

УДК 619:616.995.122.21

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-36-43

Распространение и комплексная диагностика описторхоза у непромысловых карповых рыб в Центральной России

Самат Карабаевич Шибитов

Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К. И. Скрябина и Я. Р. Коваленко Российской академии наук», 117218, Москва, ул. Б. Черемушкинская, 28, e-mail: samshib@ya.ru

Поступила в редакцию: 26.03.2019; принята в печать: 02.04.2019

Аннотация

Цель исследований: изучить распространение описторхоза у непромысловых рыб в реках и озерах Тверской, Московской, Калужской и Ярославской областей. Отработать комплексный подход при диагностике описторхоза, применяя морфологические, молекулярно-генетические методы и метод биологической пробы.

Материалы и методы. Работу выполняли в 2014–2018 гг. Всего было исследовано 90 экз. непромысловых рыб, добытой любительским методом вылова, в трех реках и трех озерах центральной России. Метацицеркарий выделяли при помощи переваривания мышц рыбы в искусственном желудочном соке в лаборатории санитарной паразитологии ВНИИП. Для дифференциальной диагностики метацицеркарий трематод в работе применяли комплексный подход, используя методы морфологического определения при помощи светового микроскопа и специальной литературы, биологической пробы в условиях вивария на золотистых хомяках и при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР) в лаборатории молекулярной биологии ВНИИП, для чего использовали ранее опубликованные видоспецифичные праймеры и стандартные коммерческие наборы для выделения и амплификации ДНК; детекцию реакции проводили в 1,5%-ном агарозном геле.

Результаты и обсуждение. По результатам проведенных исследований, плотва из реки Десна (Московская область), реки Нара (Калужская область), плотва и густера из реки Волга (Тверская область) заражены метацицеркариями *Opisthorchis felineus*, что было подтверждено ПЦР. Плотва, густера и линь из Истринского водохранилища, озера Белого и озера Неро были свободны от метацицеркарий *O. felineus*. Биологическая проба на сирийских хомяках была положительной при скормливании метацицеркарий из мышц плотвы, выловленной в реке Десна Московской области. В остальных случаях биологические пробы были отрицательными, несмотря на положительную ПЦР в плотве из реки Нара и плотве и густере из реки Волга. Таким образом, в настоящее время в Центральной России имеются очаги описторхоза *O. felineus* на малых реках (Десна, Нара) и на реке Волге в районе Тверской области. Интенсивность инвазии у плотвы в малых реках с возрастом уменьшается и протекает в виде моноинвазии, тогда как в реке Волге плотва и густера заражены метацицеркариями нескольких видов трематод, а наличие метацицеркарий *O. felineus* в данных видах можно подтверждать при помощи ПЦР, так как биологическая проба при низких концентрациях метацицеркарий описторхид мало информативна. В озере Белом на востоке Москвы плотва и линь были свободны от всех метацицеркарий трематод, тогда как в Истринском водохранилище Московской области у плотвы и густеры выявляли незначительное число непатогенных для человека и плотоядных метацицеркарий трематод. В озере Неро Ярославской области встречались единичные метацицеркарии непатогенных трематод.

Ключевые слова: описторхоз, *Opisthorchis felineus*, ПЦР, диагностика, морфология, метацицеркарии, непромысловая рыба.

Для цитирования: Шибитов С. К. Распространение и комплексная диагностика описторхоза у непромысловых карповых рыб в Центральной России // Российский паразитологический журнал. 2019. Т. 13. № 2. С. 36–43.

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-36-43.

© Шибитов С. К.

Distribution and Comprehensive Diagnosis of Opisthorchosis in Non-commercial Carp Fish in Central Russia

Samat K. Shibitov

All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – a branch of Federal State Budgetary Institution of Science "Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K. I. Skryabin and Ya. R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences", 28, B. Cheremushkinskaya street, Moscow, Russia, 117218, e-mail: samshib@ya.ru

Received on 26.03.2019; accepted for printing on: 02.04.2019

Abstract

The purpose of the research is studying the expansion of opisthorchosis in non-commercial fish in the Tver, Moscow, Kaluga and Yaroslavl Region rivers and lakes. Developing a comprehensive approach in the diagnostics of opisthorchosis applying morphological, molecular and genetic methods and the bioassay method.

