

**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 Гукровна**  
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 *BoLA-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 *BoLA-DRB3* определяет генетическую устойчивость животных к различным патогенам, циркулирующим в популяциях разных регионов. Многочисленными исследованиями показано, что ген *BoLA-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 бруцеллёзу не проводились, публикации на эту тему отсутствуют в научной литературе как стран СНГ, так и дальнего зарубежья.

Для диагностики бруцеллёза 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 бруцеллёза с помощью сочетания двух подходов:

- разработка ДНК-маркеров для отбора генетически устойчивых к бруцеллезу животных на основе аллелей гена *BoLA-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.

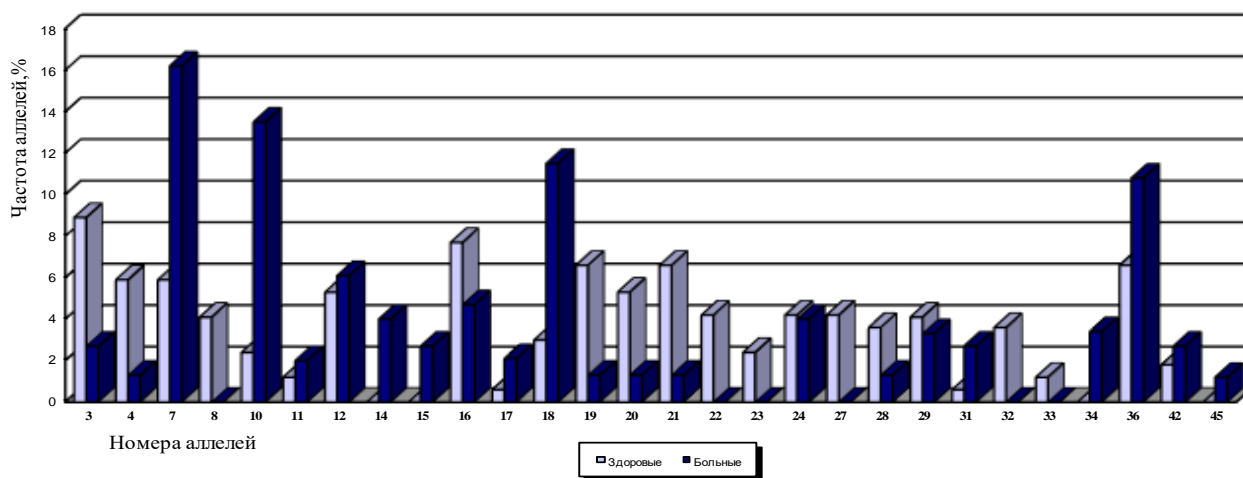


Рисунок 1 - Частота аллелей гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных коров аулиекольской породы

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%.

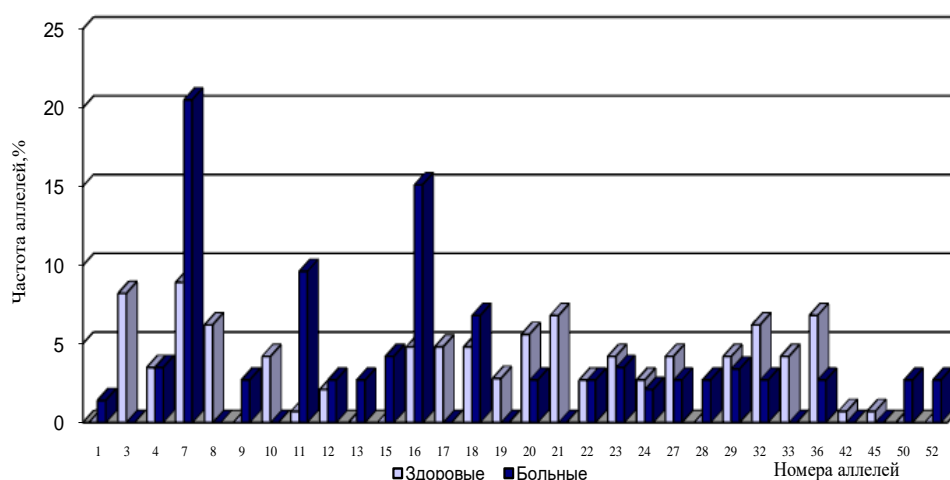


Рисунок 2 - Частота аллелей гена BoLA-DRB3 у здоровых коров и бруцеллоносителей казахской белоголовой породы

