

УДК 577:636.5.614.9.4/616.3

МАРШАЛКІНА Т.В., канд. вет. наук (tet.mtv@mail.ru)

Державна установа "Інститут сільського господарства степової зони НААН України"

МЕТОДИ МОЛЕКУЛЯРНОЇ БІОТЕХНОЛОГІЇ СПЕЦИФІЧНОЇ ПРОФІЛАКТИКИ ТА ДІАГНОСТИКИ ЕЙМЕРІОЗУ У ПТАХІВНИЦТВІ

У переліку інвазійних захворювань, які завдають значних економічних збитків птахівництву, однією з актуальних проблем є еймеріоз. Наведено дані вітчизняної та зарубіжної літератури щодо класичних і сучасних методів специфічної профілактики та діагностики захворювання з акцентом на останні розробки на основі молекулярно-генетичних методів.

Ключові слова: молекулярна біологія, ДНК-вакцини, гени, еймерії, птиця.

Постановка проблеми. Птахівництво – найбільш технологічно розвинена галузь сільського господарства, здатна забезпечувати населення високоякісними дієтичними продуктами харчування та нарощувати темпи виробництва, що дає змогу зміцнити продовольчу безпеку держави. Для підтримання наявних темпів розвитку галузі необхідне забезпечення і науковий супровід ветеринарного благополуччя [1]. В умовах інтенсивних технологій ведення птахівництва з пер-ших днів життя птиця піддається впливу факторів інфекційної та неінфекційної природи, що призводить до зниження загальної неспецифічної резистентності організму і спричинює різкі морфо-функціональні зміни в організмі, які впливають на ріст і продуктивність птахів [2]. Утім слід зауважити, що, залежно від ситуації, на частку інвазійних захворювань у птахівництві припадає від 35 до 70 % збитків [3]. Нині серед паразитарних хвороб птиці особливу увагу дослідників займає еймеріоз через широке поширення та значні економічні збитки, що складаються із великої загибелі молодняку, зниження продуктивності, погіршення якості кінцевого продукту, збільшення затрат корму на одиницю продукту та витрат на лікування. У разі виникнення захворювання серед птиці смертність становить 25–40 %, знижуються середньодобові прирости на 5–10 % та конверсія корму на 7–12 % [4].

Основним засобом профілактики еймеріозу тривалий час були синтетичні препарати, але адаптація збудників до еймеріостатиків стала проблемою в усіх країнах із промисловим птахівництвом [5]. На сучасному етапі розвитку птахівництва виробники та споживачі птахівничої продукції зацікавлені в розробці програм інтегрованого контролю з впровадженням нехімічних методів боротьби з еймеріозом та отриманням екологічно безпечних продуктів харчування. Виходячи з викладеного вище, застосування вакцин стане, можливо, основним способом профілактики еймеріозу в птахівництві [6].

Специфічна профілактика. Для боротьби з еймеріозом птиці розроблено ряд вакцин з використанням живих збудників, інжекторні вакцини, а також сконструйовані на основі методів молекулярної біотехнології (ДНК-вакцини, рекомбінантні та ін.). До складу вакцин можуть входити збудники еймеріозу з природною вірулентністю. Їх використання супроводжується короткочасним введенням у корм кокцидіостатиків, щоб попередити захворювання на еймеріоз («Кокцивак», США; культура кокцидій ВНІВП, Росія та ін.). Застосування вакцин з атенуйованих збудників не потребує супроводу кокцидіостатиків та ефективно контролює захворювання («Лівакокс», Чехія; «Паракокс» Великобританія; «Імукокс» Канада) [7].

Перераховані вакцини мають як переваги, так і недоліки. Наприклад, застосування живих атенуйованих вакцин, особливо за великомасштабного птахівництва, являє небезпеку можливості реверсії вірулентності збудників, персистенції та контамінації сторонніми агентами. Вакцини, що містять збудників еймеріозу з природною вірулентністю, представляють ризик зараження поголів'я за імуносупресивних умов [8].