Materials and methods. The work was done in 2014–2018. 90 specimens of non-commercial fish were studied which were caught by recreational fishing in three rivers and three lakes of the central part of Russia. A metacercaria was divided using fish muscles digested in a simulated gastric fluid in the VNIIP laboratory of sanitary parasitology. For a differentiated diagnostics of the metacercarias of trematodes, a comprehensive approach was applied in the work using the methods of morphology determination by a light microscope and professional literature, a method of bioassay on golden hamster in a vivarium, and by a polymerase chain reaction (PCR) in the VNIIP laboratory of molecular biology. For this purpose, species-specific primers and standard commercial sets published earlier were used to divide and amplify a DNA. The reaction was detected in a 1.5% agarose gel.

Results and discussion. According to the results of the completed studies, the roach from the Desna River (the Moscow Region), the Nara River (the Kaluga Region), and the roach and the silver bream from the Volga River (the Tver Region) were infected with metacercarias *Opisthorchis felineus*, which was evidenced by the PCR. The roach, white beam and tench from the Istra Reservoir, Lake Belye and Lake Nero were free from metacercarias *O. felineus*. A bioassay test on Syrian hamsters was positive when metacercarias from muscles of the roach caught in the Desna of the Moscow Region were fed off. In other cases, the bioassay tests were negative irrespective of the PCR positive in the roach from the Nara and the roach and silver bream from the Volga. Thus, the central part of Russia currently has pestholes of opisthorchosis *O. felineus* in the small rivers (the Desna, the Nara) and in the Volga in and around the Tver Region. The infection intensity in the roach in the small rivers decreases with age and proceeds as a mono infection, whereas the roach and the silver beam in the Volga were infected with metacercarias of several types of trematodes, and metacercarias *O. felineus* in such types can be confirmed by the PCR as a bioassay at low concentrations of metacercarias of opisthorchid flukes provides little information. The roach and the tench in Lake Belye on the east of Moscow were free from all metacercarias of trematodes, whereas some few metacercarias of trematodes that are nonpathogenic for a human being and carnivore were detected in the roach and the silver beam in the Istra Reservoir of the Moscow Region. Very few metacercarias of nonpathogenic trematodes were found in Lake Nero of the Yaroslavl Region.

Keywords: opisthorchosis, *Opisthorchis felineus*, PCR, diagnostics, morphology, metacercarias, non-commercial fish.

For citation: Shibitov S. K. Distribution and comprehensive diagnosis of opisthorchosis in non-commercial carp fish in Central Russia. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2019; 13 (2): 36–43.

DOI: 10.31016/1998-8435-2019-13-2-36-43.

Введение

Возбудитель описторхоза – *Opisthorchis felineus* (Rivolta, 1884), паразитирующий в желчных ходах печени человека и многих животных, чрезвычайно патогенен и наносит здравоохранению страны серьезный ущерб [8].

По всему миру данным зоонозом заражены 45 млн. человек. Описторхозы распространены в развивающихся странах; они тесно связаны с бедностью, загрязнением окружающей среды, ростом численности населения, а также культурными пищевыми привычками и традициями. Тем не менее, люди, живущие в

промышленно развитых странах, также заражаются описторхозом в связи с увеличением потребления сырой рыбы. Около одной трети инвазированных людей являются бессимптомными. Помимо того, описторхозы были классифицированы как I класс канцерогенов, так как они являются причиной холангиокарциномы у хронически инвазированных людей [15].

Метацеркарии описторхид локализуются в поверхностных мышцах и межреберных мышцах плотвы, ельца, леща, язя, линя, воблы, густеры, чебака, чехони, красноперки, голяна и других рыб семейства карповых, обитающих в пресноводных водоемах. В Центральной России в реках и озерах наиболее распространены плотва, густера и линь [5].

