

Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования  
«Брянский государственный университет имени акад. И.Г. Петровского»

На правах рукописи

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

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук И.Я. Нам

Брянск - 2024

## СОДЕРЖАНИЕ

Номер главы	Наименование главы	Стр.
	Введение	4
1	Литературный обзор	11
1.1	Бруцеллез – важная проблема мировой ветеринарной медицины	11
1.1.1	Распространенность бруцеллеза сельскохозяйственных животных в Российской Федерации	13
1.1.2	Распространенность бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных в Республике Казахстан	15
1.1.3	Бруцеллез – важная проблема здравоохранения в России и Казахстане	16
1.2	Породы крупного рогатого скота Республики Казахстан	19
1.2.1	Создание казахской белоголовой породы крупного рогатого скота	20
1.2.2	Создание аулиекольской породы крупного рогатого скота	22
1.3	Диагностические методы исследования бруцеллеза, бактериофаги	23
1.4	Молекулярно-генетические подходы в животноводстве и ветеринарной медицине	36
1.4.1	BoLA – комплекс генов, определяющий устойчивость крупного рогатого скота к болезням	40
1.4.2	Спектры аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 в связи с устойчивостью к лейкозу и бруцеллезу у крупного рогатого скота	42
2	Собственные исследования	44
2.1	Материалы и методы исследований	44
2.2	Результаты исследований и их обсуждение	59
2.2.1	Генетическая устойчивость к бруцеллезу разных пород крупного рогатого скота Казахстана	59
2.2.1.1	Формирование групп животных разных пород КРС для исследования генетической устойчивости к бруцеллезу	60
2.2.1.2	Анализ аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров разных пород Казахстана	62
2.2.1.2.1	Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы	62
2.2.1.2.2	Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы	80

2.2.1.2.3	Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы	96
2.2.1.3	Сравнение генотипов и аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у пород коров Казахстана в связи с устойчивостью и восприимчивостью к бруцеллезу	105
2.2.2	Разработка комплексного антигена для диагностики бруцеллеза	111
2.2.2.1	Разработка комплексного бруцеллезного антигена, содержащего диссоциированную форму бруцелл и специфический бруцеллезный бактериофаг	111
2.2.2.2	Получение стабильных диссоциантов под воздействием внешних факторов	112
2.2.2.3	Получение специфического бруцеллезного бактериофага нового типа	118
2.2.2.4	Конструирование комплексного диагностикума, содержащего измененные формы бруцелл и специфические фаги	122
2.2.2.5	Изучение информативности полученного комплексного антигена в различных серологических реакциях	125
2.2.2.5.1	Определение чувствительности комплексного антигена в сравнении с коммерческим цветным овисным антигеном в РА	125
2.2.2.5.2	Определение чувствительности комплексного антигена в сравнении с биофабричным овисным антигеном в РДСК	126
2.2.2.5.3	Определение активности комплексного и овисного биофабричного (контроль) антигенов в РДСК	128
2.2.2.5.4	Определение специфичности комплексного антигена	128
2.2.2.6	Изучение диагностической эффективности комплексного антигена в производственных условиях	129
3	Заключение	133
4	Практические предложения	139
4.1	Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы	140
5	Обозначения и сокращения	141
6	Список использованной литературы	143
7	Приложения	160

## Введение

**Актуальность темы исследования.** Проблема ликвидации бруцеллеза является важнейшей для ветеринарной медицины и здравоохранения России и Казахстана. Научно-обоснованная система противобруцеллезных мероприятий СССР позволила в 80-х – 90-х годах прошлого столетия успешно оздоровить животноводство в большинстве краев и областей страны от этого опасного заболевания. Но в связи с изменившимися экономическими отношениями и хозяйственной реструктуризацией в аграрном комплексе в последние десятилетия, начиная с 1990-х годов, заболеваемость бруцеллезом 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 выбраковки больных животных, доходящих в ряде хозяйств до четверти стада.

Поэтому разработка молекулярно-генетических подходов для поиска ДНК-маркеров устойчивости/чувствительности к бруцеллезу имеет высокую актуальность для оздоровления крупного рогатого скота от бруцеллеза и проведения селекции на устойчивость к этой болезни, что позволит повысить эпидемическую, эпизоотическую и экономическую эффективность противобруцеллезных мероприятий.

Широкое распространение заболевания имеет высокую социальную значимость, так как основные возбудители бруцеллеза животных – бактерии *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* и *Brucella ovis*, 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 крупного и мелкого рогатого скота имеет важнейшее социальное значение.

В настоящее время мероприятия по оздоровлению стада в неблагополучных по бруцеллезу пунктах основаны на систематических диагностических исследованиях поголовья с последующей изоляцией и убоем выявляемых пораженных особей. Для массовой диагностики бруцеллеза у животных во всем мире широко используются серологические методы исследования. Однако существующая система мероприятий по оздоровлению неблагополучных по бруцеллезу хозяйств методом вакцинации и систематических диагностических исследований показала недостаточную эффективность проводимых мероприятий.

**Степень разработанности темы исследования.** Многочисленными исследованиями показано, что с устойчивостью крупного рогатого скота к разным инфекционным заболеваниям связан ген BoLA-DRB3, имеющий очень высокий уровень аллельного полиморфизма – более 100 аллелей. В настоящее время установлен целый ряд маркеров – аллелей гена BoLA-DRB3, связанных с устойчивостью и восприимчивостью животных к вирусу лейкоза КРС, гемобластозам, маститам, туберкулезу, паразитарным болезням, вирусной диарее, а также некоторым паразитам. Генетический полиморфизм популяций разных пород коров по гену BoLA-DRB3 определяет генетическую устойчивость животных к различным патогенам, циркулирующим в популяциях разных регионов. 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 диагностики не

выявляют инфицированных бруцеллой животных, в частности, в случаях хронической формы бруцеллеза.

**Цель 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 больных бруцеллезом животных серологическими методами.

Практическая значимость. Обнаружение аллелей гена BoLA-DRB3, достоверно связанных с формированием генетической устойчивости и восприимчивости к бруцеллёзу, позволяет с использованием этих молекулярных маркеров создавать стада животных с повышенной

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.

**Методология и методы исследований.** В исследовании для проведения молекулярно-генетического анализа использован метод ПЦР-ПДРФ для исследования аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB* у больных и здоровых коров. Проведен сравнительный анализ частот разных аллелей у трех пород КРС, выявлены аллели чувствительности и устойчивости к бруцеллезу в группах больных и здоровых коров, что позволит в дальнейшем использовать их в качестве ДНК-маркеров генетической устойчивости к бруцеллезу в селекции и разведении КРС.

Работа по созданию комплексного антигена включает: получение стабильных диссоциантов под воздействием внешних факторов, получение специфического бруцеллезного бактериофага нового типа, с применением серологических, иммунологических, бактериологических, микробиологических методов исследования конструирование комплексного диагностикума, содержащего измененные формы бруцелл и специфические фаги, анализ и обобщение полученных результатов.

Обработку количественных показателей проводили вариационно-статистическими методами при использовании универсального программного средства Microsoft Excel.

**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.** Обоснованность научных положений и выводов базируется на результатах экспериментальных исследований и анализе данных с применением методов математической статистики. Выводы соответствуют содержанию диссертации.

Результаты исследований доложены на конференциях:

II Международной научно-практической конференции молодых ученых «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых». пос. Краснообск. 2006; Международной научно-практической конференции «Научное обеспечение развития агропромышленного комплекса стран таможенного союза». Астана. 2010; I Евразийской научно-практической 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.

**Публикация результатов исследований.** По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и 2 - в журналах баз Scopus и 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 источника, из них 36 на иностранном языке.

## 1 Литературный обзор

### 1.1 Бруцеллез – важнейшая проблема мировой ветеринарной медицины

Бруцеллез является наиболее распространенным инфекционным заболеванием животных, он широко встречается у животных разных видов во многих странах и является одной из самых серьезных проблем как ветеринарии, так и здравоохранения, так как представляет серьезнейшую опасность для здоровья людей (Забродин, 1970; Вершилова, 1972; Димов, 1993; Косилов с соавт., 1999).

На протяжении длительной истории данной болезни было много разных названий, в том числе мальтийская и средиземноморская лихорадка, а также волнообразная лихорадка (из-за рецидивирующего характера лихорадки, возникающей во время болезни). Первое описание симптоматики заболевания людей бруцеллезом было сделано Гиппократом более 2000 лет назад. Важным этапом в накоплении знаний о бруцеллезе стал 1886 год, когда во время экспедиции в Средиземном море на острове Мальта британский врач Дэвид Брюс при очередном вскрытии умершего солдата провел бактериологические исследования. В пораженной селезенке Д. Брюсу удалось обнаружить некий микроорганизм, который он назвал *Micrococcus melitensis* – т.е. мальтийский микрококк. Исследования Д. Брюса опирались на довольно солидную методическую базу: к этому времени были разработаны методы выделения микроорганизмов из патологического материала, культивирование их на искусственных питательных средах, микроскопия мазков и др. Это позволило исследователю выделить возбудитель мальтийской лихорадки на искусственных питательных средах в чистом виде. Бактерию, вызывающую лихорадку, назвали *Brucella*, позже вызываемое ею заболевание также назвали бруцеллезом. Род грамотрицательной бактерии *Brucella* spp. включает девять видов, характеризующихся более чем 90% гомологией генома (Вершилова, 1972; Белобаб, 1998).

Бруцеллезом болеют практически все домашние животные: крупный рогатый скот, козы, овцы, сайгаки, кошки (Димов, 1993; Косилов с соавт., 2001; Керимов с соавт., 1999), свиньи (Коломакин с соавт., 1972), собаки (Гордиенко, 2004), лошади, верблюды (Иванов с соавт., 2018; Керимов с соавт., 1999), северные олени (Поликарпов, 1958; Гордиенко, 2013; Лайшев с соавт., 2004), водяные буйволы (Мамателашвили, 1974), собаки (Махашвили, 1975) и др., восприимчивы к бруцеллезу многие виды диких животных. Основным симптомом заболевания у всех видов животных являются аборт или преждевременное изгнание плода.

Источником возбудителя бруцеллеза являются больные животные и скрытые бруцеллоносители из неблагополучных стад животноводческих хозяйств и диких популяций животных (Керимов, Искандеров, 1989, 1991). Занос возбудителя бруцеллеза в благополучные стада происходит чаще всего с инфицированными животными или кормами, контаминированными бактерией *Brucella*. Заражение животных происходит при контакте с больными особями или посредством факторов передачи: молоком, секретами и экскретами, через пользование совместными пастбищами, водопоями, путями миграции.

Проблема ликвидации бруцеллеза представляет значительные трудности вследствие широкого распространения, наличия скрытых форм течения инфекции, вариабельности и убиквитарности возбудителя болезни - способности его к обитанию в организме самых разнообразных видов животных и человека. Важнейшей особенностью инфекционного процесса при бруцеллезе является длительный инкубационный период. Вновь заболевшее животное становится продуцентом возбудителя, выделяя его в окружающую среду с секретами и экскретами, что способствует сохранению очагов инфекции и поддержанию эпизоотического процесса. Поскольку при поражении животных возбудителями рода *Brucella* в течение длительного времени отсутствуют клинические признаки болезни (у коров основным признаком являются аборт во второй половине стельности), то заболевших

животных невозможно быстро выявить и изолировать, поэтому они являются источником возбудителя болезни и причиной заражения здоровых животных.

Бруцеллез успешно ликвидирован в большинстве развитых стран, хотя он по-прежнему эндемичен во многих развивающихся и некоторых развитых странах Латинской Америки, Южной Европы, Африки, Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока. Доступные стратегии борьбы с бруцеллезом основаны на очень строгих процедурах управления, убойе всех серопозитивных животных и, где это возможно, вакцинации. Несмотря на достигнутые успехи в ликвидации бруцеллеза в передовых странах, распространенность этого заболевания в стадах крупного и мелкого рогатого скота является одной из важнейших проблем ветеринарии во многих странах мира, особенно в связи с потенциальной угрозой природных очагов и переносов бруцеллы от диких животных. Бруцеллез оказывает большое влияние на общественное здравоохранение и экономику животноводства (Ременцова и др., 2004; Попова и др., 2012; Оглодин и др., 2015).

В середине двадцатого века в США бактерию *Brucella* научились использовать в качестве биологического оружия, в 1969 году президент Никсон запретил такое применение бруцеллы (Семененя, И. Н., 2020).

### **1.1.1 Распространение бруцеллеза сельскохозяйственных животных в Российской Федерации**

Распространение бруцеллеза является одной из самых серьезных проблем мирового сельского хозяйства, приносящей серьезный экономический ущерб из-за снижения продукции животноводства, но и ветеринарной медицины, так как бруцеллез часто поражает детей (Рымаренко и др., 2014), и вызывает хронические заболевания человека, приводя к бесплодию и инвалидности (Corbel, 1997).

Среди 13 инфекционных заболеваний крупного рогатого скота, зарегистрированных в России, бруцеллез занимает второе место после лейкоза

(21.7% и 58.2% соответственно). В последние годы число неблагополучных по бруцеллезу крупного рогатого скота пунктов динамично растет (Забродин и др., 1970; Гулюкин и др., 2013, 2016).

По данным департамента ветеринарии МСХ Российской Федерации, в 2013 году зафиксировано 367 очагов бруцеллеза КРС. Бруцеллез выявлен у крупного и мелкого рогатого скота, собак, оленей. В 2014 году был преодолен эпидемический порог по бруцеллезу как КРС, так и МРС, при этом зафиксировано 682 очага бруцеллеза КРС.

В 2015 году бруцеллез КРС зафиксирован в 24 регионах России, было выявлено более 250 новых очагов инфекции (Гулюкин и др., 2016). Наиболее широкое распространение бруцеллеза среди крупного рогатого скота мясного и молочного направлений отмечено в Северо-Кавказском и Южном Федеральных округах. Особую опасность в эпидемическом и эпизоотическом отношении представляют очаги со смешанным содержанием животных разных видов (крупный и мелкий рогатый скот, лошади), характерном для хозяйств Южного федерального округа. Так, с начала 2015 года в Северо-Кавказском и Южном федеральном округах выявлено 235 новых очагов инфекции в Республиках Дагестан, Ингушетии, Северная Осетия-Алания и Калмыкия, Чеченской, Карачаево-Черкесской республиках, Ростовской, Волгоградской, Астраханской областях, Краснодарском и Ставропольском крае (Кассал и др., 2002; Нурлыгаянова, 2010; Гулюкин и др., 2016).

Результаты научных исследований, проведенных ВНИИ бруцеллеза и туберкулеза животных (г. Омск), в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах в течение последних лет (2011-2016 гг.) свидетельствуют о том, что при заносе возбудителя бруцеллеза в благополучные стада крупного рогатого скота отмечается высокая степень инфицированности животных. Так, в ранее благополучном по бруцеллезу крупном молочном комплексе Приморского края в 2015-2016 гг. в течение 14 месяцев оздоровительных работ стандартными методами диагностики было выявлено 211 коров и первотелок, с положительными тестами на бруцеллез,

что повлекло за собой огромные экономические потери (Гордиенко, 2014; Гордиенко и др., 2017).

Динамику поражения животных в исходно благополучном по бруцеллезу стаде иллюстрирует следующий пример: при завозе крупного рогатого скота мясного направления из трех различных ферм Республики Казахстан и проведении диагностических исследований в период карантина было выявлено две головы положительно реагирующих на бруцеллез, которых изолировали из стада. Из остального поголовья сформировали один гурт, который содержали в свободном выгуле. Через шесть месяцев во время проведения плановых диагностических исследований на бруцеллез было выявлено 35 положительно реагирующих животных. В процессе эпизоотологического расследования установлено, что источником инфекции в стаде явились животные с хроническим течением или латентными формами бруцеллеза. В последующие 6 месяцев оздоровительного периода зарегистрировали 165 (48%) инфицированных животных, которых ежемесячно выявляли и удаляли из стада.

### **1.1.2 Распространенность бруцеллеза среди сельскохозяйственных животных в Республике Казахстан**

В Казахстане данные об эпидемиологической ситуации по бруцеллезу ограничены. В 1997-1998 годах было проведено нерандомизированное исследование по 958 образцам сыворотки от домашних животных и установлено, что распространенность бруцеллеза среди домашнего скота составляет 2,4%.

В 2009 году распространенность у крупного рогатого скота составляла 1,8%. В период с 2008 по 2012 год 124 фермы крупного рогатого скота и 952 фермы мелкого рогатого скота были признаны положительными по бруцеллезу. К 2012 году усилия по борьбе с инфекцией привели к снижению распространенности сероположительных животных (0,46% у крупного

рогатого скота и 0,17% у мелких жвачных животных) (Отчеты КазНИВИ, неопубл.).

Несмотря на то, что был предпринят ряд мер по борьбе с инфекцией, включая диагностические исследования всех восприимчивых животных и отбраковку серопозитивных животных, бруцеллез по-прежнему остается серьезной проблемой для местного сельского хозяйства (Султанов, 2012; Иванов, 2014; Уразаева и др., 2016) и представляет угрозу для здоровья населения (Мустафин, 2014; Джамбулатов и др., 2018).

Большую опасность для интактных животных, сформированных из высокопродуктивного импортного крупного рогатого скота, представляет размещение на неблагополучных или угрожаемых по бруцеллезу территориях, особенно на молочных комплексах, где существует множество факторов заноса возбудителя и распространения инфекции среди восприимчивого поголовья.

Выявление инфицированных животных на ранних стадиях заболевания позволяет своевременно провести оздоровительные и профилактические мероприятия, купировать очаг бруцеллеза и не допустить широкого его распространения. Вместе с этим, в течение оздоровительного периода выявляется до 10% положительно реагирующих животных. Необходимо отметить, что у значительной части реагирующих животных зарегистрированы поствакцинальные реакции, что вызывало необходимость проведения дополнительных дифференциальных исследований.

### **1.1.3 Бруцеллез – важнейшая проблема здравоохранения в России и Казахстане**

Бруцеллез крупного рогатого скота обычно вызван *Brucella abortus*, в то время как бруцеллез коз и овец обычно вызван *Brucella melitensis*, хотя могут возникать инфекции кросс-видов (Daugaliyeva A.T., 2016). Оба этих вида *Brucella* распространены среди домашнего скота во всем мире, они способны

поражать человека и являются высококонтагиозными для людей, что делает бруцеллез наиболее распространенным зоонозом в мире (Вершилова П.А. 1972; Белобаб и др., 1998).

Бактерия *Brucella* может передаваться человеку через потребление зараженного и необработанного молока и молочных продуктов, а также путем прямого контакта с зараженными животными.

Статистические данные свидетельствуют, что заражение бруцеллезом людей находится в прямой зависимости от степени пораженности бруцеллезной инфекцией сельскохозяйственных животных крупного и мелкого рогатого скота (Пономарев, Никитаев, 2015).

У людей болезнь может вызывать волнообразную лихорадку, недомогание и миалгию, иногда связанные с тяжелыми осложнениями, такими как энцефалит, менингит, периферический неврит, спондилит, гнойный артрит и вегетативный эндокардит. Бруцеллез у людей характеризуется поражением ретикулоэндотелиальной системы, абортами с задержанием последа, эндометритами, орхитами, артритами, расстройством воспроизводительной способности. Острая фаза болезни может также переходить в хроническую форму, которая поражает различные органы и ткани. При этом, по данным ФАО/ВОЗ, летальность у зараженных людей бруцеллезом может достигать 2-5%.

В России основная часть больных бруцеллезом людей (87.7%) находится в Северо-Кавказском (62.7%), Южном (14,7%) и Сибирском (11,4%) федеральных округов РФ (Василькова и др., 2016).

Ежегодно регистрируются свежие случаи заболевания людей острой формой бруцеллёза, например, за 9 месяцев 2014 г. в Дагестане заболело 111 человек. За 7 месяцев 2015 года в Ставропольском крае заболело 42 человека, в Калмыкии – 25, в Волгоградской области - 14. Среди заболевших преобладают мужчины из числа работающих на молочно-товарных фермах по обслуживанию животных. В неблагополучных хозяйствах Республики Калмыкия, где около 60% населения занято в животноводстве, выявляли

больных бруцеллезом животных: в общественном секторе до 9%, в отдельных личных крестьянских хозяйствах до 40%.

Заболеваемость бруцеллезом людей в Казахстане (на 100 000 человек) составила 17,5 случая в 2006 году (всего 2 670 случаев), в 2013 году она была снижена до 8,49 случаев (всего 1 443 случая). Распределение бруцеллеза по регионам Казахстана неравномерно, заболеваемость людей достигала 62,7 случая на 100 000 в (Батырханова, Абуова, 2016). Однако эти данные следует рассматривать с осторожностью, поскольку истинная заболеваемость бруцеллезом может быть занижена из-за ошибок диагностики, разнообразия клинических случаев и неточности официальных данных.

В приграничных регионах России и Казахстана может возникать общее пространство природно-очаговых территорий не только давно существующих здесь инфекций, таких как туляремия и бруцеллез, но интенсивное распространение и формирование природных очагов новых инфекционных болезней (Гражданов и др., 2013).

Бруцеллез крупного рогатого скота влечет за собой огромные экономические потери в животноводстве, так как неблагополучные по данной инфекции хозяйства вынуждены расходовать большие средства на проведение мер по оздоровлению и профилактике болезни. Бруцеллезная инфекция тормозит развитие племенного скотоводства.

В настоящее время мероприятия по оздоровлению стада в неблагополучных по бруцеллезу пунктах, основаны на систематических диагностических исследованиях поголовья с последующей изоляцией и убоем выявляемых пораженных особей и при необходимости вакцинацией животных.

Предотвращение бруцеллеза людей зависит от контроля заболевания у животных, а также от надлежащей обработки продуктов животного происхождения.

В целом, анализ многолетних данных мониторинга распространенности бруцеллеза в животноводческих хозяйствах и работы по оздоровлению

неблагополучных по бруцеллезу животных методом вакцинации и систематических диагностических исследований свидетельствует о недостаточной эффективности проводимых мероприятий.

В связи с этим, необходимы новые исследования с привлечением современных подходов для оздоровления крупного рогатого скота от бруцеллеза, в частности, молекулярно-генетических методов.

## **1.2 Породы крупного рогатого скота Республики Казахстан**

Республика Казахстан является крупной животноводческой страной, в которой разводят крупный рогатый скот молочного и мясного направления (Омбаев, 2013; Кинеев, 2014). В Казахстане разводят следующие породы коров: аулиекольская, казахская белоголовая, черно-пестрая, голштинская, бестужевская, симментальская, холмогорская, красная степная, ярославская порода (Джаримбетова, 2013).

В настоящем исследовании использовали три породы: аулиекольскую, казахскую белоголовую и голштинскую. Аулиекольская и казахская белоголовая относятся к мясным породам, их отличием является не только высокое качество получаемой продукции, но и способность к достаточно быстрой акклиматизации, они отличаются достаточно крупной массой, быстротой созреваемости. Формирование мясного скотоводства невозможно без разнообразия пород, использования мировых генетических ресурсов на базе аборигенных пород. В Казахстане селекционная работа по созданию мясных пород проводилась под руководством Казахского НИИ животноводства и кормопроизводства, племенная работа проводилась в различных регионах Казахстана. Отечественные породы мясного скота были созданы методом воспроизводительного и поглотительного скрещивания (Омбаев, 2013).

Коров молочной породы – голштинской, завозят в Казахстан из-за рубежа, они характеризуются высокими надоями, но требуют тщательного ухода и высококачественных кормов в рационах.

### **1.2.1 Создание казахской белоголовой породы крупного рогатого скота**

Казахская белоголовая порода относится к породам мясного направления, селекционная работа была начата в тридцатых годах прошлого века - герефордских быков скрещивали с коровами «аборигенного» казахского и отчасти калмыцкого скота. Новая порода отличается ценными качествами мясной продуктивности и скороспелости герефордов, и высоким потенциалом адаптивности и приспособляемости к условиям разведения местного скота (Кинеев, 2014). Порода была апробирована в 1950 году на территориях КазССР и РСФСР, и ученые – селекционеры во главе с Галиакберовым Н.З. за выведение породы были удостоены Государственной премии Казахской ССР, а в 1951 году группе ученых были вручены Государственные премии СССР (Омбаев, 2013).

Казахский белоголовый скот имеет ярко выраженный мясной тип телосложения: компактное телосложение с крепким костяком и хорошо развитой мускулатурой, характерное для мясного типа продуктивности. Животные хорошо акклиматизируются в разных климатических зонах, быстро нагуливаются и имеют высокие среднесуточные приросты.

Высота коров в холке - 123 - 125 см. Масса взрослых коров составляет 500-560 кг, быков - 850-950 кг. Живая масса телят при рождении колеблется от 25 кг у телочек до 30 кг у бычков. При интенсивном откорме быков среднесуточный привес достигает 900-1000 г и в возрасте 15-18 месяцев живая масса составляет 450-480 кг. Убойный выход хорошо откормленных быков - 60-65%. Сочное мясо имеет отложения жира между мышцами.

При создании казахской белоголовой породы увеличению живой массы коров содействовали, помимо совершенствования условий кормления и содержания, проведение в племенных хозяйствах селективных работ по выбраковке низкопродуктивных особей и замены их казахско-геррефордскими помесями (Жузенев и др., 2012). Молочность казахских белоголовых пород коров была существенно выше, так как на первых ступенях породного преобразования проводилась работа по созданию скота мясомолочного типа.

В Республике Казахстан казахскую белоголовую разводят в хозяйствах Восточно-Казахстанской, Костанайской, Северо-Казахстанской областей. Особо ценится поголовье, выращенное в Акмолинской области.

В 2012 году начала свою деятельность палата казахской белоголовой породы Республики Казахстан. Основная деятельность Палаты направлена на организацию и координацию селекционно-племенной работы с казахской белоголовой породой. Палата организует учет племенного поголовья путем присвоения статуса племенной продукции и определяет племенную ценность племенных животных, в том числе племенных животных-производителей, осуществляет выдачу племенных свидетельств на племенную продукцию. По данным палаты, количество заводчиков - членов палаты составляет 286 сельхозформирований и фермерских хозяйства, зона распространения породы обширна, и условия содержания и виды кормов варьируются в зависимости от региона. Породных животных казахской белоголовой породы по состоянию 2017 год насчитывалось 225 тыс. голов, в том числе коров 98 тыс. голов.

В России казахская белоголовая порода занимает 63% от общего поголовья скота мясных пород. Ее частично разводят в Среднем и Нижнем Поволжье Волгоградской, Астраханской, Самарской, Саратовской и Оренбургской областях и Забайкальском крае РФ Агинском Бурятском автономном округе и в Республике Алтай. Большая часть племенных стад скота этой породы находятся в Волгоградской, Оренбургской, Саратовской областях и в Республике Алтай.

### 1.2.2 Создание аулиекольской породы крупного рогатого скота

Аулиекольская порода была выведена при скрещивании казахской белоголовой породой с шарале и абердино-ангусами. Работа по выведению аулиекольской породы началась в 1962 году под руководством академика ВАСХНИЛ Ростовцева Н., порода была создана на основе скрещивания трех мясных пород – казахской белоголовой, шароле и абердин-ангусской (Султанов и др., 2012; Омбаев, 2013). Порода получила свое название благодаря Аулиекольскому району Костанайской области Республики Казахстан, где была выведена. Это порода характеризуется хорошей скороспелостью, качеством мяса, высокой энергией роста, приспособленностью к местным условиям, эффективно развивается и даёт стабильную прибыль (Жузенев и др., 2012).

Масть животных аулиекольской породы – светло-серая, они характеризуются крепкой конституцией, неплохо переносят периоды бескормицы и понижения качества кормов. Зимой они обрастают густым волосяным покровом и хорошо приспособлены к суровым природно-климатическим условиям. Вес быков составляет около 1000 кг, коров - около 550 кг. Выход мяса 63%.

Животные аулиекольской породы являются долгожителями, корова может давать 12-13 отелов. Порода получила широкое распространение, основная зона распространения КРС аулиекольской породы – северные районы и юго-восток Республики Казахстана, это Костанайская, Северо-Казахстанская, Алматинская, Карагандинская и Акмолинская области (Жузенев и др., 2012; Джаримбетова, 2013).

Аулиекольская порода мясного скота стала первой и пока единственной породой отечественной селекции, которая стала мясным брендом Республики Казахстан. На сегодняшний день разведением маточного поголовья аулиекольской породой занимаются в 11 областях Республики Казахстан,

быков-производителей используют в 13 областях и начали экспортировать фермеры Российской Федерации.

В Казахстане существует республиканская палата аулиекольской породы. Это общественное объединение, членами которого являются физические и юридические лица, занимающиеся разведением аулиекольского скота, племенной и селекционной работой. В числе задач палаты и контроль над разведением аулиекольского скота за пределами страны. Аулиекольская порода считается редкой, малочисленной: по данным республиканской палаты аулиекольской породы, численность общего поголовья всех членов палаты на 1 января 2016 года составляла 10300 голов племенных чистопородных коров и 400 голов племенных чистопородных нетелей.

### **1.3 Диагностические методы исследования бруцеллеза, бактериофаги**

Вопрос устранения бруцеллеза представляет всё еще значительные проблемы, вследствие широкого распространения, наличия скрытых форм течения инфекции и изменчивости возбудителя болезни.

В настоящее время оздоровительные мероприятия против бруцеллезной инфекции основаны на проведении систематических диагностических исследований и своевременной изоляции больных животных. Однако возбудитель бруцеллеза достиг в процессе своей эволюции столь совершенных свойств, что может под воздействием различных факторов очень быстро перестроиться вплоть до изменения антигенной структуры. Поэтому наряду с ярким проявлением иммунологических реакций у некоторых животных может наблюдаться скрытое носительство бруцелл, не выявляемое серологическими методами исследования. Наличие скрытого бруцеллоносительства среди животных представляет большую опасность в смысле длительности сохранения источника инфекции.

