

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Толеповой Гулзат Канибековны на тему «Паразитологический мониторинг природных водоёмов в неблагополучных по описторхозу регионах Республики Казахстан (Акмолинская, Павлодарская, Северо-Казахстанская, Западно-Казахстанская области) с целью определения безопасности и качества рыбы и рыбной продукции для человека», представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе 8D09102 – «Ветеринарная санитария»

Актуальность темы исследования. Описторхоз, клонорхоз, псевдамфиломоз, меторхоз, эхинохазмоз, метагонимоз, нанофиетоз, гетерофиоз, парагонимоз, дифиллоботриоз, анизакидоз, диоктофимоз, гнатостомоз, спируоидоз и коринозомоз социально значимые и широко распространённые заболевания, основным источником заражения которыми являются рыбы. Эти инвазии протекают тяжело и трудноизлечимы.

В Казахстане одной из самых распространённых инвазий является описторхоз. Ареал его распространения от восточной до западной границы республики и включает большое количество пресноводных водоемов Павлодарской, Северо-Казахстанской, Костанайской, Акмолинской, Карагандинской, Западно-Казахстанской областей.

После Послания главы государства Касым-Жомарта Кемеловича Токаева «Казахстан в новой реальности: время действий» была утверждена специальная Программа развития рыбного хозяйства до 2030 года, целью которой является обеспечение населения качественной и экологически чистой рыбной продукцией. Для выполнения данной программы, в первую очередь, необходимо обеспечить эпизоотическое благополучие природных водоемов по паразитарным болезням рыб. Кроме того, в целях предотвращения заражения населения описторхозом, меторхозом, дифиллоботриозом и другими опасными гельминтозами проводить санитарное просвещение населения и пересматривать лимиты вылова карповых видов рыб.

С учетом социальной значимости зоонозных инвазий научные исследования в области паразитологии являются актуальными для ветеринарной науки и практики всех стран мира.

Цель диссертационных исследований. Паразитологический мониторинг природных водоемов в неблагополучных по описторхозу регионах Республики Казахстан (Акмолинская, Павлодарская, Северо-Казахстанская, Западно - Казахстанская области) с целью определения безопасности и качества рыбы и рыбной продукции.

Задачи исследований:

- Провести паразитологический мониторинг природных водоемов в неблагополучных по описторхозу регионах Республики Казахстан (Акмолинская, Павлодарская, Северо - Казахстанская, Западно - Казахстанская области);

- Определить показатели зараженности карповых видов рыб описторхисами и другими возбудителями зоонозных инвазий;
- Провести анализ эпидемиологической ситуации по описторхозу в Республике Казахстан;
- Изучить показатели пищевой ценности мяса рыбы, пораженной метацеркариями описторхиса;
- Провести микробиологические исследования мяса язя, зараженного метацеркариями описторхиса;
- Определить устойчивость метацеркариев описторхиса к ряду физических и химических факторов;
- Разработать научно-обоснованные рекомендации по системе повышения эффективности ветеринарно-санитарных мероприятий.

Методы исследования.

Полное паразитологическое вскрытие рыб проводили в соответствии с разработанными А.М.Абдыбековой, Г.С.Шабдарбаевой, С.С.Токпан Методическими рекомендациями по исследованию паразитов рыб.

Рыбу ловили исследовательскими сетями (6 сетей длиной 25 м каждая) с ячеей в крыльях 20-80 мм. Сети размещали в водоемах ночью, а улов собирали через 12 часов. Выловленную рыбу взвешивали, измеряли длину, чешую складывали в журнал биологического анализа с целью последующего определения возраста рыбы.

Для обнаружения метацеркарий *Opisthorchis* spp. исследовали мясо рыбы, используя трихинеллоскоп СТЕЙК V (с увеличением в 50-70 раз) и стереомикроскоп KRUSS MS Z 5000. Видовую идентификацию выявленных компрессорным методом возбудителей описторхид проводили путем выделения ДНК фенол-хлороформным методом после инкубации в экстрагирующем буфере. В ПЦР использовали специфические праймеры, позволяющие дифференцировать два возбудителя описторхид - *Opisthorchis felineus* и *Methorchis bilis*.

