

Адамбаева
Акмарал Ауелхановна

**АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА VOLA-DRB3 В СВЯЗИ
С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К БРУЦЕЛЛЕЗУ И РАЗРАБОТКА
КОМПЛЕКСНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ
БРУЦЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Брянский государственный университет имени академика И.Г. Петровского»

Научный руководитель **Нам Ирина Ян Гуковна**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты **Будулов Нурдин Рагимханович** – доктор ветеринарных наук, главный научный сотрудник Прикаспийского зонального научно-исследовательского ветеринарного института – филиал ФГБНУ «Федеральный аграрный научный центр Республики Дагестан»
Гордиенко Любовь Николаевна – кандидат ветеринарных наук, заведующая отделом ветеринарии и животноводства ФГБНУ «Омский аграрный научный центр»

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Краснодарский научный центр по зоотехнии и ветеринарии»

Защита диссертации состоится «24» декабря 2024 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета 35.2.016.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <http://www.kazanveterinary.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г. и размещен на сайтах: <http://www.vak.minobrnauki.gov.ru> и <http://www.kazanveterinary.ru>

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор ветеринарных наук

Юлия Вадимовна Ларина

1 Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. Проблема ликвидации бруцеллеза имеет важнейшее значение для ветеринарной медицины и здравоохранения России и Казахстана. Научно-обоснованная система противобруцеллезных мероприятий позволила в 80-х – 90-х годах прошлого столетия успешно оздоровить большинство регионов этих стран. Но в связи с изменившимися экономическими отношениями и хозяйственной реструктуризацией в аграрном комплексе заболеваемость бруцеллезом в последние десятилетия динамично возрастает, особенно среди животных крестьянско-фермерских и личных подсобных хозяйств Южного, Сибирского и Дальневосточного федеральных округов России и большинства районов Казахстана. В отдельных неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах этих областей уровень поражения коров может достигать 20-25% и выше. Бруцеллез вызывает огромные экономические потери в животноводстве в связи с необходимостью масштабного проведения противобруцеллезных мероприятий и выбраковки больных животных.

Широкое распространение бруцеллеза имеет высокую социальную значимость, так как возбудители бруцеллеза коров и овец – бактерии *Brucella abortus* и *Brucella melitensis*, способны поражать человека. Особенно сложное протекание болезни и высокая летальность наблюдается при поражении бруцеллезом детей. По данным FAO/ВОЗ летальность у зараженных людей бруцеллезом может достигать 2-5%. Ежегодно регистрируются свежие случаи заболевания людей острой формой бруцеллёза, заболеваемость людей коррелирует с уровнем поражения бруцеллезом крупного и мелкого рогатого скота. Поэтому своевременное выявление и выбраковка подверженных заболеванию бруцеллезом коров имеет важнейшее социальное значение.

В селекции и разведении животных в ведущих странах мира в последние десятилетия используются молекулярно-генетические маркеры хозяйственно ценных признаков, а также ДНК-маркеры для выявления генетических нарушений, приводящих к заболеваниям животных. Однако в мировой научной литературе не найдено публикаций о применении молекулярно-генетических подходов для поиска ДНК-маркеров для оздоровления крупного рогатого скота от бруцеллеза и для проведения селекции на генетическую устойчивость к этой болезни.

В настоящее время мероприятия по оздоровлению стада от бруцеллеза основаны на систематических диагностических исследованиях поголовья КРС, при этом для диагностики бруцеллеза используются серологические методы исследования. Однако существующие тест-системы для диагностики бруцеллеза показывают недостаточную эффективность выявления больных животных. Вследствие ложноотрицательных реакций бруцеллоносители остаются в стаде, они являются источником инфекции, что не позволяет оздоровить стада от бруцеллеза.

Предлагаемые подходы для решения проблемы. Для оздоровления поголовья крупного рогатого скота от бруцеллеза предполагается использовать два взаимодополняющих подхода:

- поиск аллелей гена VoLA-DRB3, связанных с устойчивостью и восприимчивостью животных к бруцеллезу, с целью использования их в селекции и разведении КРС в качестве ДНК-маркеров для отбора генетически устойчивых к бруцеллезу животных, что позволит создавать стада животных, генетически устойчивых к бруцеллезу;

- улучшение диагностики бруцеллеза путем создания комплексного антигена, способного выявлять хронические и скрытые формы бруцеллеза, в том числе вызываемые диссоциированными формами бруцелл.

Степень разработанности темы исследования. Генетический полиморфизм популяций разных пород коров по гену VoLA-DRB3 определяет генетическую устойчивость животных к различным патогенам, циркулирующим в популяциях разных регионов. Многочисленными исследованиями показано, что ген VoLA-DRB3, имеющий очень высокий уровень аллельного полиморфизма, связан с устойчивостью и восприимчивостью животных к вирусу лейкоза КРС, гемобластозам, маститам, туберкулезу, паразитарным болезням, вирусной диарее, а также некоторым паразитам. Однако подобные исследования в отношении генетической устойчивости к бруцеллезу не проводились, публикации на эту тему отсутствуют в научной литературе как стран СНГ, так и дальнего зарубежья.

Для диагностики бруцеллеза существуют стандартные наборы и антигены, рекомендованные к применению в разных государствах. Но при этом существует возможность их дальнейшего совершенствования, в частности показано, что в ряде случаев стандартные методы не выявляют инфицирования бруцеллой.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является совершенствование методов борьбы с распространением бруцеллеза с помощью сочетания двух подходов:

- разработка ДНК-маркеров для отбора генетически устойчивых к бруцеллезу животных на основе аллелей гена VoLA-DRB3, связанных с устойчивостью и восприимчивостью животных к бруцеллезу, для их использования в селекции и разведении КРС путем отбора животных аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород, генетически устойчивых к бруцеллезу;

- улучшение диагностики бруцеллеза путем создания комплексного антигена, способного выявлять хронические и скрытые формы бруцеллеза, в том числе вызываемые диссоциированными формами бруцелл.

Задачи исследования:

- формирование достаточно представительных экспериментальных групп здоровых и инфицированных животных из одних и тех же районов для аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород;

- исследование аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у больных и здоровых коров разных пород КРС;

- выявление особенностей аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у больных и здоровых животных, и выделение возможных аллелей устойчивости или восприимчивости к бруцеллезу у коров аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород;

- разработка рекомендаций по применению полученных результатов при оздоровительных и профилактических противобруцеллезных мероприятиях, формированию стад с повышенным уровнем генетической резистентности;

- получение и изучение измененных форм бруцелл и бруцеллофагов, для разработки нового более эффективного комплексного антигена для серологической диагностики бруцеллеза;

- разработка и доказательство эффективности нового антигена.

Научная новизна работы. В работе используются современные методы и подходы. Впервые в мире на основе молекулярно-генетического анализа аллельного разнообразия гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных животных разных пород крупного рогатого скота были определены аллели этого гена, достоверно связанные с устойчивостью и восприимчивостью к бруцеллёзу. Выявленные аллели могут служить ДНК-маркерами в селекции и разведении животных, генетически устойчивых к бруцеллезу.

Был создан новый комплексный антиген на основе новых форм бруцелл и бруцеллофагов, которые образовались после ультрафиолетового облучения. При серологической диагностике он демонстрирует повышение выявления зараженных животных на 38% по сравнению со стандартным антигеном, который в случае хронической формы бруцеллеза дает ложноотрицательные результаты. Новизна полученных штаммов бактерий и фагов, а также комплексного антигена на их основе подтверждена авторскими свидетельствами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты подтверждают ведущую роль генов комплекса гистосовместимости II типа в формировании иммунитета животных к разным заболеваниям и, в частности, вносят существенный вклад в понимание механизма формирования генетической устойчивости у вида *Bos taurus* к бруцеллезу, что имеет важное значение для ветеринарии и генетики качественных и количественных признаков КРС.

Получение и изучение нового антигена подтвердило преимущества комплексного типа антигена на основе бруцелл и бруцеллофагов для выявления инфицированности животных серологическими методами.