При проведении массовых диагностических исследований животных на бруцеллез в Казахстане применяют серологические тесты, официально рекомендованные Всемирной организацией здоровья животных: реакция агглютинации (Райта), пластинчатая реакция агглютинации с розбенгал-антигеном (ПРА/РБП – Роз-бенгал проба), реакция связывания комплемента и реакция длительного связывания комплемента (РСК/РДСК) при инфекционном эпидидимите баранов (овец), возбудитель которого так же относится к роду *Brucella*; иммуноферментный анализ (ИФА) и флуоресцентной поляризации (ФПА). Для определения статуса стада (отары) по бруцеллезу применяются бактериологический метод (с постановкой биологической пробы) или ПЦР. (Приказ МСХ РК от 29.06.2015 №7-1/587).

Установлено, что использование общепринятых серологических тестов РА, РСК, РДСК, ПРА/РБП при проведении систематических плановых диагностических исследований, в неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах, не способствует полному и эффективному их оздоровлению. Такие же проблемы имеются и при диагностике инфекционного эпидидимита баранов, где в ветеринарной практике применяется официально регламентированный диагностический тест РДСК, при постановке которого используется овисный антиген. Даже после неоднократных исследований, с применением указанных серологических реакций и последующей изоляции выявленных инфицированных особей, в оздоравливаемых от бруцеллеза хозяйствах, наблюдаются повторные случаи заболевания животных бруцеллезом (Белобаб, 1998; Иванов, 2000; Султанов и др., 2002).

Доказано, что бруцеллы во всех трех формах (S-, R-, L-формы) обладают способностью длительно паразитировать в организме животных, поддерживая хроническое течение инфекции и переходя из одной формой в другую, чем в числе других причин, и объясняется низкая эффективность существующих серологических тестов. Антитела, выработанные в организме животных к одной форме бруцелл, не улавливаются антигенами, приготовленными из бруцелл других форм. Так, например, применяемый

сегодня при массовых диагностических исследованиях животных в РА и РСК/РДСК единый бруцеллезный антиген приготовлен из бруцелл, находящихся в S-форме, который не может выявить животных, зараженных R- и L-формами бруцелл. Такие животные остаются в стаде источниками инфекции, а её возбудитель благодаря способности диссоциировать в различные формы мигрирует из одного вида животного на другой, рассеивая и длительно поддерживая неблагополучие по бруцеллезу (Тен, 1996; Гордиенко, 2011).

В таких случаях, для более полного и быстрого выявления больных животных, особенно при латентном течении инфекции, обусловленной диссоциированными формами бактерий, а также при установлении иммунологической характеристики стада изготовление наиболее полноценных в антигенном отношении и высокочувствительных диагностикумов имеет чрезвычайно большое значение.

Уже давно прослежена связь диссоциации микроорганизмов с инфекционным процессом. В зависимости от стадии патологического процесса частота выделения S- и R-форм различна. Большинство данных свидетельствует о том, что слабовирулентные и авирулентные диссоцианты появляются в середине и в конце инфекционного процесса. Показана принципиальная возможность диссоциативных форм вызывать заболевание (Воробьев, 2010).

Среди изученных культур *B. abortus* наблюдается тенденция к реверсии. Большинство ревертантов составили полевые диссоцианты. Скорость изменения антигенных свойств музейных штаммов зависит от степени их диссоциации у S- культур изменчивость составляет 12,5 %, у культур с положительной трипафлавиной пробой увеличивается до 50 %, у культур агглютинирующихся R- сывороткой, достигает 66,7 %, у глубокоизмененных культур с синей окраской колоний антигенные характеристики остаются неизменными. Изменение антигенных свойств культур можно установить по факту лизиса (фаготест коррелирует с методом Уайт-Вильсона), а также с

помощью гомологичного бактериофага по степени лизиса им культур (фаготест коррелирует с РА) (Блинкова, 1991).

Использование штаммов из измененных форм бруцелл при изготовлении диагностических препаратов позволит повысить их специфичность, чувствительность, а также оперативность и результативность официально рекомендованных серологических тестов на основе увеличения количества выявляемых животных инфицированных бруцеллами типичных и измененных форм.

Также определенное место в инфекционном процессе занимает - бактериофаг. Как дополнительный раздражитель он способствует повышению защитных сил организма и вместе с тем воздействует на возбудителя непосредственно, сильно изменяя его, снижая процент высеваемости, затрудняя диагностику бруцеллеза. У небруцеллезных больных и здоровых лиц бруцеллезный бактериофаг ни разу не был обнаружен. Наличие в организме больного специфического фага может изменить течение заболевания и его исход в результате воздействия на возбудителя как прямого, так и опосредованного, через стимуляцию защитных сил организма (Дрожжевкина, Мишнаевский, Уралева, 1957).

Присутствие бактериофагов в больном организме, естественно, не может не оказать влияние на возбудителя инфекции. Очевидно, это и является одной из причин частого выделения значительно измененных культур, идентификация которых чрезвычайно затруднена (Новосельцев, 1959). Возбудитель бруцеллеза, попав в организм иммунизированного животного, в одних случаях претерпевает глубокие изменения во всех своих свойствах, включая резкое падение вирулентности, в других случаях длительно сохраняется в типичной для него высоковирулентной форме. Изменчивость бруцелл в иммунизированном организме может проявиться в различной степени – от изменения отдельных признаков до глубоких изменений всех свойств культуры. В таких случаях идентификация культур значительно затруднена, и определения ее вида на основании обычно применяемых

лабораторных методов не представляется возможным, и только проба с бактериофагом и РА позволяют это осуществить (Дрожевкина, 1957).

Бактериофаги, также как и вирусы животных являются индукторами интерферона, регулирующего напряженность гуморального и клеточного иммунитета (Осидзе, Простяков, 1983). В то же время интерферон угнетает не только процесс индукции фага, но и его последующую внутриклеточную репродукцию. Возможно, что интерферон образует комплексы с ДНК лизогенной бактерии или с ее эписомными участками, препятствуя репликации ДНК профага (Колобов и др., 1966).

Н.Н. Островская (Островская, 1969) установила, что естественно лизогенные культуры бруцелл находятся в различном состоянии: типичные, высоковирулентные в S- форме, стойко сохраняющие свои свойства при оптимальных условиях их содержания; неустойчивые S- формы, быстро переходящие в состояние диссоциации, а также культуры со значительными измененными фенотипическими свойствами. Общими биологическими показателями для всех измененных под влиянием фага форм являлось состояние диссоциации, выраженное в разной степени у разных культур, разная степень ослабления вирулентности, а также изменение серологической специфичности. Видовые признаки лизогенных форм оказались наиболее стабильными.

По мнению E.Nelson и др. (Nelson, Piccet, 1951) в крови только тогда имеются условия для развития L- форм, когда в ней одновременно присутствуют и бруцеллезный бактериофаг и бруцеллы. Случаи, когда у лиц, инфицированных бруцеллами отсутствует клиника заболевания, объясняется подавлением вирулентной формы возбудителя присутствием бруцеллезного фага, который обуславливает появление авирулентных вариантов, в том числе и L- форм, как остаточных форм возбудителя в организме. При соответствующих условиях они могут реверировать и привести к генерализации инфекции.

По классификации А.С. Тихоненко (Тихоненко, 1968) бруцеллезные фаги входят в третью группу, первую подгруппу. Подавляющее большинство изученных фагов этой группы содержат ДНК обычного типа. Головка фагов гексагональной формы и, большинство из них, представляют собой изометрический многогранник. Фаги бруцелл имеют размер головки  $60 \pm 2$  нм, длина отростка  $15 \pm 1$  нм. В этой подгруппе объединены фаги с коротким конусовидным отростком без базальной пластинки.

По характеру негативных колонии бруцеллезные фаги можно разделить на 2 группы: фаги, образующие негативные колоний от точечных до 8 мм в диаметре и фаги с негативными колониями не более 1 мм в диаметре. Форма их округлая, неправильная, иногда с чистым дном, иногда с признаками вторичного роста. Появление негативных колоний отмечали через 12 часов после инкубации. При этом колонии формировались не одновременно: после обнаружения первых колоний новые продолжали появляться на протяжении 18 часов. Цикл развития бруцеллезных фагов замедлен и соответствует циклу развития бруцелл. При оптимальной множественности инфекции (10-1-0,1-0,01) и исходной концентрации бруцелл, равной  $10^6$  м.т. в  $1 \text{ см}^3$ , нарастание титра фага наблюдалось только через 9-12 часов контакта фага с клеткой. Качество питательной среды имело при этом большое значение. При использовании бульона Мартена (рН 7,2), урожайность фагов не превышала 4-12 корпускул на одну клетку, а на казеиново-ферментативном бульоне (рН 7,2) урожайность фагов резко повышалась до 75,3. Отмечено, что наряду с чувствительными к бактериофагу клетками в наблюдаемой популяции имелись и резистентные клетки, это обстоятельство является причиной слабого выявления литического действия бруцеллезного фага в жидкой среде. Бруцеллезные бактериофаги могут 2 года сохраняться при температуре  $4-6^{\circ}\text{C}$ , а также при комнатной температуре в бульоне и буферных смесях со слабощелочной (рН 7,3) и щелочной (рН 8,3) реакциями. Фаги термостабильны, гибель наступает при  $85-90^{\circ}\text{C}$  через 30 мин, при температуре  $60^{\circ}\text{C}$  в течении 60 мин. Облучение УФ- лучами приводило к

значительной инактивации через 30 мин. При добавлении 1 % раствора хлороформа число живых корпускул фага уменьшилось через 1 час в 2 раза, через 24 часа инаktivировалось 99 % фагов. В перекрестной реакции нейтрализации наблюдалась четкая специфичность антифаговых сывороток к гомологичному фагу. Гетерологичные сыворотки также нейтрализовали фаги, но в разной степени, следовательно они представляют собой родственную в антигенном отношении группу. Аллергической реакции фаги не вызывали. В результате взаимодействия корпускул фага Тб с клетками *V. abortus* регистрировали все этапы репродукции бактериофага, т.е. процесс адсорбции, латентный период, размножение фага, лизис бактериальной клетки и как следствие этого - интенсивное накопление фага во внешней среде. Процесс же взаимодействия фага Тб с клетками *V. suis* ограничен только первым этапом - адсорбцией корпускул. В отношении клеток *V. melitensis* выявлена почти полная инертность фаговых корпускул, что выражается, в большинстве случаев, в отсутствии адсорбции фага на клетках этого вида бруцелл. В препаратах ультратонких срезов *V. abortus* в разные периоды их контакта с фагом обнаружены клетки с адсорбированными и внутриклеточно расположенными репродуцированными корпускулами фага, а также разрушенные клетки с выходящими в среду частицами фага. В препаратах клеток *V. suis* наблюдались свободные от фага, неизмененные клетки или клетки с адсорбированными корпускулами, что указывает на наличие только первого этапа во взаимодействии фага с клетками этого вида бруцелл. Присутствие в препаратах ультратонких срезов *V. suis* клеточного детрита, указывало на разрушение клеток, обусловленных, вероятно, лизисом извне (Островская, 1961; Блинкова, 1989; Ломов, 1969; Островская, 1968; 1970; Островская, Соловьева, 1960).

В 1955 году М.З. Попхадзе и Т. Г. Абашидзе выделили бруцеллезный бактериофаг, проявляющий специфическое литическое действие в отношении культур *V. abortus*. Этот фаг получил название фага Тб. Принятие видовых критериев рода *Brucella* позволило сделать заключение, что все имеющиеся

расы бактериофагов обладали сходными свойствами с фагом ТБ (Островская, 1961), который был признан эталонным бруцеллезным бактериофагом (Report Joint FAO/WHO, 1970).

В 1969 году К. Glowinska из штамма *B. suis* выделила бактериофаг, получивший название Weybridge (Wb). Определение диапазона хозяев нового фага показало, что он лизирует культуры *B. abortus*, всех биоваров в S-форме и *B. neotomae*; не вызывает лизиса *B. melitensis*, *B. canis* и *B. ovis*. В 1975 году М. Corbel и Е. Thomas сообщили о выделении бактериофагов Firenze (Fi). Изучение спектра их литического действия показало, что он подобен таковому фага Wb, а от бактериофага ТБ различается более обширным диапазоном хозяев (включая *B. suis* и *B. neotomae*). J. Douglas сообщил об выделении из культуры *B. melitensis*, подвергшейся воздействию фага Wb, нового бактериофага Berkley (Bk). Выделенные фаги имели способность лизировать бруцеллы всех видов, находящихся в S-форме. Однако фаготипирование измененных форм бруцелл продолжало оставаться проблемой. В связи с этим была проведена модификация существующих фагов с использованием мутагенных агентов и в результате получили R-фаг, лизирующий измененные формы бруцелл вида *Abortus*. С идентичным спектром литического действия R-фаги выделены Д. Л. Блинковой и в Восточно-Казахстанской НИВС. В 1982 году из фекалий овец и коз изолировали фаги Izathagar (Iz), проявляющие литическую активность в отношении S-форм *B. abortus* и *B. suis* 1 и 4 биоваров, *B. neotomae*, частично лизировали S-варианты *B. melitensis* и *B. suis* 2 и 3 биоваров и образовали негативные колонии на R- культурах *B. melitensis* и *B. suis*. С. Rigby сообщил об выделении бактериофага Nepsan (Np), который по своим свойствам подобен фагу ТБ (Воробьев, 2006).

Впервые стойкие лабораторные расы бруцеллезных бактериофагов были получены из вакцинного штамма *B. abortus* 19 (Дрожжевкина, 1951). В дальнейшем совершенствование методик выделения и усиления бактериофагов позволило добиться сравнительно легкой и закономерной их изоляции из различных объектов (Ляпустина и др., 1999.). Бруцеллезные

бактериофаги изолировали из музейных и свежесодержанных культур бруцелл, из крови, спинномозговой жидкости, мочи больных бруцеллезом людей, из содержимого желудка, крови, внутренних органов абортированных плодов и больных бруцеллезом животных (Дрожевкина, Толстокорова, 1957; Дрожевкина и др., 1957).

Фаги изолировали из 25 абортплодов овец в 18 случаях, из 4 абортплодов коров в 100% (Дрожевкина, Толстокорова, 1957). Из культур *B. ovis* выделили 6 клонов фагов которые лизировали *B. abortus* и не лизировали штаммы *B. ovis*. Изучение этих фагов с помощью вторичных фагорезистентных культур и антифаговых сывороток, показало их однотипность с фагом ТБ (Попхадзе, Абашидзе, 1974). При изучении 18 клонов фагов, изолированных из культур *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis*, *B. canis* установили, что по биологическим свойствам все фаги аналогичны и они относятся к одной родственной группе (Попхадзе, Анатадзе, 1983).

В опытах по изучению влияния фага ТБ на развитие инфекционного процесса у морских свинок, зараженных различными видами бруцелл установлено, что одномоментное введение фага, а также в ближайшие дни до и после заражения, не оказывало существенного влияния на тяжесть и характер развития процесса. В отдельных опытах, например, при заражении животных культурой *B. melitensis* 565, фаг в какой-то степени усугублял патологический процесс. Все эти факты свидетельствуют о важности более глубокого изучения роли бруцеллезного бактериофага в патогенезе этого заболевания (Таран, и др., 1974).

Последние исследования, связанные с характеристикой ДНК бруцеллезных фагов для объяснения механизма относительной специфичности с помощью сравнительного рестрикционного анализа ДНК бактериофагов ТБ, Wb, Bk, R, Np показали идентичность их геномов, что не дает основания для деления их на группы (Ляпустина, Лямкин, 1999; Таран и др., 1983; Jones, Mc Duff, Wilson, 1962; Ищанова, 1970; Орлова, 1989; Corbel, 1979; Rigby, Cerqueira-Canipos et al, 1989; Блинкова, 1989; Corbel, Morgan,

1972; Morris, Corbel, 1973; Morris, Corbel, Phillip, 1973; Островская, Кайтмазова, 1966; Parnas, Sarnecka-Srunke, 1965).

Ряд авторов, изучавших бруцеллезные фаги, выделенные как из разнообразных объектов (молоко, сточные воды, кровь и т.д.), так и из различных географических пунктов (Россия, Польша, Африка, Австралия) отмечают в своих исследованиях поразительное морфологическое единообразие этих фагов (Parnas, Sarnecka-Srunke, 1965; Тихоненко, 1968; Brinley - Morgan, Kay, Bradley, 1960; Calderaie, Pickett, 1965; Parnas., Bradley, 1964).

Основной формой существования фагов бруцелл в природе является умеренный фаг. Характерной особенностью преимущественного большинства выделенных бруцеллезных фагов является их слабая литическая активность, замедленная адсорбция, сравнительно длительный период внутриклеточного развития и способность вызывать латентную инфекцию (Вершилова, 1972; Ломов, 1969).

Определено, что фаговые частицы могут прочно адсорбироваться на клетках млекопитающих и при контакте с популяцией чувствительных к нему бактерий, начинается инфекционный цикл с прогрессивным выходом фагового потомства (Гулевич и др., 1974).

Выявление значительного числа (62%) культур бруцеллносителей латентного фага (естественно лизогенных культур или L-форм бруцелл) дает основание считать, что именно профаг, фиксированный в разных локусах хромосомы клеток бруцелл, и является причиной изменчивости их генома, а следовательно изменения их метаболизма и функций. Наряду с этим наличие среди лизогенных культур бруцелл с неизменным фенотипом дает основание предполагать, что воздействие различных факторов внешней среды на такие культуры может индуцировать у них изменение ряда фенотипических признаков и тем самым индуцировать возникновение измененных форм, что, очевидно, и имеет место в природных условиях (Островская, 1969).

Сыворотки крови клинически здоровых людей не усиливали действие бактериофага на чувствительные к нему бактерии, в тоже время иммунные сыворотки неизменно стимулировали влияние бактериофага на чувствительную к нему микробную клетку (Сачков, Мосина, 1974).

Тем не менее, бактериальная клетка-хозяин не играет, видимо, какой-либо активной (т.е. связанной с ее метаболизмом) роли при адсорбции большинства штаммов фага. Об этом говорит тот факт, что фаговые частицы необратимо прикрепляются не только к убитым бактериям, но даже к обломкам лизированных или разрушенных клеток. Нечувствительность бактерий к воздействию фага обусловлена либо ограничением его развития внутри клетки, либо нарушением адсорбции фага из-за дефектности развития. Структура и роль этих рецепторов в жизни бактерий различна. Фагоустойчивые варианты бактерий с нарушенной рецепторной способностью обычно характеризуются значительной изменчивостью, что уменьшает вероятность их выделения (Лебедева, 2000).

Одним из наиболее существенных свойств фагов является их специфичность действия, которая может быть настолько высокой, что позволяет дифференцировать отдельные штаммы бактерий и даже варианты одного и того же штамма. Благодаря значительной специфичности литического действия бактериофаги используют как чрезвычайно чувствительный тест для классификации микроорганизмов (Золотухин, Васильев, 2002; Кольникова, 1992).

Антигенные свойства бактериофагов установлены давно. В 1921 Борде и Чуке впервые установили, что введение кроликам фаголизатов стимулирует продуцирование антител, нейтрализующих фаг. Однако эти сыворотки так же содержали агглютинины к бактерии – хозяину, а введение бактерии – хозяина не стимулировало образование антител, нейтрализующих фаг (Адамс, 1961).

Иммунологический анализ позволил дифференцировать у них не менее 4 антигенов. При парэнтеральном введении фагов в организм животных обнаруживают антитела, которые нейтрализуют литическую активность фага

и обладают высокой специфичностью. Иммунологическая активность фага обусловлена белками. Они специфичны и не имеют ничего общего с белками бактерии-хозяина (Ганюшин, 1988).

Давно доказано, что антифаговые сыворотки обладают значительной специфичностью т.е. они инактивируют гомологичные, но и единичные гетерологичные штаммы фагов. А также доказано что, система фаг-антифаг обладают способностью связывать комплемент (Адамс, 1961). В бактериофагии антифаговые сыворотки получают для определения антигенного родства между фагами. Антигенное свойство фагов считается основным признаком их различия. Изучение антигенных свойств между фагами проводится путем постановки реакции нейтрализации с фагами и антифаговыми сыворотками.

Отто и Винклер смогли удалить все бактериальные агглютинины, так чтобы это не сказалось на свойствах антифаговых сывороток. Калманзон, Херши и Бронфенбреннер так же указывали на то, что перед иммунизацией фаги подвергали соответствующей очистке, так как тогда полученные антифаговые сыворотки не содержали антител, специфичных к бактерия-хозяину. Это существенный этап, при постановке реакции связывания комплемента (Адамс, 1961).

В тоже время антифаговые антитела обязательно присутствуют у хронически и латентно больных (Дрожевкина и др., 1957), которые взаимодействуют с данным антигеном.

Наличие бруцеллезного бактериофага почти во всех исследованных абортплодах несомненно оказывает большое влияние на результаты их бактериологического исследования. Это определяет необходимость широкого применения в повседневной работе лабораторий антифаговой сыворотки и других средств, направленных на подавление бактериофага (Дрожевкина, Толстокорова, 1957).

Разработка быстрых и высокоэффективных методов идентификации и определения таксономического статуса бактерий рода *Brucella* тесно связана с

усовершенствованием методов диагностики. Существующая таксономия бруцелл основана на определении комплекса морфологических, биологических и биохимических свойств и признаков, обусловленных метаболизмом, генетическими особенностями, антигенной структурой возбудителя. Для идентификации и внутривидовой дифференциации значительно расширен спектр используемых фагов, что особенно важно для определения таксономического положения R-вариантов бруцелл (Драновская, 1989; Corbel, Morgan, 1975; Косилов, Ганишвили, Блинкова, 1989).

Литературные данные и собственные исследования позволили Р.Ж. Ищановой (Ищанова, 1970) сделать вывод о том, что нет бруцеллезного фага, который полностью удовлетворяет принципам в дифференциации. Все имеющиеся сейчас фаги относительно специфичны.

Применяемый для типизации бруцелл фаг ТБ проявляет избирательную литическую активность к клеткам *B. abortus*, не лизирует бруцеллы вида *B. melitensis* и в некоторых случаях, при высокой множественности инфекции, обуславливает слабый лизис клеток *B. suis* (Островская, Кайтмазова, 1966).

Включение в систему фаготипирования R-фагов для обнаружения диссоциированных штаммов бруцелл расширяет возможность метода и способствует более точной постановке диагноза (Косилов, Ганишвили, Блинкова, 1989; Morgan, Corbel, 1976). При изучении R-фагов получены результаты свидетельствующие, что все культуры *B. abortus* в S-форме лизируются фагом Тб, тогда как R-фаги лизировали лишь 6% из них. По мере того, как меняются свойства культур в сторону от S к R, чувствительность фага Тб уменьшается, а R-фагов увеличивается. Но характерно, что чужеродные виды бруцелл (*B. suis* и *B. melitensis*) в SR - и R-форме не лизировались R-фагами. У культур *B. ovis* фаголизис отмечался у 42,8 %. Интересно отметить, что в большинстве случаев у культур *B. abortus* в S-форме, но лизирующихся R-фагами, впоследствии, начинают появляться признаки диссоциации. Лизис интактных культур R-фагами, очевидно

свидетельствует о их нестабильности или о начале диссоциации (Косилов, 1992).

В этой связи предложено в качестве контроля за изменением биологических свойств вакцинного штамма 19 использовать R- фаг. Так, при сравнительном изучении динамики изменения свойств у культур 16 штаммов *B. abortus*, в т.ч. штамма 19, было установлено, что наиболее ранним признаком процесса диссоциации у *B. abortus* является лизис R- фагом. В последующем у таких штаммов появляются остальные показатели, свидетельствующие об изменчивости микроба (проба с трипафлавином, тест Уайт-Вильсона, трансформация антигенной структуры из S- в R-) (Блинкова, 1991).

Б.В. Галич (Галич, 1990) в своих работах отметил, что введение в состав диагностикума для постановки серологических реакций антигенов специфического бактериофага позволяет повысить качество диагностики на 11,8% при остром бруцеллезе, на 10,6%- при подостром бруцеллезе, на 14,5%- при хроническом субкомпенсированном и на 23,3%- при хроническом декомпенсированном бруцеллезе. Фаговая антигенемия не зависела от длительности заболевания и постоянно удерживалась на высоком уровне.

Вышеизложенное свидетельствует о перспективности и необходимости селекции и скрининга бактериофагов для идентификации и типизации возбудителя бруцеллеза, изучения таксономии бруцелл, создания диагностических препаратов на основе специфического бактериофага.

#### **1.4 Молекулярно-генетические подходы в животноводстве и ветеринарной медицине**

В мировой практике селекции, разведения и оздоровлении перспективных пород крупного рогатого скота в последние десятилетия широко используются молекулярно-генетические подходы (Гладырь и др., 2009; Доцев и др., 2018), в частности, ДНК-маркеры генетических

заболеваний, снижающих репродуктивный потенциал или устойчивость к болезням, и методы генодиагностики для выявления возбудителей инфекционных заболеваний (Зиновьева и др. 2002; Сулимова, 2004).

Молекулярно-генетические маркеры (ДНК-маркеры), разработанные на основе разных модификаций полимеразной цепной реакции (ПЦР), являются важнейшим инструментом анализа генома животных, растений, микроорганизмов (Сулимова, 1993). Они обладают высокой чувствительностью (до 2-10 молекул ДНК на пробу), избирательностью, точностью, воспроизводимостью результатов анализа.

ДНК - маркер представляет собой участок генома, который может быть связан с определенным хозяйственно-ценным признаком (например, генетическим заболеванием или устойчивостью к определенной болезни), или имеет определенные свойства, позволяющие идентифицировать его (Глазко и др., 2001). Например, при ISSR-PCR это длина амплифицируемого фрагмента, фланкированного определенными последовательностями, заданными первичной структурой праймеров. ДНК-маркеры универсальны и более информативны, и удобны, чем традиционно-используемые морфологические, кариологические или биохимические маркеры, что связано с тем, что различия особей на генетическом уровне зачастую не проявляются в фенотипе ввиду эффекта доминирования или низкого уровня экспрессии генов.

Молекулярно-генетические маркеры лежат в основе метода геномной селекции для животноводства и племенного дела (Якушева и др., 2012), их применение является одним из ключевых подходов в зарубежной генетике и селекции крупного рогатого скота. ДНК-маркеры позволяют выявлять полиморфизм животных на уровне ДНК (Sulimova et al, 1996), они используются в селекции на повышение молочной продуктивности коров и повышения качества мяса и молочной продукции (Lin et al., 1992; Селионова, 2011). Генетические маркеры применяются для выявления отцовства, установления породной чистоты животных, для отбора особей с ценными

генотипами, что позволяет значительно ускорить селекцию и направленно проводить племенную работу.

Особое значение молекулярные маркеры имеют для борьбы с врожденными генетическими заболеваниями (Эрнст, Жигачев, 2006). Наличие информативных генетических маркеров для диагностирования генетических заболеваний позволяет успешно проводить работу по улучшению имеющихся пород и стад сельскохозяйственных животных (Зиновьева, 2004). Так, во Всероссийском институте животноводства РАН проводятся исследования по мониторингу племенных животных крупного рогатого скота по комплексу селекционно-значимых ДНК-маркеров для выявления носителей генов, которые негативно влияют на воспроизводство животных, в том числе ассоциированным с эмбриональной и ранней постэмбриональной смертностью и фертильностью (Игнатьева, Сермягин, 2019). В частности, для оздоровления поголовья голштинского и голштинизированного скота ДНК-маркеры применяют для выбраковки телят с мутациями VLAD, CVM и DUMPS, поголовный скрининг по этим ДНК-маркерам молодняка племенных животных голштинского и голштинизированного скота позволяет на ранних стадиях выбраковать телят с нарушениями.

В последние десятилетия в мире активно развивается направление, связанное с разработкой ДНК-маркеров, связанных с устойчивостью животных к инфекционным заболеваниям (Lewin, 1996; Афонюшкин и др., 1998; Ковалюк, 2008; Сацук, 2009). Использование в качестве маркерных систем полиморфных последовательностей нуклеотидов в молекуле ДНК основано на наличии гомологичных последовательностей внутри генов, которые у разных индивидов могут различаться по одному или нескольким основаниям в результате точечных мутаций, вставок, делеций или инверсий. Такие последовательности ДНК называются полиморфными, а само явление гетерогенности или вариабельности нуклеотидного состава гомологичных последовательностей – полиморфизмом ДНК. Маркерные системы на основе полиморфизма ДНК дают возможность использовать для анализа любые

ткани и органы, независимо от стадии развития организма и имеют целый ряд преимуществ по сравнению с другими типами маркеров, такие как отсутствие плейотропного эффекта, возможность проведения ретроспективных исследований и др. На этой основе проводится разработка ДНК-маркеров для генетической оценки животных (Баранов и др., 2015), что позволяет проводить широкую экспресс-диагностику поголовья на наличие/отсутствие хозяйственно – ценных признаков (Sulimova et al, 1992; Дроздов и др., 2010), в том числе генетической устойчивости к генетическим и распространенным инфекционным заболеваниям (Juliarena et al, 2008; Зайцев, 2005).

С другой стороны, у животных наблюдается широкое разнообразие механизмов устойчивости к патогенным бактериям и вирусам, проявляющееся на уровнях экспрессии генома (организменном, клеточном, молекулярном). На этой основе также проводится разработка различных ДНК-маркеров для оценки поголовья на наличие/отсутствие генетической устойчивости или предрасположенности животных к распространенным инфекционным заболеваниям.