Аmplификацию 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 Мм 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 15 с, 62°C в течение 25 с и окончательная элонгация 30 с при 72°C. Амплифицированные продукты ДНК анализировали на горизонтальном электрофорезе в 1% агарозном геле с использованием 1×TAE буферного раствора и EtBr. Для определения выхода пар нуклеотидов полученных ампликонов использовали маркер Gene Ruler 100 bp *Plus DNA Ladder* (Thermo Scientific™).

Органолептические показатели и химический состав исследуемых рыб определяли в соответствии с требованиями ГОСТ 7631-2008, определение массовой доли жира - методом экстракции в аппарате Сокслета, массовую долю белка по методу Кьельдаля, влажность - путем сушки в сушильном

шкафу при температуре 105°C до достижения постоянной массы сухого вещества. Минеральные элементы определяли согласно требованиям ГОСТ 31795-2017, ГОСТ Р 55484-2013, ГОСТ Р 55503-2013, а токсические элементы - по ГОСТ 30178-96. В работе использовался атомно-абсорбционный спектрофотометр Analytic Jena № aa100831106 (Германия). Содержание жирных кислот в мышечной ткани язя определяли в соответствии с ГОСТ Р 55483-2013, аминокислотный состав - методом капиллярного электрофореза в соответствии с М-04-38-2009 на приборе Капель М-105. Содержание витаминов определяли по М-04-41-2005, ГОСТ Р 54635-2011, ГОСТ Р 54634-2011. Микробиологические исследования осуществляли согласно «Инструк-ции по санитарно-микробиологическому контролю производства пищевой продукции из рыбы и морских беспозвоночных» и техническому регламенту Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции» (ТР ЕАЭС 040/2016). Для определения устойчивости метацеркарий описторхисов к физическим и химическим факторам зараженного язя замораживали в холодильнике при температуре -18°C, -20°C, -28°C, нагревали в термостате при +60°C в течение 1 часа, кипятили при +80°C в течение 10 минут (с момента закипания), жарили на открытом воздухе 100 г мяса при температуре 150°C в течение 15 минут. При посоле использовались растворы хлорида натрия с концентрацией 50 г/л, 100 г/л, 140 г/л и 150 г/л. Для вяления рыбы в условиях температуры 20°C – 21°C проводили посол с применением массовой доли хлорида натрия - 100 г на 1 кг рыбы, контролируя процесс на 3, 4, 5 и 10 сутки.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Показатели зараженности рыб возбудителями зоонозных инвазий в природных водоемах неблагополучных по описторхозу регионов Республики Казахстан (Акмолинская, Павлодарская, Северо-Казахстанская, Западно-Казахстанская, Карагандинская и Костанайская области);
- Показатели заболеваемости населения описторхозом в Республике Казахстан;
- Показатели пищевой ценности мяса язя, инвазированного метацеркариями описторхиса;
- Показатели устойчивости метацеркариев описторхиса к ряду физических и химических факторов;
- Научно-обоснованные ветеринарно-санитарные мероприятия при описторхозе.

Описание основных результатов исследования.

По результатам исследований природными очагами описторхоза, меторхоза и псевдоамфиломоза были признаны Коргалжынские озера в Акмолинской области. К природным очагам описторхоза и меторхоза также отнесены река Иртыш в Павлодарской области, река Улы Жыланшик в Костанайской области и канал Иртыш-Караганда в Карагандинской области. В Западно-Казахстанской и Северо-Казахстанской областях описторхоз не выявлен.

Среди рыб семейства карповых, исследованных методом ПЦР, у язя были обнаружены *Opisthorchis felineus*, *Metorchis bilis* и мигрирующие трематоды семейства *Diplostomatidae*. В Павлодарской области эти трематоды были выявлены только у линя, пойманного в реке Иртыш. В рыбе, выловленной в Карагандинской области, был обнаружен вид *Holostephanus dubinini*, относящийся к семейству *Cyathocotylidae*.

За последние 10 лет (2014–2023 гг.) эпидемиологический анализ показал, что наибольшее число случаев заболевания описторхозом было зарегистрировано в Западно-Казахстанской (1111 случаев), Павлодарской (2800 случаев), Костанайской (365 случаев), Акмолинской (403 случая), Северо-Казахстанской (293 случая) областях, в г. Астана (1255 случаев). В среднем по республике за 2014–2023 годы эпидемиологический показатель составил 3,7 случая на 100 тысяч населения. Самые высокие показатели отмечены в городе Павлодар - 37,02, городе Астана - 12,96, Западно-Казахстанской области - 17,16, Северо-Казахстанской области - 5,26, Акмолинской области - 4,69 и Костанайской области - 4,15 на 100 тысяч человек.

