid.org/0009-0000-9043-6120>

²golubtsovav@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-6484-7276>

³voronezh81@rambler.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5457-1325>

Abstract

The purpose of the research is to validate an optimized protocol for studying helminths using an improved staining method to improve the quality of diagnostics of trematodosis caused by representatives of the Opisthorchidae family. An additional objective was to study the prevalence of infection of definitive hosts within the identified focus of opisthorchiasis in the Lipetsk region.

Materials and methods. Liver samples from 10 cats and 5 dogs that died in the Sosna River area (Lipetsk region), where an opisthorchiasis focus had previously been identified, were examined. Helminthological dissection was performed using the Skryabin method. The isolated trematode metacercariae were stained using an improved, previously patented technique based on the method of B. V. Romashov et al. (2003), using Gooch crucibles to improve the quality and convenience of staining. Morphometric studies and species identification of trematodes were carried out. The level of infection was assessed using the indices of number, intensity and prevalence of infection.

Results and discussion. A higher prevalence of infection (60%) was found in cats compared to dogs (20%). Among cats, the dominant species was *Pseudamphistomum truncatum* (infection rate 20.1 ind.). *Opisthorchis felineus* and *Metorchis bilis* were also identified. *P. truncatum* (infection rate 60 ind.) and *O. felineus* were identified in the infected dog. The improved staining method reduced the examination time and improved the quality of visualization of trematode morphology. The results obtained indicate a wide distribution of *P. truncatum* among animals of the Lipetsk region and emphasize the significant role of domestic cats as the main reservoirs of infection.

Keywords: diagnostics, staining, trematodes, methodology, identification, pseudamphistomiasis, Lipetsk region

Conflict of interest. The authors declare that there is no conflict of interest.

For citation: Bakhtina A. V., Golubtsov A. V., Mikhailov E. V. Approbation of the improved staining technique for trematode maritas during parasitological studies in domestic carnivores in the Lipetsk region. *Rossiyskiy parazitologicheskii zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2024; 18(4):381–387. (In Russ.).

<https://doi.org/10.31016/1998-8435-2024-18-4-381-387>

© Bakhtina A. V., Golubtsov A. V., Mikhailov E. V., 2024

Введение

Проблематика паразитарных болезней, ассоциированных с употреблением гидробионтов и продуктов их переработки, сохраняет высокую медико-социальную значимость. В эпидемиологическом аспекте особую актуальность представляют инвазии, этиологически

связанные с рыбой и продуктами ее кулинарной обработки [6].

В структуре заболеваемости населения Российской Федерации паразитозами, передающимися через гидробионты, значимое положение занимает описторхоз. Данная инвазия характеризуется широким географическим

распространением, высокими показателями заболеваемости и значительными социально-экономическими последствиями¹.

Описторхозы характеризуются обширным географическим распространением на территории Российской Федерации с наибольшей концентрацией в бассейнах рек Обь-Иртышского и Волго-Камского бассейнов. Наиболее эндемичными регионами являются Томская, Тюменская, Новосибирская, Омская области, а также Алтайский край и Ханты-Мансийский автономный округ. Заболеваемость среди людей в этих регионах может достигать нескольких тысяч на 100 тысяч населения, что определяет высокую медицинскую и ветеринарную значимость проблемы [2].

Центральный федеральный округ, включающий Белгородскую, Воронежскую, Курскую, Липецкую и Тамбовскую области, также подвержен распространению описторхозов, хотя заболеваемость здесь не так велика, как в основном ареале паразита. Эпизоотологические исследования показывают наличие отдельных очагов заражения, преимущественно связанных с гидрологическими объектами – реками, озерами и другими водоемами, являющимися средой обитания промежуточных хозяев [3, 6].

В систематике трематод семейства *Opisthorchidae* выделяется группа природно-очаговых гельминтозов, объединяемых под общим названием «описторхозы». Данная группа включает в себя ряд зоонозных инвазий, наиболее значимыми из которых являются описторхоз, псевдамфиломоз и меторхоз. Этиологическими агентами указанных болезней выступают три филогенетически родственных вида трематод [2].

Описторхозы характеризуются наличием природных очагов, где циркуляция возбудителей поддерживается за счет сложных биоценологических взаимосвязей между окончательными хозяевами (различными видами млекопитающих, включая человека), промежуточными хозяевами (пресноводными моллюсками) и дополнительными хозяевами (рыбами семейства карповых) [2].