С помощью молекулярно-генетических методов возможно также исследование штаммов, рас и биоваров возбудителей различных инфекционных заболеваний (Маккреди, Чимера, 1999), распространенных на различных территориях и поражающих животных определенных видов и пород, получение важных данных по типированию и филогенографии возбудителей заболеваний (Панин и др., 1998).

В последние десятилетия в мире, в связи с широкой распространенностью бруцеллеза, активно развивается направление, связанное с разработкой ДНК-маркеров, связанных с устойчивостью животных к бруцеллезу (Семендеева, 1994). Изучали раннюю экспрессию генома - транскрипты у естественно-резистентных и восприимчивых пород коров (Rossetti et al, 2011).

### **1.4.1 BoLA - комплекс генов, определяющий устойчивость крупного рогатого скота к болезням**

В настоящее время доказано, что система генетической защиты животных от болезней включает в себя главный комплекс гистосовместимости – ГКГ (или МНС — Major Histocompatibility Complex). ГКГ играет решающую роль в определении иммунологической реактивности организма при воздействии возбудителей инфекционных заболеваний. Проведенные в разных странах исследования показали связь между ГКГ и устойчивостью к различным заболеваниям (Lewin et al, 1996).

В настоящее время показано существование ГКГ у всех сельскохозяйственных животных и птицы: крупного рогатого скота, лошадей, свиней, овец, коз, кур и др. Активно изучается ассоциация ГКГ-антигенов с восприимчивостью и резистентностью к различным заболеваниям у разных видов животных и птицы.

Главный комплекс гистосовместимости крупного рогатого скота BoLA интенсивно изучается более чем в 30 лабораториях мира (Aida et al, 1994; Behl et al, 2012). У крупного рогатого скота комплекс генов, определяющий устойчивость к болезням, назван BoLA (Lewin et al, 1999). Система BoLA закодирована в 23 хромосоме, содержит более 154 генов и разделена на три класса I, II, III. Молекулы BoLA II класса экспрессируются на поверхности антиген-представляющих клеток (АПК), таких как дендритные клетки, макрофаги, В-лимфоциты. АПК представляют чужеродные пептиды (после внутриклеточного процессинга) на своей мембране в комплексе с молекулами МНС II класса CD4<sup>+</sup> Т-клеткам. CD4<sup>+</sup> Т-клетки могут дифференцироваться в CD4 (Th1)-воспалительные клетки, которые индуцируют воспалительный или клеточно-опосредованный ответ, или в CD4(Th2) - Т-хелперные клетки, индуцирующие гуморальный иммунный ответ (Nassiry et al, 2005). Дифференцировка CD4 Т-клеток зависит от цитокинов, секреция которых

регулируется видом антигена, захваченного антиген-представляющей клеткой.

За устойчивость или чувствительность крупного рогатого скота к болезням отвечает ген BoLA-DRB3. Впервые аллельное разнообразие экзона 2 гена BoLA-DRB3 было изучено Van Eijk с соавторами (Van Eijk et al, 1992). Ими была предложена система на основе ПЦР-ПДРФ анализа. Продукты ПЦР-амплификации обрабатывали рестриктазами RsaI, BstYI и Hae III. В результате в полиакриламидном геле визуализировали ряд фрагментов ДНК разного размера, так называемых ДНК-паттернов. Каждому аллелю был присущ свой набор длин этих рестрикционных фрагментов, что позволяло идентифицировать разные аллели (Xu et al, 1993). Ген имеет очень высокий уровень аллельного полиморфизма, методом ПЦР-ПДРФ протипировано 54 аллеля (Zanotti et al, 1996). С помощью прямого секвенирования продуктов амплификации гена BoLA-DRB3 (Сулимова, Зинченко, 2011) было показано, что ген представлен в популяциях разных пород КРС более 100 аллелями, что в некоторых аллелях существуют различия в несколько нуклеотидов, которые невозможно определить с помощью ПЦР-ПДРФ анализа, поскольку в процессе рестрикции образуются одинаковые ДНК-паттерны.

Многочисленными исследованиями доказаны ассоциативные связи между антигенами BoLA-системы и восприимчивостью животных к вирусу лейкоза КРС и гемобластозам (Sulimova et al, 1995), маститам (Suprovych et al, 2016; Zhang et al, 2007), некробиозу (Супрович, Колинчук, 2018), туберкулезу, паразитарным болезням, вирусной диарее, анкилозирующему спондилиту, нодулярному дерматиту и др. На настоящий момент достоверно установлен целый ряд маркеров, связанных с устойчивостью крупного рогатого скота к паразитам (трипаносома, сальмонелла и др.). Эти работы проводятся в Китае (Zhang et al, 2007), Иране (Nassiry et al, 2005)

Генетический полиморфизм BoLA-системы у разных пород крупного рогатого скота определяет породоспецифическую устойчивость животных к

различным патогенам, циркулирующим в популяции в разных регионах (Мачульская и др., 2013; Лукичев и др., 2015).

ДНК-маркеры на основе аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 для изучения генетической устойчивости или предрасположенности крупного рогатого скота к бруцеллезу ранее в мире не изучались.

#### **1.4.2 Спектры аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 в связи с устойчивостью к лейкозу и бруцеллезу у крупного рогатого скота**

BoLA-система является прекрасной моделью для изучения генетической предопределенной устойчивостью жвачных к различным заболеваниям. В настоящее время активно исследуется роль этой системы в иммунном ответе. Особое значение приобретает поиск внутри ГКГ-локуса генов, ответственных за восприимчивость к различным болезням, что поможет в дальнейшем использовать BoLA-систему для иммуногенетического мониторинга в селекции на резистентность крупного рогатого скота по данному признаку.

В настоящее время хорошо известно, что за устойчивость или чувствительность крупного рогатого скота к вирусу лейкоза отвечает ген BoLA-DRB3. Ген представлен в популяциях разных пород КРС более 100 аллелями, из них 54 протипированы методом ПЦР-ПДРФ. Устойчивость к лейкозу связана с 3 аллелями (\*11, \*23, \*28), а восприимчивость – с 4 аллелями (\*8, \*16, \*22, \*24), причем у животных с аллелями восприимчивости вируса лейкоза подавлен иммунитет, что приводит к заболеванию животного, развитию новообразований и гибели. Очень важно, что аллель устойчивости является доминирующим.

При анализе аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 используется метод ПЦР-ПДРФ, который основан на обработке ДНК рестрицирующими эндонуклеазами с последующим электрофоретическим разделением полученной смеси и определением длин рестрикционных фрагментов. Так как рестрицирующие эндонуклеазы имеют строго специфические места

расщепления, то генетические различия в нуклеотидной последовательности ДНК между индивидуумами (т. е. полиморфизм на уровне ДНК) приведут к различному распределению сайтов рестрикции вдоль соответствующих молекул ДНК, а следовательно, к получению смесей продуктов рестрикции, в которых длина гомологичных фрагментов будет различаться. Таким образом, полиморфизм ДНК будет тестироваться как полиморфизм длин рестриционных фрагментов (ПДРФ) (Сулимова, 1993).

Успешное проведение направленной работы по улучшению имеющихся пород и стад сельскохозяйственных животных опирается на выявление молекулярно-генетических маркеров для диагностирования инфекционных заболеваний и маркеров на устойчивость животных к болезням и другие хозяйственно-ценные признаки.

Особое значение для селекции на устойчивость крупного рогатого скота к бруцеллезу приобретает поиск внутри ГКГ-локуса генов, ответственных за восприимчивость к этому патогену, что поможет в дальнейшем использовать ВоLA-систему для иммуногенетического мониторинга в селекции на резистентность крупного рогатого скота к этому широко распространенному и опасному заболеванию.

Настоящая диссертационная работа посвящена выявлению молекулярно-генетических ДНК-маркеров - аллелей гена ВоLA-DRB3, связанных с генетической устойчивостью животных к *Brucella*, с целью их использования для селекции генетически устойчивых к бруцеллезу пород, и для оздоровления поголовья КРС от бруцеллеза. При разработке ДНК-маркеров генетической устойчивостью животных к *Brucella* в племенных или неблагополучных по бруцеллезу хозяйствах может проводиться поголовный скрининг новорожденных телок, что позволит формировать генетически устойчивые к бруцеллезу стада.

## 2 Собственные исследования

### 2.1 Материалы и методы исследований

Исследования проводились в Инновационном научно-образовательном центре биотехнологии и экологии Брянского государственного университета и в лаборатории бруцеллеза ТОО «Казахский научно-исследовательский ветеринарный институт» при АО Национальный холдинг «QazBioPharm» МЗ РК и ветеринарных лабораториях Костанайской, Атырауской и Алматинской областей в период с 2004 по 2019 гг.

Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у коров в связи с их устойчивостью к бруцеллезу.

Для поиска молекулярных маркеров устойчивости и чувствительности к бруцеллезу были использованы образцы геномной ДНК крупного рогатого скота аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород Казахстана, выделенные из цельной крови животных.

Кровь отбиралась у животных из следующих регионов (областей) РК: Западно-Казахстанской, Карагандинской, Костанайской, Восточно-Казахстанской и Алматинской областей. В общей сложности разного рода исследования были проведены на 339 образцах геномной ДНК КРС.

В исследовании генетического полиморфизма аллелей гена BoLA-DRB3 был проведен анализ следующих групп животных:

взрослые здоровые животные – 180 голов, из них

- аулиекольская порода- 84
- казахская белоголовая порода -73
- голштинская порода -23

взрослые больные бруцеллезом животные – 159 голов:

- аулиекольская порода- 74
- казахская белоголовая порода-73
- голштинская порода- 12

Схема проведения работы по поиску молекулярно-генетических маркеров устойчивости / чувствительности к бруцеллезу представлена на рисунке 1.

### СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

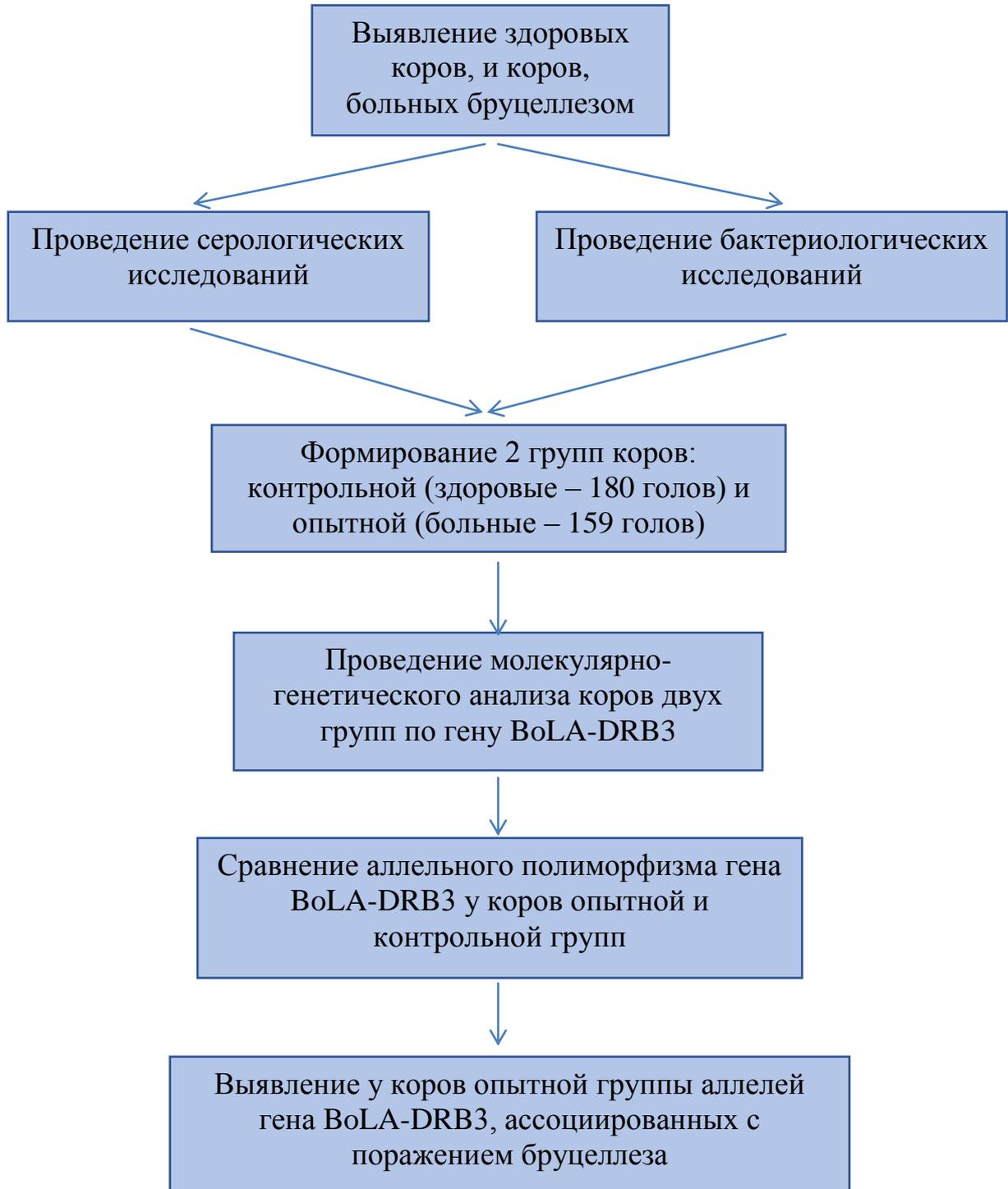


Рисунок 1 - Схема проведения исследования

Исследование генетической устойчивости крупного рогатого скота к бруцеллезу методом ПЦР-ПДРФ основано на определении генетического полиморфизма гена *BoLA-DRB3* и выявлении аллелей, ассоциированных с устойчивостью или чувствительностью к бруцелле и ответственных за формирование иммунной реакции к патогену.

Анализ аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* животных проводили согласно методу ПЦР-ПДРФ, описанному Удиной И., который включает следующие этапы работы:

1. Выделение ДНК из образцов крови животных.
2. Амплификация фрагмента гена *BoLA-DRB3* длиной 284 п.о.
3. Горизонтальный электрофорез в агарозном геле продукта амплификации.
4. Рестрикционный анализ фрагмента 284 п.о. ферментами *RsaI*, *HaeIII*, *BstX2I*.
5. Вертикальный электрофорез продуктов рестрикции в полиакриламидном геле (ПААГ).

Выделение ДНК из цельной крови КРС

Выделение ДНК из цельной крови КРС проводили согласно методу, описанному в диссертации Дроздова Е.В. (2013). Для выделения ДНК использовали венозную кровь крупного рогатого скота с антикоагулянтом – ЭДТА. Отбор крови осуществлялся одноразовыми вакутейнерами на 5 мл из яремной или хвостовой вены животных. В работе применяли методику выделения, основанную на лизисе лейкоцитов крови гуанидин тиоционатом и сорбции молекул ДНК на силике.

Состав растворов для выделения:

1. Лизирующий буфер: Гуанидин тиоционат – 59 г; Трис сухой – 1,2 г; ЭДТА – 0,584 г; Соляная кислота конц. – 100 мкл; Тритон (детергент) – 1 мл; Вода до 100 мл.
2. Солевой буфер: 1М раствор *KCl* и *NaCl* – 10 мл; Вода – 90 мл; Спирт этиловый 96% – 300 мл.

3. Силика: Силика подготовленная (промытая два раза водой по 100 мл и сутки отстоявшаяся) – 10 г; Вода – 10 мл.

Этапы выделения ДНК:

1. В пробирку эппендорф (1,5-2 мл) отобрать 150-200 мкл крови. Добавить 500 мкл 5М гуанидин тиоционатного буфера и 50 мкл силики.

2. Перемешать содержимое пробирки на вортексе. Инкубировать раствор 5-6 минут при 65°С периодически встряхивая на вортексе.

3. Отцентрифугировать содержимое пробирки 30 секунд на 5000 об. Слить надосадочную жидкость. Добавить 500 мкл 5М гуанидин тиоционатного буфера.

4. Перемешать раствор на вортексе до полной гомогенизации. Отцентрифугировать содержимое пробирки 30 секунд на 5000 об. Слить надосадочную жидкость. Добавить 600 мкл солевого буфера.

5. Перемешать раствор на вортексе до полной гомогенизации. Отцентрифугировать содержимое пробирки 30 секунд на 5000 об. Слить надосадочную жидкость. Добавить 600 мкл солевого буфера.

6. Перемешать раствор на вортексе до полной гомогенизации. Отцентрифугировать содержимое пробирки 30 секунд на 10000 об. Слить надосадочную жидкость.

7. Высушить осадок 5-10 минут при 65° С. Добавить 100 мкл деионизированной воды. Перемешать раствор на вортексе до полной гомогенизации.

8. Инкубировать раствор 5 минут при 65° С периодически встряхивая на вортексе. Отцентрифугировать содержимое пробирки 10 минут на 14000 об. Хранить раствор ДНК при -20° С.

Для оценки качества выделенной ДНК выполняли электрофорез в 1 % агарозном геле в TBE-буфере (U=150 В; t=20 мин). Состав агарозного геля (100 мл): 1) агароза – 1 г; 2) TBE буфер 1x – 100 мл; 3) Бромистый этидий (EtBr) – 10 мкл стандартного раствора.

Выделенная ДНК находится в супернатанте. При необходимости перенести супернатант в чистую пробирку и хранить 1-2 дня при 4°C или перенести на -20° С для длительного хранения

Выделение ДНК проводили без соблюдения стерильности, но под ламинарным боксом для исключения перекрестного загрязнения образцов ДНК. Анализ образцов ДНК проводили методом горизонтального электрофеза в агарозном геле (рис. 2).

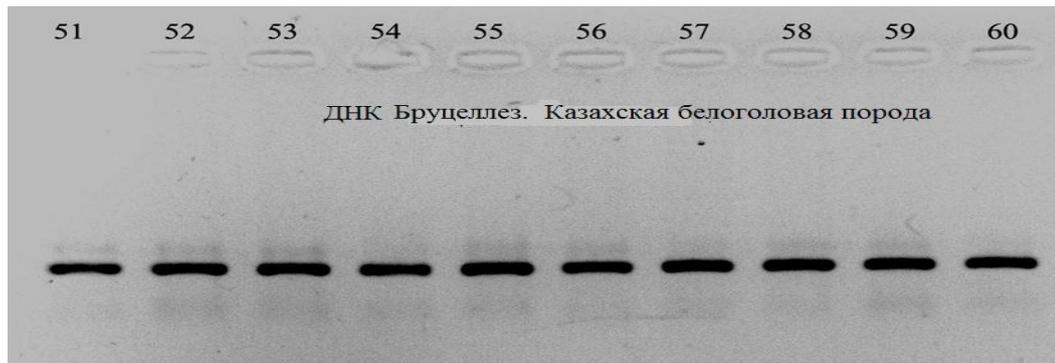


Рисунок 2 - Электрофореграмма геномной ДНК в 1 % агарозном геле

На рисунке видно, что из всех образцов цельной крови ДНК выделилась количественно, концентрация ДНК в пробах выровнена. Амплификация фрагмента гена *BoLA-DRB3* длиной 284 п.о.

Для изучения генетического полиморфизма гена *BoLA-DRB3* использовали реакцию амплификации фрагмента данного гена длиной 284 п.н., условия реакции представлены в таблицах 1, 2, 3.

Таблица 1 - Состав ПЦР-смеси на одну реакцию (общий объем 20 мкл)

№ п/п	Компонент	Объем, мкл
1	Вода деионизированная	9.3 мкл
2	10X полимеразный буфер	2 мкл
3	MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 мкл
4	dNTP Mix (2 mM/ml)	2 мкл
5	Праймер 1 (100 пмоль/мкл)	0,25 мкл
6	Праймер 1 (100 пмоль/мкл)	0,25 мкл

7	Тақ ДНК-полимераза (5000 u/ml)	0,2 мкл
8	Геномная ДНК	4 мкл

Таблица 2 - Температурно-временной режим ПЦР-РВ

№ п/п	Этап	Температура, °С	Время, сек	Количество циклов
1	Первичная денатурация	95	300	36
2	Денатурация	95	15	
3	Отжиг	69	15	
4	Элонгация	72	20	
5	Финальный синтез	72	120	

Полимеразная цепная реакция проводится с использованием праймеров, позволяющих амплифицировать фрагмент гена *BoLA-DRB3* размером 284 п.о.

Таблица 3 - Характеристика праймеров для анализа

Название	5'-3' последовательность	Кол-во нкд	Длина ампликона
HLO-30	atc-ctc-tct-ctg-cag-cac-att-tcc	24	284
HLO-32	tcg-ccg-ctg-cac-agt-gaa-act-ctc	24	

В работе была проверена специфичность праймеров, подбор температуры их отжига и глубина протекания реакции ПЦР в серии экспериментов, при этом для анализа продуктов реакции использовали электрофорез амплифицированного фрагмента в агарозном геле (рис. 3). Как видно на рисунке, амплификация прошла количественно, продукт – фрагмент ДНК длиной 284 п.о. получен для всех образцов ДНК.

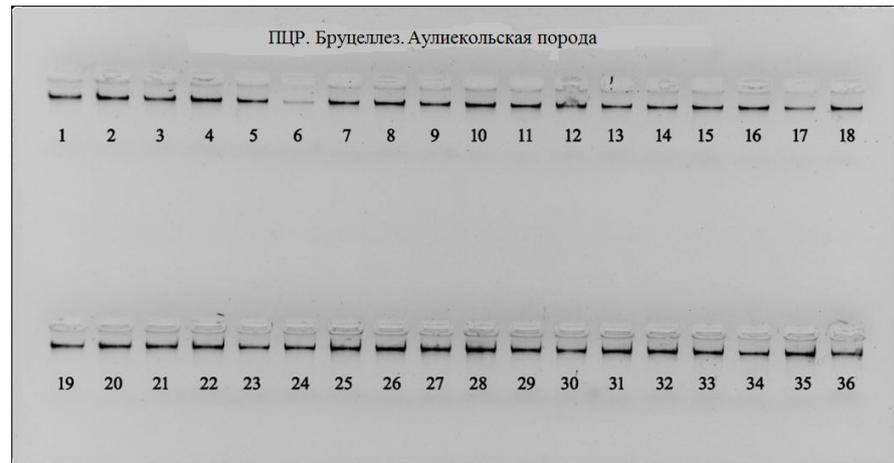


Рисунок 3 – Электрофореграмма продуктов ПЦР.

После амплификации проводили серию рестрикций с тремя эндонуклеазами: *RsaI*, *HaeIII* и *BstX2I*. Условия рестрикции приведены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4 - Условия рестрикции

№ п/п	Рестриктаза	Темп., °С	ПЦР-смесь, мкл	Время, мин
1	<i>RsaI</i>	37	4	60
2	<i>HaeIII</i>	37	4	60
3	<i>BstX2I</i>	60	4	60

Таблица 5 - Буферы для рестриктирующих эндонуклеаз

Ионная сила буфера	NaCl, mM	Tris-HCl, pH7,5	MgCl, mM	Дитиотреитол, mM
Низкая	0	10	10	1
Средняя	50	10	10	1
Высокая	100	50	10	1

Рестрикционные фрагменты разделяли в ходе вертикального электрофореза в 9% полиакриламидном геле следующего состава: 1) 6 мл 29/1% раствора акриламида/бисакриламида; 2) 5 мл TBE буфера 5x; 3) 9 мл воды; 4) 0,013 г персульфата аммония; 5) 24 мкл тетраметилэтилендиамина

(ТЕМЕД). После электрофоретического разделения гель выдерживали в растворе этидия бромида концентрацией 0,1 мкг/мл (Рис. 3,4,5).

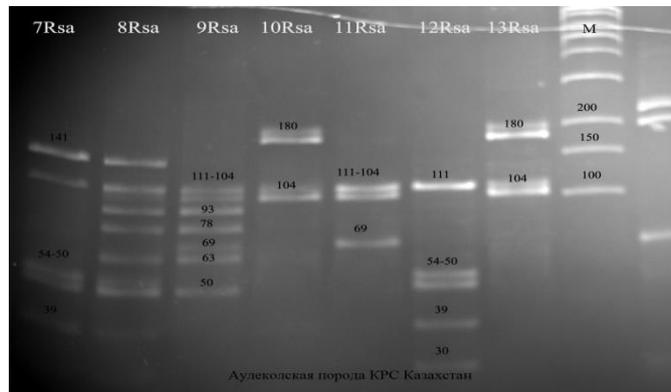


Рисунок 4 - Электрофореграмма продуктов рестрикции фрагмента 284 п.о. эндонуклеазой RsaI

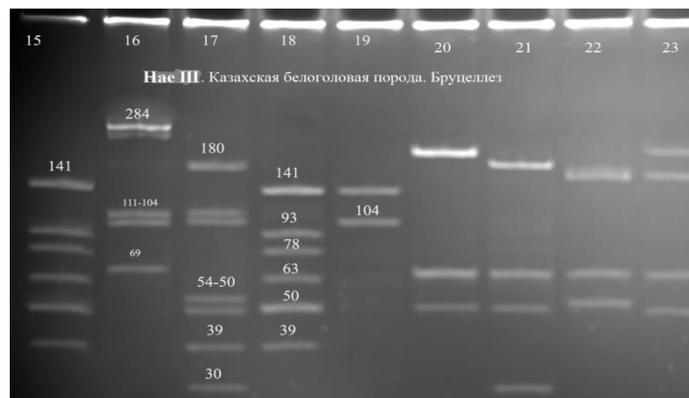


Рисунок 5 - Электрофореграмма продуктов рестрикции фрагмента 284 п.о. эндонуклеазой HaeIII

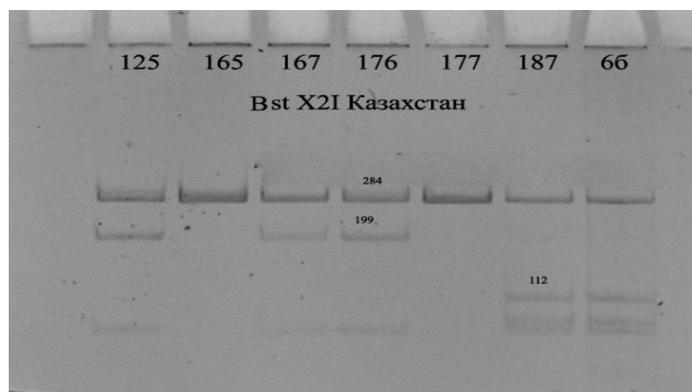


Рисунок 6 - Электрофореграмма продуктов рестрикции фрагмента 284 п.о. эндонуклеазой BstX2I

Гель-электрофореграммы спектров рестрикции анализировали с помощью системы документации GelDoc фирмы BioRad и далее определяли длины рестриктных фрагментов.

Определение длин рестриктных фрагментов после реакций с эндонуклеазами RsaI, HaeIII и BstX2I проводили с помощью таблицы рестрикции для фрагмента гена BoLA-DRB3.2. (Удина, 1998) (таблица 6).

Таблица 6 - Карта рестрикции второго экзона гена BoLA-DRB3

Тип	Рестриктный фрагмент	Тип	Рестриктный фрагмент	Тип	Рестриктный фрагмент
<b>RsaI</b>					
a	78, 33, 30, 39, 54, 50	j	78, 63, 93, 50	s	141, 93, 50
b	111, 30, 39, 54, 50	k	78, 156, 50	t	141, 143
c	111, 30, 93, 50	l	234, 50	u	111, 123, 50
d	111, 30, 143	m	111, 69, 104	v	78, 102, 54, 50
e	141, 39, 51*, 50	n	180, 104	w	78, 33, 69, 54, 50
f	141, 39, 54, 50	o	284	x	78, 33, 69, 104
g	141, 39, 104	p	111, 30, 39, 51*, 50	y	78, 63, 39, 54, 50
h	111, 69, 54, 50	q	141, 90*, 50		
i	180, 54, 50	r	111, 30, 90*, 50		
<b>HaeIII</b>					
a	167, 52, 65	d	190, 29, 65	g	164, 55, 65
b	219, 65	e	167, 117	h	167, 46, 6, 56
c	167, 49*, 65	f	167, 4, 48, 65	i	167, 4, 113
<b>BstX2I</b>					
a	199, 85	c	196*, 85	e	87, 112, 85
b	284	d	87, 197		

Аллельный состав гена BoLA-DRB3 определяли по комплексному анализу спектров рестрикции, согласно таблице 7.