Практическая значимость. Обнаружение аллелей гена BoLA-DRB3, достоверно связанных с формированием генетической устойчивости и восприимчивости к бруцеллёзу позволяет, используя эти молекулярные маркеры, создавать стада животных с генетической устойчивостью к этой опасной болезни, что важно не только для ветеринарии, но также имеет большое социальное значение для здоровья человека.

Повышение с помощью предложенного комплексного антигена уровня выявления инфицированных животных на 38% имеет принципиальное значение для ветеринарных мероприятий, поскольку ложноотрицательные результаты не позволяют избавиться от больных животных, что сильно затрудняет борьбу с распространением инфекции.

Внедрение результатов в производство позволит повысить эпидемическую, эпизоотическую и экономическую эффективность противобруцеллезных мероприятий.

Основные положения, выносимые на защиту.

- Аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* в группах больных и здоровых коров аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород КРС, данные по частоте распределения разных аллелей, мажорные аллели по каждой группе животных;

- ДНК-маркеры устойчивости или чувствительности к бруцеллезу, аллели гена *BoLA-DRB3*, связанные с устойчивостью или чувствительностью к бруцеллезу, их доминирование у больных и здоровых животных аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород;

- Антиген для серологической диагностики бруцеллеза, содержащий измененные формы бруцелл и бруцеллофаги, способный выявлять хронические и скрытые формы бруцеллеза на 38% эффективнее контроля.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты доложены на конференциях: II Международной научно-практ. конференции молодых ученых «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых», пос. Краснообск, 2006; Международной научно-практ. конференции «Научное обеспечение развития агропромышленного комплекса стран таможенного союза», Астана, 2010; I Евразийской научно-практ.конференции «Инновационные агробiotехнологии в животноводстве и ветеринарной медицине», Санкт-Петербург, 2015; III Евразийской конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты клеточной биотехнологии и молекулярной генетики в племенном животноводстве стран ЕАЭС», г. Брянск, 2016; III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», г. Минск, 2016; Евразийской конференции «Управление инновациями в агропромышленном комплексе стран Евразийского экономического союза: развитие агроиндустрии и агроинжиниринга для перехода к цифровой экономике», Санкт-Петербург, 2018; Деловая программа «Управление инновациями в аграрном секторе экономики». Санкт-Петербург, 2021; X Международный экономический форум «Инновации. Инвестиции. Перспективы». Витебск, 2022.

Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК и 2 - в журналах базы Web of Science.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 179 страницах, состоит из следующих разделов: введение, литературный обзор, материалы и методы исследований, результаты и обсуждение, заключение,

выводы, рекомендации производству, список литературы. Работа содержит 42 таблицы, 11 рисунков, 10 приложений. Список цитируемой литературы содержит 157 источников, из них 36 на английском языке.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность д.б.н. И.Я. Нам и д.б.н., проф. В.В. Заякину за консультации и помощь в написании диссертации, и признательность коллективу ИННО-биотехнологии и экологии БГУ за помощь в выполнении работы.

2 Собственные исследования

2.1 Материалы и методы исследования

Настоящая работа была проведена на образцах ДНК здоровых и больных бруцеллезом животных трех пород КРС: аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород, из разных регионов Казахстана. В исследовании использован метод ПЦР-ПДРФ для проведения молекулярно-генетического анализа гена *BoLA-DRB3* и определения аллельного полиморфизма животных. Проведен сравнительный анализ частот разных аллелей и выявлены аллели чувствительности и устойчивости к бруцеллезу у больных и здоровых коров различных пород для использования их в качестве ДНК-маркеров в селекции и разведении КРС.

Создание комплексного антигена включает получение стабильных диссоциантов под воздействием внешних факторов, получение специфического бруцеллезного бактериофага нового типа, с применением серологических, бактериологических методов исследования. При конструировании комплексного диагностикума, содержащего измененные формы бруцелл и специфические фаги, использовались методы, применяемые в бактериофагии. Комплексный антиген конструировали путем адсорбции фага на клетках штамма *B.abortus 0071B* (R-форма) из расчета 100 фаговых корпускул на 1 бактерию и после инактивации, созревания и разведения получали целевой продукт.

Настоящая работа была проведена на образцах ДНК животных трех пород крупного рогатого скота: аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород, из следующих регионов Республики Казахстан: Западно-Казахстанской области, Карагандинской области, Костанайской области, Восточно-Казахстанской области и Алматинской областей:

1) взрослые здоровые животные: 180 образцов, в том числе аулиекольской - 84 гол., казахской белоголовой - 73 гол., и голштинской - 23 гол.

2) взрослые животные, больные бруцеллезом: 159 образцов, в том числе аулиекольской - 74 гол., казахской белоголовой - 73 гол., и голштинской - 12 гол.

2.2 Аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* у здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы

Аулиекольская порода относится к мясному направлению и была выведена на основе казахской белоголовой, шарале и абердин-ангусов.

На образцах ДНК аулиекольской породы было проведено исследование аллельного полиморфизма гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных коров с целью выявления аллелей, ассоциированных с устойчивостью или чувствительностью к бруцеллезу. Для здоровых коров и бруцеллоносителей были получены рестриктные спектры и определены аллели и генотипы гена VoLA-DRB3. Изучение аллельного полиморфизма выявило 24 аллеля у здоровых коров (84 образца) и 22 аллеля в группе больных бруцеллезом коров (74 образца), частоты встречаемости разных аллелей в геномах здоровых коров и бруцеллоносителей представлены на рисунке 1.

Представленные на рисунке результаты позволяют сравнить аллельный полиморфизм гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы, а также определить наиболее распространенные аллели в обеих группах и сравнить их между собой по частоте встречаемости в популяции.

Как видно на рисунке 1, у группы здоровых животных выявлено 24 разных аллеля, в группе больных коров - 22 аллеля. При этом частота аллелей варьирует от 16.2% для аллеля 7* у больных коров до 0 – для девяти разных аллелей, которые отсутствуют у здоровых (14*, 15*, 34*) и больных (8*, 22*, 23*, 27*, 32, 33*) коров.

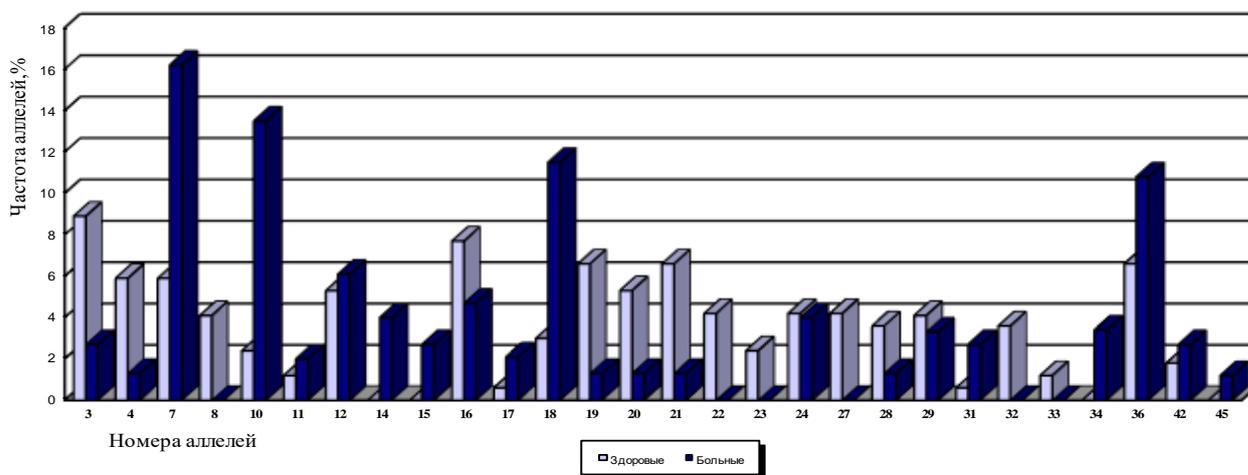


Рисунок 1 - Частота аллелей гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных коров аулиекольской породы

В таблице 1 показаны наиболее часто встречающиеся у здоровых и больных бруцеллезом коров аллели гена VoLA-DRB3, различие в частотах которых статистически достоверно.