В мышцах рыб встречаются как патогенные, так и непатогенные для человека и животных метацеркарии трематод. Последних в половозрелой стадии обнаруживают в кишечнике рыбоядных птиц (чайки, цапли) и хищных рыб (щука). Для патогенных метацеркарий трематод сем. *Opisthorchidae* при осмотре под микроскопом характерно наличие двух круглых одинакового размера присосок, которые окрашены светлее тела личинки и черного экскреторного пузыря овальной или грушевидной формы, занимающего 1/3–1/4 тела личинки. Для живых личинок характерно активное движение в цисте. Из непатогенных для человека и животных метацеркарий трематод близкое строение к описторхидам имеют личинки *Vucephalus polymorphus* Baer, 1857 и *Rhipidocotyle illense* (Zigler, 1883) Дук, 1954, для которых характерно наличие одной крупной ротовой присоски чашеобразной формы с пальцеобразными выступами, экскреторного пузыря зигзагообразной формы, занимающего 2/3 тела личинки и слабой подвижности живых личинок в цисте [10].

Генетические особенности *O. felineus* на территории Евразийского пространства методом ПЦР в настоящее время хорошо изучены и подробно описаны [11]. В Италии описана методика для ПЦР фрагмента цитохром с-оксидазы I в митохондриальной ДНК метацеркарий *O. felineus*, выделенных из рыбного филе [12].

Описторхоз является эндемичным заболеванием, а вид возбудителя зависит от региона, например, для Западной Сибири (*O. felineus*) [5, 8, 9], Амурской области, Северного Китая

(*Clonorchis sinensis* Looss, 1907) [13], Стран Юго-Восточной Азии (*O. viverrini* Poirier, 1886, Stiles & Hassal, 1896) [16] в Европейской части России и Белоруссии встречаемость описторхоза в эпизоотологическом и эпидемиологическом плане значительно ниже. Это объясняется как культурой питания людей, так и культурой кормления домашних плотоядных, где исключено поедание и соответственно скармливание сырой рыбы карповых пород не промышленного разведения. Исключением является Украина, где зараженность выше, чем в соседних регионах [6]. Описторхоз выявляется также в ряде стран Европы — во Франции, Болгарии, Голландии, Италии, Швейцарии, Швеции, Польше и Румынии [5].

Семейство *Opisthorchidae* в реках Европейской части России представлено тремя видами *O. felineus*, *Metorchis bilis* (Braun, 1790) Odening, 1962, *Pseudamphistomum truncatum* (Rudolphi, 1819) Lühe, 1908 [7].

Морфологически лишь метацеркарии *M. bilis* возможно дифференцировать под микроскопом, тогда как метацеркарии *O. felineus* и *P. truncatum* морфологически трудно различимы между собой. С другой стороны, *P. truncatum* чаще обнаруживают у морских млекопитающих [14] и диких плотоядных [2]. С эпидемиологической точки зрения, *O. felineus* является медицинской проблемой в Западной Сибири и реже в других регионах России, а подтвержденных случаев заражения людей *P. truncatum* в литературе не описано.

В Курской области (Центральная Россия) при исследовании 1155 экз. рыб семейства карповых зараженными метацеркариями *O. felineus* оказались 75 (6,5%) экз., из них плотва — на 18%, что в 1,4 и 1,9 раза выше, чем у леща (12,7%) и красноперки (9,4%). Верховка, карась и уклея были свободны от метацеркарий *O. felineus* [4].

Установлено, что описторхоз рыб может протекать как моноинвазия, так и в смешанной форме с другими трематодами, а именно: *Bolbophorus confuses* (Krause, 1914) Dubois, 1935 (сем. *Posthodiplostomidae*) и *Hysteromorpha triloba* (Rudolphi, 1819) Lutz, 1931 (сем. *Diplostomidae*) [1]. Метацеркарии данных видов являются непатогенными для человека и домашних плотоядных.

Целью исследований было изучение эпизоотологической ситуации по инвазирован-

ности *O. felineus* непромысловых видов карповых рыб в водоемах Центрального региона Российской Федерации комплексным методом, в том числе при помощи ПЦР.