Таблица 7 - Соответствие получаемых рестриктных спектров аллелям гена BoLA-DRB3.2

Спектр RsaI, HaeIII, BstX2I	Номер аллеля по ПЦР- ПДРФ	Аллель гена BoLA- DRB 3.2	Спектр RsaI, HaeIII, BstX2I	Номер аллеля по ПЦР- ПДРФ	Аллель гена BoLA- DRB 3.2	Спектр RsaI, HaeIII BstX2I	Номер аллеля по ПЦР- ПДРФ	Аллель гена BoLA- DRB 3.2
aaa	01	DRB3* 0501	iab	15	DRB3*2 003	ifb	31	DRB3*28 01
aaa	01	DRB3* 0503	jdb	16	DRB3*1 501	maa	32	DRB3*24 01
bab	02	DRB3* 1301	jdb	16	DRB3*1 502	nfb	33	DRB3*27 04
bbb	03	DRB3* 1001	kbb	17	No sequence	lba	34	DRB3*30 01
bbb	03	DRB3* 1002	lfb	18	DRB3*1 801	lba	34	DRB3*30 02
caa	04	No sequenc	lfb	18	DRB3*1 802	cbb	35	DRB3*21 01
rcc	05	DRB3* 3301	sbb	19	DRB3*2 601	lab	36	DRB05
daa	06	DRB3* 2201	lbb	20	DRB3*2 301	oab	37	DRB07
daa	06	DRB3* 2202	lbb	20	DRB3*2 901	bad	38	DRB18
ecc	07	DRB3* 0201	lbb	20	DRB3*3 601	tab	39	No sequenc
faa	08	DRB3* 1201	leb	21	DRB3*0 801	uab	40	No sequenc
fad	09	DRB3* 0301	mab	22	DRB3*1 101	aab	41	DRB3*05 02

fad	09	DRB3* 0302	nab	23	DRB3*2 701	aab	41	DRB3*19 01
fab	10	DRB3* 1601	nab	23	DRB3*2 702	aab	41	DRB3*38 01
fab	10	DRB3* 1602	nab	23	DRB3*2 703	hfb	42	DRB3*28 02
gae	11	DRB3* 0901	nab	23	DRB3*2 705	kfb	43	DRB3*25 012
gae	11	DRB3* 0902	nab	23	DRB3*2 706	kib	44	DRB3*25 011
gae	11	DRB3* 1202	nab	23	DRB3*2 707	sbd	45	DRB3*34 01
haa	12	DRB3* 1701	nbb	24	DRB3*0 101	sbd	45	DRB3*34 02
haa	12	DRB3* 1702	nbb	24	DRB3*0 102	vab	46	DRB3*35 01
haa	12	DRB3* 3201	oaa	25	No sequence	waa	47	DRB3*17 03
haa	12	DRB3* 3202	oda	26	DRB3*0 601	wab	48	DRB3*39 01
haa	12	DRB3* 3203	ofb	27	DRB3*1 4011	web	49	DRB3*37 01
hab	13	DRB3* 0401	ofb	27	DRB3*1 4012	xab	50	DRB3*40 01
hbb	14	No sequenc	ofb	27	DRB3*3 101	gaa	51	DRB3*42 01
iab	15	DRB3* 20011	obb	28	DRB3*0 701	sad	52	DRB3*03 03
iab	15	DRB3* 20012	pcc	29	DRB3*4 101	yab	53	DRB3*19 02
iab	15	DRB3* 2002	qcc	30	Genotypi ng error	jbd	54	DRB3*43 01

Полученные спектры рестрикции позволил определить отдельные аллели для каждого животного, а также определить их генотипы.

Статистическую обработку полученных результатов и определение достоверности различий полученных показателей в исследуемых группах животных проводили по критериям Стьюдента по общепринятым методам (Доспехов, 1985; Усманов, Прошина, 2013). При этом при анализе данных сравнительных популяционно-генетических исследований частоту встречаемости аллелей и доверительные интервалы определяли при 5%- и 1%-ном уровне значимости.

Ошибки частоты аллелей считали по формуле:

$$Si = \sqrt{pi * (1 - pi) / N}$$

Где  $Si$  – ошибка частоты  $i$  – аллеля,  
 $pi$  – частота встречаемости  $i$  – аллеля,  
 $N$  – объем выборки.

Доверительные интервалы для встречаемости аллелей рассчитывали стандартным методом.

В таблицах данные представлены как:

$$Pi \pm t * Si$$

где  $Pi$  – частота встречаемости  
 $i$  – аллеля в процентах,  
 $Si$  – ошибка частоты  $i$  – аллеля в процентах,  
 $t$  – коэффициент Стьюдента для уровней значимости 0,05 или 0,01.

#### Разработка комплексного антигена для диагностики бруцеллеза животных

Разработка комплексного антигена для диагностики бруцеллеза животных включала получение стабильных диссоциантов под воздействием внешних факторов, получение специфического бруцеллезного бактериофага нового типа, конструирование комплексного диагностикума, содержащего измененные формы бруцелл и специфические фаги.

При проведении диагностических исследований животных на бруцеллез применяли серологические (РБП, РА, РСК/РДСК) и бактериологические исследования согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике бруцеллеза», принятым Ветеринарным законодательством РК (Астана, 2005), а также согласно ГОСТам 25385-91 Межгосударственный стандарт. Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы.

Серологическим методом были происследованы образцы сывороток крови от 339 голов крупного и 3559 голов мелкого рогатого скота.

При выполнении экспериментов использовали 30 голов морских свинок и 20 голов кроликов.

Идентификацию и дифференциацию видов и биотипов бруцелл проводили по методике ВОЗЖ (Руководство по наземным животным. Разделы 3.1.-3.3., 2021) и согласно ГОСТу 33675-2015 Межгосударственный стандарт. Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Бактериологические методы.

При проведении исследований использовали 10 штаммов бруцелл видов *B.abortus*, *B.suis*, *B.melitensis*, *B.ovis* и *B.canis*, в том числе штаммы: *B.abortus* 960 (R), *B.melitensis* Невский-12 (R); *B.ovis* 8 (R) и 11 (R) референтные штаммы: *B.abortus* 544 (S), *B.abortus* 54 (S), *B.melitensis* 16M (S), *B.suis* 1330 (S), *B.ovis* 63/290 (R), *B.canis* 1066 (R).

Для получения стабильных диссоциантов бруцелл в качестве индуцирующего агента применяли ультрафиолетовое облучение (ртутно-кварцевую лампу ПКР-2 мощностью 375 Вт). Облучали 3-5 см<sup>3</sup> 10 млрд взвеси (концентрацию бактерий определяли по оптическому стандарту мутности) 48-часовой культуры бруцелл, помещенных в чашки Петри, на расстоянии 20 см от источника облучения, при постоянном покачивании чашки для предотвращения экранирования части бактерий. Из взвеси бруцелл через каждые 2, 3, 5, 15, 30, 60 секунд, 2 и 3 минут от начала облучения отбирали пробы по 0,1-0,2 см<sup>3</sup> в стерильные пробирки. Затем облученные бактерии

высевали на чашки Петри с элективными для бруцелл питательными средами по 100-200 микробных клеток.

В последующем окрашивали выросшие колонии по Уайт-Вильсону и отбирали окрашенные в синий или фиолетовый цвет колонии (диссоцианты).

Изучение степени диссоциации полученных культур бруцелл осуществляли пробой с трипафлавином, термоагглютинацией, реакцией агглютинации на стекле с S-, R- иммунными бруцеллезными сыворотками и определение чувствительности к специфическим фагам.

Референтные штаммы бактериофагов ТБ и IZ получили из лаборатории «Музей культур микроорганизмов» ТОО «КазНИВИ».

Лизогенизацию бактерий с целью выделения бактериофагов проводили согласно способу, предложенному А.Л. Воробьевым и др. (Предпатент РК 14203, 2003).

Антифаговые сыворотки получали по разработанному нами методу. Для этого кроликам вводили бактериофаг, подкожно, в области нижней части каждой из четырех лапок, общим объемом 5,0 см<sup>3</sup>, с предельным титром не менее 10<sup>6</sup>, пятикратно, с интервалом 3 дня. Одновременно с инъекцией фага, вводили препарат «Риботан» на 1, 2, 3, 4 и 5 дни после начала иммунизации и спустя 15 дней, проводили обескровливание подопытных животных для получения сыворотки, которую исследовали в реакции нейтрализации. [Предпатент РК 19392, 2008].

Комплексный антиген для серологической диагностики бруцеллеза готовили согласно разработанному нами способу [Предпатент РК 18053, 2005].

Определение чувствительности комплексного антигена проводили в сравнении с цветным овисным антигеном в РА и биофабричным овисным антигеном в РДСК. В реакциях с опытным и контрольными антигенами использовали сыворотки: антифаговую R- и антифаговую S-сыворотки; иммунные сыворотки, полученные на SR-, L-формы бруцелл; биофабричные:

бруцеллезную, овисную и негативную сыворотки, а также сыворотки крови животных из неблагополучных по бруцеллезу хозяйств.

Изучение активности предлагаемого и биофабричного овисного (контроль) антигенов осуществляли путем их титрации до предельного разведения в РДСК с биофабричной овисной сывороткой.

Специфичность опытного антигена устанавливали в РДСК с биофабричными сыворотками: кампилобактериозной, сальмонеллезной, туляремийной, иерсиниозной, бруцеллезной, овисной и негативной.

При этом использовали следующие компоненты:

- биофабричные бруцеллезный и овисный антигены;
- гемолизин для РСК и РДСК при диагностике инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных;
- комплемент сухой для РСК и РДСК при диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных;
- эритроциты барана;

## **2.2 Результаты исследований и их обсуждение**

### **2.2.1 Генетическая устойчивость к бруцеллезу разных пород крупного рогатого скота Казахстана**

Система BoLA — это главный комплекс гистосовместимости у крупного рогатого скота. Многими учеными изучаются ассоциативные связи между антигенами BoLA-системы и восприимчивостью животных к различным инфекционным заболеваниям. Особое значение приобретает поиск внутри ГКГ-локуса генов, ответственных за восприимчивость к определенным инфекционным болезням, что поможет в дальнейшем использовать BoLA-систему для иммуногенетического мониторинга в селекции на резистентность крупного рогатого скота по данному признаку.

Генетическая устойчивость КРС к инфекционным болезням, в том числе к бруцеллезу, определяется системой BoLA - комплексом генов, определяющим устойчивость животных к патогенам, формирование защитных реакций. Устойчивость к разным заболеваниям крупного рогатого скота связана с наличием определенных генов, и полиморфизмом гена BoLA-DRB3.

В популяциях разных пород КРС ген BoLA-DRB3 представлен более 100 аллелями, из них 54 аллеля можно определить методом ПЦР-ПДРФ. Генетический полиморфизм популяций по гену BoLA-DRB3 разных пород коров в разных регионах определяет генетическую устойчивость животных к возбудителям различных заболеваний, циркулирующим в популяции. Для выделения аллелей, связанных с генетической устойчивостью к определенному возбудителю заболевания, изучается аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 в группах здоровых и больных животных. Генетический полиморфизм гена BoLA-DRB3 в популяциях разных пород коров в разных регионах определяет генетическую устойчивость животных к возбудителям различных болезней, циркулирующих в популяции.

При выполнении диссертационной работы были проведены исследования аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* у здоровых и пораженных бруцеллезом коров мясных пород: аулиекольской, казахской белоголовой, и молочной породы – голштинской. Работа была направлена на выявление аллелей гена *BoLA-DRB3*, встречающихся преимущественно у здоровых или больных бруцеллезом животных изучаемых пород КРС. На основании полученных результатов о присутствии определенных аллелей у здоровых или больных коров могут быть сделаны выводы о наличии генетической устойчивости/восприимчивости к бруцеллезу или их отсутствии у крупного рогатого скота изученных пород КРС.

Молекулярно-генетические исследования для определения генотипов и аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* были проведены на 339 образцах ДНК крупного рогатого скота аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород. Образцы биологического материала отбирались у скота из следующих регионов Республики Казахстан: Западно-Казахстанской области, Карагандинской области, Костанайской области, Восточно-Казахстанской области и Алматинской областей.

#### **2.2.1.1 Формирование групп животных разных пород КРС для исследования генетической устойчивости к бруцеллезу**

Исследование по выявлению генетической устойчивости крупного рогатого скота к бруцеллезу является сложной в организационном плане работой в связи с тем, что для набора группы больных животных необходимо провести очень большой объем работы по выявлению бруцеллоносителей.

Для проведения исследований на генетическую устойчивость /восприимчивость по результатам серологического и бактериологического анализов образцов крови были сформированы группы больных бруцеллезом животных 3 пород. Уровень поражения коров бруцеллезом в животноводческих хозяйствах Казахстана невысокий (до 1.5-2 %, в

зависимости от региона), и для формирования группы больных коров количеством 100 голов необходимо провести исследование примерно 5000 - 6500 образцов. Для проведения настоящего исследования было отобрано около 200 образцов материала больных животных, и для их выявления было исследовано более 10 тыс. образцов крови.

Для выявления больных коров использовались серологические и бактериологические методы, описанные в методике.

Результаты анализа образцов крови больных коров аулиекольской и казахской белоголовой пород из разных регионов Казахстана приведены в приложениях 1 и 2. Анализ коров голштинской породы из Алматинской области выявил 12 больных животных.

В качестве контроля использовали образцы крови здоровых животных из тех же регионов Казахстана, отобранные пропорционально количеству больных коров из этих регионов.

Для проведения исследований было сформировано шесть групп образцов:

1) взрослые здоровые животные трех пород: аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской;

2) взрослые животные трех пород, больные бруцеллезом.

По результатам молекулярно-генетического анализа ДНК методом ПЦР-ПДРФ было проведено генотипирование особей и изучен аллельный полиморфизм по гену *BoLA-DRB3* для следующих групп животных:

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.

Из образцов крови животных была выделена ДНК, проведена амплификация фрагментов длиной 284 п.п. и рестрикция ампликонов. Далее были определены длины рестриктных фрагментов.

### **2.2.1.2 Анализ аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров разных пород Казахстана**

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

В результате анализа полученных рестриктных спектров были определены аллели гена BoLA-DRB3 для 158 образцов геномной ДНК коров аулиекольской породы: здоровые коров - 84 пробы, больные бруцеллезом животных - 74 пробы.

Определение частоты встречаемости разных аллелей гена BoLA-DRB3 в изучаемых выборках здоровых и больных бруцеллезом коров и сравнение аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы проводили на основе анализа электрофоретических спектров продуктов рестрикции по длине рестрикционных фрагментов. Аллели гена определяются по наличию или отсутствию определенных сайтов рестрикции, полученные результаты по аллельному составу и генотипам гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных лейкозом коров аулиекольской породы показаны в таблицах 8 и 9.

Таблица 8 - Спектры рестрикции и генотипы по гену BoLA-DRB3 у здоровых животных аулиекольской породы

№ исх	Спектры RsaI, HaeIII, BstY2	Генотип
1аул	lfb/fab	18/10
4аул	maa/ecc	32/7

5аул	ofb/sbb	27/19
6аул	nfb/nfb	33/42
8аул	lab/faa	36/8
9аул	mab/bbb	22/3
10аул	pcc/caa	29/4
11аул	haa/leb	12/21
12аул	gae/nbb	11/24
13аул	lfb/jdb	18/16
14аул	nbb/lbb	24/20
15аул	faa/haa	8/12
18аул	jdb/sbb	16/19
19аул	nfb/ofb	33/27
20аул	maa/lfb	32/18
21аул	pcc/mab	29/22
22аул	nfb/faa	42/8
23аул	nbb/ecc	24/7
24аул	lab/nab	36/23
25аул	jdb/maa	16/32
26аул	bbb/caa	3/4
27аул	lab/sbb	36/19
30аул	fab/nab	10/23
31аул	nfb/faa	42/8
32аул	obb/leb	28/21
33аул	obb/bbb	28/3
34аул	caa/haa	4/12
35аул	lfb/lbb	18/20
36аул	lbb/jdb	20/16
37аул	lbb/nab	20/23
38аул	jdb/ecc	16/7

39аул	leb/ofb	21/27
40аул	ecc/lbb	7/20
41аул	faa/bbb	8/3
42аул	faa/bbb	8/3
43аул	lab/sbb	36/19
45аул	obb/lbb	28/20
46аул	lab/sbb	36/19
48аул	haa/ofb	12/27
49аул	jdb/sbb	16/19
50аул	ifb/obb	31/28
51аул	gae/fab	11/10
52аул	nbb/pcc	24/29
54аул	lfb/ecc	18/7
56аул	lbb/caa	20/4
57аул	lab/jdb	36/16
60аул	faa/kbb	8/17
61аул	bbb/leb	3/21
62аул	mab/fab	22/10
63аул	nbb/maa	24/32
64аул	sbb/jdb	19/16
65аул	nab/lab	23/36
66аул	lfb/jdb	18/16
67аул	ecc/caa	7/4
68аул	nbb/maa	24/32
69аул	caa/haa	4/12
70аул	pcc/mab	29/22
71аул	haa/leb	12/21
72аул	ecc/lbb	7/20
73аул	caa/lab	4/36

74аул	bbb/leb	3/21
75аул	bbb/leb	3/21
78аул	leb/caa	21/4
79аул	sbb/haa	19/12
80аул	nbb/maa	24/32
81аул	ofb/sbb	27/19
82аул	obb/bbb	28/3
83аул	pcc/caa	29/4
84аул	bbb/leb	3/21
85аул	jdb/ecc	16/7
86аул	jdb/ecc	16/7
87аул	caa/haa	4/12
88аул	ofb/sbb	27/19
89аул	ecc/lbb	7/20
92аул	mab/bbb	22/3
93аул	haa/leb	12/21
94аул	haa/leb	12/21
95аул	obb/bbb	28/3
96аул	pcc/mab	29/22
97аул	ofb/sbb	27/19
98аул	bbb/caa	3/4
100аул	mab/pcc	22/29
102аул	mab/bbb	22/3
103аул	lab/jdb	36/16
104аул	lab/jdb	36/16
105аул	mab/bbb	22/3
106аул	lab/jdb	36/16
108аул	pcc/caa	29/4

Генотипы и аллели гена BoLA-DRB3 были установлены всего для 84 здоровых коров аулиекольской породы.

Аналогичная работа была проведена с образцами ДНК больных коров аулиекольской породы, спектры рестрикции и генотипы для гена BoLA-DRB3 для 74 животных представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Спектры рестрикции и генотипы по гену BoLA-DRB3 у больных коров аулиекольской породы

№ образца, регион	Спектры RsaI, HaeIII, BstY2	Генотип
1 Кар	ecc/ecc	7/7
2 Кар	gae/obb	11/28
3 Кар	fab/fab	10/10
5 Кар	lfb/lfb	18/18
6 Кар	haa/haa	12/12
17 Алм (19)	lfb/lfb	18/18
16 Алм (82)	obb/lba	28/34
1 Алм (82)	hbb /hbb	14/14
2 Коста	bbb/bbb	3/3
3 Коста	kbb/pcc	17/29
5 Коста	lbb/caa	20/4
10 Коста	leb/leb	21/21
11 Коста	haa/haa	12/12
12 Коста	fab/fab	10/10
13 Коста	ecc/lfb	7/18
14 Коста	jdb/sbb	16/19
19 Коста	gae/gae	11/11
20 Коста	pcc/pcc	29/29
1 Алм	ecc/ecc	7/7
10 Алм	jdb/ecc	16/7

19 АЛМ	fab/fab	10/10
40 АЛМ	fab/hbb	10/24
75 АЛМ	fab/lab	10/36
95 АЛМ	jdb/sbd	16/45
98 АЛМ	fab/lab	10/36
99 АЛМ	hbb/haa	14/12
112 АЛМ	lfb/lfb	18/18
128 АЛМ	lba/lab	34/36
165 АЛМ	ecc/ecc	7/7
186 АЛМ	ifb/ifb	31/31
189 АЛМ	ecc/ecc	7/7
219 АЛМ	iab/htb	15/42
237 АЛМ	lab/lab	36/36
1ВКО	lba/lab	34/36
2 ВКО	hbb/haa	14/12
3 ВКО	iab/htb	15/42
4 ВКО	ecc/ecc	7/7
5 ВКО	iab/htb	15/42
6 Кар	fab/hbb	10/24
7 Кар	lba/lab	34/36
8 Кар	fab/fab	10/10
9 Кар	ecc/ecc	7/7
10 Кар	ecc/ecc	7/7
11 Кар	lab/lab	36/36
12 Кар	fab/hbb	10/24
13 Кар	jdb/sbd	16/45
14 Кар	lfb/lfb	18/18
15 Кар	ifb/ifb	31/31
16 Кар	fab/lab	10/36

17 Kap	lfb/lfb	18/18
18 Kap	bbb/bbb	3/3
19 Kap	ecc/ecc	7/7
20 Kap	jdb/ecc	16/7
21 ЗКО	lfb/lfb	18/18
22 ЗКО	haa/haa	12/12
23 ЗКО	hbb/haa	14/12
24 ЗКО	lab/lab	36/36
25 ЗКО	fab/hbb	10/24
26 ЗКО	jdb/sbb	16/19
27 ЗКО	lfb/lfb	18/18
28 ЗКО	lab/lab	36/36
29 ЗКО	kbb/pcc	17/29
30 ЗКО	ecc/lfb	7/18
31 ЗКО	fab/hbb	10/24
32 ЗКО	kbb/pcc	17/29
33 ЗКО	lbb/caa	20/4
34 ЗКО	fab/lab	10/36
35 ЗКО	jdb/ecc	16/7
36 ЗКО	fab/fab	10/10
37 ЗКО	ecc/ecc	7/7
38 ЗКО	iab/htb	15/42
39 ЗКО	ecc/lfb	7/18
40 ЗКО	lba/lab	34/36
41 ЗКО	fab/hbb	10/24

Данные таблиц 8 и 9 позволили рассчитать частоты встречаемости разных аллелей гена BoLA-DRB3.2 в геномах здоровых коров и бруцеллоносителей аулиекольской породы КРС. Полученные результаты представлены в таблицах 10 и 11.

Таблица 10 - Частота встречаемости аллелей VoLA-DBD3 у здоровых коров аулиекольской породы КРС

№	№ аллеля	Количество	
		шт.	%
1	3	15	8.9 ± 2.2
2	4	10	5.9 ± 1.8
3	7	10	5.9 ± 1.8
4	8	7	4.1 ± 1.5
5	10	4	2.4 ± 1.2
6	11	2	1.2 ± 0.84
7	12	9	5.3 ± 1.7
8	16	13	7.7 ± 2.1
9	17	1	0.6 ± 0.59
10	18	5	3.0 ± 1.3
11	19	11	6.6 ± 1.9
12	20	9	5.3 ± 1.7
13	21	11	6.6 ± 1.9
14	22	7	4.2 ± 1.5
15	23	4	2.4 ± 1.2
16	24	7	4.2 ± 1.5
17	27	7	4.2 ± 1.5
18	28	6	3.6 ± 1.4
19	29	7	4.1 ± 1.5
20	31	1	0.6 ± 0.59
21	32	6	3.6 ± 1.4
22	33	2	1.2 ± 0.84
23	36	11	6.6 ± 1.9
24	42	3	1.8 ± 1.0
	<b>ИТОГО</b>	<b>168</b>	<b>100</b>

Как видно из данных таблицы 10, совокупно в геномах исследованной группы здоровых коров аулиекольской породы (84 особи) встречается всего 24 аллеля гена *BoLA-DBD3*, при этом чаще всего встречаются аллели \*3 (8.9%), \*19, \*21 и \*36 (по 6.6%), а также \*4 и \*7 – по 5.9%.

Таблица 11 - Частота встречаемости аллелей *BoLA-DBD3* у больных бруцеллезом коров аулиекольской породы КРС

№	№ аллеля	Количество	
		штук	%
1	3	4	2.7 ± 1.3
2	4	2	1.3 ± 0.93
3	7	24	16.2 ± 3.02
4	10	20	13,5 ± 2.8
5	11	3	2.0 ± 1.2
6	12	9	6.1 ± 2.0
7	14	5	4.0 ± 1.6 *
8	15	4	2.7 ± 1.3
9	16	7	4.7 ± 1.7
10	17	3	2.0 ± 1.2
11	18	17	11.5 ± 2.6
12	19	2	1.3 ± 0.93
13	20	2	1.3 ± 0.93
14	21	2	1.3 ± 0.93
15	24	6	4.0 ± 1.6
16	28	2	1.3 ± 0.93
17	29	5	3.3 ± 1.5
18	31	4	2.7 ± 1.3
19	34	5	3.4 ± 1.5
20	36	16	10.8 ± 2.6
21	42	4	2.7 ± 1.3
22	45	2	1.2 ± 0.89
	<b>ИТОГО</b>	<b>148</b>	<b>100</b>

Данные таблицы 11 свидетельствуют, что в исследованной группе больных бруцеллезом коров аулиекольской породы (74 особи) выявлено всего 22 аллеля гена VoLA-DBD3, при этом чаще всего встречаются аллели \*7 (16.2%), \*10 (13.5%), \*18 (11.5%) и \*36 (10.8%). На эти 4 аллеля приходится более 50% всех аллелей.

На рисунке 7 представлено сравнение частот аллелей гена VoLA-DRB3 у здоровых коров и бруцеллоносителей аулиекольской породы.

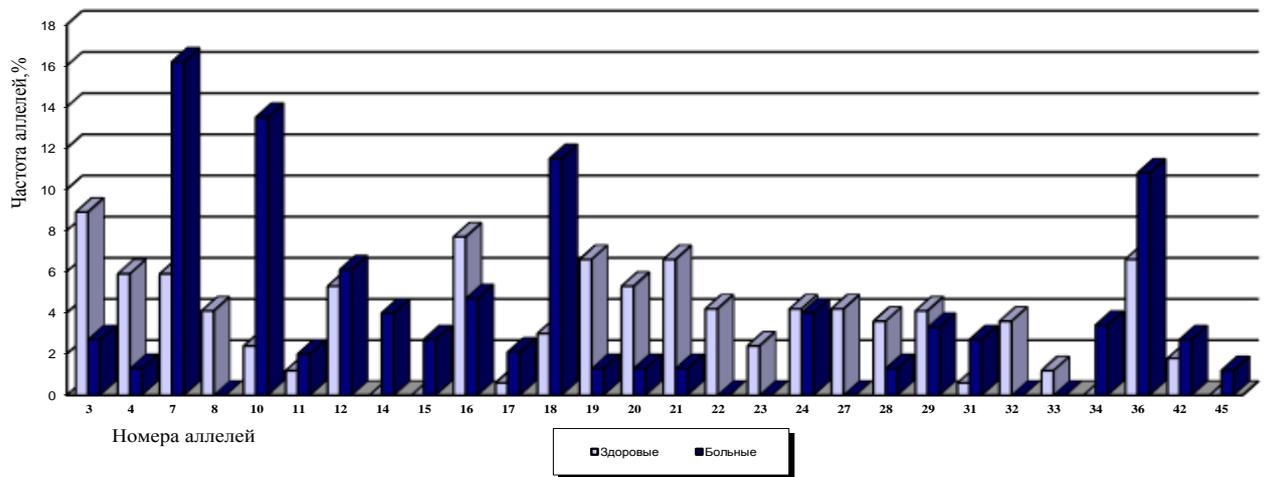


Рисунок 7 - Частота аллелей гена VoLA-DRB3 у здоровых коров и бруцеллоносителей аулиекольской породы

Представленные на рисунке 7 результаты позволяют визуально сравнить аллельный полиморфизм гена VoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы. Аллели, которые чаще всего встречаются в группах здоровых и больных животных (самыми распространенными у здоровых коров являются аллели \*3, \*4, \*16, \*19, \*21, и в группе больных коров чаще всего встречаются аллели \*7, \*10, \*18, \*36) и были сравнены по частотам и проведена статистическая обработка результатов (табл. 12).

Как следует из таблицы 12 нами выявлено 7 аллелей, различие в частоте которых между группами подтверждается статистически - с уровнем достоверности 0.9 (\*) и 0.95 (\*\*). У здоровых коров с устойчивостью к

бруцеллезу статистически достоверно коррелируют аллели \*3, \*4, \*19, \*21, присутствующие у 49.9% особей, причем в гетерозиготном состоянии У/Н – 43%. В группе больных животных аллели устойчивости выявлены всего у 6.6% особей.

Таблица 12 - Наиболее распространенные аллели VoLA-DBD3 у здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы КРС

Тип аллелей	Аллели, %	Здоровые коровы	Больные коровы
Аллели У устойчивость	3	<b>8.9 ± 2.2 *</b>	2.7 ± 1.3
	4	<b>5.9 ± 1.8*</b>	1.3 ± 0.93
	19	<b>6.6 ± 1.9*</b>	1.3 ± 0.93
	21	<b>6.6 ± 1.9*</b>	1.3 ± 0.93
Аллели Ч чувствительность	7	5.9 ± 1.8	<b>16.2 ± 3.02 **</b>
	10	2.4 ± 1.2	<b>13,5 ± 2.8 **</b>
	12	5.3 ± 1.7	6.1 ± 2.0
	18	3.6 ± 1.4	<b>11.5 ± 2.6 **</b>
	36	6.6 ± 1.9	10.8 ± 2.6

\* - различие между здоровыми и больными животными достоверно для уровня значимости 0.9

\*\* - различие между здоровыми и больными животными достоверно для уровня значимости 0.95

У больных коров статистически достоверно выделяются аллели \*7, \*10 и \*18, выявленные у 41.2% бруцеллоносителей у аулиекольской породы. Для аллелей \*12 и \*36 различие в частоте встречаемости между здоровыми и больными коровами статистически недостоверно.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать статистически достоверный вывод о том, что нами выявлены аллели У (\*3, \*4, \*19, \*21), ответственные за устойчивость и преимущественно представленные у 50.1% здоровых коров. Также выявлены аллели чувствительности Ч (\*7, \*10,

\*18), ответственные за чувствительность к бруцеллезу и встречающиеся у 41.2% бруцеллоносителей у аулиекольской породы.

Данные по частоте встречаемости аллелей, характерных для больных (Ч - чувствительность) и здоровых коров (У - устойчивость), представлены в таблице 13. Это позволит сгруппировать генотипы здоровых и больных животных по аллелям устойчивости и чувствительности и проанализировать взаимодействие этих аллелей на предмет доминирования при проявлении кодируемых ими признаков.