Таблица 1 - Наиболее распространенные аллели гена BoLA-DBD3 у здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы КРС

Тип аллелей	Аллели, %	Здоровые коровы	Больные коровы
Аллели здоровых коров (У - Устойчивость)	3	8.9 ± 2.2 *	2.7 ± 1.3
	4	5.9 ± 1.8*	1.3 ± 0.93
	19	6.6 ± 1.9*	1.3 ± 0.93
	21	6.6 ± 1.9*	1.3 ± 0.93
Аллели больных коров (Ч - Чувствительность)	7	5.9 ± 1.8	16.2 ± 3.02 **
	10	2.4 ± 1.2	13,5 ± 2.8 **
	18	3.6 ± 1.4	11.5 ± 2.6 **

* - различие между группами достоверно для уровня значимости 0.9

** - различие между группами достоверно для уровня значимости 0.95

Таким образом, результаты, представленные в таблице 1, позволяют сделать достоверный вывод о наличии аллелей гена BoLA-DBD3, преимущественно распространенных у здоровых коров (*3, *4, *19, *21) и бруцеллоносителей (*7, *10, *18).

Анализ обеих групп коров на наличие в них аллелей У показал, что 42 здоровые коровы (49.9%) имеют аллели устойчивости *3, *4, *19, *21. При этом у 36 коров эти аллели встречаются в гетерозиготном состоянии в сочетании с нейтральными аллелями, у 6 здоровых коров обнаружено сочетание аллелей *3/*4, *3/*21 и *4/*21, животные с гомозиготами по аллелям У не выявлены.

У больных коров аллели У (*4, *19) выявлены у всего у 7 (9.5%) коров: у 4 коров в гетерозиготном состоянии с нейтральными аллелями У/Н и в гомозиготном состоянии (21/21 и 3/3) – у 2 коров.

Таким образом, можно сделать вывод, что аллели *3, *4, *19, *21 связаны с устойчивостью коров аулиекольской породы к бруцеллезу, но не полностью защищают животных от болезни.

Аллели чувствительности *7, *10, *18 выявлены у 51.5% больных коров. При этом 18.9% коров имеют аллели Ч гетерозиготном состоянии Ч/Н, и наиболее часто встречается аллель *10 (у 11 особей). Аллели Ч/Ч в гомозиготном и сочетанном состоянии выявлены у 24 (32.6%) коров, из них 9 особей имеют генотип *7/*7, 5 голов – генотип *10/*10 и 7 коров – генотип *18/*18.

В группе здоровых животных аллели чувствительности *7, *10, *18 присутствуют у 18 (21.5%) особей, большая часть коров имеет генотип Ч/Н - 20.3%, при этом наиболее распространенным является аллель *7 – 10 (11.9%) коров. В этой группе животных с гомозиготами Ч/Ч не обнаружено, лишь одна корова имеет генотип *10/*18.

Распределение аллелей устойчивости и чувствительности к бруцеллезу в группах здоровых и больных коров аулиекольской породы показано в таблице 2.

Таблица 2 - Частота аллелей У и Ч здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы

Группа животных	Встречаемость аллелей У и Ч			
	У	У/У	Ч	Ч/Ч
Здоровые коровы	36 (42.8%)	6 (7.1%)	17 (20.3%)	1 (1.2%)
Больные коровы	4 95.4%)	3 (4.1%)	14 (18.9%)	24 (32.6%)

Важным является вопрос о взаимодействии аллелей устойчивости и чувствительности, если они одновременно присутствуют в генотипе животного: в группе здоровых животных выявлено одно с генотипом *4/*7, в то же время в группе больных животных не выявлено ни одного животного с генотипом У/Ч. Это подтверждает вывод о доминировании аллелей устойчивости У.

Таким образом, экспериментальные данные позволяют сделать для аулиекольской породы следующие статистически достоверные выводы:

- аллели *3, *4, *19, *21 связаны с устойчивостью и могут защищать животных от возбудителя, хоть и не в полном объеме (у больных коров эти аллели встречаются с частотой всего 9.5%);

- аллели *7, *10, *18 связаны с чувствительностью к бруцеллезу, сочетание аллелей Ч/Ч практически всегда приводит к заболеванию коров; аллели чувствительности действительно связаны с развитием инфекционного процесса и заболеваемостью коров бруцеллезом, подавлении ими защитной реакции к бруцеллезу.

2.3. Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы

Казахская белоголовая порода была выведена на основе местных пород крупного рогатого скота и герефордов, она относится к мясному направлению. Изучение аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 выявило 23 аллеля у здоровых и 21 аллель у больных бруцеллезом коров. Частоты встречаемости разных аллелей в геномах здоровых коров и бруцеллоносителей казахской белоголовой породы КРС представлены на рис.2

Сравнение спектров аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у здоровых и пораженных бруцеллезом животных казахской белоголовой породы выявило существенные различия в частоте и комбинации аллелей, а также наличие некоторых аллелей, преимущественно встречающихся у здоровых и больных животных.

На рисунке 2 видно, что у здоровых коров чаще всего встречаются аллели *3 (8.2%), *7 (8.9%), *8 (6.2%) и *21 и *36 (по 6.8%). Эти аллели распределены в популяции относительно равномерно.

В группе бруцеллоносителей чаще всего встречаются аллели *7 (20.5%), *11 (9.6%), *16 (15.1%) и *18 (6.8%). На эти 4 аллеля приходится 52% всех аллелей, особенно часто встречается аллель *7. Частота встречаемости остальных аллелей не превышает 4.2%.

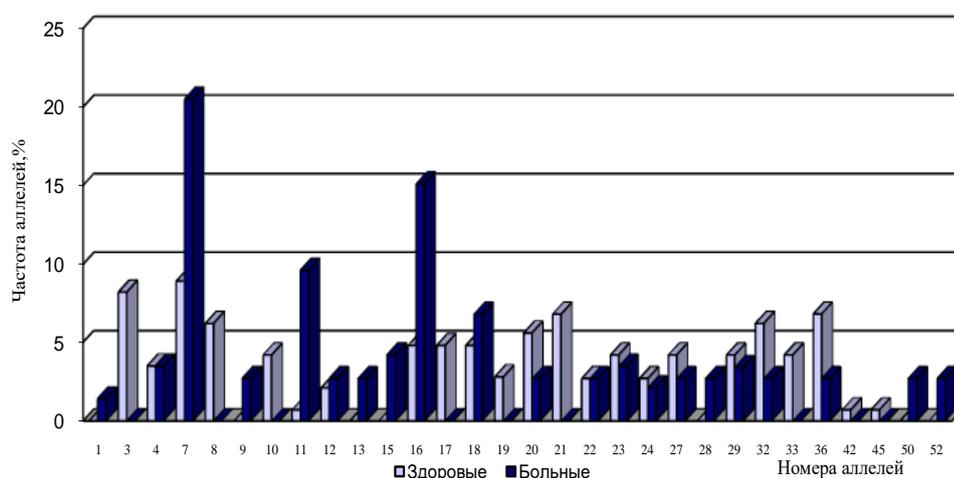


Рисунок 2 - Частота аллелей гена BoLA-DRB3 у здоровых коров и бруцеллоносителей казахской белоголовой породы

В таблице 3 показаны наиболее распространенные аллели гена BoLA-DRB3 в группах здоровых коров и бруцеллоносителей и приведены данные статистической обработки для выделения аллелей, достоверно различающихся по частоте встречаемости в двух группах коров.

Таблица 3 - Наиболее распространенные аллели гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных коров казахской белоголовой породы

Тип аллелей	Аллели, %	Здоровые коровы	Больные коровы
Аллели здоровых коров (У - устойчивость)	3	8.2 ± 2.2**	0
	8	6.2 ± 1.9 *	0
	21	6.8 ± 2.1**	0
	32	6.2 ± 1.9	2.7 ± 1.3
	36	6.8 ± 2.1	2.7 ± 1.3
Аллели больных коров (Ч - Чувствительность)	7	8.9 ± 2.3	20.5 ± 3.3 **
	11	0.7 ± 0.6	9.6 ± 2.4 **
	16	4.8 ± 1.8	15.1 ± 3.0 **
	18	4.2 ± 1.6	6.8 ± 2.1

* - различие между группами достоверно для уровня значимости 0.9

** - различие между группами достоверно для уровня значимости 0.95

Как следует из данных таблицы 3, аллели *3, *8, *21 достоверно преобладают в группе здоровых коров казахской белоголовой породы, что свидетельствует о том, что эти аллели могут быть связаны с формированием устойчивости к бруцеллезу.