Материалы и методы

Объектом исследования служила непромысловая рыба семейства карповых (*Cyprinidae*): плотва (*Rutilus rutilus* L., 1758), густера (*Blicca bjoerkna* L., 1758) и линь (*Tinca tinca* L., 1758). В период с 2014 по 2016 гг. нами было обследовано четыре региона Центральной России: Московская область – река Десна, оз. Белое и Истринское водохранилище; Калужская область – река Нара, Тверская область – река Волга и Ярославская область – озеро Неро на зараженность рыбы метацеркариями описторхид. Для этих целей рыбу семейства карповых добывали при помощи рыбаков-любителей. Рыбу после вылова измеряли, взвешивали, определяли возраст. В условиях лаборатории ВНИИП им К. И. Скрябина поверхностный слой мышц рыбы переваривали в искусственном желудочном соке, который готовили по прописи; метацеркарий определяли морфологически под световым микроскопом [9]. Дифференциальную диагностику описторхид проводили методом классической ПЦР и постановкой биопробы на сирийских хомяках, которым задавали выделенные из мышц рыб метацеркарии *per os*. Через 21 сут

хомяков подвергали эвтаназии при помощи хлороформа и препарировали печень с целью обнаружения гельминтов.

Для ПЦР использовали видоспецифичные праймеры для *O. felineus* [3] – Off ATGATTTCCCCACGCAT с обратным праймером ITS2exR GGAACGACCTGAACACCA; образцы метацеркарий *O. felineus* для положительного контроля получали из язя (*Leuciscus idus* L., 1758), выловленного в реке Обь Ханты-Мансийского автономного округа. Для проведения реакции использовали настольную центрифугу, морозильник, термостаты, термальный циклер (амплификатор) фирмы Bio Rad, устройство для горизонтального электрофореза Bio Rad, УФ-транслюминатор для чтения и документирования электрофореграмм, регулируемые пипетки с диапазоном объема 1–1000 мкл, Vortex, лабораторный пластик. Использовали реагенты для проведения ПЦР описторхоза: набор для выделения ДНК PureLink™ DNA Mini Kit фирмы Invitrogen каталожный номер K1820-00, набор реагентов для ПЦР амплификации ДНК GenePak® PCR core фирмы ООО «Изоген», 2%-ный буфер для электрофореза (TAE), агароза, этидия бромид, вода класса Milli-Q.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований приведены в таблице.

Таблица

Результаты исследования непромысловой рыбы карповых пород на зараженность *Opisthorchis felineus* в Центральной России

Название водоема и местности	Название рыбы, возраст	Исследовано рыб, экз.	Экстенсивность инвазии, %	Обнаружено метацеркарий в одной рыбе, экз.	Биопроба	ПЦР
Река Десна, Московская область	Сеголетка плотвы	5	100	10,0±1,1	Положительная	Положительная
	Плотва 2 года	5	100	3,0±0,30		
	Густера 2 года	5	0	–	–	–
Истринское водохранилище, Московская область	Плотва 2 года	25	0	–	–	–
	Густера 2 года	10	0	–	–	–
Озеро Белое, Московская область	Плотва, 3 года	5	0	–	–	–
	Линь 3 года	5	0	–	–	–
Река Нара, Калужская область	Плотва 1 год	10	100	5±0,51	Не проводили	Положительная
Река Волга, Тверская область	Плотва 2 года	5	100	40,0±4,3	Отрицательная	Положительная
	Густера 2 года	5	100	150,0±9,6	Отрицательная	Положительная
Озеро Неро, Ярославская область	Плотва 2 года	5	0	–	–	–
	Густера 1 год	5	0	–	–	–

Зараженность рыбы, выловленной в реке Десна, Московская область. Из 5 исследованных сеголеток плотвы зараженными оказались 5; экстенсивность инвазии (ЭИ) составила 100%, интенсивность инвазии (ИИ) – 10 ± 2 экз. Из 10 экз. двухлеток плотвы у 10 обнаружены метацеркарии трематод (рис. 1); ЭИ составила 100%, ИИ – 3 ± 1 экз. У 5 экз. двухлеток густеры метацеркарии не обнаружены. После постановки биопробы из трех зараженных хомячков в печени одного обнаружили две мари-ты *O. felineus* из 15 задаваемых в начале опыта. ПЦР на *O. felineus* была положительной.