Таблица 13 - Встречаемость аллелей Ч и У гена BoLA-DBD3 в группах здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы КРС

Распределение аллелей у здоровых коров			Распределение аллелей у больных коров		
Генотип	Аллели У	Аллели Ч	Генотип	Аллели У	Аллели Ч
18/10		Ч/Ч	7/7		Ч/Ч
32/7		Ч	11/28		
27/19	У		10/10		Ч/Ч
33/42			18/18		Ч/Ч
36/8			12/12		
22/3	У		18/18		Ч/Ч
29/4	У		28/34		
12/21	У		14/14		
11/24			3/3	У/У	
18/16			17/29		
24/20			20/4	У	
8/12			21/21	У/У	
16/19	У		12/12		
33/27			10/10		Ч/Ч
32/18		Ч	7/18		Ч/Ч

29/22			16/19	У	
42/8			11/11		
24/7		У	29/29		У
36/23			7/7		
16/32			16/7		
3/4	У/У		10/10		У/У
36/19	У		10/24		У
10/23		У	10/36		У
42/8			16/45		
28/21	У		10/36		У
28/3	У		14/12		
4/12	У		18/18		У/У
18/20		У	34/36		
20/16			7/7		У/У
20/23			31/31		
16/7		У	7/7		У/У
21/27	У		15/42		
7/20		У	36/36		
8/3	У		34/36		
8/3	У		14/12		
36/19	У		15/42		
28/20			7/7		У/У
36/19	У		15/42		
12/27			10/24		У
16/19	У		34/36		
31/28			10/10		У/У
11/10		У	7/7		У/У
24/29			7/7		У/У
18/7		У	36/36		

20/4	у		10/24		ч
36/16			16/45		
8/17			18/18		ч/ч
3/21	у/у		31/31		
22/10		ч	10/36		ч
24/32			18/18		ч/ч
19/16	у		3/3	у/у	
23/36			7/7		ч/ч
18/16			16/7		ч
7/4	у	ч	18/18		ч/ч
24/32			12/12		
4/12	у		14/12		
29/22			36/36		
12/21	у		10/24		ч
7/20		ч	16/19	у	
4/36	у		18/18		ч/ч
3/21	у/у		36/36		
3/21	у/у		17/29		
21/4	у/у		7/18		ч/ч
19/12	у		10/24		ч
24/32			17/29		
27/19	у		20/4	у	
28/3	у		10/36		ч
29/4	у		16/7		ч
3/21	у		10/10		ч/ч
16/7		ч	7/7		ч/ч
16/7		ч	15/42		
4/12	у		7/18		ч/ч
27/19	у		34/36		

7/20		Ч	10/24		Ч
22/3	У				
12/21	У				
12/21	У				
28/21	У				
29/22					
27/19	У				
3/4	У/У				
22/29					
22/3	У				
36/16					
36/16					
22/3	У				
36/16					
29/4	У				

Для животных обеих групп животных были выделены аллели, характерные для здоровых коров (У - устойчивость) и больных (Ч - чувствительность), совокупное распределение аллелей и генотипов У, У/У, Ч и Ч/Ч показано в таблицах 14 и 15.

Таблица 14 - Сравнение групп здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы по аллелям и генотипам устойчивости к бруцеллезу

Генотип	Здоровые коровы (гол./ %)		Больные особи (гол./ %)	
	У/Н	У/У	У/Н	У/У
3/Н	9 (10.7%)			
4/Н	9 (10.7%)		2 (2.7%)	
19/Н	11 (13.1%)		2 (2.7%)	
21/Н	7 (8.3%)			
3/3				2 (2.7%)
3/4		2 (2.4%)		
3/21		3 (3.5%)		
4/21		1 (1.2%)		
21/21				1 (1.4%)
<b>ИТОГО</b>	<b>36</b> <b>42.8%</b>	<b>6</b> <b>7.1%</b>	<b>4</b> <b>5.4%</b>	<b>3</b> <b>4.1%</b>

У здоровых коров потенциальные аллели устойчивости У (\*19, \*3, \*4, \*21) в сочетании с нейтральными аллелями (Н) присутствуют у 42.8%. Сочетание аллелей \*3/\*4, \*3/\*21 и \*4/\*21 обнаружено у 6 здоровых коров (7.1%). Животные с гомозиготами по аллелям У не выявлены. Таким образом, особи с аллелями У в сочетании с нейтральными аллелями и с друг с другом присутствуют у 49.9% особей.

В группе больных животных аллели устойчивости выявлены всего у 9.5% - 4 коровы с аллелями \*4 и \*19 в гетерозиготном состоянии, и 3 коровы в гомозиготном состоянии – две особи с генотипом \*3/\*3 (4.1%) и 1 корова с генотипом \*21/\*21.

Таким образом, можно сделать предварительный вывод, что аллели устойчивости действительно могут влиять на процесс формирования защитной реакции к бруцеллезу, они имеют доминантный характер, но не

полностью защищают животных от поражения бруцеллой, с незначительной вероятностью (4-5%) диагностируется заболевание коров бруцеллезом. Поскольку формирование иммунитета является сложным многокомпонентным и многоэтапным процессом, с преобладанием на каждом этапе разных систем защиты от возбудителей болезней, то этим можно объяснить полученные результаты, что присутствие аллелей устойчивости (У) не обеспечивает 100% защиты животных от бруцеллеза.

Распределение аллелей чувствительности к бруцеллезу Ч в группах здоровых и больных коров аулиекольской породы показано в таблице 15. Данные таблицы 15 иллюстрируют распределение аллелей чувствительности Ч: в группе здоровых животных аулиекольской породы аллели чувствительности присутствуют у 17 коров (20.3%) в гетерозиготном состоянии Ч/Н, при этом наиболее распространен аллель \*7. 1 особь имеет генотип \*10/\*18, в группе отсутствуют животные с аллелями Ч в гомозиготном состоянии.

Таблица 15 - Сравнение групп здоровых и больных бруцеллезом коров аулиекольской породы по аллелям и генотипам чувствительности к бруцеллезу

Генотип	Здоровые коровы (гол./ %)		Больные коровы (гол./ %)	
	Ч/Н	Ч/Ч	Ч/Н	Ч/Ч
7/Н	10 (11.9%)		2 (2.7%)	
10/Н	3 (3.6%)		11 (14.8%)	
18/Н	4 (4.8%)		1 (1.4%)	
7/7				9 (12.2%)
7/18				3 (4.1%)
10/10				5 (6.8%)
10/18		1 (1.2%)		
18/18				7 (9.5%)
<b>ИТОГО</b>	<b>17</b> <b>20.3%</b>	<b>1</b> <b>1.2%</b>	<b>14</b> <b>18.9%</b>	<b>24</b> <b>32.6%</b>

Аллели чувствительности в гомозиготном и сочетанном состоянии Ч/Ч встречаются в группе больных животных с очень высокой частотой: аллели Ч присутствуют у 51.5% животных, что позволяет предположить, что аллели \*7, \*10 и \*18 могут быть связаны с подавлением иммунитета к бруцеллезу. В этой группе аллели Ч находятся в гомозиготном состоянии Ч/Ч (28.5%), и выявлено 3 генотипа \*7/\*18. В гетерозиготном состоянии Ч/Н наиболее часто распространен аллель \*10 (11 голов), остальные аллели выявлены у 1-2 животных. Можно сделать вывод, что в гомозиготном состоянии или в сочетании их действие усиливается – это, свидетельствует о влиянии дозы гена на развитие инфекционного процесса и говорит о рецессивном характере проявления активности аллелей Ч.

Важным является вопрос о взаимодействии аллелей устойчивости и чувствительности, если они выявлены в генотипе одного животного одновременно (У/Ч): из таблицы 15 следует, что в группе здоровых коров имеется 1 корова с генотипом \*4/\*7. В то же время в группе больных животных не выявлено ни одного животного с генотипом У/Ч, что подтверждает вывод о доминировании аллелей У.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что у животных аулиекольской породы аллели устойчивости \*3, \*4, \*19, \*21 могут защищать животных от возбудителя бруцеллеза, хоть и не в полном объеме (у больных коров эти аллели встречаются с частотой 9.5%). Аллели чувствительности \*7, \*10, \*18 могут подавлять процесс формирования иммунитета к возбудителю бруцеллеза, они действуют в гомозиготном и гетерозиготном состоянии и при сочетании аллелей. Полученные результаты позволяют предположить доминантный характер аллелей устойчивости У, что имеет важнейшее значение в дальнейшей работе по созданию генетически устойчивого к бруцеллезу поголовья аулиекольской породы

### **2.2.1.2.2 Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы**

Казахская белоголовая порода относится к мясному направлению и была выведена в Казахстане на основе местных пород с введением в селекцию племенных быков герефордов - мясной породы европейской селекции.

Для изучения аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 у больных бруцеллезом и здоровых коров казахской белоголовой породы были изучены аллели, характерные для этих групп животных.

Для проведения исследований были использованы образцы геномной ДНК крупного рогатого скота, выделенные из цельной крови здоровых животных и бруцеллоносителей казахской белоголовой породы КРС из следующих регионов Казахстана: Западно-Казахстанской, Восточно-Казахстанской и Алматинской областей.

Методом ПЦР-ПДРФ изучали аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 в группах больных бруцеллезом и здоровых коров казахской белоголовой породы, в качестве контроля использовали образцы крови здоровых животных, отобранных пропорционально количеству больных коров из этих регионов.

В результате молекулярно-генетического анализа проб ДНК коров по гену BoLA-DRB3, были определены генотипы и аллели животных двух групп:

- 1) взрослые здоровые животные - 73 гол.
- 2) взрослые животные, больные бруцеллезом - 73 гол.

Полученные результаты по генотипам и аллельному составу гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных лейкозом коров казахской белоголовой породы показаны в таблицах 16 и 17.

Таблица 16 - Спектры рестрикции и генотипы по гену BoLA-DRB3 у здоровых коров казахской белоголовой породы

№	Образец	Спектры RsaI, HaeIII, BstY2	Генотип
1	110кб	faa/kbb	8/17
2	111кб	lbb/ecc	20/7
3	112кб	leb/lab	21/36
4	113кб	sbb/bbb	19/3
5	114кб	haa/lfb	12/18
6	115кб	ecc/mab	7/22
7	116кб	jdb/maa	16/32
8	117кб	jdb/bbb	16/3
9	120кб	lab/faa	36/8
10	121кб	nab/leb	23/21
11	122кб	faa/bbb	8/3
12	123кб	mab/kbb	22/17
13	124кб	pcc/ecc	29/7
14	125кб	pcc/lbb	29/20
15	126кб	nbb/caa	24/4
16	127кб	nab/leb	23/21
17	128кб	lfb/ecc	18/7
18	129кб	bbb/ofb	3/27
19	131кб	kbb/maa	17/32
20	132кб	nfb/ofb	33/27
21	134кб	sbb/maa	19/32
22	135кб	hfb/lbb	42/20
23	136кб	lab/jdb	36/16
24	137кб	lfb/fab	18/10
25	138кб	lab/lfb	36/18

26	139κб	maa/hfb	32/42
27	140κб	maa/bbb	32/3
28	141κб	ofb/kbb	27/17
29	142κб	lfb/lbb	18/20
30	143κб	pcc/ecc	29/7
31	144κб	lfb/maa	18/32
32	146κб	jdb/nfb	16/33
33	147κб	caa/leb	4/21
34	149κб	mab/bbb	22/3
35	150κб	ecc/lab	7/36
36	151κб	leb/haa	21/12
37	152κб	fab/nab	10/23
38	153κб	ofb/haa	27/12
39	154κб	maa/lab	32/36
40	155κб	bbb/faa	3/8
41	156κб	faa/kbb	8/17
42	159κб	bbb/ecc	3/7
43	160κб	bbb/ecc	3/7
44	161κб	nab/leb	23/21
45	162κб	fab/lbb	10/20
46	163κб	ecc/nfb	7/33
47	164κб	fab/lbb	10/20
48	165κб	faa/kbb	8/17
49	167κб	pcc/ecc	29/7
50	168κб	jdb/bbb	16/3
51	170κб	lfb/nfb	18/33
52	171κб	nab/leb	23/21
53	172κб	pcc/lbb	29/20
54	173κб	lab/jdb	36/16

55	174кб	faa/fab	8/10
56	175кб	maa/nbb	32/24
57	176кб	sbd/bbb	45/3
58	178кб	lab/fab	36/10
59	179кб	kbb/caa	17/4
60	180кб	nab/ofb	23/27
61	181кб	nfb/mab	33/22
62	182кб	lbb/nbb	20/24
63	183кб	leb/sbb	21/19
64	184кб	leb/gae	21/11
65	185кб	jdb/ecc	16/7
66	186кб	pcc/ecc	29/7
67	187кб	caa/haa	4/12
68	191кб	bbb/sbb	3/19
69	192кб	lab/faa	36/8
70	193кб	caa/leb	4/21
71	194кб	ecc/nfb	7/33
72	195кб	ofb/maa	27/32
73	196кб	lab/faa	36/8

Аналогичная работа была проведена с образцами ДНК больных коров казахской белоголовой породы, спектры рестрикции и генотипы для гена BoLA-DRB3 для 73 животных представлены в таблице 17.

Таблица 17 - Спектры рестрикции и генотипы по гену BoLA-DRB3 у больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы

№	№ пробы	Спектры RsaI, HaeIII, BstY2	Аллели
1	6 vko	nbb/nab	24/23
2	7 vko	lab/lfb	36/18
3	8 BKO	maa/ofb	32/27
4	11 BKO	jdb/jdb	16/16
5	13 BKO	ecc/ecc	7/7
6	14 BKO	obb/obb	28/28
7	16 BKO	ecc/ecc	7/7
8	17 BKO	lab/lfb	36/18
9	20 BKO	ecc/ecc	7/7
10	21 BKO	jdb/jdb	16/16
1	22 BKO	ecc/ecc	7/7
2	25 BKO	jdb/jdb	16/16
3	26 BKO	ecc/ecc	7/7
4	27 BKO	jdb/gae	16/11
5	28 BKO	pcc/pcc	29/29
6	29 BKO	haa/hab	12/13
7	30 BKO	ecc/pcc	7/29
8	33 BKO	ecc/ecc	7/7
9	37 BKO	jdb/ecc	16/7
20	40 BKO	nab/hab	23/13
1	43 BKO	jdb/jdb	16/16
2	45 BKO	ecc/ecc	7/7
3	48 BKO	jdb/gae	16/11
4	98 BKO	haa/haa	12/12

5	10 CX	aaa/iab	1/15
6	27 CX	iab/sad	15/52
7	28 CX	mab/xab	22/50
8	32 CM	gae/caa	11/4
9	33 CM	fad/fad	9/9
30	2/9	gae/gae	11/11
1	6/9	lbb/lbb	20/20
2	8/9	jdb/jdb	16/16
3	9/9	lfb/lfb	18/18
4	42 3KO	gae/caa	11/4
5	43 3KO	nbb/nab	24/23
6	44 3KO	ecc/ecc	7/7
7	45 3KO	lbb/lbb	20/20
8	46 3KO	jdb/ecc	16/7
9	47 3KO	gae/gae	11/11
40	48 3KO	ecc/ecc	7/7
1	49 3KO	iab/sad	15/52
2	50 3KO	jdb/jdb	16/16
3	51 3KO	maa/ofb	32/27
4	52 3KO	ecc/ecc	7/7
5	53 3KO	lab/lfb	36/18
6	54 3KO	nab/hab	23/13
7	55 3KO	gae/caa	11/4
8	56 3KO	ecc/pcc	7/29
9	57 3KO	iab/sad	15/52
50	58 3KO	jdb/gae	16/11
1	59 3KO	haa/hab	12/13
2	60 3KO	ecc/ecc	7/7
3	61 3KO	lab/lfb	36/18

4	62 ЗКО	jdb/gae	16/11
5	63 ЗКО	fad/fad	9/9
6	64 ЗКО	lfb/lfb	18/18
7	65 ЗКО	ecc/pcc	7/29
8	66 ЗКО	mab/xab	22/50
9	67 ЗКО	gae/caa	11/4
60	68 ЗКО	ecc/ecc	7/7
1	69 ЗКО	maa/ofb	32/27
2	70 ЗКО	mab/xab	22/50
3	71 ЗКО	iab/sad	15/52
4	72 ЗКО	gae/caa	11/4
5	73 ЗКО	jdb/ecc	16/7
6	74 ЗКО	lfb/lfb	18/18
7	75 ЗКО	mab/xab	22/50
8	76 ЗКО	maa/ofb	32/27
9	77 ЗКО	nbb/nab	24/23
70	78 ЗКО	jdb/gae	16/11
71	79 ЗКО	aaa/iab	1/15
72	80 ЗКО	jdb/jdb	16/16
73	81 ЗКО	obb/obb	28/28

Частота встречаемости разных аллелей гена BoLA-DRB3.2 в геномах здоровых коров и бруцеллоносителей представлена в таблицах 18 и 19.

Таблица 18 - Частота встречаемости аллелей VoLA-DBD3 у здоровых коров казахской белоголовой породы КРС

№	№ аллеля	Количество	
		аллелей	%
1	3	12	8.2 ± 2.2
2	4	5	3.5 ± 1.5
3	7	13	8.9 ± 2.3
4	8	9	6.2 ± 1.9
5	10	6	4.2 ± 1.6
6	11	1	0.7 ± 0.6
7	12	3	2.1 ± 1.2
8	16	7	4.8 ± 1.8
9	17	7	4.8 ± 1.8
10	18	7	4.8 ± 1.8
11	19	4	2.8 ± 1.4
12	20	8	5.6 ± 1.9
13	21	10	6.8 ± 2.1
14	22	4	2.7 ± 1.3
15	23	6	4.2 ± 1.6
16	24	3	2.7 ± 1.3
17	27	6	4.2 ± 1.6
18	29	6	4.2 ± 1.6
19	32	9	6.2 ± 1.9
20	33	6	4.2 ± 1.6
21	36	10	6.8 ± 2.1
22	42	2	0.7 ± 0.6
23	45	1	0.7 ± 0.6
	<b>ИТОГО</b>	<b>146</b>	<b>100</b>

Как видно из данных таблицы 18, совокупно в геномах исследованной группы здоровых коров казахской белоголовой породы (73 особи) встречается всего 23 аллеля гена BoLA-DBD3, при этом чаще всего встречаются аллели \*7 (8.9%), \*3 (8.2%), \*21 и \*36 (по 6.8%), \*8 и \*32 (по 6.2%).

Таблица 19 - Частота встречаемости аллелей BoLA-DBD3 у больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы КРС

№	№ аллеля	Аллелей	
		количество	%
1	1	2	1.4 ± 0.9
2	4	5	3.5 ± 1.5
3	7	30	20.5 ± 3.3
4	9	4	2.7 ± 1.3
5	11	14	9.6 ± 2.4
6	12	4	2.7 ± 1.4
7	13	4	2.7 ± 1.4
8	15	6	4.2 ± 1.6
9	16	22	15.1 ± 3.0
10	18	10	6.8 ± 2.1
11	20	4	2.7 ± 1.3
12	22	4	2.7 ± 1.3
13	23	5	3.5 ± 1.5
14	24	3	2.1 ± 1.2
15	27	4	2.7 ± 1.3
16	28	4	2.7 ± 1.3
17	29	5	3.4 ± 1.5
18	32	4	2.7 ± 1.3
19	36	4	2.7 ± 1.3
20	50	4	2.7 ± 1.3
21	52	4	2.7 ± 1.3
	<b>ИТОГО</b>	<b>146</b>	<b>100</b>

Из данных таблицы 19 следует, что в исследованной группе больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы (73 особи) всего выявлен 21 аллель гена *BoLA-DBD3*, при этом чаще всего встречаются аллели \*7 (20.5%), \*16 (15.1%), \*11 (9.6%) и \*18 (6.8%). На эти 4 аллеля приходится 52% всех аллелей. Частота встречаемости остальных аллелей не превышает 4.2%.

Наглядно увидеть картинку аллельного полиморфизма гена *BoLA-DRB3* в группах здоровых и больных коров казахской белоголовой породы позволяет рисунок 8.

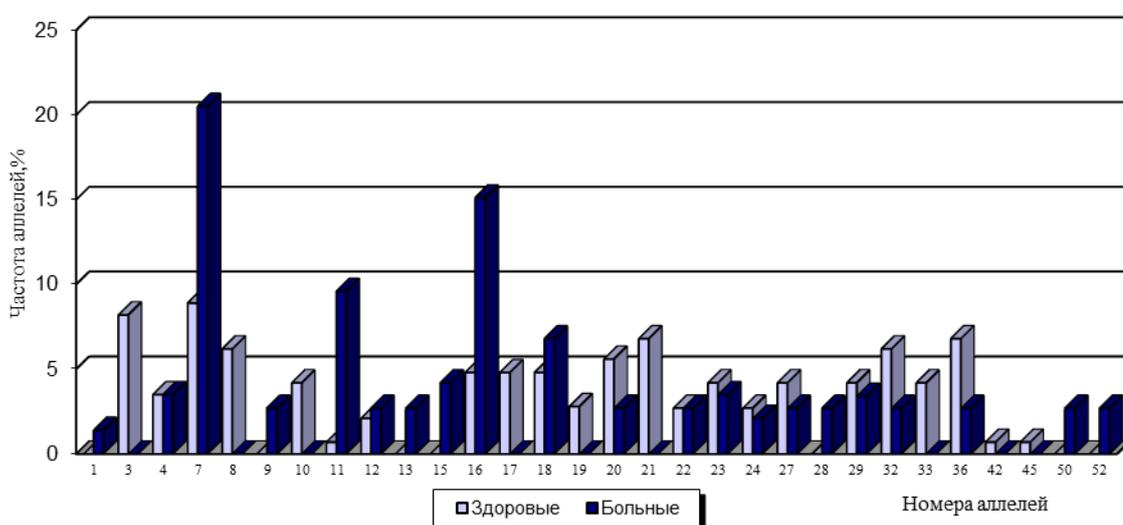


Рисунок 8 - Частота аллелей гена *BoLA-DRB3* у здоровых коров и бруцеллоносителей казахской белоголовой породы

Рисунок 8 позволяет сравнить частоту встречаемости разных аллелей, на нем четко видно высокая частота встречаемости аллелей \*7 и \*16, характерных для больных животных. Аллели в группе здоровых коров распределены более равномерно.

Для определения потенциально ответственных за устойчивость и чувствительность к бруцеллезу аллелей, достоверно характерных для больных (Ч - чувствительность) и здоровых коров (У - устойчивость) был проведен анализ генотипов животных. Наиболее распространенные аллели гена *BoLA-DRB3* в группах здоровых коров и бруцеллоносителей представлены в

таблице 20, которая позволяет сравнить их частоту и оценить статистическую погрешность в оценке достоверности полученных результатов. Звездочками отмечены аллели, которые чаще всего встречаются в группах здоровых и больных животных, и различие между группами по этим аллелям подтверждается статистически - с уровнем достоверности 0.9 (\*) и 0.95 (\*\*).

Таблица 20 - Наиболее распространенные аллели гена BoLA-DRB3 у здоровых коров и бруцеллоносителей 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 больными и здоровыми животными достоверно для уровня значимости 0.9

\*\* - различие между больными и здоровыми животными достоверно для уровня значимости 0.95

Как следует из таблицы 20, аллели \*3, \*8, \*21 характерны только для здоровых коров казахской белоголовой породы, что может свидетельствовать о том, что эти аллели связаны с формированием защитной реакции к бруцеллезу. Частоты аллелей \*32 и \*36 недостоверно отличаются от их частоты в группе больных коров.

В группе больных бруцеллезом коров наблюдается высокая частота встречаемости аллелей \*7, \*11 и \*16. В группе здоровых коров эти аллели также выявляются, но с достоверно меньшей частотой. Аллель \*18 также встречается у здоровых коров, и не может быть маркером чувствительности к бруцеллезу.

Статистическая обработка полученных результатов позволяет утверждать достоверность полученных результатов.

В таблице 21 представлена частота встречаемости наиболее распространенных генотипов, содержащих аллели гена BoLA-DRB3, характерные для здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы КРС. Данные этой таблицы далее позволят оценить потенциально доминантные и рецессивные аллели.

Таблица 21 - Встречаемость аллелей У и Ч гена BoLA- DRB3 в группах здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы КРС

Распределение аллелей у здоровых коров			Распределение аллелей у больных коров		
Генотип	Аллели У	Аллели Ч	Генотип	Аллел и у	Аллели Ч
8/17	У		24/23		
20/7		Ч	36/18		
21/36	У		32/27		
19/3	У		16/16		Ч/Ч
12/18			7/7		Ч/Ч
7/22		Ч	28/28		
16/32		Ч	7/7		Ч/Ч
16/3	У	Ч	36/18		
36/8	У		7/7		Ч/Ч
23/21	У		16/16		Ч/Ч

8/3	y/y		7/7		ц/ц
22/17			16/16		ц/ц
29/7		ц	7/7		ц/ц
29/20			16/11		ц/ц
24/4			29/29		
23/21	y		12/13		
18/7		ц	7/29		ц
3/27	y		7/7		ц/ц
17/32			16/7		ц/ц
33/27			23/13		
19/32			16/16		ц/ц
42/20			7/7		ц/ц
36/16		ц	16/11		ц/ц
18/10			12/12		
36/18			1/15		
32/42			15/52		
32/3	y		22/50		
27/17			11/4		ц
18/20			9/9		
29/7		ц	11/11		ц/ц
18/32			20/20		
16/33		ц	16/16		ц/ц
4/21	y		18/18		
22/3	y		11/4		ц
7/36		ц	24/23		
21/12	y		7/7		ц/ц
10/23			20/20		
27/12			16/7		ц/ц
32/36			11/11		ц/ц

3/8	y/y		7/7		ч/ч
8/17	y		15/52		
3/7	y	ч	16/16		ч/ч
3/7	y	ч	32/27		
23/21	y		7/7		ч/ч
10/20			36/18		
7/33		ч	23/13		
10/20			11/4		ч
8/17	y		7/29		ч
29/7		ч	15/52		
16/3	y	ч	16/11		ч/ч
18/33			12/13		
23/21	y		7/7		ч/ч
29/20			36/18		
36/16		ч	16/11		ч/ч
8/10	y		9/9		
32/24			18/18		
45/3	y		7/29		ч
36/10			22/50		
17/4			11/4		ч
23/27			7/7		ч/ч
33/22			32/27		
20/24			22/50		
21/19	y		15/52		
21/11	y	ч	11/4		ч
16/7		ч/ч	16/7		ч/ч
29/7		ч	18/18		
4/12			22/50		
3/19	y		32/27		

36/8	У		24/23		
4/21	У		16/11		Ч/Ч
7/33		Ч	1/15		
27/32			16/16		Ч/Ч
36/8	У		28/28		

Распределение аллелей устойчивости У и чувствительности Ч к бруцеллезу по генотипам в группах здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы показано в таблицах 22 и 23.

Таблица 22 - Сравнение групп здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы по аллелям и генотипам устойчивости к бруцеллезу

Генотип	Здоровые коровы		Больные коровы	
	У/Н	У/У	У/Н	У/У
3/Н	10 (13.7%)			
8/Н	7 (9.6%)			
21/Н	10 (13.7%)			
3/8		2 (2.7%)		
<b>ИТОГО</b>	<b>27 (37%)</b>	<b>2 (2.7%)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

Сравнение встречаемости генотипов с аллелями устойчивости в группах здоровых и больных коров, показанное в таблице 22, свидетельствует, что в группе здоровых животных преобладают аллели устойчивости \*3, \*8, \*21, составляющие суммарно 37% популяции. Сочетание этих аллелей \*3/\*8, \*обнаружено у 2 здоровых коров (2.7%). Животные, имеющие эти аллели в гомозиготном состоянии, не выявлены.

Таким образом, в группе здоровых коров аллели устойчивости имеют примерно 40% особей, причем генотипы У/Н составляют 37%, причем эти аллели устойчивости отсутствуют у зараженных животных. То есть, можно

сделать вывод, что аллели устойчивости даже в гетерозиготном состоянии обеспечивают иммунитет к бруцеллезу.

Распределение аллелей чувствительности к бруцеллезу в группах здоровых коров и бруцеллоносителей показано в таблице 23.

Таблица 23 - Сравнение групп здоровых и больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы по аллелям и генотипам чувствительности к бруцеллезу

Генотип	Здоровые коровы		Больные коровы	
	Ч/Н	Ч/Ч	Ч/Н	Ч/Ч
7/Н	12 (16.4%)		3 (4.1%)	
11/Н	1 (1.4%)		5 (6.8%)	
16/Н	6 (8.2%)			
7/7				12 (16.4%)
7/16		1 (1.4%)		3 (4.1%)
11/11				2 (2.7%)
11/16				5 (6.8%)
16/16				7 (9.6%)
<b>ИТОГО</b>	<b>19 (26%)</b>	<b>1 (1.4%)</b>	<b>8 (10.9%)</b>	<b>29 (39.6%)</b>

Частота аллелей Ч в группах здоровых и больных коров, представленная в таблице 23, показывает, что здоровые животные имеют аллели чувствительности \*7, \*11, \*16, составляющие суммарно 26% популяции. Сочетание этих аллелей \*7/\*16 обнаружено у 1 здоровой коровы (1.4%). Животные, имеющие аллели Ч в гомозиготном состоянии, в группе здоровых коров не выявлены.

В группе больных коров аллели Ч присутствуют у 50.5% особей. Так, аллели чувствительности \*7 и \*11 в гетерозиготном состоянии Ч/Н выявлены всего у 3 и 5 особей соответственно. В гомозиготном состоянии Ч/Ч и сочетаниях аллелей Ч выявлено у 39.6% генотипов, гомозиготы наиболее

часто встречаются для аллелей \*7/\*7 (16.4%), \*11/\*11 (2.7%) и \*16/\*16 (9.6%), сочетание аллелей Ч выявлено у 8 больных коров.

Это свидетельствует, аллели \*7, \*11, \*16 могут быть связаны с подавлением иммунитета к бруцеллезу, причем в гомозиготном состоянии или в сочетании их действие усиливается.

Важным является вопрос о взаимодействии аллелей устойчивости и чувствительности, если они выявлены в генотипе одного животного одновременно: из таблицы 30 следует, что в группе здоровых коров имеется две особи с генотипом \*3/\*7 и одна особь с генотипом \*11/\*21. В то же время в группе больных животных не выявлено ни одного животного с генотипом У/Ч, что подтверждает вывод о доминировании признака устойчивости к бруцеллезу.