В группе больных бруцеллезом коров статистическая достоверность различий в частоте встречаемости показана только для аллелей *7, *11, *16. В

группе здоровых коров эти аллели также выявляются, но с меньшей частотой. Можно предположить, что эти аллели подавляют защитную реакцию.

Анализ генотипов животных в группах здоровых и больных коров по распределению аллелей У и Ч показал, что аллели У (*3, *8, *21) встречаются у 29 особей (39.7%), аллели *3 и *21 - у 10 коров, аллель *8 – у 7 коров. Две коровы имеют генотип *3/*8, гомозиготы У/У не выявлены.

В группе больных коров ни одного животного с аллелями У не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о доминантном характере аллелей У, причем они даже в гетерозиготном состоянии обеспечивают иммунитет к бруцеллезу.

Анализ распределения аллелей чувствительности к бруцеллезу Ч в группах здоровых коров и бруцеллоносителей показал, что из 73 больных особей 37 (50.5%) несут аллели Ч, причем большая часть – 21 корова, в гомозиготном состоянии, у 8 коров генотипы имеют сочетания Ч/Ч. В гетерозиготном состоянии Ч/Н аллели Ч выявлены у 8 коров.

Аллели Ч встречаются и у здоровых коров, преимущественно в гетерозиготном состоянии Ч/Н (19 особей – 26%). Чаще всего встречается аллель *7 (у 12 коров) и *16 – у 6 коров. Гомозиготы У/У в здоровой популяции не выявлены, лишь одна корова имеет генотип *7/*16.

Данные по частотам аллелей У и Ч в гомозиготной и гетерозиготной форме представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Частота аллелей У и Ч здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы

Группа животных	Встречаемость аллелей У и Ч			
	У	У/У	Ч	Ч/Ч
Здоровые коровы	27 (37%)	2 (2.7%)	19 (26%)	1 (1.4%)
Больные коровы	0	0	8 (10.9%)	29 (39.6%)

Данные таблицы 4 позволяют сделать вывод, что аллели устойчивости *3, *8, *21 оказывают защитное действие при контакте с бруцеллой, и для его проявления достаточно одной дозы гена, то есть эти аллели имеют доминантный характер.

Аллели чувствительности *7, *11, *16 гомозиготном состоянии или в сочетании Ч/Ч могут вызывать подавление иммунитета к бруцеллезу. В гетерозиготном состоянии действие этих аллелей слабее и не имеет такой четкой определенности.

Важным является вопрос о взаимодействии аллелей устойчивости У и чувствительности Ч, если они встречаются в генотипе одного животного. В группе здоровых коров имеется две особи с генотипом *3/*16 и одна особь с генотипом *11/*21, то есть аллели устойчивости оказываются сильнее аллелей чувствительности. В то же время в группе больных животных не выявлено ни одного животного с генотипом У/Ч, что подтверждает вывод о доминировании признака У.

Таким образом, экспериментальные данные позволяют сделать следующие статистически достоверные выводы для казахской белоголовой породы:

- аллели 3, *8, *21 связаны с устойчивостью казахской белоголовой породы к бруцеллезу, они могут защищать животных от возбудителя, они имеют доминантный характер;

- аллели чувствительности *7, *11, *16 могут подавлять процесс формирования иммунитета к возбудителю бруцеллеза, они действуют в гомозиготном и гетерозиготном состоянии, их действие зависит от дозы гена и усиливается в сочетании Ч/Ч.

2.4 Аллельный полиморфизм гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы

Голштинская порода является самой распространенной в мире породой молочного направления. В селекции крупного рогатого скота многих странах мира для повышения молочной продуктивности местных пород КРС проводится голштинизация, при этом повышается молочная продуктивность коров, и селекционный процесс не всегда направлен на отбор гибридных животных, сохраняющих высокую приспособляемость к местным условиям.

В Республике Казахстан некоторые крупные агрофирмы используют голштинский скот для получения товарного молока. Бруцеллез коров выявляется в этих хозяйствах в исключительных случаях, поэтому группа исследованных больных коров - голштинок составляет всего 12 коров. В контрольной группе было проанализировано 23 образца.

При определении генотипов гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы было выявлено 11 аллелей у 23 здоровых коров, 10 аллелей в группе больных коров обнаружено всего. Частоты аллелей для двух групп животных представлены на рисунке 3.

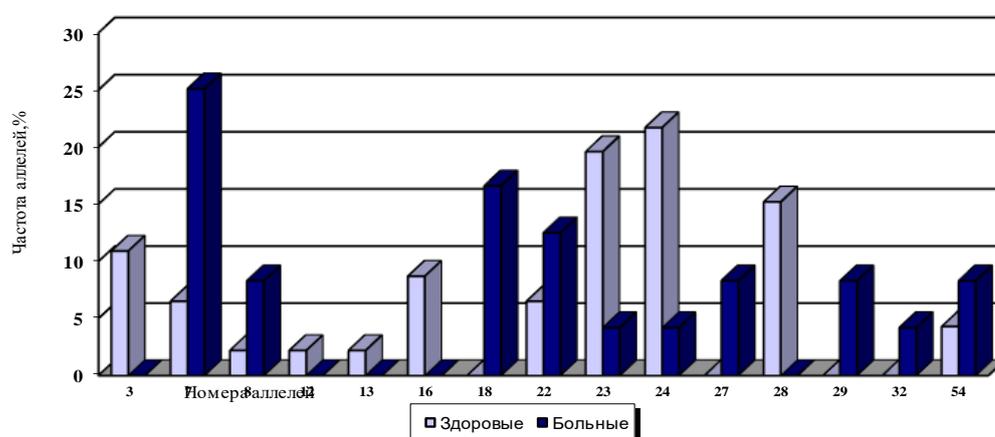


Рисунок 3 - Частота аллелей гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных коров голштинской породы

Как видно на рисунке 3, у здоровых коров чаще всего встречаются аллели *24, *23, *28 и *3. У больных коров наиболее частыми являются аллели *7 (25.1%), *18 (16.6%), *22 (12.5%).

Статистический анализ достоверности различия в частоте встречаемости этих аллелей в двух группах коров голштинской породы аллели показан в таблице 5. Здоровые и больные животные были проанализированы на наличие аллелей У и Ч.

Сравнение частоты встречаемости аллелей У (*24, *23, *28 и *3) в обеих группах коров показало, что у здоровых животных 18 особей из 23 (78.3%) несут аллели У в гетерозиготном состоянии (5), гомозиготном (5) и в сочетании У/У (8).

Таблица 5 - Наиболее распространенные аллели BoLA-DBD3 у здоровых и больных коров голштинской породы КРС

Тип аллелей	№ аллеля	Частота аллелей	
		Здоровые коровы	Больные коровы
Аллели У здоровых коров	3	10.9 ± 4.6*	0
	23	19.6 ± 5.8*	4.2 ± 4.0
	24	21.7 ± 6.0*	4.2 ± 4.0
	28	15.2 ± 5.2*	0
Аллели Ч больных коров	7	6.5 ± 3.6	25.1 ± 8.8*
	18	0	16.6 ± 7.5*
	22	6.5 ± 3.6	12.5 ± 6.7

* - различие между группами достоверно для уровня значимости 0.9

У больных коров аллели У в гетерозиготном состоянии не выявлены ни у одного животного, 1 особь несет сочетание 23/24.

Сравнение по аллелям чувствительности Ч здоровых и больных коров голштинской породы показало, что половина больных коров несет аллели Ч, при этом в гетерозиготном состоянии аллели Ч/Ч выявлены у 2 коров (*18/Н) и в гомозиготном состоянии *7/*7 у 3 коров и *18/*18 – у одной особи. В группе из 23 здоровых коров выявлено по одному животному, несущему *7 и *7/*7.