Зараженность рыбы, выловленной в Истринском водохранилище, Московская область. У 25 экз. двухлеток плотвы и 10 экз. двухлеток густеры метацеркарий описторхид не обнаружено; выявлены единичные метацеркарии, непатогенные для человека и плотоядных (рис. 2). Дифференциальную диагностику методами ПЦР и биопробы не проводили, так как морфологически эти метацеркарии отличить не составляло особого труда.

Зараженность рыбы, выловленной в озере Белое, Московская область. У трехлеток плотвы и линя метацеркарий описторхид и других видов трематод не обнаружено.

Зараженность рыбы, выловленной в реке Нара, Калужская область. Из 10 исследованных сеголеток все были заражены; ЭИ – 100 %, ИИ – 5 ± 1 экз. Обнаруженные метацеркарии имели разную морфологическую структуру и размеры до 500 мкм (рис. 3). Рыбу доставляли в лабораторию после заморозки и в связи с этим метацеркарии были не жизнеспособны, а биологическую пробу не проводили. Для уточнения диагноза проводили ПЦР.

Зараженность рыбы, выловленной в реке Волга, Тверская область. У всех исследованных двухлеток плотвы и густеры обнаружены метацеркарии трематод; ЭИ составила 100 % при ИИ соответственно 40 и 150 метацеркарий (рис. 4). Метацеркарии в основной массе были морфологически отличимы от метацеркарий описторхид, но были и описторхоподобные метацеркарии. ПЦР на *O. felineus* оказалась положительной, биологическая проба – отрицательной.

Зараженность рыбы, выловленной в озере Неро, Ярославская область. У исследованных сеголеток плотвы (5 экз.), двухлеток плотвы (5

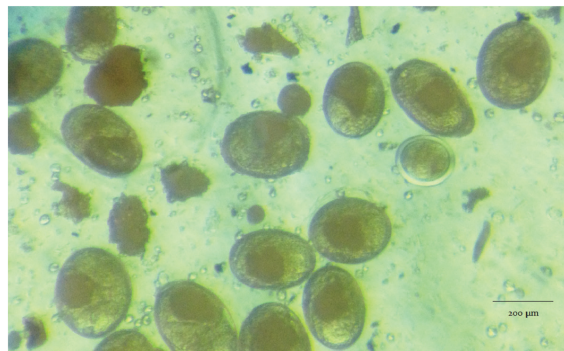


Рис. 1. Метацеркарии, выделенные из мышц плотвы, выловленной в р. Десна Московской области (× 100, оригинал)

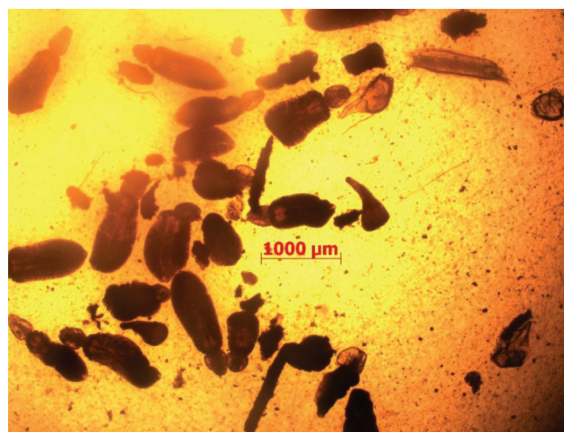


Рис. 2. Непатогенные метацеркарии из плотвы, выловленной в Истринском водохранилище Московской области (× 100, оригинал)

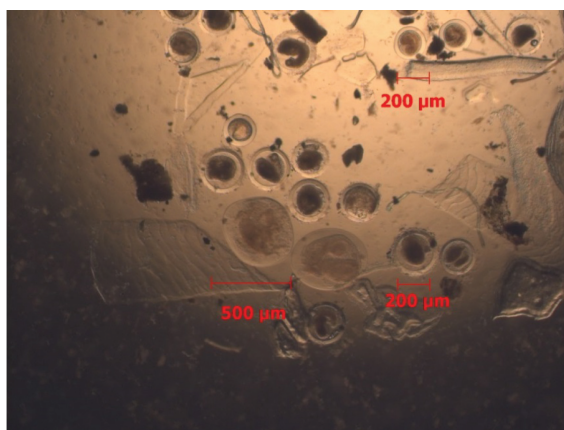


Рис. 3. Метацеркарии, выделенные из плотвы, выловленной в реке Нара Калужской области (× 100, оригинал)

экз.), однолеток густеры (5 экз.) по результатам микроскопического исследования метацеркарий описторхид не обнаружено. Найдены единичные (по 1 экз. у плотвы и 1 экз. у густеры) метацеркарии непатогенных трематод.