Таким образом, можно сделать вывод, что у животных казахской белоголовой породы аллели устойчивости \*3, \*8, \*21 статистически достоверно способствуют устойчивости животных к бруцеллезу – эти аллели не выявлены ни у одного больного животного.

Аллели чувствительности \*7, \*11, \*16 могут подавлять процесс формирования иммунитета к возбудителю бруцеллеза, они действуют в гомозиготном и гетерозиготном состоянии и при сочетании аллелей.

### **2.2.1.2.3 Аллельный полиморфизм гена BoLA-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 которой для осеменения коров местных пород используют сперму высокопродуктивных быков голштинской породы. При этом селекционный процесс направлен на отбор гибридных животных, сохраняющих высокую приспособляемость животных к местным условиям и

имеющих высокую адаптивность к низким и высоким температурам, к более низкому качеству кормов и воздействию прочих неблагоприятных факторов окружающей среды.

В Республике Казахстан некоторые крупные агрофирмы используют голштинский скот для получения товарного молока. В некоторых хозяйствах наблюдается заболевание коров-голштинов бруцеллезом, но это исключительные случаи, поэтому группа бруцеллоносителей этой породы для проведения исследований составляла 12 коров. В более многочисленной контрольной группе было проанализировано 23 образца ДНК.

Генотипы гена *BoLA-DRB3* у здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы показаны соответственно в таблицах 24 и 25.

Таблица 24 - Генотипы по гену *BoLA-DRB3* здоровых коров голштинской породы

№ животного	Генотип	№ животного	Генотип
1	24/16	13	16/7
2	24/24	14	23/23
3	28/28	15	23/23
4	24/8	16	16/16
5	24/3	17	13/12
6	28/22	18	28/23
7	24/3	19	28/23
8	24/23	20	54/54
9	3/3	21	7/7
10	24/23	22	23/22
11	28/22	23	28/24
12	24/3		

Данные показывают, что в геномах исследованной группы здоровых коров голштинской породы (23 особи) всего выявлено 11 аллелей гена BoLA-DBD3.

В таблице 25 представлены генотипы особей больных коров голштинской породы (12 голов), данные таблицы показывают, что группа больных коров также обеднена в плане генетического разнообразия, они имеют всего 10 аллелей гена BoLA-DBD3.

Таблица 25 - Генотипы по гену BoLA-DRB3 больных бруцеллезом коров голштинской породы

№ животного	Генотип	№ животного	Генотип
1	8/8	7	32/27
2	22/22	8	22/27
3	29/29	9	7/7
4	7/7	10	36/18
5	24/23	11	7/7
6	36/18	12	18/18

Частота встречаемости разных аллелей гена BoLA-DRB3.2 в геномах здоровых коров и бруцеллоносителей голштинской породы КРС представлена в таблицах 26 и 27.

Таблица 26 - Частота встречаемости аллелей VoLA-DBD3 у здоровых коров голштинской породы

№	№ аллеля	Аллелей	
		количество	%
1	3	5	10.9 ± 4.6 *
2	7	3	6.5 ± 3.6
3	8	1	2.2 ± 2.1
4	12	1	2.2 ± 2.1
5	13	1	2.2 ± 2.1
6	16	4	8.7 ± 4.2
7	22	3	6.5 ± 3.6
8	23	9	19.6 ± 5.8
9	24	10	21.7 ± 6.0 *
10	28	7	15.2 ± 5.2 *
11	54	2	4.3 ± 2.9
	<b>ИТОГО</b>	<b>46</b>	<b>100.0</b>

Как видно из данных таблицы 26, совокупно в геномах исследованной группы здоровых коров голштинской породы 11 аллелей гена VoLA-DBD3 сильно различаются по частоте встречаемости – от 2.2% до 21.7%, при этом чаще всего встречаются аллели \*24 (21.7%), \*23 (19.6%), \*28 (15.2%) и \*3 (10.9%).

Таблица 27 - Частота встречаемости аллелей BoLA-DBD3 у больных бруцеллезом коров голштинской породы

№	№ аллеля	Аллелей	
		количество	%
1	7	6	25.1 ± 8.8
2	8	2	8.3 ± 5.6
3	18	4	16.6 ± 7.5 *
4	22	3	12.5 ± 6.7
5	23	1	4.2 ± 4.0
6	24	1	4.2 ± 4.0
7	27	2	8.3 ± 5.6
8	29	2	8.3 ± 5.6
9	32	1	4.2 ± 4.0
10	36	2	8.3 ± 5.6
	<b>ИТОГО</b>	<b>24</b>	<b>100.0</b>

В популяции больных бруцеллезом коров голштинской породы (табл. 27) 10 аллелей гена BoLA-DBD3 очень сильно различаются по частоте - от 4.2% до 25.1%, при этом чаще всего встречаются аллели \*7, \*18, \*22.

На рисунке 9 представлено сравнение частот всех аллелей, выявленных в группах здоровых коров и бруцеллоносителей голштинской породы.

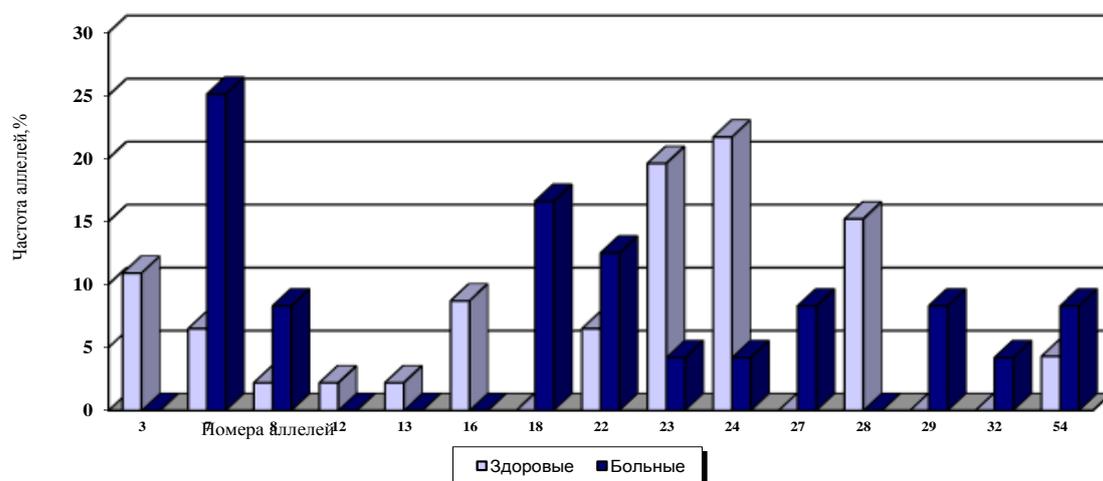


Рисунок 9 - Частота аллелей гена BoLA-DRB3 у здоровых коров и бруцеллоносителей голштинской породы

Наиболее часто встречающиеся в двух группах коров аллели показаны в таблице 28.

Таблица 28 - Наиболее распространенные аллели BoLA-DRB3 у здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы КРС

Тип аллелей	№ аллеля	Частота аллелей	
		Здоровые коровы	Больные коровы
Аллели здоровых коров (У - устойчивость)	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 больных коров (Ч - чувствительность)	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 здоровыми и больными животными достоверно для уровня значимости 0.9

Результаты, представленные в таблице 28, позволяют предположить, что аллели \*3, \*23, \*24, \*28 преимущественно распространены у здоровых коров, а для бруцеллоносителей статистически достоверно выделяются аллели \*7, \*18.

Далее был проведен анализ генотипов животных по аллелям, характерным для больных (Ч - чувствительность) и здоровых коров (У - устойчивость). Результаты представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Встречаемость аллелей гена BoLA-DBD3 в генотипах здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы

Распределение генотипов у здоровых коров			Распределение генотипов у больных коров		
Генотип	Аллели У	Аллели Ч	Генотип	Аллели У	Аллели Ч
24/16	У		8/8		
24/24	У/У		22/22		
28/28	У/У		29/29		
24/8	У		7/7		Ч/Ч
24/3	У/У		24/23	У/У	
28/22	У		36/18		Ч
24/3	У/У		32/27		
24/23	У/У		22/27		
3/3	У/У		7/7		Ч/Ч
24/23	У/У		36/18		Ч
28/22	У		7/7		Ч/Ч
24/3	У/У		18/18		Ч/Ч
16/7		Ч			
23/23	У/У				
23/23	У/У				
16/16					

13/12					
28/23	У/У				
28/23	У/У				
54/54					
7/7		Ч/Ч			
23/22	У				
28/24	У/У				

Сравнение групп здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы по аллелям и генотипам устойчивости и чувствительности к бруцеллезу представлено в таблицах 30 и 31.

Таблица 30 - Сравнение групп здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы по аллелям и генотипам устойчивости к бруцеллезу

Генотип	Здоровые коровы		Больные коровы	
	У/Н	У/У	У/Н	У/У
3/Н	0			
23/Н	1			
24/Н	2			
28/Н	2			
3/3		1		
3/24		3		
23/23		2		
23/24		2		1
23/28		2		
24/24		1		
24/28		1		
28/28		1		
<b>ИТОГО</b>	<b>5</b>	<b>13</b>	<b>0</b>	<b>1</b>

Как следует из таблицы 30, 78% здоровых коров несут аллели устойчивости: в гетерозиготном состоянии У/Н – 5 особей, гомозиготном – 5 коров, в сочетании аллелей У/У – 8 коров. У больных коров аллели У в гетерозиготном состоянии У/Н не выявлены ни у одного животного, 1 особь несет сочетание \*23/\*24.

В таблице 31 представлены данные, из которых следует, что из 12 больных коров 50% имеют аллели Ч: в состоянии Ч/Н выявлены всего у 2 коров и в гомозиготном состоянии - у 4 коров., то есть половина животных имеет аллели чувствительности, причем 33% - в гомозиготной состоянии.

Из 23 здоровых животных выявлено по 1 особи, имеющей аллели Ч - \*7 и \*7/\*7.

Таблица 31 - Сравнение групп здоровых и больных бруцеллезом коров голштинской породы по аллелям и генотипам чувствительности к бруцеллезу

Генотип	Здоровые коровы		Больные коровы	
	Ч/Н	Ч/Ч	Ч/Н	Ч/Ч
7/Н	1			
18/Н			2	
7/7		1		3
18/18				1
<b>ИТОГО</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>

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 12 больных коров одна особь имела сочетание \*23/\*24);

аллели \*7 и \*18 могут быть связаны с чувствительностью к бруцеллезу. У здоровых коров обнаружена одна особь с \*7 и одна – с \*7/\*7.

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

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

Важнейшей характеристикой популяции является разнообразие входящих в нее особей по жизненно важным генетическим системам, контролирующим базовые процессы, в частности, формирование устойчивости или чувствительности к инфекционным заболеваниям. Поскольку система BoLA отвечает за защитные реакции животных, в частности на микроорганизмы, вызывающие заболевания, то полиморфизм аллелей гена BoLA-DRB3 является важным показателем популяций – разных пород крупного рогатого скота Казахстана.

Изучение аллельного полиморфизма гена BoLA-DRB3 двух пород крупного рогатого скота Республики Казахстан мясного направления – аулиекольской и казахской белоголовой, и молочной породы – голштинской породы зарубежной селекции включает генотипирование по этому гену здоровых и больных коров трех пород и определение аллельного полиморфизма в каждой группе животных. Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у здоровых коров и бруцеллоносителей всех трех пород представлен в таблице 32.

Таблица 32 - Аллельный полиморфизм гена BoLA-DRB3 у здоровых и больных коров трех пород КРС

№ аллеля	Аулиекольская, %		Казахская белоголовая, %		Голштинская, %	
	здоровые	больные	здоровые	больные	здоровые	больные
1	0	0	0	1.4		0
3	8.9	2.7	8.2	0	10.9	0
4	5.9	1.3	3.5	3.5	0	0
7	5.9	16.2	8.9	20.5	6.5	25.1
8	4.1	0	6.2	0	2.2	8.3

9	0	0	0	2.7	0	0
10	2.4	13,5	4.2	0	0	0
11	1.2	2.0	0.7	9.6	0	0
12	5.3	6.1	2.1	2.7	2.2	0
13	0	0	0	2.7	2.2	0
14	0	4.0	0	0	0	0
15	0	2.7	0	4.2	0	0
16	7.7	4.7	4.8	15.1	8.7	0
17	0.6	2.0	4.8	0	0	0
18	3.0	11.5	4.8	6.8	0	16.6
19	6.6	1.3	2.8	0	0	0
20	5.3	1.3	5.6	2.7	0	0
21	6.6	1.3	6.8	0	0	0
22	4.2	0	2.7	2.7	6.5	12.5
23	2.4	0	4.2	3.5	19.6	4.2
24	4.2	4.0	2.7	2.1	21.7	4.2
27	4.2	0	4.2	2.7	0	8.3
28	3.6	1.3	0	2.7	15.2	0
29	4.1	3.3	4.2	3.4	0	8.3
31	0.6	2.7	0	0	0	0
32	3.6	0	6.2	2.7	0	4.2
33	1.2	0	4.2	0	0	0
34	0	3.4	0	0	0	0
36	6.6	10.8	6.8	2.7	0	8.3
42	1.8	2.7	0.7	0	0	0
45	0	1.2	0.7	0	0	0
50	0	0	0	2.7	0	0
52	0	0	0	2.7	0	0
54	0	0	0	0	4.3	0

Кол-во аллелей	24	22	23	21	11	10
H	4.344	3.947	4.318	3.916	3.079	3.074
K <sub>d</sub>	86.170	52.195	82.995	47.386	24.744	23.894

Данные таблицы 32 показывают, что при изучении аллельного полиморфизма гена BoLA-DBD3 выявлено 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 не сильно различаются индексы, в то время как голштинская молочная порода имеет высокую генетическую вырожденность, поскольку в течение многих десятилетий в селекции используется сперма быков высокопродуктивных животных, исходно имеющих общих предков - семь быков.

Наиболее распространенные аллели гена BoLA-DRB3 в группах здоровых и больных коров аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской пород представлены в таблице 33.

В таблице 33 выделены аллели, различие по частоте встречаемости между группами больных и здоровых животных достоверно для уровня значимости 0.9-0.95. Это потенциальные аллели устойчивости и чувствительности к бруцеллезу, характерные для трех изученных пород.

Таблица 33 - Наиболее распространенные аллели гена BoLA-DRB3 в группах здоровых коров и бруцеллоносителей аулиекольской и казахской белоголовой пород

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

Для наглядности в оценке аллелей в связи с формированием устойчивости животных к бруцеллезу, частота аллелей устойчивости для всех трех пород показана на рисунке 10.

Как видно на рисунке 10, аллель \*3 присутствует с высокой частотой у здоровых коров всех трех пород коров. При этом этот аллель отсутствует у больных коров казахской белоголовой и голштинской пород, и встречается с достоверно более низкой частотой 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.

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.

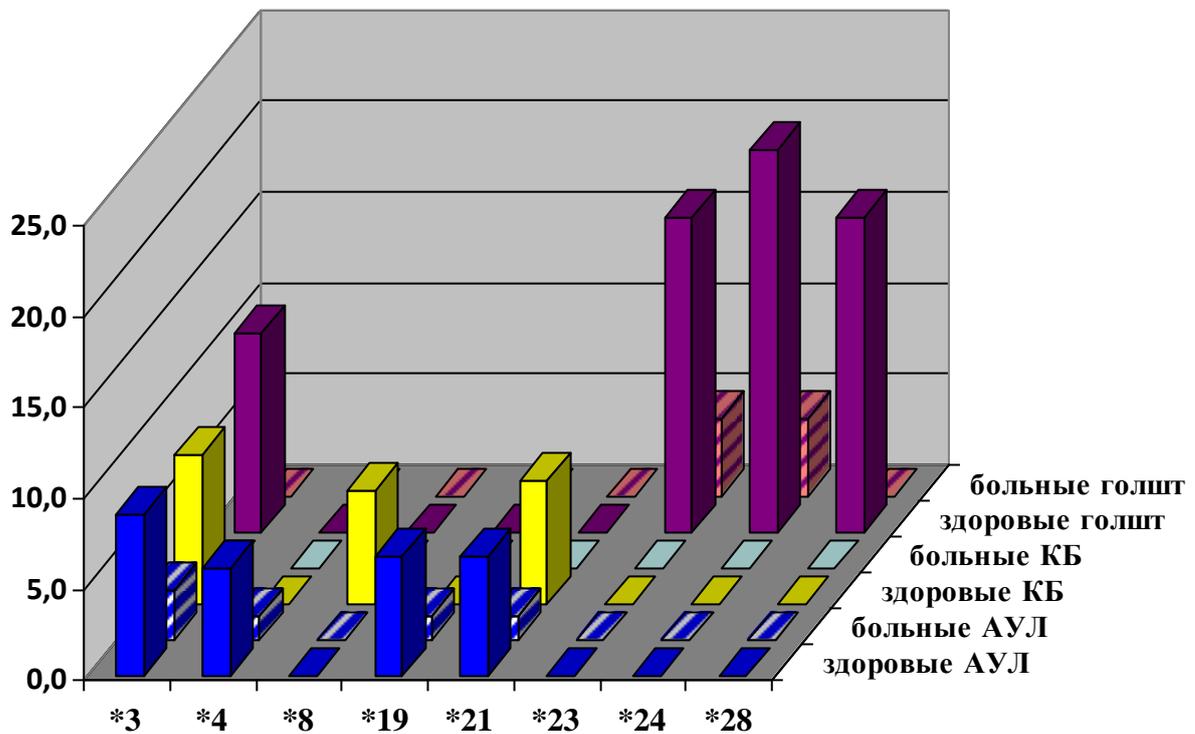


Рисунок 10 - Сравнение трех пород крупного рогатого скота Казахстана по аллелям устойчивости гена BoLA-DRB3

На рисунке 11 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.

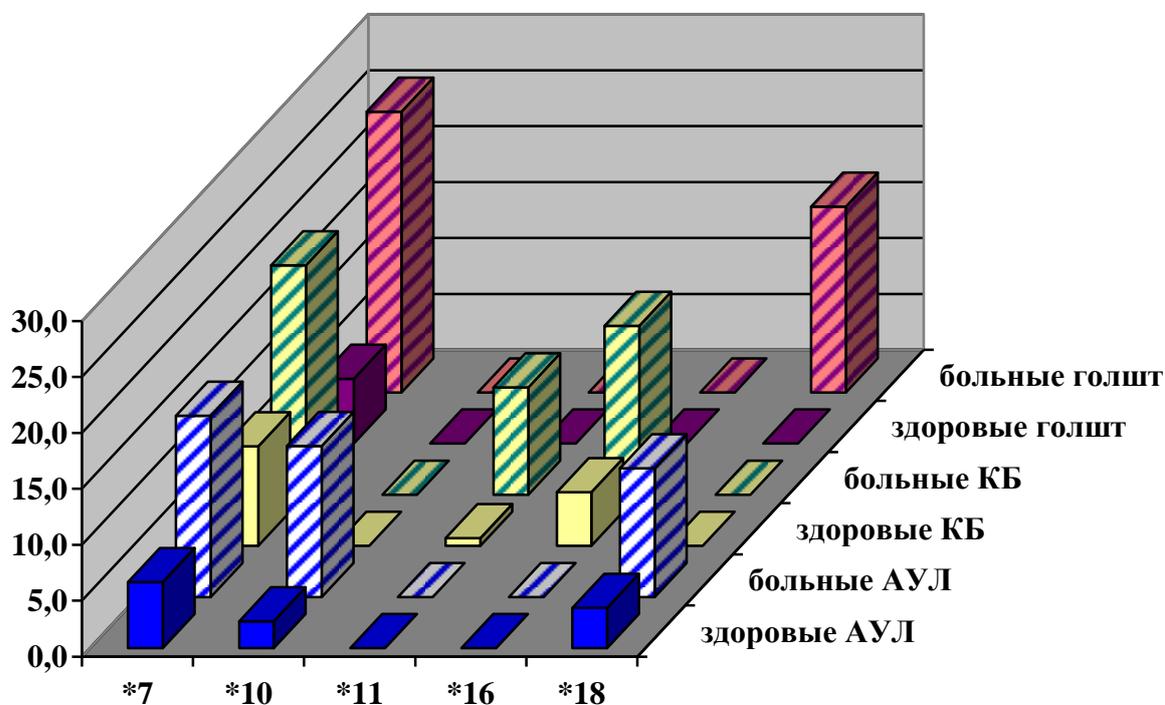


Рисунок 11 - Сравнение трех пород крупного рогатого скота Казахстана по аллелям чувствительности гена BoLA-DRB3

Аллели \*10, \*11, \*16 и \*18 встречаются у больных коров, 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.

## **2.2.2 Разработка комплексного антигена для диагностики бруцеллеза**

### **2.2.2.1 Разработка комплексного бруцеллезного антигена, содержащего диссоциированную форму бруцелл и специфический бруцеллезный бактериофаг**

Для диагностики бруцеллеза сельскохозяйственных животных в Казахстане применяют официально рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения серологические методы исследования (РА, ПРА/РБП РСК/РДСК) и согласно ветеринарно-санитарным правилам (Приказ МСХ РК от 29.06.2015 №7-1/587). Во всех этих серологических тестах применяют антиген, изготовленный из S- форм бруцелл. При диагностических исследованиях на инфекционный эпидидимит баранов применяют серологический метод диагностики РДСК с так называемым овисным антигеном, приготовленным из штамма бруцелл вида *B. ovis*, находящегося в R-форме. R-форма, как и L-форма, является диссоциированной формой бруцелл.

При бруцеллезе животных на определенном этапе течения инфекционного процесса бруцеллы могут находиться в организме в диссоциированном состоянии, т.е. иметь измененную антигенную структуру. Переход бруцелл в диссоциированное состояние может происходить под воздействием различных внешних факторов, влияющих на организм. У животных, зараженных такими измененными формами бруцелл, вырабатываются антитела соответствующей специфичности, которые не обнаруживаются в серологических реакциях с общепринятыми антигенами.

Есть сведения ряда исследователей, которые установили присутствие бактериофага в организме больных бруцеллезом (Дрожжевкина и др., 1957). Эпизоотические культуры бруцелл на 70-80% поражены бактериофагами, что доказывает широкую распространённость их в очагах инфекции (Косилов, 1975). Присутствующие в культурах бруцелл бактериофаги под воздействием

внешних факторов переходят в лизогенное состояние и начинают продуцировать бруцеллезный бактериофаг (Воробьев, 2006).

Так же можно отметить, что антифаговые антитела циркулируют в организме больных бруцеллезом, и присутствие антифаговых антител в сыворотке крови доказывает присутствие в макроорганизме (больного животного) жизнеспособных бруцелл, так как репродукция фага возможна только в живых бактериях. Таким образом, антиген, содержащий специфический бактериофаг, способен вступать в реакцию как с антибруцеллезными, так и антифаговыми антителами, что повышает его чувствительность и специфичность.

С целью повышения результативности серологической диагностики бруцеллеза животных, инфицированных диссоциированными вариантами бруцелл, нами сконструирован комбинированный антиген, включающий диссоциированные формы бруцелл и специфический бруцеллезный бактериофаг.

Для этого мы провели селекционные исследования с последующим скринингом штаммов бруцелл и бактериофагов с целью создания R-бруцеллезного антигена, содержащего специфический бруцеллезный бактериофаг.

#### **2.2.2.2 Получение стабильных диссоциантов под воздействием внешних факторов**

С целью изучения получения диссоциированных форм бруцелл под воздействием внешних факторов (УФ излучение) выбрали некоторые виды штаммов бруцелл, находящихся в разных формах (S- и R-формы): *B.aborus* 544 (S-φ); *B.aborus* 54(S-φ); *B.aborus* 960(R-φ); *B.melitensis* 16M(S-φ); *B.melitensis* Невский -12 (R-φ); *B.suis* 1330(S-φ); *B.ovis* 63/290 (R-φ); *B.ovis* 8(R-φ); *B.ovis* 11(R-φ) и *B.canis* 1066(R-φ). Для полноценного изучения степени изменчивости бруцелл среди выше приведенных бруцеллезных

штаммов были выбраны типичные и диссоциированные формы. Источником УФ излучения для повышения частоты выделения диссоциантов являлась ртутно-кварцевая лампа ПРК-2 мощностью 375 Вт, длина волны 253,7 нм.

В последующем облученные и необлученные культуры бруцелл (контрольные штаммы) высевали в две пробирки с эритроит-агаром и в одну с питательным бульоном. Посевы инкубировали в термостате при 37°C до появления видимого роста (обычно 2-3 суток) для последующего изучения морфологических и тинкториальных особенностей, биологических свойств облученных культур бруцелл и получения стабильных диссоциантов. В результате селекционного исследования отобрали 72 клона бруцелл.

На следующем этапе проводили скрининг диссоциированных форм бруцелл, для чего вновь провели посев всех отобранных клонов бруцелл на питательные среды и культивировали в термостате (37° С) в течение 48 часов. Скрининг позволил отобрать 20 культур бруцелл, которые обладали типичными морфологическими и тинкториальными признаками, характерными для этой группы микробов и в так же стабильно сохраняли свой измененные биологические свойства.

Как показано в таблице 34, у всех бруцелл под влиянием УФ излучения полностью или частично изменились биологические свойства, что выразилось в неодинаковой серологической активности и других дифференциальных признаках этих штаммов в сравнении с исходными культурам. Культуры бруцелл 544/11, 54/1, 16М/12, 16М/123, 1330/22, 1330/222 по дифференциальным тестам отнесены к R-форме. Перечисленные культуры бруцелл провели через организм лабораторных животных (морских свинок) и изучили биологические свойства выделенных культуры бруцелл. Все культур обладали типичными морфологическими и тинкториальными признаками, характерными для бруцелл. По дифференциальным свойствам культура бруцелл под номером 544/11 стабильно сохранила все биологические свойства R-форм бруцелл, хотя в исходный 544 эталонный штамм имел признаки S-форм бруцелл. В результате выбрали один наиболее перспективный

диссоциированный штамм *B. abortus* 544/11 R, со следующими признаками: грамтрицательные овоиды от 0,4-2,2х 0,4-0,6 мкм, неподвижные, спор и капсул не образуют. На питательном агаре вырастают янтарные, мутные, выпуклые колонии, круглые с неровными краями. Накопление бакмассы наблюдается через 24-48 часов выращивания. В питательном бульоне образуют равномерную муть с пристеночным кольцом. Аэроб. Оптимальная температура выращивания 37 °С при рН 6,8-7,2. Проба на диссоциацию. По Уайт-Вильсону колонии окрашиваются в темно-синий цвет (R-форма), проба с трипафлавином и реакция термоагглютинации – положительные. Антигенная структура содержит типичный набор антигенных детерминант, характерных для бруцелл R-форм, т.е. агглютинируется R-бруцеллезными сыворотками.

Штамм *B.abortus* 544 R защищен предпатентом РК №15970 под коллекционным номером *Brucella abortus* 0071B (2004 г.). Таким образом, получение диссоциированных форм бруцелл под воздействием УФ излучения для изменения генетического кода бактерий с последующей селекцией и скринингом, позволяет получить бруцеллы с желаемой характеристикой, в том числе и антигенной структурой, необходимых для создания высокоинформативных диагностических препаратов.

Таблица 34 - Биологическая характеристика диссоциированных форм бруцелл

№ п/п	Вид бруцелл	№ Штамма	Проба с	Реакция термоагглютинации	Окраска по Уайт-Вильсону	Агглютинация с иммунными сыворотками ПРА			Чувстви- тельность к фагу ТБ	Рост на средах с красками					Активность ферментов			
						S-	R-	SR-		тионин			фуксин		Уреазная	Оксидазная	H <sub>2</sub> S	
										1:25000	1:50000	1:10000	1:50000	1:10000				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16	17	18	19	
1	B. abortus	544 /11	+	+	R	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	
2		544 /21	+	+	SR	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
3		54/ 1	+	+	R	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	
4		960 /1	+	±	SR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5		960 /11 1	+	±	SR	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-
6		960 /22	-	-	S	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+



17		63/ 290 /10	-	-	S	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
18	B. canis	106 6/1	-	-	S	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
20		106 6/1 1	+	±	SR	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+

### 2.2.2.3 Получение специфического бруцеллезного бактериофага нового типа

С целью получения бруцеллезных бактериофагов нового типа для использования их при конструировании диагностикумов из R-форм бруцелл были проведены исследования по выделению бактериофагов лизирующих бруцеллезных штаммов в R-форме. Для выделения бруцеллезного бактериофага использовали штамм *B.abortus* 54. Для проявления свойства бруцелл к продукции специфических фагов требуется индуцирующее воздействие внешних факторов, в результате чего бруцеллы переходят в лизогенное состояние. Лизогенизацию штамма проводили по способу, предложенному А.Л. Воробьевым и др. (Предпатент РК 14203, 2003). Под воздействием пенициллина бруцеллы штамма *B.abortus* 54 перешли в лизогенное состояние.

Литический спектр изолятов фага выделенных из штамма *B.abortus* 54 изучали путем нанесения капли фильтрата на газон с индикаторными штаммами, инкубировали 2-3 суток в термостате (37° С) и выявляли наличие негативных колоний фага. В качестве индикаторных культур использовали штаммы: *B.abortus* 19, 544, 54, 82, 960; *B.suis* 1330; *B.melitensis* 16М, Н-12; *B.ovis* 63/290, 10/2, 8, 11 и *B.canis* 1066. Однако состав первичных популяций фагов, полученных под индуцирующим воздействием пенициллина, был разнородным и представлен несколькими вариантами негативных колоний, появляющихся на газоне индикаторных культур.