Таким образом, для голштинской породы экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы:

- аллели *3, *23, *24, *28 связаны с устойчивостью и могут защищать животных от возбудителя, хоть и не в полном объеме (из больных коров одна корова имела сочетание *23/*24);

- аллели *7 и *18 могут быть связаны с чувствительностью к бруцеллезу.

Из-за недостаточной выборки больных животных более определенные выводы сделать сложно.

2.5 Сравнение генотипов и аллельного полиморфизма спектров гена BoLA-DRB3 у пород коров Казахстана в связи с устойчивостью – восприимчивостью к бруцеллезу

Важнейшей характеристикой популяции является генетического разнообразие входящих в нее особей. Для оценки биоразнообразия необходимо использовать системы, отличающиеся высоким полиморфизмом входящих в них генов. Система BoLA отличается высокой полиморфностью генов: ген BoLA-DRB3 имеет около 100 аллелей, и аллельный полиморфизм этого гена служит важным показателем адаптивности популяций, отвечая за формирование устойчивости или чувствительности к инфекционным заболеваниям.

Показатели аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 также могут служить характеристикой адаптивного потенциала: у аулиекольской породы 24 аллеля у здоровых и 22 аллеля у больных бруцеллезом коров; у казахской белоголовой породы - 23 аллеля у здоровых и 21 аллель у бруцеллоносителей; у голштинской породы - 11 аллелей у здоровых и 10 аллелей у бруцеллоносителей. То есть полиморфизм популяций коров двух мясных пород казахской селекции достаточно высок и не сильно различается. В то же время голштинская молочная порода имеет высокую генетическую вырожденность, что объясняется длительной селекцией, в основу которой заложено использование всего семи групп быков-производителей.

Поскольку аллели устойчивости и чувствительности к бруцеллезу у разных пород различаются, представляется важным сравнить их частоты у всех трех изученных пород (в табл. 6). В таблице 6 представлены аллели аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород, для которых различие по частоте встречаемости между группами достоверно для уровня значимости 0.85-0.95.

Для наглядности в оценке аллелей в связи с формированием устойчивости животных к бруцеллезу, частота аллелей устойчивости для всех трех пород показана на рисунке 4. Как видно на рисунке, аллель *3 присутствует с высокой частотой у здоровых коров всех трех пород коров. Этот аллель отсутствует у больных коров казахской белоголовой и голштинской пород, и с достоверно более низкой частотой встречается у аулиекольской породы.

Аллель *21 с высокой частотой встречается у здоровых коров мясных пород, достоверно превышая уровень встречаемости у больных коров; его нет у голштинских коров. Полученные результаты позволяют сделать статистически подтвержденный вывод о влиянии аллелей *3 и *21 на формирование устойчивости к бруцеллезу у аулиекольской и казахской белоголовой пород. Аллели *4 и *19 могут играть положительную роль при развитии защитной реакции у аулиекольской породы, а аллель *8 – у казахской белоголовой породы.

Таблица 6 - Наиболее распространенные аллели гена BoLA-DRB3 в группах здоровых коров и бруцеллоносителей трех пород Казахстана

№ аллеля	Аулиекольская порода		Казахская белоголовая		Голштинская порода	
	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные
3	8.9 ± 2.2*	2.7 ± 1.3	8.2 ± 2.2**	0	10.9 ± 4.6*	0
4	5.9 ± 1.8*	1.3 ± 0.93	0	0	0	0
8	0	0	6.2* ± 1.9	0	0	0
19	6.6 ± 1.9*	1.3 ± 0.93	0	0	0	0
21	6.6 ± 1.9*	1.3 ± 0.93	6.8 ± 2.1	0	0	0
23	0	0	0	0	19.6 ± 5.8*	4.2 ± 4.0
24	0	0	0	0	21.7 ± 6.0*	4.2 ± 4.0
28	0	0	0	0	15.2 ± 5.2*	0
7	5.9 ± 1.8	16.2 ± 3.02**	8.9 ± 2.3	20.5 ± 3.3**	6.5 ± 3.6	25.1 ± 8.8*
10	2.4 ± 1.2	13,5 ± 2.8**	0	0	0	0
11	0	0	0.7 ± 0.6	9.6 ± 2.4**	0	0
16	0	0	4.8 ± 1.8	15.1 ± 3.0**	0	0
18	3.6 ± 1.4	11.5 ± 2.6**	6.8 ± 2.1	2.7 ± 1.3	0	16.6 ± 7.5*

* - различие между группами достоверно для уровня значимости 0.9

** - различие между группами достоверно для уровня значимости 0.95

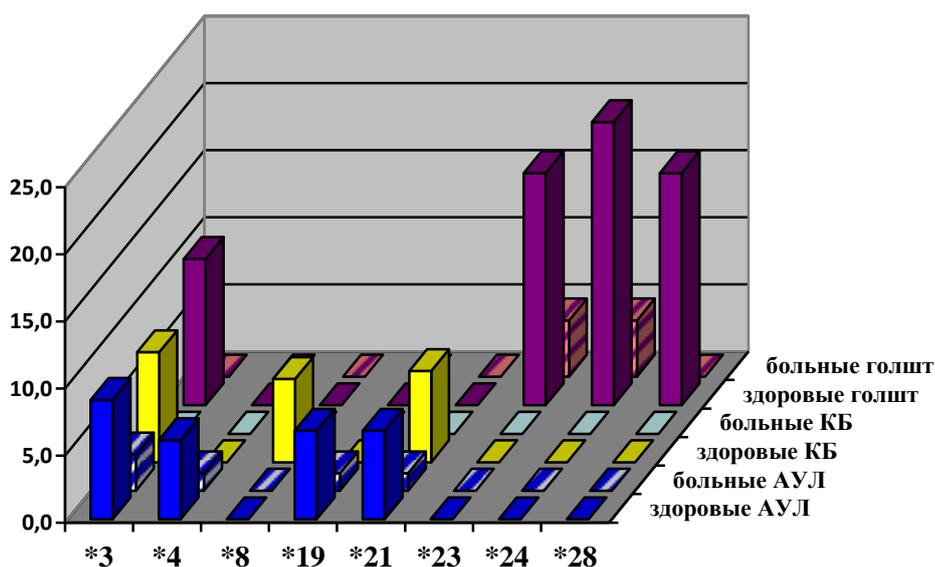


Рисунок 4 - Сравнение трех пород крупного рогатого скота Казахстана по аллелям устойчивости гена BoLA-DRB3

Можно сделать вывод о положительном влиянии на устойчивость к бруцеллезу коров голштинской породы аллелей *23, *24 и *28 не позволяет маленькая выборка проанализированных животных, хотя различия в частоте этих аллелей между группами здоровых и больных коров статистически достоверно.

На рисунке 5 представлены частоты аллелей чувствительности в группах здоровых и больных коров трех пород. На рисунке видно, что аллель *7 встречается с высокой частотой у больных коров всех трех пород, достоверно превышая уровень его встречаемости в группах здоровых животных.