В ходе ранее проведенных нами исследований на территории Липецкой области, среди вторых промежуточных хозяев выявлено функционирование очага описторхозов. Очаг сосредоточен в населённых пунктах, таких как село Голиково и деревни Заосенка и Суворовка вблизи реки Сосна. Эти исследования позволили выявить эндемичные зоны циркуляции возбудителей в местных экосистемах [1].

В 2023 г. на данной территории было зафиксировано 14 случаев заболевания описторхозом².

В контексте эпидемиологии описторхозов ключевую роль в распространении инвазионных яиц паразита играют домашние животные, принадлежащие к отрядам хищных и всеядных, с особым акцентом на представителей семейства кошачьих и псовых. Среди них наибольшее эпидемиологическое значение имеют кошки и собаки, которые выступают в качестве основных резервуаров инвазии. Особо отмечается, что популяция домашних кошек рассматривается исследователями как значимый биоиндикатор, позволяющий оценить интенсивность циркуляции возбудителя описторхоза в различных географических локациях и экологических нишах [2].

Подготовка и окрашивание препаратов гельминтов при проведении научных исследований занимает центральное место в паразитологии, поскольку позволяет детально исследовать морфологическую структуру и анатомическое строение паразитов, что является необходимым условием для точной диагностики и углубленного научного анализа.

Целью настоящего исследования является апробация разработанного и оптимизированного протокола исследования гельминтов с применением усовершенствованной методики окрашивания. Научная работа преимущественно направлена на минимизацию возможных ошибок и упрощение процесса окрашивания, что, в свою очередь, способствует повышению скорости проведения исследований, а также качества и точности диагностики трематодозов, вызываемых представителями семейства *Opisthorchidae*.

¹ О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году: Государственный доклад. М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2023. 368 с.

² Число зарегистрированных случаев паразитарных заболеваний на сайте [ЕМИСС ГОСУДАРСТВЕННАЯ СТАТИСТИКА]. ЕМИСС; 2009 [обновлено 29 марта 2024; процитировано 12.07.2024]. Доступно: <https://www.fedstat.ru/indicator/38207>

В настоящем исследовании также приведены данные о распространенности паразитарной инвазии описторхозов среди дефинитивных хозяев в идентифицированном очаге на территории Липецкой области. Обнаружение данного очага является значимым фактом, поскольку свидетельствует о нетипичной локализации возбудителя и расширении его ареала, что представляет собой новое и до настоящего времени не зарегистрированное явление для данного региона.

Материалы и методы

Образцы печени были получены на станции кремации животных от собак и кошек, павших на территории Липецкой области, вблизи ранее обнаруженного очага инвазии.

Согласно данным, полученным из анамнеза от владельцев павших животных, установлено, что животным скармливали рыбу, выловленную в реке Сосна, без предварительной термической обработки.

Исследования проведены на базе лаборатории инновационных препаратов рекомбинантной протеомики ФГБНУ «ВНИВИПФиТ». Методом неполного гельминтологического вскрытия по К. И. Скрыбину из желчных протоков печени были выделены мариты трематод семейства *Opisthorchidae*.

При идентификации морфолого-таксономических материалов значимые данные относительно систематики трематод и уточнения их таксономического статуса были получены из компилятивных работ отечественных исследователей [4, 7].

Для дальнейшей дифференцировки и точного определения видовой принадлежности гельминтов было проведено окрашивание с применением усовершенствованной методики.

В качестве прототипа был выбран метод окрашивания и изготовления гельминтологических препаратов, описанный Б. В. Ромашовым с соавт. (2003)³. Данный метод включает следующие этапы: предварительное промывание гельминтов в проточной воде, их последующее окрашивание в растворе уксуснокислого кармина, промывка в дистиллированной воде и перенос в солянокислый спирт для устранения избытка красителя. После этого гельмин-

ты подвергаются последовательной обработке этанолом с возрастающей концентрацией для достижения обезвоживания, а затем помещаются в диметилфталат для консервирования. Окрашенные гельминты изучают под микроскопом для проведения их дифференциации и заключают в бальзам с целью создания постоянных микропрепаратов.