Отбор фагов для изучения литического диапазона осуществляли при последовательном пассировании морфологически однотипных колоний до получения однородной популяции. При этом пользовались одной серией питательной среды и соблюдали одинаковые условия культивирования. Исследованию подвергали 8 клонов бактериофагов (таблица 9).

По величине образовавшихся негативных колоний при пересеве на твердые питательные среды смеси фаг-бактерия разделили на 3 группы: 1-

точечные негативные колонии; 2- негативные колонии величиной 1,0-2,0 мм без зоны неполного лизиса на краях; 3 – крупные негативные колонии величиной 2,0-3,0 мм с прозрачным центром и хорошо выраженной зоной неполного лизиса.

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 35, диапазон литической активности индуцированных пенициллином фагов весьма обширен. Отмечены фаги, способные лизировать *B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*, находящиеся в S-форме, есть фаги. Наблюдали фаги, образующие негативные колонии на всех взятых в опыт и лизирующие только диссоциированные варианты бруцелл, в т. ч. *B. ovīs* и *B. canis* штаммах бруцелл, разных видов и форм. Выявлены фаги, способные лизировать какой-либо один штамм бруцелл и не лизирующий другие штаммы. Контролем служил фаг ТБ.

Индуцированные воздействием пенициллина фаги лизировали все используемые в опыте штаммы бруцелл. Так, фаги 54/1, 54/2 и 54/11 показали активность в отношении R-форм бруцелл; фаги 54/12, 54/18, 54/16 и 54/22 – лизировали как S-, так и R- формы бруцелл; у фага 54/28 отмечались негативные колонии на S-формах *B. abortus*, *B. melitensis* *B. suis*; фаг 54/11 слабо лизировал отдельные штаммы бруцелл, находящихся в типичном и диссоциированном состоянии.

Референтный фаг ТБ проявил литическую активность в отношении S-форм *B. abortus*, *B. suis*.

Отбор фагов при пассировании проводили по главному признаку - по спектру литической активности. Как видно из данных, представленных в таблице 2, фаги имеют достаточно широкий литический спектр в отношении бруцелл разных видов и степени изменчивости. В результате выбрали один наиболее перспективный для дальнейшей работы фага 54/2, который изолировали из лизогенного штамма *B. abortus* 54.

Таблица 35 - Литический спектр клонов фага

№ п/п	№ фагов	Клоны бактерио- фагов	Пассаж фагов на штаммах бруцелл	Вид бруцелл										
				<i>B. abortus</i>				<i>B. melitensis</i>		<i>B. suis</i>	<i>B. ovis</i>		<i>B. canis</i>	
				19, S	54, S	544, S	960, R	16 M S,	H-12, R	1330 S,	10/2, R	63/290, R	1066, R	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1	ТБ			сл	сл	сл				сл				
2		54/1	544,54, 16 М, 960	30			л	24		л				
3		54/2	54, 1066, 10/2, 960				сл		сл		сл	сл	сл	
4		54/11	544,10/2,544,10/2, 63/290	30	40	20		10		30				
5		54/12	1330, 10/2, 16М, 1066	сл	сл	сл		30	10	л	сл	сл	10	
6		54/18	10/2, H-12, 16М,1330, 10/2	сл	сл	сл		л	40	сл	сл	сл		
7		54/16	10/2, 54, 1330,	сл	сл	л	л	л		20	40	л	л	
8		54/22	1330, 16М	сл	сл	л		сл	30	сл	10	л	30	
9		54/28	63/290,1066				л		сл		л	л	л	

Примечание. СЛ - сливной лизис; Л - лизис; цифрами обозначено количество негативных колоний.

При сравнительном изучении литического диапазона вышеуказанного фага 54/2 с референтным фагом ТБ установили некоторые характерные особенности, которые показаны в таблице 36.

Индикаторными культурами служили штаммы: *B.abortus* 19, 54, 544, 82, 960; *B.melitensis* 16М, Н-12; *B.suis* 1330; *B.ovis* 63/290, 10/2, 8, 11; *B.canis* 1066.

Как видно из таблицы 36, выделенный из лизогенного штамма *B.abortus* 54 фаг лизирует все культуры бруцелл в R-форме. Не проявляет активность в отношении культур *B.abortus*, *B.melitensis* *B.suis* в S-форме.

Таблица 36 - Литический диапазон бруцеллезного бактериофага 54/2 и ТБ

Бруцеллезные штаммы и формы (S-, R-)		Бактериофаги	
		54/2	ТБ
<i>B.abortus</i>	19, S	-	+
	544, S	-	+
	82, S R	+	+
	54, S	-	-
	960, R	+	-
<i>B.melitensis</i>	16М, S	-	-
	Н-12, R	+	-
<i>B.suis</i>	1330, S	-	+
<i>B.ovis</i>	63/290, R	+	-
	10/2, R	+	-
	8, R	+	-
	11, R	+	-
<i>B.canis</i>	1066, R	+	-

Примечание + лизис; - отсутствие лизиса.

Из вышеизложенного следует отметить, что полученный нами бруцеллезный бактериофаг отличается по литическому диапазону действия от известного бруцеллезного бактериофага ТБ способностью лизировать культуры бруцелл в R-форме и обладает повышенной литической активностью.

Таким образом, штамм бактериофага 54/2 полученный из бактерий *V.abortus* 54, характеризуется следующими признаками:

- обладает высокой урожайностью. Повышает эффективность серологической диагностики бруцеллеза. Используется для приготовления комбинированных бруцеллезных антигенов.

- по морфологическим признакам корпускулы фага 54/2 имеют головку гексагональной формы, размером  $60\pm 5$  нм, слабовыраженный отросток длиной  $16\pm 2$  нм, базальная пластинка отсутствует. Фаг 54/2 относится к III морфологической группе, I подгруппе.

- лизирует культуры бруцелл в R-форме. Не проявляет активность в отношении культур *V.abortus*, *V.melitensis*, *V.suis*, *V.neotomae* в S-форме.

- антигенная структура. Реакция нейтрализации антифаговой сывороткой показала, что нет существенной разницы между фагами ТБ и 54/2 как в титрах сывороток, так и в скорости нейтрализации, что указывает на принадлежность к одной серологической группе.

В результате проведенных работ из штамма бруцелл *V.abortus* 54 выделен штамм бактериофага с коллекционным номером 0073 BV (КазНИВИ, CD) и получен предпатент РК 15976 (2004 г.).

#### **2.2.2.4 Конструирование комплексного диагностикума, содержащего измененные формы бруцелл и специфические фаги**

Целью нашей работы на данном этапе исследования являлась возможность получения стабильного комплекса фаг+бактерия. Для чего мы

провели адсорбцию фага на бактерии по методу, описанному И.Ф. Тараном и др. (Таран и др., 1972).

Для проведения данного исследования использовали бруцеллезные бактериофаги 0073 BV и ТБ (контроль) и бруцеллы штаммов *B.abortus* 0071 В (R -форма) и *B. abortus* 19 (S-форма). Культуры бруцелл сеяли в пробирки с питательным бульоном в объеме 4,5 см<sup>3</sup> и выдерживали 6 часов в термостате (37° С). Затем добавляли по 0,5 см<sup>3</sup> исследуемых фагов (10<sup>-8</sup> ф.к./см<sup>3</sup>), помещали в холодильник с целью предотвращения размножения фагов и определяли концентрацию корпускул фага в питательном бульоне в разное время контакта при 4-5° С. Каждый фаг добавляли в две пробирки: одна с бруцеллами штамма *B.abortus* 0071 В (R -форма) и *B. abortus* 19 (S-форма). Перед исследованием бульон в течение 30 мин центрифугировали при 6000 об/мин, бруцеллы с адсорбированными фагами осаждались, неадсорбированные корпускулы фага оставались в надосадочной жидкости, количество которых определяли путем титрации на газоне индикаторной культуры. Результаты опыта показаны в таблице 37.

Как свидетельствуют данные таблицы 11, фаг 0073 BV полностью адсорбировался на клетках штамма *B.abortus* 0071 В в течение 4 часов. Полная адсорбция S-фага ТБ на бактериях штамма *B.abortus* 19 также закончилась за 4 часа. Адсорбцию R-фага на бруцеллах в S-форме и S- фага на R- формах не отмечали.

Таблица 37 - Количество адсорбированных фагов в разное время контакта

Штаммы бруцелл	Количество адсорбированных фагов, %					
	Штамм фагов 0073 BV			Штамм фагов ТБ		
	Время контакта (час.)					
	4	12	24	4	12	24
<i>B.abortus</i> 19 (S-форма)	-	-	-	99,0	100,0	100,0
<i>B.abortus</i> 0071 В (R-форма)	100,0	100,0	100,0	-	-	-

Для создания комплексного антигена предварительно получили штамм *B.abortus 0071B* из бактерий штамма *B.abortus 544R* воздействием ультрафиолетовых лучей с последующей селекцией и скринингом колоний в R-форме по культурально-морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам. В качестве второго компонента комплексного антигена использовали штамм бактериофага *0073BV* (R-фаг), который селекционировали из бактерий *B. abortus 54* под индуцирующим воздействием пенициллина.

Способ приготовления данного антигена заключается в следующем: штамм *B.abortus 0071B* (R-форма) выращивали на плотной питательной среде, смывали физиологическим раствором, затем штамм специфического бактериофага *0073BV* репродуцировали в клетках штамма *B.abortus 0071B* в жидкой питательной среде, фильтровали через керамический фильтр, определяли титр полученного фага, после чего фаг адсорбировали на клетках штамма *B.abortus 0071B* из расчета 100 фаговых корпускул на 1 бактерию при температуре 4 °С в течение 24 час. Взвесь бруцелл с адсорбированным фагом центрифугировали при 5000 об/мин в течение 15 мин, супернатант удаляли, центрифугат разводили 0,5% фенолизированным физиологическим раствором до 100 млрд. взвеси, далее инактивировали при 80 °С в течение 60 мин, стабилизировали при 4 °С в течение 10 суток и получили целевой продукт.

На данный способ получения антигена для серологической диагностики бруцеллеза получен предпатент РК № 18053 (2005 г.).

**2.2.2.5 Изучение информативности полученного комплексного  
антигена в различных серологических реакциях**  
**2.2.2.5.1 Определение чувствительности комплексного антигена  
в сравнении с коммерческим цветным овисным антигеном в РА**

При определении чувствительности комплексного антигена в реакции агглютинации (РА) для сравнения был взят коммерческий цветной антиген, разработанный Алимбековой М.Е. для диагностики бруцеллеза и инфекционного эпидидимита в РА (Алимбекова М.Е., 2006 г.). Реакцию ставили на 0,85%-ном растворе хлорида натрия при постановке реакции с комплексным антигеном и 2%-ном растворе хлорида натрия при постановке реакции цветным овисным антигеном. С опытным антигеном сыворотки применяли в разведениях 1:25; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400 в объеме 0,5 см<sup>3</sup>. В реакциях с комплексным и цветным овисным антигенами в качестве контроля использовали сыворотки: биофабричные овисную и негативную, антифаговые R- и S-сыворотки, полученные из штаммов бактериофагов 0073 BV и ТБ. При этом получили следующие результаты: с биофабричной овисной сывороткой зарегистрированы идентичные результаты с обоими антигенами. Фагосодержащий антиген, с иммунной антифаговой R-сывороткой показал положительные результаты, цветной овисный антиген с данной сывороткой дал отрицательные результаты. Иммунная антифаговая S-сыворотка с фагосодержащим антигеном показал титры на порядок ниже, чем с иммунной антифаговой R-сывороткой, в то время как с цветным овисным антигеном результаты были отрицательными (табл. 38).

Таблица 38 - Результаты РА комплексного антигена в сравнении с цветным овисным антигеном

№ п/п	Исследуемые сыворотки	Цветной овисный антиген для РА	Комплексный антиген
1	Биофабричная овисная сыворотка (R)	1:200	1:200
2	Иммунная антифаговая S-сыворотка	отриц	1:200
3	Иммунная антифаговая R - сыворотка	отриц	1:400
4	Биофабричная негативная сыворотка	-	-

#### 2.2.2.5.2 Определение чувствительности комплексного антигена в сравнении с биофабричным овисным антигеном в РДСК

Чувствительность фагосодержащего антигена устанавливали в сравнении с овисным биофабричным антигеном. Исследовали иммунные сыворотки, полученные на SR-, L- формы бруцелл, а также биофабричные бруцеллезную и овисную сыворотки. Реакцию ставили путем разведения сывороток до предельного титра 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280. Одновременно ставили контроль с негативной сывороткой в разведениях 1:5 и 1:10.

При определении чувствительности антигена, содержащего специфический фаг в сравнении с овисным биофабричным в РДСК с S-, SR-, R-и L-иммунными сыворотками, полученными на различные виды и формы бруцелл получили идентичные результаты с обеими антигенами, однако титры с комплексным антигеном были несколько выше. С L-иммунной сывороткой биофабричный антиген дал негативные показания, в то время как антиген содержащий фаг вступал с ним в реакцию (табл. 39).

Таблица 39 - Результаты сравнительного изучения чувствительности комплексного антигена биофабричным овисным антигеном в РДСК

№ п/п	Исследуемые сыворотки	Комплексный антиген										Биофабричный овисный антиген										
		Титры исследуемых сывороток																				
		1:5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	
1	Иммунная SR-бруцеллезная сыворотка	-	#	#	#	+++	-	-	-	-	-	-	-	#	#	#	++	-	-	-	-	-
2	Иммунная L-бруцеллезная сыворотка	-	#	#	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Биофабричная S-бруцеллезная сыворотка	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Биофабричная R-овисная сыворотка	-	#	#	#	#	+++	-	-	-	-	-	-	#	#	#	#	++	-	-	-	-
5	Негативная																					

**Примечание:** # - оценка результатов реакции 4 креста; +++ - оценка результатов реакции в 3 креста; ++ - оценка результатов реакции в 2 креста.

### 2.2.2.5.3 Определение активности комплексного и овисного биофабричного (контроль) антигенов в РДСК

Изучение активности проводили путем титрации комплексного и биофабричного овисного антигенов до предельного разведения в РДСК с биофабричной овисной сывороткой.

При этом установили, что комплексный антиген в разведении 1:50; 1:100; 1:150 с разведением сыворотки 1:80 показал +++. А с биофабричным овисным антигеном при разведении антигена 1:100 с разведением сыворотки 1:80 показал ++.

### 2.2.2.5.4 Определение специфичности комплексного антигена

Специфичность опытного комплексного антигена устанавливали с биофабричными сыворотками, полученными на возбудителей кампилобактериоза, сальмонеллеза, туляремии и иерсиниоза, а также негативной, бруцеллезной и овисной сыворотками при постановке РДСК.

Таблица 40 – Данные РДСК с комплексным антигеном и иммунными сыворотками, полученными на возбудителей инфекционных заболеваний

Наименование сыворотки		Титры сывороток					
		1:5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:160
1	Кампилобактериозная	-	-	-	-	-	-
2	Сальмонеллезная	-	-	-	-	-	-
3	Туляремийная	-	-	-	-	-	-
4	Йерсиниозная	-	-	-	-	-	-
5	Негативная	-	-	-	-	-	-
6	Овисная (R-ф)	-	#	#	#	+++	-
7	Бруцеллезная (S-ф)	-	-	-	-	-	-

Результаты, представленные в таблице 40, были следующими: положительные реакции наблюдали только лишь с овисной сывороткой, а остальными сыворотками получили негативные результаты.

### 2.2.2.6 Изучение диагностической эффективности комплексного антигена в производственных условиях

Изучение диагностической ценности разработанного нами антигена проводили в РДСК и РА путем исследования сывороток крови животных в Алматинской, Костанайской и Атырауской областях. 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 (табл. 41).

Таблица 41 - Результаты производственных сравнительных испытаний комплексного антигена и биофабричного овисного антигена в РДСК

Алматинская область							
Название ветеринарного участка	Количество голов	Результаты реакции					
		РДСК с комплексным антигеном			РДСК с биофабричным овисным антигеном		
		Пол.	Отр.	Сом.	Пол.	Отр.	Сом.
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>							
		Пол.	Отр.	Сом.	Пол.	Отр.	Сом.
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>-</b>	<b>2</b>	<b>585</b>	<b>-</b>
	<b>694</b>	<b>17</b>	<b>677</b>	<b>-</b>	<b>9</b>	<b>682</b>	<b>3</b>

**Примечание:** Пол – положительные, Отр – отрицательные, Сом-сомнительные результаты реакции.

Из данных таблицы 41 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.

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 41%.

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

Группа баранов	Количество голов	Результаты диагностических реакций					
		РДСК с биофабричным овисным антигеном			РА с комплексным антигеном		
		Положительная		Отрицательная	Положительная		Отрицательная
		Голов	%		Голов	%	
Отара 3	929	11	100	918	16	145%	913
Отара 4	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 33% - 41% (в среднем

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 эффективность выявления животных, инфицированных диссоциированными формами бруцелл.

### 3 Заключение

Одним из подходов для оздоровления крупного рогатого скота от бруцеллеза является 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.

Важнейшей характеристикой генетической структуры популяций является их полиморфизм, который определяет их адаптивность, изменчивость при воздействии неблагоприятных факторов внешней среды, в том числе ответную реакцию на патогенные микроорганизмы.

Мерой генетического разнообразия популяции может служить полиморфизм аллелей гена *BoLA-DRB3*, который имеет более 100 аллелей. Молекулярно-генетический анализ 3 пород крупного рогатого скота Республики Казахстан по гену *BoLA-DRB3* позволил выявить у аулиекольской породы 24 аллеля у здоровых и 22 аллеля у больных бруцеллезом коров; у казахской белоголовой породы - 23 аллеля у здоровых и 21 аллеля у бруцеллоносителей; у голштинской породы - 11 аллелей у здоровых и 10 аллелей у бруцеллоносителей. Полученные данные свидетельствуют о достаточно высоком генетическом разнообразии мясных пород Казахстана, и соответственно их высоком адаптивном потенциале.

Низкий полиморфизм гена *BoLA-DRB3* у голштинов связан с тем, что в селекции и разведении племенного скота голштинской породы использовали всего 7 групп быков-производителей, он свидетельствует о невысокой приспособляемости животных этой породы, что и подтверждается высокими потребностями этой породы в уровне содержания, в качестве ухода, кормов и пр. Общее количество аллелей, выявленных у животных голштинской породы, совпадает с ранее полученными в ИННО-центре биотехнологии и экологии БГУ данными о резком снижении полиморфизма гена *BoLA-DRB3* в племенных стадах и у быков-производителей голштинской породы (Nam et al,

2014; Latypova et al., 2017; Смазнова, 2014), и соответствует многочисленным литературным источникам.

В настоящее время оздоровление поголовья крупного рогатого скота в неблагополучных по бруцеллезу пунктах основано на систематических диагностических исследованиях поголовья с последующей изоляцией и убоем выявляемых пораженных особей. Для массовой диагностики бруцеллеза у животных во всем мире широко используются серологические методы исследования, и для диагностики бруцеллёза существуют стандартные наборы и антигены, рекомендованные к применению в разных государствах.

Однако показано, что в ряде случаев стандартные методы не позволяют диагностировать 100% инфицированных бруцеллой животных, что в целом определяет недостаточную эффективность мероприятий по оздоровлению: невыявленные в результате ложноотрицательных результатов бруцеллоносители являются источником инфекции, и хозяйство остается неблагополучным по 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 ложноотрицательные результаты стандартных диагностикомов не позволяют избавиться от источников инфекции и сильно затрудняют борьбу с распространением инфекции.

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

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.

Особый интерес представляет анализ сравнение частот аллелей у коров голштинской породы в связи с устойчивостью животных к лейкозу и бруцеллезу. Известно, что при селекции этой молочной породы было выделено 7 выдающихся быков – родоначальников отдельных линий племенных животных, сперма которых использовалась при дальнейшем разведении этой породы. Популяция обогащалась генами высокой молочной продуктивности и хозяйственно-ценных признаков, и одновременно происходило обеднение по генам, которые не контролировались в процессе селекции. Поэтому за десятилетия накопились мутации, снижающие репродуктивный потенциал, приводящие к врожденным уродствам и даже к гибели животных.

Аллельный полиморфизм гена *BoLA-DBD3* у коров голштинской породы очень подробно изучался в связи с широкой распространенностью лейкоза в стадах этой породы. В настоящее время доказано, что аллельный полиморфизм у этой породы коров существенно ниже, чем у других пород (всего 10-11 аллелей). При этом аллели \*11, \*23 и \*28 связаны с устойчивостью животных к лейкозу, а аллели \*8, \*16, \*22 и \*24 подавляют формирование защитной реакции при поражении коров вирусом лейкоза КРС.

Как показано в настоящей работе, в случае бруцеллеза аллели \*23 и \*28 также связаны с устойчивостью, при этом аллель \*24 также способствуют защитной реакции, а не подавлению иммунитета, как в случае лейкоза. Аллель \*22 может быть связан с чувствительностью к бруцеллезу, как и в случае с лейкозом. Остальные значимые для лейкоза аллели являются нейтральными в случае развития бруцеллеза у коров голштинской породы.

Также большой интерес привлекает аллель \*7, выявленный у всех трех пород КРС Казахстана. Он широко распространен у коров айрширской породы (около 25% популяции) и связан с признаками высокой молочной продуктивности и устойчивости к лейкозу. Однако у всех трех проанализированных пород – аулиекольской, казахской белоголовой и голштинской, этот аллель ассоциируется с чувствительностью к бруцеллезу.

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

Выявленные молекулярно-генетические маркеры позволяют проводить селекционную работу на повышение генетической устойчивости КРС к бруцеллезу: 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 представления о влиянии системы BoLA на формирование устойчивости и чувствительности к бруцеллезу.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать следующие выводы:

Поиск молекулярно-генетических маркеров устойчивости и чувствительности к бруцеллезу и изучение системы BoLA как потенциального источника таких маркеров привело к выявлению аллелей гена BoLA-DRB3, которые могут служить такими маркерами.

Комплексный антиген способен выявлять хронические и скрытые формы бруцеллеза, в том числе вызываемые диссоциированными формами бруцелл, его эффективность на 38% выше 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 ложноотрицательные результаты стандартных диагностикомов не позволяют избавиться от источников инфекции и сильно затрудняют борьбу с распространением инфекции.

В целом, результаты диссертационного исследования по теме «Аллельный полиморфизм гена *BoLA-DRB3* в связи с устойчивостью к бруцеллезу и разработка комплексного антигена для диагностики бруцеллеза животных» 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.).

#### **4 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 при бруцеллезе животных 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.

#### **4.1 Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы**

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

## 5 Обозначения и сокращения

МСХ РК – Министерство сельского хозяйства Республики Казахстан;

РК – Республика Казахстан;

ФАО/ВОЗ – Федерация аграрных объединений всемирной организации здравоохранения;

РСК – реакция связывания комплемента;

РДСК – реакция длительного связывания комплемента;

РА – реакция агглютинации;

РБП – Роз-бенгал проба;

ПРА – пластинчатая реакция агглютинации;

МЭБ – международное эпизоотическое бюро;

НИВС – научно-исследовательская ветеринарная станция;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

нм – нанометр;

УФ – ультрафиолет;

мкм – микрометр;

pH – показатель величины водородных ионов;

мм – миллиметр;

м.к. – микробные клетки;

ф.к. – фаговые корпускулы;

млрд – миллиард;

см<sup>3</sup> – кубический сантиметр;

об/мин – оборотов в минуту;

РГКП – Республиканское государственное казенное предприятие

РГП – республиканское государственное предприятие

ЮЗНПЦСХ – Юго-западный научно-производственный центр сельского хозяйства

ПЦР-ПДРФ – полимеразная цепная реакция с изучением полиморфизма длин рестрикционных фрагментов

ГКГ – главный комплекс гистосовместимости

BoLA – bovine leucocyte antigen

MHC – major histocompatibility complex

GH - соматотропин

$\beta$ LG -  $\beta$ -лактоглобулин

PRL - пролактин

CSN3 - каппа-казеин

SNP - единичные однонуклеотидные мутации

### Список использованной литературы

1. Адамс М. Бактериофаги: моногр. Москва, 1961. - 527с.
2. Афонюшкин В.Н., Юшков Ю.Г., Городов В.С. перспективы использования генодиагностики в ветеринарной практике//Вопросы вирусологии, 1998. №12. С.12-16.
3. Баранов А.В., Баранова Н.С., Егоров О.С., Подречнева И.Ю. Эффективность генетического маркирования в селекции скота костромской породы // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. 2015. № 4 (47). С. 70-75.
4. Батырханова С.Т., Абуова Г.Н. Бруцеллез в Южно-Казахстанской области // В сборнике: The Europe and the Turkic World: Science, Engineering and Technology Materials of the international scientific-practical conference. Editorial Board: Chairman of the Board S. Midelski. 2016. С. 204-206.
5. Белобаб В.И. Пути совершенствования диагностики и профилактики бруцеллеза у животных: дис. ... д-ра вет. наук. - Алматы, 1998. - 426 с.
6. Блинкова Д.Л. Бактериофагия в связи с изменчивостью бруцелл: автореф. ... канд. вет. наук. Новосибирск, 1989. - 17 с.
7. Блинкова Д.Л. Изменение культур Br. abortus при хранении на питательных средах // Научное обеспечение мероприятий по проф. и ликвидации туб. и бруц. с.-х. животных: сб. науч. тр. - Новосибирск, 1991. С. 132-136.
8. Василькова В.В., Галимзянов Х.М., Алиева А.А., Егорова Е.А. Бруцеллез у людей на территории Астраханской области // В сборнике: Природно-очаговые инфекции в современной практике врача. 2016. С. 50-56.
9. Вершилова П.А. Бруцеллез: моногр. Москва: Медицина, 1972. - 439 с.
10. Ветеринарные (ветеринарно-санитарных) правила Республики Казахстан Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 29 июня 2015 года № 7-1/587.

11. Ветеринарное законодательство Республики Казахстан// Методические указания по лабораторной диагностике бруцеллеза. Т.3 С. 19-26.
12. Воробьев А.Л., Способ лизогенизации бактерий. Предпатаент РК №14203//<https://kzpatents.com/0-pp14203-sposob-lizogenizacii-bakterijj.html>. База патентов Казахстана.
13. Воробьев А.Л. Биологические свойства сапрофитных вариантов бруцелл //Ветеринарная патология. 2010. № 1. С. 11-16.
14. Воробьев А.Л. Фаги бруцелл и их иммунобиологические свойства: автореф. ... д-ра биол. наук. Алматы, 2006.- 41с.
15. ВОЗЖ. Руководство по наземным животным. Раздел 3.1. Болезни общие для всех видов животных. Глава 3.1.4. Бруцеллез (*Brucella abortus*, *B. melitensis* и *B. suis*). Версия, принятая на Всемирной ассамблее делегатов МЭБ в мае 2016 года. 65 с. ([https://rr-europe.woah.org/wp-content/uploads/2021/08/3-1-4-brc\\_.pdf](https://rr-europe.woah.org/wp-content/uploads/2021/08/3-1-4-brc_.pdf)).
16. ВОЗЖ. Руководство по наземным животным. Раздел 3.3. Козлы и бараны. Глава 3.7.8. Эпидидимит овец (*Brucella ovis*) NB: Версия, принятая на Всемирной ассамблее делегатов МЭБ в мае 2015 года 16 с. (<https://rr-europe.woah.org/app/uploads/2021/08/3-7-8.pdf>).
17. Глазко В.И., Дунин В.И., Глазко Г.В., Калашникова Л.А. Введение в ДНК-технологии // Москва: ФГНУ «Росинформагротех», 2001. - 434 с.
18. Ганюшин В.Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии. Ульяновск, 1988. - 84 с.
19. Галич Б.Ф. Динамика изменений гуморального антифагового и противобруцеллезного иммунитета у больных бруцеллезом: автореф. ...канд. мед. наук. - Алма-Ата, 1990. - 20 с.
20. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К., Костюнина О.В., Быкова А.С., Банникова А.Д.,Кудина Е.П., Брем Г. Молекулярные методы в диагностике заболеваний и наследственных дефектов сельскохозяйственных животных//Зоотехния. № 8. 2009. С. 26-28.

21. Гордиенко Л.Н. Фенотипическая изменчивость бруцелл в процессе L-трансформации *in vitro* // Вестник Алтайского государственного аграрного университета №8 (82) 2011. С. 71-73.

22. Гордиенко Л.Н. Повышение эффективности эпизоотологического мониторинга при бруцеллезе северных оленей // Ветеринария. 2013. № 11. С. 22-24.

23. Гордиенко Л.Н. Интенсивность распространения бруцеллеза среди крупного рогатого скота мясной породы при выгульном содержании // Ветеринария. 2014. № 11. С. 17-20.

24. Гордиенко Л.Н. Бруцеллез собак: эпизоотология, клиническая и лабораторная диагностика // В сборнике: XII Международный Московский конгресс по болезням мелких домашних животных. 2004. С. 3.

25. Гордиенко Л.Н., Куликова Е.В., Гайдуцкая Г.М., Еланцева Н.Б., Волкова Т.И., Гуськова Т.В. Оценка иммунного статуса импортного крупного рогатого скота, оздоравливаемого от бруцеллеза // Ветеринария. 2017. № 2. С. 19-22.

26. Гражданов А.К., Кожанова О.И., Топорков А.В., Аязбаев Т.З., Матвеева Н.И., Карнаухов И.Г., Попов Н.В., Раздорский А.С., Архипова Г.Н. Сравнительный анализ проявлений опасных инфекций в Саратовской и Западно-Казахстанской областях в целях современной оценки эпидемиологических рисков // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. № 4. С. 16-23.