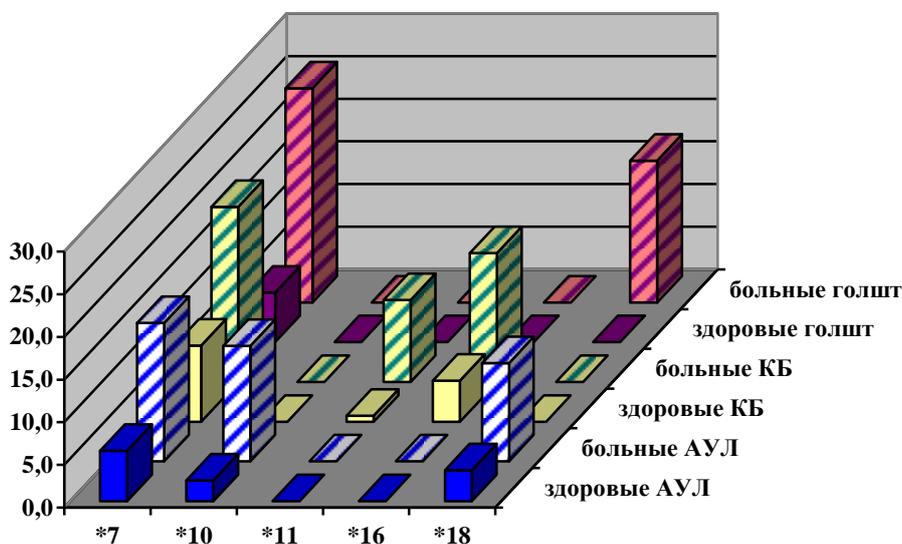


Рисунок 5 - Сравнение трех пород крупного рогатого скота Казахстана по аллелям чувствительности гена *BoLA-DRB3*

Аллели *10, *11, *16 и *18 встречаются у больных коров разных пород, частота их достоверно выше, чем у здоровых коров. Это позволяет сделать предположение, что эти аллели могут влиять на снижение защитной реакции к бруцеллезу животных этих пород.

3. Разработка комплексного антигена для диагностики бруцеллеза животных

Для планового диагностического исследования сельскохозяйственных животных в Казахстане применяют официально рекомендованные Всемирной организацией здоровья животных серологические тесты, и пользуются единым бруцеллезным Роз-бенгал антигеном, приготовленным из бруцелл вакцинного штамма *V.abortus 19*. Применение данного антигена не позволяет выявить всех больных бруцеллезом, в особенности с латентной формой инфекции, т.к. он обладает относительно невысокой чувствительностью. Кроме того, особенно плохо выявляются диссоциированные R-формы и L-формы, образующиеся под действием антибиотиков.

Лизогенные бруцеллофаги, содержащиеся в эпизоотических штаммах бруцелл, вызывают активный иммунологический ответ. Создание эффективного комплексного антигена основано на получении и использовании R-формы бруцеллы и соответствующего ей штамма бруцеллофага.

Для получения перспективных диссоциированных форм выбрали 10 штаммов (S- и R-формы) пяти видов бруцелл: *V.abortus 544* (S-ф); *V.abortus 54* (S-ф); *V.abortus 960* (R-ф); *V.melitensis 16M* (S-ф); *V.melitensis Невский -12* (R-ф); *V.suis 1330* (S-ф); *V.ovis 63/290* (R-ф); *V.ovis 8* (R-ф); *V.ovis 11* (R-ф) и

B. canis 1066 (R-ф). Их подвергли действию УФ излучения ртутно-кварцевой лампы ПРК-2 мощностью 375 Вт (длина волны 253,7 нм).

Из 72 полученных культур для дальнейшего исследования было отобрано 20 культур. После их изучения согласно стандартным методам идентификации и дифференциации диссоциированных форм бруцелл (ГОСТ 25385-91) из штамма *B. abortus* 544 отобрали диссоциированную культуру 11 (R-форма). Полученный таким образом штамм *B. abortus* 544 R защищен предпатентом РК №15970 под коллекционным номером *Brucella abortus* 0071B.

С целью получения бруцеллезных бактериофагов нового типа для использования их при конструировании диагностикумов из R-форм бруцелл штамм *B. abortus* 54 подвергли действию пенициллина для лизогенизации по способу, предложенному А.Л. Воробьевым и др. (предпатент РК 14203, 2003). Был получен широкий спектр изолятов бруцеллофага, перешедших в литическое состояние, сильно различающихся по активности лизиса и широте литического спектра в отношении видов и форм бруцелл.

В результате был выбран наиболее перспективный для дальнейшей работы штамм фага 54/2, который вызывал активный сплошной лизис всех R-форм четырех из пяти индикаторных видов бруцелл *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* и *B. canis* (кроме *B. suis*). Он был зарегистрирован под коллекционным номером 0073 BV (КазНИВИ, CD) и защищен предпатентом РК 15976.

Комплексный антиген конструировали путем адсорбции фага на клетках штамма *B. abortus* 0071B (R-форма) из расчета 100 фаговых корпускул на 1 бактерию и после инактивации, созревания и разведения получали целевой продукт. Полученный комплексный антиген реагирует с биофабричной R-овисной сывороткой и стандартной иммунной SR- бруцеллезной сывороткой, как и биофабричный овисный антиген, но в отличие от последнего реагирует также с иммунной L- бруцеллезной сывороткой.

Разработанный нами препарат был апробирован в условиях лаборатории Алматинского областного филиала РГП Центральной ветеринарной лаборатории и Костанайского филиала РГП «Республиканская ветеринарная лаборатория» на овцах в реакции связывания комплемента (РДСК). Для сравнительного анализа использовали овисный биофабричный антиген. Разработанный нами препарат апробирован в условиях лаборатории Алматинского областного филиала РГП Центральной ветеринарной лаборатории и Костанайского филиала РГП «Республиканская ветеринарная лаборатория», серологическому исследованию комплексным антигеном в сравнении с биофабричным овисным антигеном на бруцеллез подвергнуты всего 694 головы МРС, из них 107 голов Алматинской и 587 голов Костанайской областей (таблица 7).

Из данных таблицы 7 видно, что в Алматинской области из 107 следуемых проб сыворотки крови в РДСК с опытным антигеном положительно реагировало 12 проб, в РДСК с биофабричным овисным антигеном 7 проб и 3 пробы сомнительно, положительные результаты совпадали с обоими антигенами в 10 случаях. В Костанайской области по результатам

серологического исследования комплексным антигеном, выделили 5 положительно реагирующих животных и с биофабричным овисным антигеном 2 пробы.

Таблица 7 - Результаты производственных сравнительных испытаний комплексного антигена и биофабричного овисного антигена в РДСК

Название ветеринарного участка	Количество голов	Результаты диагностических реакции					
		РДСК с комплексным антигеном			РДСК с биофабричным овисным антигеном		
		пол.	отр.	сом.	пол.	отр.	сом.
Алматинская область							
Кербулакский	45	9	36	-	6	37	2
Екпинди	7	1	6	-	-	6	1
Междулы	47	2	45	-	1	46	-
Акшй Куртстрой	8	-	8	-	-	8	-
Всего	107	12	95		7	97	3
Костанайская область							
Аулиекольский район ТОО «Сулукольский» 1	172	5	167	-	2	170	-
Аулиекольский район ТОО «Сулукольский» 2	415	-	415	-	-	415	-
Всего	587	5	582	-	2	585	-
Итого	694	17	677	-	9	682	3

Примечание: пол – положительные, отр – отрицательные, сом-сомнительные результаты реакции.

При исследовании 415 проб от животных, благополучных по бруцеллезу и другим инфекционным заболеваниям, с обоими антигенами получили отрицательные результаты. Полученные результаты свидетельствуют о специфичности комплексного антигена.

Для подтверждения чувствительности бруцеллезного антигена, из числа исследуемых животных Алматинской области, отрицательно реагировавших в РДСК с биофабричным овисным антигеном, но положительно с опытным комплексным антигеном, провели убой одного животного, а также одного барана, сомнительно реагировавшего с биофабричным овисным антигеном и положительно с опытным антигеном, с последующим бактериологическим исследованием. В Костанайской области провели убой 2 голов животных из числа положительно реагирующих на опытный антиген и отрицательно на биофабричный, так же с последующим бактериологическим исследованием.

В результате из патологического материала от животных Алматинской и Костанайской областей изолировали эпизоотические культуры бруцелл вида *B. ovis*, что подтверждает положительные показания диагностического теста.

Таким образом, при проведении производственных испытаний сравнительного изучения комплексного антигена и биофабричного овисного антигена, опытный антиген показал эффективность на 42%.

В Атырауской области на базе Атырауского областного филиала РГКП «Республиканская ветеринарная лаборатория» и Атырауского филиала РГП «ЮЗНПЦСХ» осуществили производственные испытания эффективности комплексного антигена в РА, в сравнении в биофабричным овисным антигеном в РДСК.