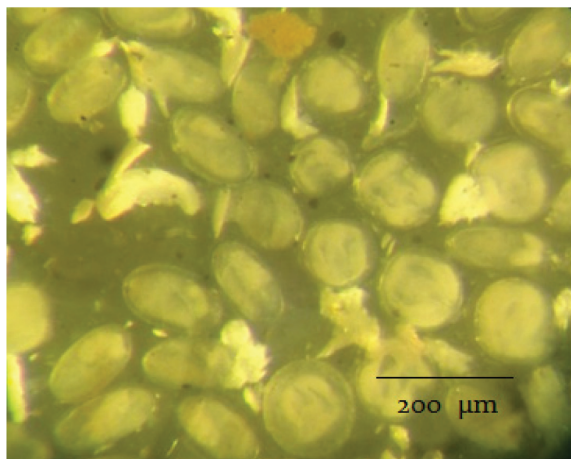


Рис. 4. Метацеркарии из плотвы, выловленной в реке Волга Тверской области (× 100, оригинал)

По результатам проведенных исследований, плотва из реки Десна (Московская область), из реки Нара (Калужская область), плотва и густера из реки Волга (Тверская область) оказались заражены метацеркариями *O. felineus*, что было подтверждено ПЦР. Плотва, густера и линь из Истринского водохранилища, озер Белое и Неро были свободны от метацеркарий *O. felineus*. По нашему мнению, это обусловлено гидрологическими особенностями водоемов. В Центральной России на реках создаются более благоприятные условия для циркуляции инвазии *O. felineus*, чем на озерах и водохранилищах.

Биологическая проба на сирийских хомяках была положительной при скармливании метацеркарий из мышц плотвы, выловленной в реке Десна Московской области. В остальных случаях биологические пробы были отрицательными, несмотря на положительную ПЦР у плотвы из реки Нара и плотвы и густеры из реки Волга. Полученные результаты можно объяснить низкой зараженностью метацеркариями *O. felineus* исследуемой рыбы и естественной резистентностью организма лабораторных животных. Выделенные метацеркарии от рыбы из реки Нары были не жизнеспособные и биологическую пробу в этом случае не проводили.

Таким образом, в настоящее время в Центральной России имеются очаги описторхоза *O. felineus* на малых реках (Десна, Нара) и на реке Волге в районе Тверской области. Интенсивность инвазии у плотвы в малых реках с возрастом уменьшается и протекает в виде моноинвазии, тогда как в реке Волга плотва и густера заражены метацеркариями нескольких видов трематод, а наличие метацеркарий *O. felineus* в данных видах можно подтверждать при помощи ПЦР, так как биологическая проба при низких концентрациях метацеркарий описторхид мало информативна. В озере Белом на востоке Москвы плотва и линь были свободны от всех метацеркарий трематод, тогда как в Истринском водохранилище Московской области у плотвы и густеры выявляли незначительное число непатогенных для человека и плотоядных метацеркарий трематод; в озере Неро Ярославской области встречались единичные метацеркарии непатогенных видов трематод.

В зону риска заражения описторхозом в Центральном регионе России могут входить любители рыбалки, члены их семей и домашние животные, а также дикие плотоядные животные. Это обстоятельство необходимо учитывать при оценке эпидемиологической и эпизоотологической ситуации в регионе. Диагноз на описторхоз необходимо проводить комплексно, учитывая морфологию возбудителя, подтверждение биологической пробой на лабораторных животных и в отдельных случаях использовать ПЦР как дополнительный метод.