Субодиничні вакцини. За даними М. Jenkins [9], альтернативою вірулентним та атенуйованим є субодиничні вакцини з очищених нативних білків. Вони стабільніші, в них можна сконцентрувати антигени, що індукують «протективну» імунну відповідь. Для профілактики еймеріозу бройлерів розроблена субодинична вакцина «Коксабік» (Ізраїль), до складу якої включений комплекс білків, виділених з гаметоцитів *Eimeria maxima*, споріднених з іншими видами паразитів цього роду.

ДНК-вакцини. Можливості розшифровки послідовностей ДНК і РНК, поява різних напрямів у технології рекомбінантної ДНК відкривають нову еру в створенні більш ефективних і безпечних біопрепаратів для профілактики інфекційних та інвазійних хвороб людини і тварин. Розробка вакцин генно-інженерними методами базується на спрямованості імунної відповіді на деяку

кількість антигенних детермінант, які представляють не всю білкову молекулу, а тільки її окремі ділянки [10].

Генетична імунізація, відома як полінуклеотидна або ДНК-імунізація, представляє новий підхід до специфічної профілактики. Введення очищеного ДНК-патогену в організм птахів призводить до *in vivo* експресії гена білка, закодованого в цій ДНК. Ген клонують у плазмиду з відповідним промотором, і плазмідна ДНК вводиться в організм реципієнта. Відбувається ендogenous синтез чужорідного білка клітинами господаря, що призводить до розвитку імунної відповіді [11].

Генетична імунізація має великі переваги перед живими атенуйованими вакцинами, оскільки у разі ДНК-імунізації не відбувається реверсія вакцини до вірулентної патогенної форми та поширення в популяції. ДНК-вакцини привабні також з економічних міркувань – вони відносно легко і швидко виробляються у великих кількостях та не потребують спеціальних умов транспортування або зберігання. Такі вакцини здатні надійно захистити організм птиці від зараження патогенними збудниками [12].

Рекомбінантні ДНК-вакцини. В основі технології рекомбінантної ДНК існує можливість заміни віддаленого гена чужорідним геном. За рахунок включення в одну плазмиду генів, що кодують різні антигени, досягається протективна відповідь організму на різні види збудників еймеріозу.

Для індукції більш потужної імунної відповіді за ДНК-імунізації найбільш перспективними можуть стати біологічні ад'юванти, наприклад цитокіни. Було проведено безліч досліджень й доведено, що ін'єкція генів цитокінів може посилювати імунну відповідь на білковий антиген [13].

Останнім часом питаннями генетичної імунізації займається багато зарубіжних вчених. Так, дослідниками з Нідерландів для імунізації свійської птиці від еймеріозу було запропоновано використання поліпептиду, отриманого з *Eimeria acervulina* й присутнього у вигляді вставки в плазміді pEa1A (штам кишкової палички) [14].

Китайські вчені Нанкінського аграрного університету проводили дослідження з конструювання ДНК-вакцини, що кодує ген спорозоїтів *Eimeria acervulina* CSZ-2 з курячими цитокінами IL-2 та IFN- γ . Отримані дані вказували на синергічний ефект спільного введення цитокінів та антигену у разі захисту проти гомологічного виклику за рахунок зменшення ураження кишкової тканини, втрати маси тіла та кількості ооцист [15]. Також проведені дослідження щодо створення ДНК-вакцини з генів MZ5-7 другої генерації мерозоїтів *Eimeria tenella* та курячого інтерлейкіну IL-17, за спільної експресії яких відбувалося блокування проникнення паразитів в епітеліальні клітини кишечника [16]. Результати досліджень ряду вчених вказували на те, що курячі цитокіни (IFN- α , IFN- γ , IFN-1 β , IL-2, IL-8, IL-15 та TGF- β 4) підвищували імунну відповідь за ДНК-вакцинації проти *Eimeria acervulina* та *Eimeria tenella* [17–20].