Несмотря на широкое признание и использование данного метода, он обладает рядом недостатков: неудобство использования часовых стекол, трудоемкость процесса, неравномерное окрашивание при обработке нескольких особей одновременно, высокий расход красителей и реактивов, сложность контроля процесса окрашивания, а также риск пролива реактивов и потери объектов исследования при перенесении между часовыми стеклами.

Для исключения вышеперечисленных недостатков все этапы окрашивания гельминтов нами проведены в тиглях Гуча. Предложенное усовершенствование упростило способ выполнения метода и повысило качество окрашивания гельминтов. Благодаря отверстиям, расположенным в дне тигля, растворы реактивов свободно проникали внутрь, обеспечивали непрерывное, равномерное и эффективное окрашивание трематод. Поскольку размеры трематод превышают размеры отверстий тигля они оставались внутри [5].

Предварительно промытые мариты трематод поместили в тигель Гуча № 1, который затем погрузили в высокий стаканчик для взвешивания СВ 34/12 мм, заполненный 25 мл раствора уксуснокислого кармина. Время окрашивания составило 7 мин. (рис. 1).

Последующие этапы выполнения методики предполагали тщательную промывку гельминтов в дистиллированной воде, после чего их подвергали последовательной обработке в спиртовом градиенте с возрастающей концентрацией спирта (70%, 80, 90 и 96%) также в высоких стаканчиках для взвешивания СВ 34/12 мм. Время экспозиции в каждом растворе составляло также 7 мин., причем данную процедуру повторяли дважды в одной и той же концентрации спирта, но в разных сосудах. Затем тигель с гельминтами перемещали в

³ Ромашов Б. В., Хицова Л. Н., Труфанова Е. И., Ромашова Н. Б. Методика гельминтологических исследований позвоночных животных: учебно-методическое пособие. Воронеж: Изд-во Воронеж. ун-та, 2003. 35 с.

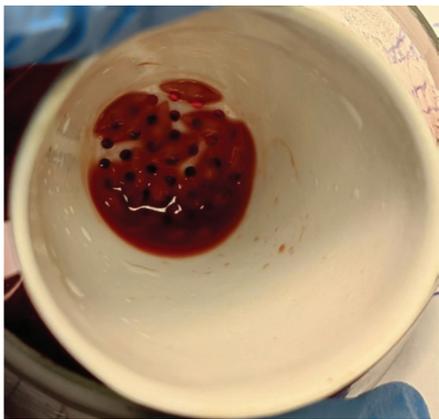


Рис. 1. Извлечение тигля Гуча с маритами трематод из раствора уксуснокислого кармина

Fig. 1. Removal of the Gooch crucible with trematode maritas from acetic carmine solution

следующий стаканчик, заполненный в равных пропорциях 96%-ным этанолом и раствором диметилфталата. После того как гельминты оседали на дно, тигель перенесли в емкость с чистым диметилфталатом (рис. 2).



Рис. 2. Погружение тигля Гуча и окрашенных трематод в диметилфталат для последующего хранения и дифференцировки

Fig. 2. Immersion of Gucci's crucible and colored trematodes in dimethyl phthalate for subsequent storage and differentiation

Стаканчики с рабочими растворами во время окрашивания закрывали притертой крышечкой, что предотвращало испарение, контаминацию и загрязнение красителя и спир-

товых растворов и способствовало сохранению чистоты и их стабильности в процессе окрашивания.

В последующем были проведены морфометрические исследования окрашенных экземпляров трематод с целью определения их видовой принадлежности. Каждый экземпляр анализировали индивидуально.

Для оценки качественных и количественных показателей зараженности и распределения взрослых стадий описторхид у хозяев применяли индекс обилия, показатели интенсивности и экстенсивности инвазии. Статистическую обработку данных выполняли в соответствии с общепринятыми методологическими подходами⁴.

Результаты и обсуждение

На текущий момент на территории Липецкой области выявлены четыре вида описторхид: *Opisthorchis felineus*, *Pseudamphistomum truncatum*, *Metorchis bilis* и *M. xanthosomus*, которые обладают значительным эпидемическим и эпизоотологическим значением. Территориальное распределение очагов описторхоза тесно связано с наличием пресноводных водоемов, преимущественно рек со слабым течением [1, 2].