Таблица 8 - Результаты производственных испытаний эффективности комплексного антигена в РА, в сравнении в биофабричным овисным антигеном в РДСК

Группа животных	Количество голов	Результаты диагностических реакций					
		РДСК с биофабричным овисным антигеном			РА с комплексным антигеном		
		Положительные		Отрицательные	Положительные		Отрицательные
		Голов	%		Голов	%	
Бараны Отара 2	929	11	100	918	16	145%	913
Бараны Отара 3	1936	22	100	1914	28	127%	1908
Всего	2865	33	100	2832	44	133%	2821

Из данных производственных сравнительных испытаний эффективности комплексного антигена в РА и биофабричного овисного антигена в РДСК следует, что разработанный комплексный антиген на 38% превышает эффективность выявления бруцеллоносителей по сравнению с биофабричным овисным антигеном.

Исследование показало, что положительно реагирующие сыворотки крови с комплексным антигеном совпали с результатами РДСК в 22 случаях и 11 случаях соответственно. В последующем из числа животных, отрицательно реагировавших в РДСК, но положительно с опытным комплексным антигеном в РА провели убой 7 животных для дальнейших бактериологических исследований, при этом в 6 случаях выделили культуры *B. ovis*, что указывает на большую эффективность комплексного антигена.

Полученный антиген способен вступать в реакцию с антителами, продуцируемыми на R-формы бруцелл и на специфический фаг, что повышает чувствительность предлагаемого антигена в сравнении с биофабричным овисным антигеном, также приготовленным из R-формы бруцелл. Применение предлагаемого комплексного антигена для серологической диагностики бруцеллеза позволит на 38% увеличить на эффективность выявления животных, инфицированных диссоциированными формами бруцелл.

Заключение

Разработка молекулярно-генетических маркеров, позволяющих создавать стада животных, более устойчивых на генетическом уровне, или проводить генетическое оздоровление от бруцеллеза животноводческих хозяйств, в первую очередь племенных.

Результаты исследования аллельного полиморфизма гена *BoLA-DBD3* в связи с генетической устойчивостью / чувствительностью к бруцеллезу позволяют сделать следующие выводы:

- анализ совокупных данных по трем породам КРС Казахстана позволяет сделать статистически подтвержденный вывод о влиянии аллелей *3 и *21 на формирование устойчивости к бруцеллезу у аулиекольской и казахской белоголовой пород;

- при этом положительную роль при развитии защитной реакции могут играть у аулиекольской породы аллели *4 и *19, и у казахской белоголовой породы - аллель *8;

- аллель чувствительности к бруцеллезу *7 встречается с высокой частотой у больных коров всех трех пород, его частота достоверно превышает уровень его встречаемости в группах здоровых животных;

- аллели *10, *18 у аулиекольской и *11 и *16 у казахской белоголовой пород также могут быть связаны с чувствительностью, их частота в исследованных популяциях достоверно выше по сравнению с контрольной группой здоровых коров, и это позволяет сделать предположение, что эти аллели могут влиять на снижение защитной реакции к бруцеллезу животных этих пород.

Для голштинской породы экспериментальные данные позволяют сделать следующие выводы: - аллели *3, *23, *24, *28 связаны с устойчивостью и могут способствовать устойчивости животных к бруцеллезу, хоть и не в полном объеме (из 12 больных коров одна особь имела сочетание *23/*24). Сделать вывод о положительном влиянии на устойчивость к бруцеллезу коров голштинской породы аллелей *23, *24 и *28 не позволяет маленькая выборка проанализированных животных, хотя различия в частоте этих аллелей между группами здоровых и больных коров статистически достоверно.

Аллели *7 и *18 у голштинов имеют высокую частоту в группе больных коров, что совпадает с данными по мясным породам КРС, и может свидетельствовать о связи этих аллелей с чувствительностью к бруцеллезу.

Таким образом, полученные в исследовании данные позволяют вывод, что аллели *3, *4, *8, *19, *21 связаны с устойчивостью и могут защищать животных от возбудителя бруцеллеза, хоть и не в полном объеме (у больных коров эти аллели встречаются с невысокой частотой). Аллели чувствительности *7, *10, *11, *16, *18 могут подавлять процесс формирования иммунитета к возбудителю бруцеллеза, их действие усиливается в гомозиготном состоянии и при сочетании аллелей Ч. Предполагается доминантный характер аллелей устойчивости У.

Для характеристики полиморфизма популяций здоровых и больных коров трех пород и их сравнения в настоящей работе используются индексы Шеннона H и Топтикова Kd . Индекс Шеннона H отображает степень «хаотичности» распределения элементов популяции. Индекс Kd Топтикова чувствителен как к степени выровненности мажорных аллелей, так и богатству минорных аллелей в популяции, имеет большую амплитуду изменчивости и лучше подходит для характеристики разнообразия гена $BoLA-DRB3$ в популяции.

Для популяций здоровых животных двух казахских пород мясного направления индексы H и Kd довольно близки. Для голштинской индекс H ниже на 29%, а индекс Kd ниже в 3.4 раза, что свидетельствует о генетической вырожденности популяции здоровых коров голштинов.

В группе больных коров местных мясных пород индекс H несколько ниже (91% от здоровых коров), но индекс Kd снизился до 61% и 57% у аулиекольской и казахской белоголовой пород соответственно, что свидетельствует о значительном обогащении этих популяций аллелями чувствительности, хотя количество аллелей уменьшилось всего на 2 аллеля.

У инфицированных голштинов индекс H не изменился, и индекс Kd практически не снизился – всего на 3%. То есть степень разнообразия групп здоровых и больных коров примерно одинакова, но при этом по набору аллелей они сильно различаются. Возможно, это следствие недостаточно представительных выборок, особенно здоровых животных, что согласуется с низкой достоверностью различий между этими выборками.

Результаты настоящего исследования подтверждают важную роль генов комплекса гистосовместимости II типа в формировании иммунитета животных к разным заболеваниям, в частности, устойчивости к бруцеллезу.

Результаты настоящей работы позволяют проводить направленную селекционную работу на повышение генетической устойчивости поголовья КРС к бруцеллезу с использованием молекулярно-генетические маркеров: обогащение популяцию аллелями*3 и *21 и снижение уровня аллеля *7 повысит устойчивость популяции к бруцеллезу.

Продолжение исследований по выявлению аллелей гена $BoLA-DRB3$, связанных с генетической устойчивостью или восприимчивостью к бруцеллезу, на других породах КРС Казахстана и России позволит углубить знания о защитном действии системы $BoLA$ на формирование устойчивости к бруцеллезу.

Для совершенствования диагностики бруцеллеза в настоящей работе предложен комплексный антиген, разработанный на основе мутантных форм бруцелл и бруцеллофагов, в том числе в R-форме. Изучение нового антигена подтвердило преимущества комплексного типа антигена на основе бруцелл и бруцеллофагов для выявления инфицированности животных серологическими методами. Комплексный антиген способен выявлять хронические и скрытые формы бруцеллеза, в том числе вызываемые диссоциированными формами бруцелл, в среднем на 38% более эффективно по сравнению с общепринятыми методами диагностики.

Повышение уровня обнаружения инфицированных животных с помощью предложенного комплексного антигена на 38% имеет принципиальное значение для ветеринарных мероприятий, поскольку невыявленные в результате ложноотрицательных результатов бруцеллоносители являются источником инфекции, и сильно затрудняют борьбу с распространением инфекции.

Новизна полученных штаммов бактерий и фагов, а также комплексного антигена на их основе подтверждена авторскими свидетельствами.