У Харбінському Північно-Східному сільськогосподарському університеті [21] як потенційні імунорегуляторні гени були визначені поверхневі антигени 3-1E спорозоїтів та шизонтів *Eimeria acervulina*, що споріднені до інших *Eimeria spp.*

Аналогічні дослідження проводили американські вчені М. Дженкінс, П. Аллен та ін., які визначили ДНК антигенів (EASZ240, EAMZ250, EASZ22) *Eimeria acervulina* для подальшого створення ДНК-вакцини проти еймеріозу курей [22]. Канадськими науковцями розробляється метод ДНК-імунізації за допомогою рекомбінації антигенів (Chey-SO7, SC), які були виділені зі спорозоїтів *Eimeria tenella* [23].

Нині діагностика еймеріозної інвазії переважно спирається на традиційні методи – мікроскопічні дослідження фекальних зразків та оцінку ступеня ураження, незважаючи на наявність чутливих молекулярних аналізів, що пов'язано з вартістю й потребою спеціального обладнання. Хоча ефективність традиційних методів доведена часом, вони недостатньо об'єктивні у разі субклінічного захворювання та ідентифікації видів збудників. Жорстка конкуренція, яка існує в сучасному птахівництві між виробниками, та наслідки еймеріозу зумовлюють потребу у розробці чутливих, та, в першу чергу, рентабельних діагностичних методів з визначення різних видів *Eimeria* [24].

Досягнення у сфері лабораторних технологій призвели до розробки нових способів молекулярної діагностики у відповідь на ці проблеми, наприклад, полімеразна ланцюгова реакція (PCR), ДНК-дактилоскопія, випадкова ампліфікація поліморфної ДНК-ПЛІР (RAPD-PCR), а також кількісна PCR [25].

У 2011 р. англійськими та чеськими науковцями [26] була розроблена та запропонована методика цикл-опосередкованої ізотермічної ампліфікації (LAMP) для визначення семи патогенних видів *Eimeria* курей. LAMP – це простий, швидкий та відносно недорогий діагностичний метод з високим рівнем чутливості й можливістю виявлення від одного до десяти

геномів збудника. В основі методу лежить ізотермічна ампліфікація нуклеїнових кислот за допомогою термостабільного ферменту та чотирьох специфічних праймерів. У зв'язку з особливим характером дії праймерів, вихід кількості ампліфікованого продукту значно більший, ніж за звичайної *PCR*-ампліфікації. Важливо відзначити, що у *LAMP* використовують фермент ДНК-полімеразу *Bst*, яка активна в ізотермічних умовах за відносно високої температури. Ефективності реакції *LAMP* сприяє використання інтеркальованих барвників, що дозволяє ідентифікувати позитивну реакцію за зміною кольору без додаткового обладнання. Розробка панелі чутливих видоспецифічних *LAMP* аналізів сприятиме появі нового рентабельного інструменту діагностики паразитарних захворювань у птахівництві.