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	<b>8.2 ± 2.2**</b>	0
	8	<b>6.2 ± 1.9 *</b>	0
	21	<b>6.8 ± 2.1**</b>	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	<b>8.9 ± 2.3</b>	<b>20.5 ± 3.3 **</b>
	11	0.7 ± 0.6	<b>9.6 ± 2.4 **</b>
	16	4.8 ± 1.8	<b>15.1 ± 3.0 **</b>
	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.

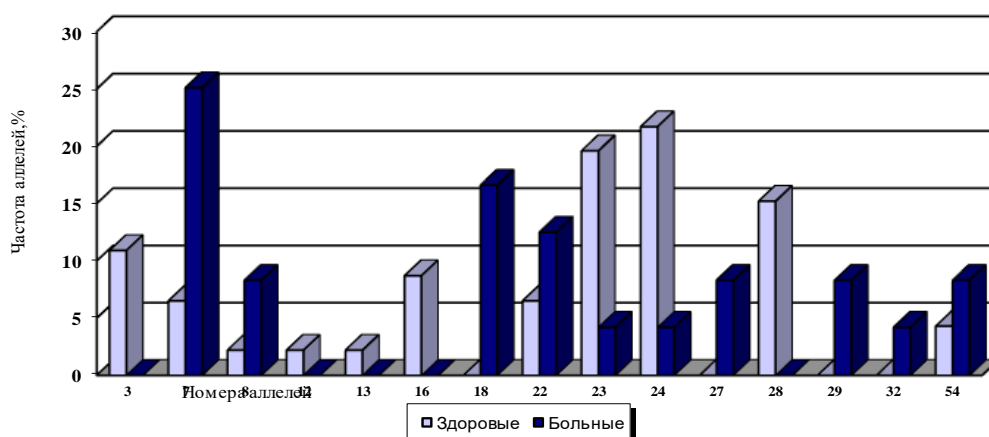


Рисунок 3 - Частота аллелей гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных коров голштинской породы

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	<b>10.9 ± 4.6*</b>	0
	23	<b>19.6 ± 5.8*</b>	4.2 ± 4.0
	24	<b>21.7 ± 6.0*</b>	4.2 ± 4.0
	28	<b>15.2 ± 5.2*</b>	0
Аллели Ч больных коров	7	6.5 ± 3.6	<b>25.1 ± 8.8*</b>
	18	0	<b>16.6 ± 7.5*</b>
	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