При исследовании десяти образцов печени, взятых у кошек, и пяти образцов печени, взятых у собак, трематодная инвазия была выявлена у шести кошек и у одной собаки.

В ходе исследования из желчных протоков печени шести кошек было извлечено всего 196 экз. трематод, в то время как из желчных протоков печени одной собаки было выделено 73 экз. трематод.

У кошек выявлено три вида описторхид: *P. truncatum*, *O. felineus* и *M. bilis*. Наиболее часто фиксировали *P. truncatum*.

Видовой состав гельминтов у собаки включал *P. truncatum* и *O. felineus*. Мариты *M. bilis* не обнаружены (табл.).

Заключение

Усовершенствованная методика показала высокую эффективность и позволила значительно сократить время, затрачиваемое на перенос трематод между емкостями, обе-

⁴ Лакин Г. Ф. Биометрия: учебное пособие для спец. вузов. М.: Высшая школа, 1990. 352 с.

Таблица

Зараженность животных описторхидами в населённых пунктах (село Голиково, деревни Заосенка и Суворовка), расположенных вблизи реки Сосна на территории Липецкой области

Table

Analysis of the level of opisthorchiasis infection in animals in the settlements of Golikovo, Zaosenka, and Suvorovka, located near the Sosna River in the Lipetsk region

Показатель зараженности	Возбудитель		
	<i>Pseudamphistomum truncatum</i>	<i>Opisthorchis felineus</i>	<i>Metorchis bilis</i>
Кошки (n = 10)			
ЭИ, %	60	60	60
ИИ, экз.	20,1	8,6	3,8
ИО	12,1	5,2	2,3
Собаки (n = 5)			
ЭИ, %	20	20	Не обнаружено
ИИ, экз.	60	13	
ИО	12	2,6	

спечивая при этом равномерное окрашивание всех внутренних структур каждой особи. Этот подход способствует тому, что становится возможным четко рассмотреть структуру и морфологию всех исследуемых особей гельминтов и нет необходимости проводить их дополнительное доокрашивание или наоборот осветление, что сокращает время на исследование и обеспечивает возможность достоверной классификации окрашенных экземпляров.

Проведенный сравнительный анализ гельминтофауны кошек и собак показал наличие межвидовых различий в интенсивности инвазии трематодами. У кошек наблюдали более высокую интенсивность инвазии *P. truncatum* (20,1 экз.) по сравнению с *O. felineus* (8,6 экз.) и *M. bilis* (3,8 экз.). У собак, напротив, отмечали более высокую интенсивность инвазии *P. truncatum* (60 экз.) и *O. felineus* (13 экз.), в то время как инвазия *M. bilis* у них зарегистрирована не была.

Следовательно, можно сделать вывод, что в Липецкой области потенциал распространения псевдамфистомоза существенно превышает потенциал других описторхидозов. Результаты исследований дефинитивных хозяев указывают на то, что в природных условиях Липецкой области основную роль в циркуляции возбудителей описторхидозов играют домашние хищные млекопитающие, обитающие в селах вблизи водоемов, при этом доминирующее место занимает домашняя кошка.

Список источников

1. Бахтина А. В. Особенности распространения метацеркарий описторхид (Opisthorchiidae) у карповых рыб реки Сосна Липецкой области // Ветеринария Северного Кавказа. 2024. № 9. С. 137-142. <https://doi.org/10.24412/37120-2024-9-137-142>
2. Безр С. А. Биология возбудителя описторхоза. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. 336 с.
3. Буряк М. В., Малышева Н. С. Роль эколого-паразитологического мониторинга в снижении циркуляции описторхозной инвазии на территории Курской области // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2008. Т. 82, № 7. С. 88-89.
4. Ивашкин В. М., Контримавичус В. Л., Назарова Н. С. Методы сбора и изучения гельминтов наземных млекопитающих. М.: Наука, 1971. 124 с.
5. Бахтина А. В., Ромашов Б. В., Голубцов А. В., Михайлов Е. В. Способ подготовки марит трематод для морфологического исследования: пат. 2825149 Рос. Федерация. № 2023130176; заявл. 20.11.2023; опубл. 21.08.2024, Бюл. № 24.
6. Ромашов Б. В., Ромашова Н. Б., Бахтина А. В., Кудрин Л. П. Метацеркарии трематод карповых рыб в природных водоемах Центрального Черноземья: видовое и морфологическое разнообразие, диагностика и мониторинг // «Современные проблемы общей и частной паразитологии»: материалы IV Международного паразитологического симпозиума. Санкт-Петербург, 2022. С. 200-203.
7. Шульц Р. С., Гвоздев К. В. Основы общей гельминтологии: морфология, систематика, филогения гельминтов. Т. 1. М.: Наука, 1969. 492 с.