Литература

1. Адиатулин И. Ф. Ветеринарно-санитарная экспертиза рыбы при описторхозе: дис. ... канд. вет. наук. Москва, 2008. 148 с.
2. Андреев О. Н., Горохов В. В., Сафиуллин Р. Т., Хрусталева А. В., Москвин А. С. Возбудитель описторхоза *Opisthorchis felineus* на территории Рязанской области // Российский паразитологический журнал. 2013. № 2. С. 6–9.
3. Брусенцов И. И., Катохин А. В., Сахаровская З. В., Сазонов А. Э., Огородова Л. М., Федорова О. С., Колчанов Н. А., Мордвинов В. А. ДНК-диагностика микст-инвазий *Opisthorchis felineus* и *Metorchis bilis* с помощью метода ПЦР // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. 2010. № 2. С. 10–13.

4. Буряк М. В. Экологические основы функционирования очагов описторхоза в условиях Центрально-Черноземной зоны на примере Курской области: дис. ... канд. биол. наук. Курск, 2009. 127 с.
5. Бэер С. А. Биология возбудителя описторхоза. Москва, 2005. – 336 с.
6. Кочетков А. В., Чемич Н. Д. Клинико-эпидемиологические особенности описторхоза в условиях Северо-Восточного региона Украины: матер. докл. научно-практической конференции студентов, молодых ученых, врачей и преподавателей «Актуальные вопросы теоретической медицины». Сумы, 2010. С. 118–119.
7. Ромашов Б. В., Ромашов В. А., Семенов В. А., Филимонова Л. В. Описторхоз в бассейне Верхнего Дона (Воронежская область): фауна описторхид, эколого-биологические закономерности циркуляции и очаговость описторхозов. Воронеж, 2005. 201 с.
8. Скрябин К. И. Трематоды животных и человека. М.: Изд-во АН СССР, 1950. Т. IV. 496 с.
9. Шибитов С. К. Описторхоз плотоядных животных в условиях Западной Сибири (распространение, патогенез, диагностика, меры борьбы): дис. ... канд. вет. наук. Москва, 2013. 147 с.
10. Методические указания по определению возбудителей гельминтозоонозов в пресноводных рыбах 04.10.99 г., № 13-4-2/1751 УТВ. Деп. ветеринарии МСХ РФ
11. Brusentsov I. I., Katokhin A. V., Brusentsova I. V., Shekhovtsov S. V., Borovikov S. N., Goncharenko G. G., Lider L. A., Romashov B. V., Rusinek O. T., Shibitov S. K., Suleymanov M. M., Yevtushenko A. V., Mordvinov V. A. Low genetic diversity in wide-spread Eurasian liver fluke *Opisthorchis felinus* suggests special demographic history of this trematode species. *PloS one*. 2013; 8(4): e62453.
12. Caffara M., Serracca L., Gustinelli A., Vencia W., Rossini I., Prearo M., Fioravanti M. L. Development and validation of species-specific molecular diagnostic tool for *Opisthorchis felinus* (Digenea, Opisthorchiidae) metacercariae. *International Journal of Food Microbiology*. 2017; 242(2): 98–100.
13. Fang Y. Y., Chen Y.-D., Li X.-M., Wu J., Zhang Qi-M., Ruan C.-W. Current prevalence of *Clonorchis sinensis* infection in endemic areas of China. *Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 2008; 26(2): 99–103, 109.
14. Neimanis A. S., Moraes C., Bergman A. et al. Emergence of the Zoonotic Biliary Trematode *Pseudamphistomum truncatum* in Grey Seals (*Halichoerus grypus*) in the Baltic Sea. *PLoS One*. 2016; Oct 18; 11(10): e0164782.
15. Pozio E., Gomez-Morales M. A. Clonorchiasis and Opisthorchiasis. *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*. Springer Vienna, 2014; 123–152.
16. Sriamporn S., Pisani P., Pipitgool V., Suwanrungruang K., Kamsa-Ard S., Parkin D. M. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Tropical Medicine & International Health*. 2004; 9(5): 588–594.