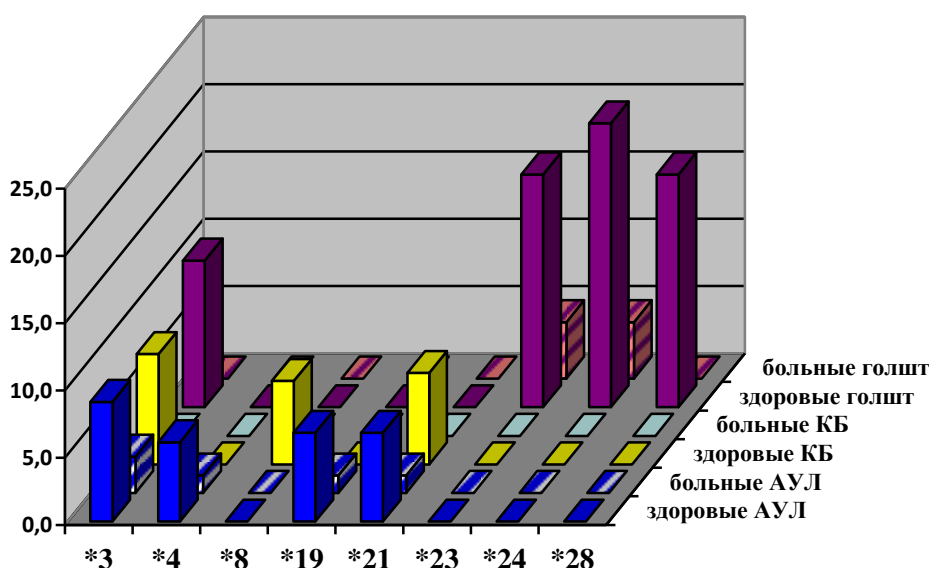


Рисунок 4 - Сравнение трех пород крупного рогатого скота Казахстана по аллелям устойчивости гена BoLA-DRB3

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.

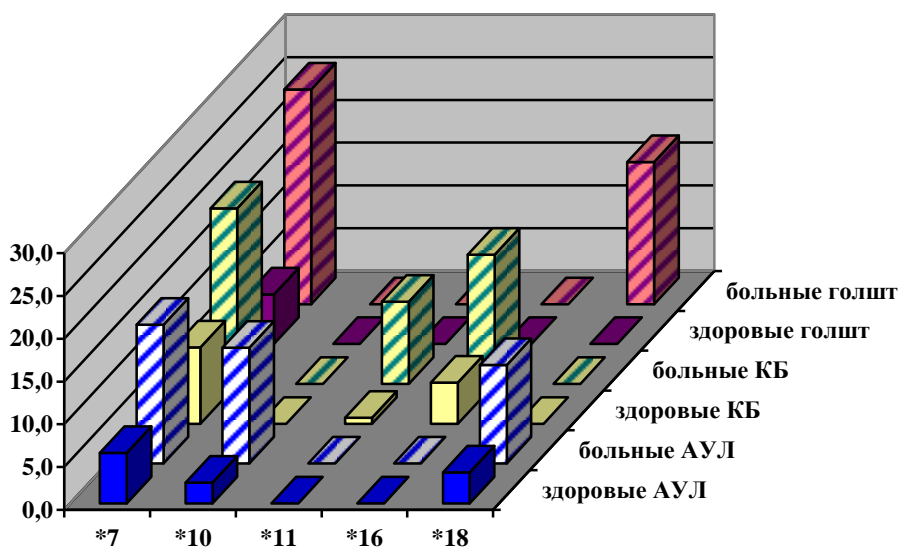


Рисунок 5 - Сравнение трех пород крупного рогатого скота Казахстана по аллелям чувствительности гена *BoLA-DRB3*

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.
<b>Алматинская область</b>							
Кербулакский	45	9	36	-	6	37	2
Екпинди	7	1	6	-	-	6	1
Междулы	47	2	45	-	1	46	-
Акшй Куртстрой	8	-	8	-	-	8	-
<b>Всего</b>	<b>107</b>	<b>12</b>	<b>95</b>		<b>7</b>	<b>97</b>	<b>3</b>
<b>Костанайская область</b>							
Аулиекольский район ТОО «Сулукольский» 1	172	5	167	-	2	170	-
Аулиекольский район ТОО «Сулукольский» 2	415	-	415	-	-	415	-
<b>Всего</b>	<b>587</b>	<b>5</b>	<b>582</b>	-	<b>2</b>	<b>585</b>	-
<b>Итого</b>	<b>694</b>	<b>17</b>	<b>677</b>	-	<b>9</b>	<b>682</b>	<b>3</b>

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
<b>Всего</b>	<b>2865</b>	<b>33</b>	<b>100</b>	<b>2832</b>	<b>44</b>	<b>133%</b>	<b>2821</b>

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», Алмалыбак. - 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 агробiotехнологии 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 агробiotехнологии 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.