Статья поступила в редакцию 17.07.24; одобрена после рецензирования 30.08.24; принята к публикации 07.11.24

Об авторах:

Бахтина Анастасия Владимировна, аспирант кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии; SPIN-код: 3520-3870.

Голубцов Андрей Васильевич, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры ветеринарно-санитарной экспертизы, эпизоотологии и паразитологии; SPIN-код: 2589-6508, Researcher ID: I-7963-2017.

Михайлов Евгений Владимирович, кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующий отделом экспериментальной фармакологии и функционирования живых систем; SPIN-код: 9506-5052, Scopus ID: 57214682211.

Вклад соавторов:

Бахтина А. В. – исследование материала, анализ полученных данных, написание текста рукописи.

Голубцов А. В. – анализ полученных данных, написание текста рукописи, критический пересмотр рукописи в части значимого интеллектуального содержания.

Михайлов Е. В. – исследование материала, написание текста рукописи, окончательное одобрение варианта статьи для опубликования.

Авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

References

1. Bakhtina A. V. Features of metacercariae distribution of Opisthorchiidae in carp fish of the Sosna River, Lipetsk region. *Veterinariya Severnogo Kavkaza = Veterinary of the North Caucasus*. 2024; 9: 137-142. (In Russ.) <https://doi.org/10.24412/37120-2024-9-137-142>
2. Beer S. A. Biology of the Opisthorchis agent. Moscow: Association of Scientific Publications KMK, 2005; 336. (In Russ.)
3. Buryak M. V., Malysheva N. S. The role of eco-parasitological monitoring in reducing the circulation of opisthorchiasis infection in the Kursk region. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = Siberian Medical Journal (Irkutsk)*. 2008; 82 (7): 88-89. (In Russ.)
4. Ivashkin V. M., Kontrimavichus V. L., Nazarova N. S. Methods of collecting and studying helminths of terrestrial mammals. Moscow: Nauka, 1971;124. (In Russ.)
5. Bakhtina A. V., Romashov B.V., Golubtsov A. V., Mikhailov E. V. Method for preparing trematode maritas for morphological study: patent 2825149 Russian Federation. No. 2023130176; filed 20.11.2023; published 21.08.2024, Bulletin No. 24. (In Russ.)
6. Romashov B. V., Romashova N. B., Bakhtina A. V., Kudrin L. P. Metacercariae of trematodes in carp fish in natural water bodies of the Central Chernozem Region: species and morphological diversity, diagnostics, and monitoring. «*Current problems of general and special parasitology*»: materials of the IV International parasitological symposium. St. Petersburg, 2022; 200-203. (In Russ.)
7. Shulz R. S., Gvozdev K. V. Fundamentals of general helminthology: Morphology, systematics, phylogeny of helminths. Vol. 1. Moscow: Nauka, 1969; 492. (In Russ.)

The article was submitted 17.07.2024; approved after reviewing 30.08.24; accepted for publication 07.11.2024

About the authors:

Anastasia V. Bakhtina, Postgraduate student of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise, Epizootology and Parasitology; SPIN: 3520-3870.

Andrey V. Golubtsov, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor of the Department of Veterinary and Sanitary Expertise, Epizootology and Parasitology; SPIN: 2589-6508, Researcher ID: I-7963-2017.

Evgeny V. Mikhailov, Candidate of Veterinary Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Experimental Pharmacology and Functioning of Living Systems; SPIN: 9506-5052, Scopus ID: 57214682211.

Contribution of the authors:

Bakhtina A. V. – research of the material, analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript.

Golubtsov A. V. – analysis of the data obtained, writing the text of the manuscript, critical revision of the manuscript in terms of significant intellectual content.

Mikhailov E. V. – research of the material, writing the text of the manuscript, final approval of the version of the article for publication.

All authors have read and approved the final manuscript.