В целом, результаты исследования по теме диссертации позволяют сделать следующие выводы:

- для проведения диссертационной работы сформированы представительные экспериментальные группы здоровых и инфицированных бруцеллой коров аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород из нескольких районов Казахстана;

- исследован аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* у больных и здоровых коров аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород КРС, изучены частоты распределения разных аллелей, выявлены мажорные аллели по каждой группе животных, определены генотипы каждого животного;

- выявлены особенности аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* у больных и здоровых животных, определены аллели гена *BoLA-DRB3*, связанные с устойчивостью или чувствительностью к бруцеллезу, которые могут служить ДНК-маркерами устойчивости или чувствительности к бруцеллезу, показано доминирование аллелей устойчивости у животных аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород;

- разработаны рекомендации для формирования стада с повышенным уровнем генетической резистентности к бруцеллезу и при проведении оздоровительных и профилактических противобруцеллезных мероприятий с применением ДНК-маркеров на основе аллелей устойчивости или чувствительности к бруцеллезу на основе данных по аллельному полиморфизму гена *BoLA-DRB3*;

- под воздействием ультрафиолетового облучения получены бруцеллезный штамм *B.abortus* 544 R под коллекционным номером *Brucella abortus* 0071B и штамм бактериофага с коллекционным номером 0073 BV (КазНИВИ, CD) с желаемыми характеристиками, в том числе и антигенной структурой, необходимыми для создания высокоинформативных диагностических препаратов и защищенными предпатентами РК №15970, РК 15976;

- разработан комплексный антиген для серологической диагностики бруцеллеза на основе измененных форм бруцелл и специфических фагов, способный выявлять хронические и скрытые формы бруцеллеза, эффективность которого на 38% превышает общепринятые методы диагностики. На способ получения антигена для серологической диагностики бруцеллеза получен предпатент РК № 18053 (2005 г.).

Практические предложения

Использование молекулярно-генетических маркеров устойчивости У(*3, *4, *8, *19, *21) и чувствительности Ч (*7, *10, *11, *16, *18) в селекции, усовершенствовании и разведении крупного рогатого скота позволит повысить генетическую устойчивость животных к бруцеллезу и будет способствовать оздоровлению поголовья от бруцеллеза.

Поголовный скрининг в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах новорожденных животных и молодняка по молекулярно-генетическим маркерам на устойчивость/чувствительность к бруцеллезу позволит создавать стада, генетически более устойчивые к бруцеллезу, и ускорит оздоровление от бруцеллеза.

Предлагается применение для диагностических исследований комплексного антигена, эффективность которого на 38% выше по сравнению с общепринятыми методами диагностики, за счет выявления хронических и скрытых формы бруцеллеза, в том числе вызываемых диссоциированными формами бруцелл.

В целом, применение результатов исследования позволит повысить эпидемическую, эпизоотическую и экономическую эффективность противобруцеллезных мероприятий.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

Рекомендуется продолжение исследований по выявлению аллелей гена VoLA-DRB3, связанных с генетической устойчивостью или восприимчивостью к бруцеллезу, на других породах КРС Казахстана и России, а также изучение защитного действия генов системы VoLA на формирование устойчивости к бруцеллезу.

В селекции и разведении поголовья КРС для повышения генетической устойчивости животных к бруцеллезу рекомендуется проведение направленной генетической работы на обогащение популяций коров аллелями *3 и *21 и снижение уровня аллеля *7.

Для выявления хронических и скрытых форм бруцеллеза перспективно дальнейшее проведение работ с комплексным антигеном.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи, опубликованные в журналах, рекомендуемых ВАК РФ

1. Адамбаева, А.А. Генетические особенности больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы / А.А. Адамбаева, И.Я. Нам, А.А. Султанов, В.В. Заякин, Р.Б. Ахмедов // Вестник АПК Ставрополя. - 2019. - № 4 (36). - С. 16-20.

2. Адамбаева, А.А. Изменение аллелотипов гена VoLA-DRB3 у коров – бруцеллоносителей аулиекольской породы Казахстана / А.А. Адамбаева, И.Я. Нам, В.В. Заякин, Р.Б. Ахмедов, М.С. Кобозева, А.А. Султанов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2020. – Т. 241. – С. 12-16.

Список работ, опубликованные в Международных базах данных

3. Nam, I.Ya. Genetic polymorphism of Kazakhstan meat breeds of cattle in relation to resistance to brucellosis / I.Ya. Nam, A.A. Adambayeva, A.A. Sultanov, V.V. Zayakin // *Annals of Romanian Society for Cell Biology*. – 2021. - Vol. 25. – P. 1781 – 1785.

4. Adambayeva, A.A. Allelic polymorphisms of the BoLA-DRB3 gene and resistance to brucellosis in Kazakh cattle / A.A. Adambayeva, A.A. Sultanov, I.Ya. Nam. V.V. Zayakin // *Veterinaria Italiana, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise* – 2022. - Vol. 58, N.2, - P. 213-218.

Статьи, опубликованные в сборниках конференций

5. Танирбергенова, А.А. Фаголизабельность штаммов бруцелл, измененных воздействием ультрафиолетовых лучей / А.А. Танирбергенова, В.Б. Тен // Сборник трудов II Международной научно-практической конференции молодых ученых «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых». пос. Краснообск. - 2006. - С. 453-459.

6. Танирбергенова, А.А. Комплексный антиген для серологической диагностики бруцеллеза, вызываемого диссоциированными формами возбудителя / А.А. Танирбергенова // Сборник трудов «Актуальные проблемы развития сельского хозяйства Казахстана, Сибири и Монголии», Алматыбак. - 2006. - С. 204-205.

7. Адамбаева, А.А. Результаты производственных испытаний комплексного антигена, содержащего специфический фаг для серологической диагностики бруцеллеза / А.А. Адамбаева // *Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана*. - 2007. - № 6. - С. 47-48.

8. Адамбаева, А.А. Усовершенствование метода получения противофаговой иммунной сыворотки / А.А. Адамбаева, Ш.А. Барамова, А.Ж. Мырзалиев, С.Е. Алпысбаева // *Материалы Международной научно-практической конференции «Научное обеспечение развития агропромышленного комплекса стран таможенного союза»*, Астана. - 2010. - С. 27-30.

9. Адамбаева, А.А. Адсорбция бактериофагов / А.А. Адамбаева // *Материалы I Евразийской научно-практической конференции «Инновационные агробιοтехнологии в животноводстве и ветеринарной медицине»*, Санкт-Петербург. - 2015. - С. 15-17.

10. Адамбаева, А.А. Исследование генетической устойчивости и восприимчивости к бруцеллезу у разных пород крупного рогатого скота Казахстана, России и Киргизии / А.А. Адамбаева, А.А. Султанов, Р.Б. Ахмедов, М.С. Кобозева, В.В. Заякин, И.Я. Нам // *Материалы I Евразийской научно-практической конференции «Инновационные агробιοтехнологии в животноводстве и ветеринарной медицине»*, Санкт-Петербург. - 2015. - С. 17-19.

11. Адамбаева, А.А. Особенности аллельного профиля гена BoLA-DRB3 у больных бруцеллезом коров Казахстана / А.А. Адамбаева, Р.Б. Ахмедов, И.Я. Нам // *Материалы III Евразийской конференции «Фундаментальные и*

прикладные аспекты клеточной биотехнологии и молекулярной генетики в племенном животноводстве стран ЕАЭС», г. Брянск. - 2016. - С. 107-108.

12. Адамбаева, А.А. Аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* у больных бруцеллезом коров Казахстана / А.А. Адамбаева, Р.Б. Ахмедов, М.С. Кобозева, В.В. Заякин, А.А. Султанов, И.Я. Нам // Материалы конференции III Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы», г. Минск. - 2016. - С. 88.

13. Воробьев А.Л., Тен В.Б., Танирбергенова А.А., Алпысбаева С.Е. Предпатент РК Штамм бактерии *Brucella abortus* 0071В, используемый для приготовления бруцеллезных антигенов. № 15970. 2005.

14. Воробьев А.Л., Тен В.Б., Танирбергенова А.А., Алпысбаева С.Е. Предпатент РК Штамм бактериофагов 0073 BV (CD КазНИВИ) штамма бактерий *Brucella abortus* 54, используемый для приготовления бруцеллезных антигенов. № 15976. 2005.

15. Воробьев А.Л., Танирбергенова А.А., Мустафин Б.М., Тен В.Б. Предпатент РК Способ получения антигена для серологической диагностики бруцеллеза. № 18053. 2006.

16. Танирбергенова А.А., Воробьев А.Л., Тен В.Б. Предпатент РК Способ получения противофаговой иммунной сыворотки. № 19392. 2008.