Висновок. Аналіз сучасного стану проблеми еймеріозу у птахівництві показав, що дуже важливим і перспективним напрямом є створення технології специфічної профілактики та диференціації патогенів на основі молекулярно-генетичних методів. Останнім часом ведеться розробка ДНК-вакцин, що містять комбінації генів, які здатні надійно захистити організм птиці проти проникнення збудників еймеріозу та модулювати утворення імунної відповіді; запропоновано нові доступні методи молекулярного скринінг-аналізу еймеріозу. Це принципово новий підхід у створенні профілактичних препаратів, який потребує ретельного вивчення не лише питань боротьби із захворюванням, але й з вирішення проблем небезпеки введення птиці чужорідної генетично зміненої ДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Терещенко О.В. Стан галузі птахівництва та перспективи її наукового забезпечення / О.В. Терещенко // Птахівництво. – 2013 : матеріали ІХ міжнар. конф. (м. Судак, АР Крим, 22–26 вересня 2013 р.). – Харків, 2013. – С. 10–15.
2. Györke A. Prevalence and distribution of *Eimeria* species in broiler chicken farms of different capacities [Електронний ресурс] / A. Györke, L. Pop, V. Cozma // *Parasite*. 2013; 20: 50. Published online 2013 December 6. – Режим доступу до журн.: <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2013052> – Назва з екрану.
3. Довгій Ю.Ю. Ефективність еймеріостатика та його вплив на організм курей за еймеріозу / Ю.Ю. Довгій, О.В. Стахівський, Д.В. Феценко // Вісник Житомир. нац. агрокол. ун-ту. – Житомир, 2011. – № 2 (29), Т. 1 – С. 185–191.
4. Сучасні тенденції діагностики та профілактики еймеріозів птиці / І.К. Авдос'єва, О.М. Щербатовська, Н.О. Сидорук, А.М. Федів // Птахівництво : міжвід. темат. наук. зб. ІТ НААН. – Харків, 2013. – Вип. 69. – С. 5–15.
5. Гиско В. Н. Изучение профилактической эффективности препаратов максибан и сакокс при эймериозе птиц / В.Н. Гиско, А.В. Сандул // Материалы III науч.-практ. конф. Междунар. ассоциации паразитологов, Витебск, 14–17 окт. 2008 г. – Витебск, 2008. – Т. 1. – С. 51–52.
6. Маршалкіна Т.В. Еймеріоз курей, розробка імунізуючого препарату із *Eimeria tenella* (Railliet, Lucet, 1891) з прискореним циклом розвитку: дис. на здобуття наук. ступеня. канд. вет. наук: 16.00.11 «Паразитологія» / Т.В. Маршалкіна. – Київ, 2011. – 127 с.
7. Еймеріоз свійської птиці у господарствах центральних областей України, заходи боротьби і профілактики // [Л.С. Короленко, В.А. Веселий, І.І. Коваленко та ін.] // Вет. медицина України. – 2012. – № 4. – С. 21–22.
8. Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge / [D. Ma, C. Ma, L. Pan et al.] // *Experimental Parasitology*. – 2011. – Vol. 127. – P. 208–214.
9. Jenkins M. Advances and prospects for subunit vaccines against protozoa of veterinary importance / M. Jenkins // *Veter. Parasitol.* – 2001. – Vol. 101. – P. 291–310.
10. Wallach M. Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis / M. Wallach // *Trends in Parasitology*. – 2010. – Vol. 26. – P. 382–387.
11. Дмитриева М. Создание иммунобиологических препаратов с использованием методов нанобиотехнологий [Електронний ресурс] / М. Дмитриева. – Санкт-Петербург, сайт ГНУ ВНИВИП Россельхозакадемии. Опубликовано онлайн 17.03.2011. – Режим доступу до статті: <http://www.vnivip.ru/scientific-effort/articles/sozdanie-immuno-biologicheskikh-preparatov-s-ispolzovaniem-metodov-nanobiotehnologii> – Назва з екрану.
12. A survey of the economic impact of subclinical *Eimeria* infections in broiler chickens in Norway / A. Haug, A.G. Gjevre, E. Skjerve, M. Kaldhusdal // *Avian Pathol.* – 2008. – Vol. 37(3). – P. 333–341.
13. Embryo vaccination of chickens using a novel adjuvant formulation stimulates protective immunity against *Eimeria maxima* infection / [S.H. Lee, H.S. Lillehoj, S.I. Jang et al.] // *Vaccine*. – 2010. – Vol. 28. – P. 7774–7778.
14. Induction of Cellular Immune Response by DNA Vaccine Coexpressing *E. acervulina* 3-1E Gene and Mature CHIL-15 Gene / [D. Ma, Ch. Ma, M. Gao et al.] // *Journal of Parasitology Research*. – 2012. – Vol. 12. – P. 65–72.
15. Construction of DNA vaccines encoding *Eimeria acervulina* cSZ-2 with chicken IL-2 and IFN- γ and their efficacy against poultry coccidiosis / [M.A. Shah, X. Song, L. Xu et al.] // *Res Vet Sci*. – 2011. – Vol. 90(1). – P. 2–7.
16. Vaccination of chickens with DNA vaccine expressing *Eimeria tenella* MZ5-7 against coccidiosis / Geriletu, L. Xu, Xurihua, X. Li // *Vet. Parasitol.* – 2011. – Vol. 177. – P. 6–12.
17. IL-18 stimulates the proliferation and IFN- γ release of CD4+ T cells in the chicken: conservation of a Th1-like system in a nonmammalian species / [T. W. Göbel, K. Schneider, B. Schaerer et al.] // *Journal of Immunology*. – 2003. – Vol. 171. – P. 1809–1815.
18. Protective immunity against *Eimeria acervulina* following in ovo immunization with a recombinant subunit vaccine and cytokine genes / [X. Ding, H. S. Lillehoj, M. A. Quiroz et al.] // *Infection and Immunity*. – 2004. – Vol. 72. – P. 6939–6944.
19. Resistance to intestinal coccidiosis following DNA immunization with the cloned 3-1E *Eimeria* gene plus IL-2, IL-15 and IFN- γ / [H.S. Lillehoj, X. Ding, M. A. Quiroz et al.] // *Avian Diseases*. – 2005. – Vol. 49. – P. 112–117.