Результаты исследования показали, что органолептические показатели рыб, зараженных метацеркариями *Opisthorchis felineus*, не отличались от показателей не инвазированных рыб. При анализе химического состава было установлено, что в зараженных *O. felineus* рыбах повышается содержание влаги, а содержание белка снижается. Минеральные вещества и токсичные элементы в исследованных образцах рыбы не превышали предельно допустимых уровней. В мышечной ткани язя, зараженного описторхозом, содержание жирных кислот, аминокислот и витаминов было ниже, чем у не инвазированной рыбы. Бактериологические исследования показали, что образцы мяса рыбы не были загрязнены патогенной микрофлорой, а показатели загрязненности условно-патогенными микроорганизмами не превышали нормативных значений, установленных техническим регламентом.

В ходе определения воздействия физических и химических факторов на метацеркарии описторхид провели замораживание рыбы при низких температурах -18°C , -20°C и -28°C . Результаты показали, что при замораживании рыбы при температуре -28°C в течение 32 часов метацеркарии полностью погибали (СанПиН 321333-03).

При массовой доле хлорида натрия 5% посол продолжительностью 30 суток, при 10% - 21 сутки, и при 15% - 15 суток дали хорошие результаты. Вместо рекомендованных Ветеринарными правилами 40 суток, достаточно посола при массовой доле хлорида натрия 14% в течение 15 суток. При температуре $20-21^{\circ}\text{C}$ и массовой доле соли 100 г на 1 кг рыбы подвижность метацеркарий описторхисов сохранялась на протяжении 3 суток; на 4-е сутки подвижность у некоторых метацеркарий начала снижаться, на 5-е сутки подвижность снизилась на 50%, а на 10-е сутки подвижность полностью исчезла. Перед исследованием рыбу выдерживали в воде в течение 20–30 минут. Неподвижные метацеркарии хранились в физиологическом растворе.

Исследования показали, что посол не оказывает полного воздействия на жизнеспособность метацеркарий - гельминты уничтожаются только в тех участках, куда проникла соль. Под воздействием температуры соль проникает в более глубокие слои, снижая содержание воды, в результате чего метацеркарии начинают изменять форму и разрушаться.

С целью снижения уровня заболеваемости населения в регионах с очень высоким и высоким уровнем заболеваемости описторхозом предложены дополнения к ветеринарно-санитарным мероприятиям.

Обоснование новизны и важности полученных результатов. Впервые за последние 50 лет был проведен масштабный паразитологический мониторинг природных водоемов в неблагоприятных по описторхозу регионах Республики Казахстан (Акмолинская, Павлодарская, Северо-Казахстанская, Западно-Казахстанская, Карагандинская и Костанайская области) и установлены природные очаги описторхозной инвазии. По результатам полного паразитологического вскрытия 13 видов карповых рыб у 3 видов (язь, линь, серебряный карась) были установлены трематоды семейства *Opisthorchidae*: *Opisthorchis felineus*, *Metorchis bilis*, *Pseudamphistomum truncatum*, что указывает на возможность заражения человека как описторхозом, так и меторхозом. Изучены показатели пищевой ценности мяса язя, как основного источника заражения человека описторхозом и меторхозом. Определена устойчивость метацеркарий описторхисов к физическим и химическим факторам.

Соответствие направлениям развития науки или государственным программам. Научные исследования проводились в рамках научно - технической программы МСХ РК «Изучить эпизоотологическую характеристику территории страны по описторхозу рыб и разработать ветеринарно-санитарные мероприятия по повышению их эффективности» (№BR10764899-ОТ-23) на 2021-2023 годы.

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации. По материалам диссертации в соавторстве опубликовано 9 научных работ, в том числе: 3 статьи - в изданиях, рекомендованных Комитетом по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования РК; 1 статья - в журнале, входящем в базу Scopus; 2 статьи - в сборниках международных научно-практических конференций; 1 свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом, 1 методические указания, 1 рекомендации.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа выполнена по общепринятому образцу и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обобщения и оценки результатов исследований, заключения, списка использованной литературы и приложений. Диссертация изложена на 117 страницах, иллюстрирована 20 таблицами, 26 рисунками.