References

1. Adiatulin I. F. Veterinary-sanitary examination of fish in case of opisthorchosis: dis. ... Ph. D, Biology. Moscow, 2008; 148. (In Russ.)
2. Andreyanov O. N., Gorokhov V. V., Safiullin R. T., Khrustalev A. V., Moskvina A. S. Opisthorchosis *Opisthorchis felinus* agent in the Ryazan Region. *Rossiyskiy parazitologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Parasitology*. 2013; 2: 6–9. (In Russ.)
3. Brusentsov I. I., Katokhin A. V., Sakharovskaya Z. V., Sazonov A. E., Ogorodova L. M., Fedorova O. S., Kolchanov N. A., Mordvinov V. A. DNA diagnostics of mixed invasions *Opisthorchis felinus* and *Metorchis bilis* by the PCR method. *Meditinskaya parazitologiya i parazitarnyye bolezni = Medical parasitology and parasitic diseases*. 2010; 2: 10–13. (In Russ.)
4. Buryak M. V. Ecological bases for functioning of opisthorchosis pestholes in the Central Black Earth region by the example of the Kursk Region: dis. ... Ph. D, Biology. Kursk, 2009; 127. (In Russ.)
5. Бэер С. А. Описторхоз возбудитель биология. Москва, 2005; 336. (In Russ.)
6. Kochetkov A. V., Chemich N. D. Clinical and epidemiological aspects of opisthorchosis in the North East of Ukraine: report materials of the research and practice conference of students, young scientists, doctors and teachers “*Theoretical medicine urgent issues*”. Sумы, 2010; 118–119. (In Russ.)
7. Romashov B. V., Romashov V. A., Semenov V. A., Filimonova L. V. Opisthorchosis in the Upper Don basin (the Voronezh Region): opisthorchid flukes fauna, an ecological and biological pattern of the opisthorchosis circulation and nidality. *Voronezh*, 2005; 201. (In Russ.)
8. Skryabin K. I. Animal and human trematodes. М.: Publishing house of the USSR Academy of Sciences, 1950; IV: 496. (In Russ.)

9. Shibitov S. K. Opisthorchosis of carnivorous animals in Western Siberia (expansion, pathogenesis, diagnostics, control measures): dis. ... Ph. D, Veterinary. Moscow, 2013; 147. (In Russ.)
10. Methodology guidelines to determine helminthoosonosis agents in fresh-water fish 04.10.99, No. 13-4-2/1751 Approved by the Veterinary Department of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation.
11. Brusentsov I. I., Katokhin A. V., Brusentsova I. V., Shekhovtsov S. V., Borovikov S. N., Goncharenko G. G., Lider L. A., Romashov B. V., Rusinek O. T., Shibitov S. K., Suleymanov M. M., Yevtushenko A. V., Mordvinov V. A. Low genetic diversity in wide-spread Eurasian liver fluke *Opisthorchis felineus* suggests special demographic history of this trematode species. *PLoS one*. 2013; 8(4): e62453.
12. Caffara M., Serracca L., Gustinelli A., Vencia W., Rossini I., Prearo M., Fioravanti M. L. Development and validation of species-specific molecular diagnostic tool for *Opisthorchis felineus* (Digenea, Opisthorchiidae) metacercariae. *International Journal of Food Microbiology*. 2017; 242(2): 98–100.
13. Fang Y. Y., Chen Y.-D., Li X.-M., Wu J., Zhang Qi-M., Ruan C.-W. Current prevalence of *Clonorchis sinensis* infection in endemic areas of China. *Chinese journal of parasitology & parasitic diseases*. 2008; 26(2): 99–103, 109.
14. Neimanis A. S., Moraeus C., Bergman A. et al. Emergence of the Zoonotic Biliary Trematode *Pseudamphistomum truncatum* in Grey Seals (*Halichoerus grypus*) in the Baltic Sea. *PLoS One*. 2016; Oct 18;11(10): e0164782.
15. Pozio E., Gomez-Morales M. A. Clonorchiasis and Opisthorchiasis. *Helminth Infections and their Impact on Global Public Health*. Springer Vienna, 2014; 123–152.
16. Sriamporn S., Pisani P., Pipitgool V., Suwanrungruang K., Kamsa-Ard S., Parkin D. M. Prevalence of *Opisthorchis viverrini* infection and incidence of cholangiocarcinoma in Khon Kaen, Northeast Thailand. *Tropical Medicine & International Health*. 2004; 9(5): 588–594.