20. Xu S. Protective immunity enhanced by chimeric DNA prime-protein booster strategy against *Eimeria tenella* challenge / S. Xu, Z. T. Chen, M. Wang // *Avian Diseases*. – 2006. – Vol. 50. – P. 579–585.
21. Vaccination of chickens with DNA vaccine encoding *Eimeria acervulina* 3-1E and chicken IL-15 offers protection against homologous challenge / [D. Ma, C. Ma, L. Pan et al.] // *Experimental Parasitology*. – 2011. – Vol. 127. – P. 208–214.
22. Immunization of Chickens with Plasmid DNA Encoding Recombinant *Eimeria Acervulina* Antigen Via Jet-Gun Injection Elicits Protective Immunity Against Coccidiosis [Електронний ресурс] / M. Jenkins, P. Allen, H. Danforth, P. Augustine // server United States D United States Department of Agriculture. Published online 1998 August 28. – Режим доступу до статті http://www.canalpoint.sugarcane.usda.gov/research/publications/publications.htm?SEQ_NO_115=95226 – Назва з екрану.
23. Kopko S.H. Responses of chickens to a recombinant refractile bodyantigen of *Eimeria tenella* administered using various immunizing strategies / S.H. Kopko, D.S. Martin, J.R. Barta // *Poult. Sci.* – 2000. – Vol. 79(3). – P. 336–342.
24. Vrba V. Quantitative real-time PCR assays for detection and quantification of all seven *Eimeria* species that infect the chicken / V. Vrba, D.P. Blake, M. Poplstein // *Vet Parasitol.* – 2010. – Vol. 174(34). – P. 183-190.
25. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue / [M. Goto, E. Honda, A. Ogura et al.] // *BioTechniques* – 2009. – Vol. 46(3). – P. 167–172.
26. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the species-specific detection of *Eimeria* that infect chickens [Електронний ресурс] / C. P. Barkway, R. L. Pocock, V. Vrba, D. P. Blake // *BMC Veterinary Research*. Published online 2011 November 3. – Режим доступу до статті: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/67> – Назва з екрану.

Методы молекулярной биотехнологии специфической профилактики и диагностики эймериоза в птицеводстве

Т.В. Маршалкина

В статье дан перечень инвазионных заболеваний, наносящих значительный экономический ущерб птицеводству. Одной из актуальных проблем является эймериоз. Приведены данные отечественной и зарубежной литературы относительно классических и современных методов профилактики и диагностики заболевания, акцентируется внимание на последних разработках, в основе которых лежат молекулярно-генетические методы.

Ключевые слова: молекулярная биология, ДНК-вакцины, гены, эймерии, птица.