27. Гулевич Н.Е., Бахуташвили В.И., Чхаидзе М.Я. Длительность носительства дизентерийного бактериофага клетками перевиваемой линии // Теоретические и практические вопросы бактериофагии. Тбилиси, 1974. С. 139-140.

28. Гулюкин М.И., Альбертян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И., Коломыцев С.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных в Российской Федерации // Ветеринария. 2013. №6. С. 23 – 28.

29. Гулюкин М.И., Альбертян М.П., Искандаров М.И., Федоров А.И., Искандарова С.С. Эффективность мероприятий, проводимых против бруцеллеза крупного рогатого скота, в Российской Федерации// Ветеринария. 2016. № 12. С. 24-28.

30. Джаримбетова С.О., Основные проблемы в животноводстве Казахстана // Вестник Казахский экономический университет им. Т. Рыскулова. Алматы, 2013 г. №3 С. 81-90.

31. Джамбулатов З.М., Сакидибиров О.П., Ахмедов М.М., Гаджиев Б.М., Джабарова Г.А., Баратов О.М. Бруцеллез: проблемы и суждения // Проблемы развития АПК региона. 2018. № 1 (33). С. 80-84.

32. Димов С.К. Теория и практика управления эпизоотическими процессами бруцеллеза: дис. ... д-ра вет. наук. - Новосибирск, 1993. 330 с.

33. Доцев А.В., Сермягин А.А., Шахин А.В., Паронян И.А., Племяшов К.В., Рейер, Виммерс, Брем. Г., Зиновьева Н.А. Оценка современного состояния генофонда холмогорской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота на основе полногеномного SNP-анализа // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018 (6). С. 742-747.

34. Доспехов Б.А. монограф. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований): Москва: Агропромиздат, 1985. 352 с.

35. Драновская Е.А. Таксономия возбудителя бруцеллеза// Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации медицинской помощи больным: тез. докл. Москва, 1989. С. 53-55.

36. Дроздов Е.В. Полиморфизм генов, связанных с молочной продуктивностью крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург, 2013. 20 с.

37. Дроздов Е.В., Заякин В.В., Нам И.Я. Анализ сочетания мутаций при изменении А и В аллелей гена  $\beta$ -лактоглобулина у КРС // Вестник Брянского государственного университета. 2010. №4. С. 136-140.

38. Дрожевкина М.С. Бактериологическая диагностика бруцеллеза в свете новейших данных по микробиологии возбудителя // Тр. Ростов-на-Дону ГНИПЧИ. 1957. Т.12.С. 354-361.
39. Дрожевкина М.С. Свойства бруцеллезного бактериофага, выделенного из вакцинного штамма Бр.абортус 19// ЖМЭИ. 1951. № 11. С. 34-37.
40. Дрожевкина М.С., Толстокорова В.И. Выделение бруцеллезного бактериофага из абортированных плодов сельскохозяйственных животных // Тр. Ростов-на-Дону противочумн. ин-та. 1957. Т. 12. С. 424-427.
41. Дрожевкина М.С., Мишнаевский М.Х., Уралева В.С. Специфический бактериофаг в организме бруцеллезных больных // Тр.Ростов-на-Дону противочумн. ин-та. 1957. Т. 12. С. 412-417.
42. Жузенов Ш.А., Крючков В.Д., Тамаровский М.В. Ключевые направления развития и некоторые результаты исследований в мясном скотоводстве РК// в сб. «Новости науки Казахстана» 2012. №34 С. 97-100.
43. Забродин В.А. Бруцеллез диких животных Заполярья// Ветеринария. 1970. № 1. С. 56-57.
44. Зайцев В.Л. Разработка полимеразной цепной реакции для диагностики вирусов особо опасной инфекций у человека//Матер. науч.-практ. семинара. Астана, 2005. С.106-116.
45. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Эрнст Л.К., Брем Г. Введение в молекулярную генную диагностику сельскохозяйственных животных // ВИЖ, 2002. - 129 с.
46. Зиновьева Н.А. Молекулярно-генетические модели ДНК-диагностики селекционных признаков свиней //Матер. межд. конф. «Развитие ключевых направ. сельскохоз. науки в Казахстане: селекция, биотехнология, генетические ресурсы. Алматы, 2004. С. 54-59.
47. Золотухин С.Н., Васильев Д.А. Проблемы применения бактериофагов в ветеринарии // Вестник ветеринарии. Оренбург, 2002. Вып. 5. С. 93-99.

48. Иванов Н.П., Арысбекова А.Т., Намет А.М., Бакиева Ф.А., Саттарова Р.С. Исследования молока верблюдиц на бруцеллез // Ветеринария. 2018. №3. С. 24 – 27.

49. Иванов Н.П. Бруцеллез животных, методы и средства борьбы с ним: моногр. Алматы: Полиграфис, 2002.- 367 с.

50. Иванов Н.П. Специальные ветеринарные мероприятия при бруцеллезе сельскохозяйственных животных в Республике Казахстан // Ветеринария. 2014. №1. С. 18 – 21.

51. Игнатьева Л.П., Сермягин А.А. Мониторинг генетических аномалий в современной популяции скота симментальской породы России //Генетика и разведение животных. 2019. № 4. С. 33-42.

52. Ищанова Р.Ж. Изучение действия бактериофагов различного происхождения на культуры бруцелл // Тр. ин-та краевой патологии МЗ КазССР. 1970. Т. 20. С. 47-55.

53. Кассал Б.Ю., Новицкий А.А. Бруцеллез крупного рогатого скота в Западной Сибири // Ветеринария. 2002. № 10. С. 6-11.

54. Керимов Ч., Искандаров М.И. Исследование диких животных на бруцеллез // В книге: Проблемы экологии в ветеринарной медицине тезисы докладов Всесоюзной научно-технической конференции. 1989. С. 169-170.

55. Керимов Ч., Искандаров М.И. О природной очаговости бруцеллеза в Туркмении // Известия Академии Наук Туркменской ССР. Ашхабад: Изд. «Ылым», 1991. № 6. С. 71-72.

56. Керимов Ч. Искандаров М.И. Профилактика и оздоровление верблюдов и крупного рогатого скота от бруцеллеза // Развитию животноводства научное обеспечение: Сб. науч. тр. Ашгабат, 1999. С. 36-37.

57. Косилов И.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных: моногр. под ред. И.А. Косилова / Косилов И.А. Аракелян П.К., Димов С.К. [и др.] // – Новосибирск, 1999. – 344 с.

58. Косилов И.А. Изменчивость бруцелл и ее значение в проблеме бруцеллеза сельскохозяйственных животных: автореф. ... д-ра вет. наук. Омск, 1975. - 40 с.

59. Косилов И.А., Ганишвили Т.Г., Блинкова Д.Л. Фагодиагностика бруцеллеза в связи с изменчивостью возбудителя // Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организаций медицинской помощи больным: тез. докл. Москва, 1989. С. 126.

60. Кольникова Т.И., Бакулов И.А., Котляров В.И. Перспективы практического применения листериозных бактериофагов // Вопросы ветеринарной бактериологии, микробиологии и эпизоотологии. Покров, 1992. С. 211-212.

61. Косилов И.А. Бруцеллез сельскохозяйственных животных: моногр. Новосибирск, 1992. 260 с.

62. Косилов И.А. Оптимизация противоэпизоотических мероприятий при бруцеллезе мелкого рогатого скота. /И.А.Косилов, П.К.Аракелян // Ветеринария.-2001. № 6. С. 12-15.

63. Ковалюк Н. В. Молекулярно-генетические аспекты в селекции и ранней диагностике лейкоза крупного рогатого скота: дис. ... д-ра биол. наук. Краснодар, 2008.- 174 с.

64. Коломакин Г.А., Исламов Р.З., Стеблюк Т.Д., Гононов Ю.М. Диагностика бруцеллеза свиней при различной давности заражения // Ветеринария. 1972. №7. С.30.

65. Колобов А.В., Губерниев Н.И., Рыбаков Н.И., Гимиров О.Б. Влияние интерферона на индукцию умеренного бактериофага, вызванную УФ-лучами // Антибиотики. 1966.Т. 6 № 1 С. 67-72.

66. Кинеев М.А. Породы и генетический потенциал КРС Казахстана: моногр. Алматы: Бастау, 2014. С. 70-79.

67. Лайшев К.А., Забродин В.А., Димов С.К. и др. Специфическая профилактика бруцеллеза у северных оленей // Ветеринария. 2004. № 4. С. 17-20.

68. Лебедева С.А. Устойчивые к диагностическому бактериофагу варианты *Yersinia pestis* и проблемы связанные с ними // ЖМЭИ. 2000. № 3. С. 99-104.

69. Ломов Ю.М. Некоторые биологические свойства бруцеллезных фагов// ЖМЭИ. 1969. № 1. С. 117-121.

70. Лукичев Д.Л., Лукичев В.Л., Ершова А.В. Распределение и роль полезных генов в породах крупного рогатого скота //Иновации в сельском хозяйстве. 2015. № 2 (12). С. 261-264.

71. Ляпустина Л.В., Лямкин Г.И., Таран И.Ф. История открытия и изучения бруцеллезных бактериофагов// ЖМЭИ. 1999. № 6. С. 123-124.

72. Мачульская Е.В., Волченко А.Е., Якушева Л.И., Сацук В.Ф., Дениз Ф., Ковалюк Н.В. Экспериментальное обоснование размера выборки животных для генотипирования по локусу *BOLA DRB3* // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. 2013. Т. 3. № 6. С. 168-171.

73. Маккреди Б.Д., Чимера Д.А. Обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов молекулярными методами // Молекулярная клиническая диагностика. Методы. Москва: Мир, 1999. С.496-506.

74. Махашвили А.С. Материалы о патоморфологических, гистохимических, гематологических, серологических и бактериологических исследованиях при бруцеллезе собак: автореф. дис. ... канд. вет. наук/ Тбилиси, 1975. 27 с.

75. Мамателашвили В.Г. Бруцеллез буйволов: моногр. Тбилиси, Ганатлеба, 1974.-246 с.

76. Межгосударственный стандарт. Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Бактериологические методы. [Текст]: ГОСТ 33675-2015. Введ. 2017-01-01. – М.: Изд-во Стандартиформ, 2016 г. 18 с.

77. Межгосударственный стандарт. Животные. Лабораторная диагностика бруцеллеза. Серологические методы. [Текст]: ГОСТ 34105-2017. Введ. 2018-07-01. – М.: Изд-во Стандартиформ, 2017 г. 23 с.

78. Мустафин Б.М. Анализ эпизоотической ситуации по бруцеллезу, туберкулезу и инвазионным заболеваниям животных в Костанайской области // Ветеринария. 2014. №1. С. 27 – 31.

79. Новосельцев Н.Н. Изменчивость бруцелл в организме иммунных животных // Тр. Ростов-на-Дону ГНИПЧИ. 1959. Т.14. С. 147-153.

80. Нурлыгаянова Г.А. Особенности проявления эпизоотического процесса при бруцеллезе в условиях Карачаево-Черкесской республики: автореф. дис. ... канд. с-х наук / Москва, 2010. - 262 с.

81. Оглодин Е.Г., Никифоров К.А., Ерошенко Г.А. Филогенетическая принадлежность штаммов *Yersinia pestis* из очагов России и сопредельных стран // В книге: Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием 2015. С. 250.

82. Омбаев А.М. Современные тенденции развития аграрной науки Казахстана в области животноводства // Известия национальной академии Республики Казахстан/ Ветеринария и животноводство// г. Алматы, 2013. №6. С. 3-9.

83. Орлова В.А. Выделение фагов из инагглютиногенных штаммов бруцелл // Актуальные вопросы профилактики бруцеллеза и организации медицинской помощи больным: тез. докл. - Москва, 1989. С. 65-66.

84. Осидзе Д.Ф., Простяков А.П. Факторы резистентности организма животных // Ветеринария. 1983. № 3. С. 32-34.

85. Островская Н.Н., Кайтмазова Е.И. Проба с бактериофагом Тб как дополнительный тест для дифференциации видов бруцелл//ЖМЭИ. 1966. № 3. С. 75.

86. Островская Н.Н. Бруцеллезные бактериофаги и их значение в изменчивости бруцелл: автореф. ... д-ра. мед. наук. - Москва, 1969. 32 с.

87. Островская Н.Н., Толмачева Т.А. Динамика адсорбции антибруцеллезного фага ТБ на клетках // ЖМЭИ. 1968. № 9. С. 79.

88. Островская Н.Н., Манькин А.А., Толмачева Т.А. Электронномикроскопическое изучение срезов клеток *Bt. abortus* и *suis* в

разные периоды взаимодействия их с корпускулами фага ТБ// ЖМЭИ. 1970. № 2. С. 76.

89. Островская Н.Н., Соловьева Н.Н. Электронная микроскопия фаголизиса бруцелл // ЖМЭИ. 1960. № 11. С. 4-10.

90. Островская Н.Н. К характеристике бруцеллезного фага ТБ // ЖМЭИ. 1961. № 6. С. 70-78.

91. Панин А.Н., Шумилов К.В., Груздев К.Н., Обухов И.Л., Скляр О.Д., Покровский В.В., Шипулин Г.А., Шипулина О.Ю. Методические указания по диагностике бруцеллеза методом полимеразной цепной реакции //Методические указания по диагностике заболеваний сельскохозяйственных животных методом полимеразной цепной реакции. Владимир, 1998. С. 291-304.

92. Предпатент 14203. РК. Способ лизогенизации бактерий / А.Л.Воробьев, В.Б.Тен, М.Ш.Искаков; опубл. 14.02.02.

93. Поликарпов В.А. О бруцеллезе северных оленей // Бюлл. НТИ Якут. НИИ сельского хозяйства. Якутск, 1958. № 3. С. 34-37.

94. Попова Т.Г., Новицкий А.А., Колычев Н.М. Эпизоотологические и экологические аспекты специфической профилактики бруцеллеза // Ветеринария. 2012. № 3. С. 24-26.

95. Пономарев Д.Ю., Никитаев А.В. Болезнь скотоводов. заболевание бруцеллез у жителей Среднего Боспора // Таврические студии. Серия: Исторические науки. 2015. № 7. С. 91-96.

96. Попхадзе М.З., Абашидзе Т.Г., Каричашвили Л.Н. Выделение фагов из культур *Bt. ovis* и изучение их свойств // Теоретические и практические вопросы бактериофагии. Тбилиси, 1974. С. 101.

97. Попхадзе М.З., Анатадзе И.А. Сравнительное изучение свойств фагов, выделенных из различных видов бруцелл // Бактериофагия. Теоретические и практические вопросы. М.: Медицина, 1983. 189 с.

98. Ременцова М.М., Грушина Т.А., Цирельсон Л.Е. Роль диких животных в переносе возбудителей инфекционных заболеваний и пути

снижения потенциальной угрозы природных очагов // Актуальные вопросы производства и применения ветеринарных биологических препаратов: мат. 1-ой Междунар. научно-практ. конф. Алматы, 2004. С. 50-60.

99. Рымаренко Н.В., Дедюра Е.Н., Мазинова Э.Р., Ивановский С.В., Джемилева Х.Ш. Бруцеллез - редкое, но все еще существующее заболевание (клинический случай) // Современная педиатрия. 2014. № 2 (58). С. 116.

100. Смазнова И. А. Характеристика аллельного полиморфизма и гена *BoLA-DRB3*, влияющего на устойчивость к лейкозу, и генов молочной продуктивности у быков-производителей: автореф. ... канд. биолог. наук, Санкт-Петербург – Пушкин – 2014, - 21 с.

101. Сачков В.И., Мосина Е.М. Противостафилококковые антитела, усиливающие действие стафилококкового фага // ЖМЭИ. 1974. № 12. С. 32-34.

102. Сацук В.Ф. Использование маркера *BoLA - DRB3* в селекционно-племенной работе с крупным рогатым скотом: дисс. ... канд. биолог. наук. Кубанский университет, Ставрополь. 2009 - 118 с.

103. Селионова М.И. Молочная продуктивность и уровень естественной резистентности у коров разных генотипов гена каппа-казеина // Вестник АПК Ставрополя. 2011. №1(1). С. 21-24.

104. Семененя И. Н. Биологическое оружие: прошлое, настоящее, будущее // Современные вопросы радиационной и экологической медицины, лучевой диагностики и терапии : сборник материалов Республиканской научно-практической конференции с международным участием, Гродно, 24–25 сентября 2020 года / Гродно: Гродненский государственный медицинский университет, 2020. – С. 261-313.

105. Семендеева Л.А. Генетические маркеры в селекции крупного рогатого скота на устойчивость к заболеванию бруцеллезом: автореф. ... кандидата с-х наук. Лесные Поляны, Московская обл., 1994 – 15 с.

106. Сулимова Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров их свойства и области применения // Успехи соврем. генетики 2004. Т.124. №3. С. 260- 271.

107. Сулимова Г.Е. Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов ДНК сельскохозяйственных животных: методология, результаты и перспективы // Успехи соврем. генетики. 1993. Т.18. С. 3-35.

108. Сулимова Г.Е., Зинченко В.В. Анализ полиморфизма ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции // Методическое пособие к практикуму «ДНК-маркеры для генетической паспортизации и улучшения геномов животных хозяйственно ценных видов». 2011. С. 34-38.

109. Султанов А.А. Ветеринарные вопросы развития мясного скотоводства Казахстана // Аграрный сектор 2012. № 1 (11). С. 16-18.

110. Султанов А.А., Воробьев А.Л. и др. Рекомендации по ликвидации и профилактике инфекционного эпидидимита баранов. Алматы, 2002. - 14 с.

111. Супрович Т.М., Колинчук Р.В. Аллельный полиморфизм гена VOLA-DRB3.2 при некробактериозе коров украинской черно-пестрой молочной породы // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. 2018. № 21-1. С. 79-85.

112. Таран И.Ф., Запина В.М., Лямкин Г.И. Сравнительное изучение спектра действия бактериофагов Тб, Wb, Fi, Bk<sub>2</sub>, и R на различные виды рода Brucella // ЖМЭИ. 1983. № 2. С. 48-51.

113. Таран И.Ф., Козлов М.П., Погорелов Н.Ф. Взаимодействие бактериофага ТБ с культурами бруцелл трех видов // ЖМЭИ. 1972. № 7. С. 16-21.

114. Таран И.Ф., Погорелов Н.А., Сафронова В.М. Влияние бруцеллезного бактериофага ТБ на характер инфекционного процесса при бруцеллезе в опытах на морских свинках // Особо опасные инфекции на Кавказе: тез. докл. 3-ей научно-практ. конф. противочумн. учреждений Кавказа. Ставрополь, 1974. Вып. 2. С. 116-119.

115. Тен В.Б. Методологические основы приготовления и совершенствования профилактических противобруцеллезных препаратов и диагностических средств: дис. ...д-ра вет. наук. - Алма-Ата, 1996. - 398 с.

116. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий: моногр. Москва: Наука, 1968. - 170 с.

117. Удина И.Г., Карамышева Е.Е., Сулимова Г.Е. Сравнительный анализ айрширской и черно-пестрой породы по маркерам гистосовместимости // Генетика. 1998. Т. 34. №12. С. 1-7.

118. Уразаева С.Т., Нурмухамедова Ш.М., Умарова А.Е. Бруцеллез в Казахстане // Міжнародний науковий журнал. 2016. № 1-1. С. 27-28.

119. Усманов Р.Р., Прошина Е.Т. Особенности статистической обработки полевого опыта: Учебно-методическое пособие – М.: ФГБОУ ДОД ФДЭБЦ, 2013. 96 с.

120. Эрнст Л.К., Жигачев А.И. Мониторинг генетических заболеваний животных в системе крупномасштабной селекции. Монография. Москва. Изд-во РАСХН, 2006. - 383 с.

121. Якушева Л.И., Сацук В.Ф., Ковалюк Н.В., Мачульская Е.В., Горбунова Т.П. Совершенствование генетической структуры стада крупного рогатого скота айрширской породы с использованием маркера BOLA-DRB3 // Проблемы биологии продуктивных животных. 2012. № 3. С. 69-74.

122. Aida Y., Kohda C., Morooka A., Nakai Y., Ogimoto K., Urao T., Asahina M. Cloning of cDNAs and the molecular evolution of a bovine MHC class II DRA gene // Biochemical and Biophysical Research Communications. 1994. V. 204. P. 195–202.

123. Behl J.D., Verma N.K., Tyagi N., Mishra P., Behl R., Joshi B.K. The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review // ISRN Veterinary Science. 2012. 12 p.

124. Brinley - Morgan W., Kay D., Bradley D. Brucella bacteriophage// Nature. – 1960. - № 188. - P. 74.

125. Calderaie J., Pickett M. Characterization of Brucellophage // J. Gen. Microbiol. – 1965. - № 39. - P. 1-6.
126. Corbel M., Morgan W. The relationship of *Brucella abortus* agglutinogenic antigens to the receptor sites for Tbilisi phage// Res. Vet. Sci. – 1972. - V. 13. - P. 91-92.
127. Corbel M. Isolation and properties of a phage lytic for nonsmooth *Brucella* organisms // J. Biol. Stand. – 1979. - № 4. - P. 343-360.
128. Corbel MJ. Brucellosis: an overview. Emerging Infectious Disease. 1997; 3:213–221.
129. Corbel M., Morgan W. Proposal for minimal standards for descriptions of new species and biotypes of the genus *Brucella* // Inter. J. System Bact. – 1975. - № 25. - P. 83-89.
130. Daugaliyeva, A. Development of a Differential PCR Assay for Detection of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* [Text]: Daugaliyeva, A., Peletto, S., Sultanov, A. Baramova, Sh., Luigi Acutis, P., Adambaeva, A., Tusipkanuly, O., Ussebayev, B.// Journal of Food Quality and Hazards Control. - 2016. V.3. -P. 53-59.
131. Juliarena M.A., Poli M., Sala L., Ceriani C., Gutierrez S., Dolcini G., Rodríguez E.M., Mariño B., Rodríguez-Dubra C., Esteban E.N. Association of BLV infection profiles with alleles of the BoLA-DRB3.2 gene // Animal Genetics. 2008. V. 39. № 4. P. 432–438.
132. Jones L., Mc Duff C., Wilson J. Phenotypic alterations in the colonial morphology of *Brucella abortus* due to a bacteriophage carrier state // J. Bact. – 1962. - T. 83, V. 4. - P. 860.
133. Kalmanson G. M., Hershey A.D., Bronfenbrenner J. 1942. Factor influencing the rate of neutralization of bacteriophage by the antibody, J. Immunol., 45.1.
134. Latypova Z., Sarbakanova Sh., Sultanov A., Nam I., Zayakin V., Achmedov R., Smaznova I., Egiazaryan A., Sheiko I., Budevich A. DNA-polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in crossbreeding of Holstein and Black

Pied cattle from the Bryansk region of Russia, Belarus and Kazakhstan // CURRENT SCIENCE. 2017. №5. P. 2173–2186.

135. Latypova Z., Sarbakanova S., Mamanova S., Sultanov A., Nam I., Smaznova I., Zayakin V. and Kozlov A. Comparison between Populations of Black Pied and Holstein Cows and Stud Bulls from Russia, Belarus and Kazakhstan by the Genetic Markers for Resistance to Leukemia // Int. J. Curr. Res. BioSci. Plant Biol. – 2017. – 4(8) – P. 1-7.

136. Lin C.Y., Sabour M.P., Lee A.J. Direct typing of milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: A review // Anim. Breed. Abst. 1992. V. 60. P. 1-10.

137. Lewin H. A. Schook L.B., Lamont S.J. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. The Major Histocompatibility Complex Region of Domestic Animal Species // CRC Press, Florida. P. 65–98. 1996.

138. Lewin H.A., Russel G.C., Glass E.J. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle // Immunol. Rev. 1999. V. 167. P. 145-158.

139. Morris J., Corbel M. Properties of a new phage lytic for *Brucella suis* // J. Gen. Virol. – 1973. - V. 21. - P. 539-544.

140. Morris J., Corbel M., Phillip J. Characterization of three phages lytic for *Brucella* species // J. Gen Virol. – 1973. - V. 20. - P. 63-74.

141. Morgan W., Corbel M., Recommendation for the description of species and biotype of the genus *Brucella* // Develop. Biol. Stand. – 1976. - V. 31. - P. 27-37.

142. Nam I.Ya., Zayakin V.V., Smaznova I.A., Egiazaryan A.V., Sulimova G.E., Sheiko I.P., Budevich A.I. High Genetic Susceptibility to Leukemia in Breeding Black Pied and Holstein Cattle // Middle-East Journal of Scientific Research. 2014. V.20 (10). P. 1297-1301. DOI: 10.5829/idosi.mejsr.2014.20.20.21068.

143. Nelson E., Piccet M. The recovery of L- form of brucella and their relation to brucella phage // I. Ent. Dis. – 1951. - № 3. - P. 226-232.
144. Nassiry M.R., Eftekhar Shahroodi F., Mosafer J., Mohammadi A., Manshad E., Ghazanfari S., Mohammad Abadi M.R., Sulimova G.E. analysis and frequency of bovine lymphocyte antigen (BOLA-DRB3) alleles in iranian holstein cattle // Генетика. 2005. Т. 41. № 6. С. 817-822.
145. Parnas J., Sarnecka-Srunke B. Weitere charakteristik der Brucellophagen // Arch. exper. Vet. – 1965. - V. 19. - P. 498.
146. Parnas J., Bradley D. Characteristic of Brucella phages negative colonies and morphology // Bull. Acad. polon sci. Ser. biol. – 1964. - № 12. - P. 3-15.
147. Report Joint FAO/WHO Expert Comimtle on Brucellosis, Fifth Report. –WHO. - Techn. Rept. Ser., 1970.
148. Rigby C., Cerqueira-Canipos M. et al. Propertis and partial genetic characterization of Nepcan phage of Brucella species // Canad. J. Veter. Res. – 1989. - № 3. - P. 319-325.
149. Rossetti1 C.A., Galindo C.L., Everts R.E., Lewin H.A., Garner H.R. and Adams1 L.G. Brucellosis is a worldwide zoonotic infectious disease that has a significant economic impact on animal production and human public health. // Comparative analysis of the early transcriptome of Brucella abortus - infected monocyte-derived macrophages from cattle naturally resistant or susceptible to brucellosis Res Vet Sci. 2011 August; 91(1): 40–51. doi:10.1016/j.rvsc.2010.09.002.
150. Sulimova G.E., Udina I.G., Shaïkhaev G.O., Zakharov I.A. DNA polymorphism of the BoLA-DRB3 gene in cattle in connection with resistance and susceptibility to leukemia // Genetika. 1995. V. 31(9). P. 1294-9.
151. Suprovych T., Suprovych N., Karchevska T., Chornyuy I., Chepurna V. allelic polymorphism gene BOLA-DRB3.2 in connection with the types of excretory ducts udder and mastitis cows ukrainian black-pied dairy breed // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної

медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. 2016. Т. 18. № 3-2 (71). С.117-123.

152. Sulimova G.E., Badagueva I.N., Udina I.G. Polymorphism of the  $\kappa$ -casein gene in subfamilies of the Bovidae // *Genetika*. 1996.

153. Sulimova G.E., Sokolova S.S., Semikozova O.P., Nguet L.M., Berberov E.M. Analysis of DNA polymorphism of cluster genes in cattle: casein genes and major histocompatibility complex (MHC) genes // *Genet*. 1992. V. 26(5). P. 18-26.

154. Van Eijk M.J., Stewart-Haynes J.A., Lewin H.A. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP // *Anim Genet*. 1992. V. 23(6). P. 483-96.

155. Xu A., Van Eijk M.J., Park C., Lewin H.A. Polymorphism in BoLA-DRB3 exon 2 correlates with resistance to persistent lymphocytosis caused by bovine leukemia virus // *J. Immunol*. 1993. V. 151(12). P. 6977-85.

156. Zanotti M., Poli G., Ponti W., Polli M., Rocchi M., Bolzani E., Longeri M., Russo S., Lewin H.A., van Eijk M.J. Association of BoLA class II haplotypes with subclinical progression of bovine leukaemia virus infection in Holstein-Friesian cattle // *Anim. Genet*. 1996. V. 27(5). P. 337-41.

157. Zhang Fu-qian, Zheng Xiao-min, Tang Da-Wei, Zhao Peng, Shi Yuan-gang Research on Polymorphism of BoLA-DRB3 Gene in Holstein and the Relationship between Different Genotypes and Resistance to Dairy Mastitis // *Acta veter. zootechn. sinica*. 2007. Vol.38, N 2.-P. 115-119.

# Приложения

Выявление больных бруцеллезом коров аулиекольской породы  
из разных регионов Казахстана

№ п/п	№ проб	Порода КРС	Результаты серологических исследований			Результаты бактериологических
			РБП	РА	РСК	
1	1 Кар	Аул	+	+	+	+
2	2 Кар	Аул	+	+	+	+
3	3 Кар	Аул	+	+	+	+
4	5 Кар	Аул	+	+	+	+
5	6 Кар	Аул	+	+	+	+
6	7 Кар	Аул	+	+	+	+
7	8 Кар	Аул	+	+	+	+
8	9 Кар	Аул	+	+	+	+
9	10 Кар	Аул	+	+	+	+
10	11 Кар	Аул	+	+	+	+
11	12 Кар	Аул	+	+	+	+
12	13 Кар	Аул	+	+	+	+
13	14 Кар	Аул	+	+	+	+
14	15 Кар	Аул	+	+	+	+
15	16 Кар	Аул	+	+	+	+
16	17 Кар	Аул	+	+	+	+
17	18 Кар	Аул	+	+	+	+
18	19 Кар	Аул	+	+	+	+
19	20 Кар	Аул	+	+	+	+
20	17 Алм (19)	Аул	+	+	+	+
21	16 Алм (82)	Аул	+	+	+	+

22	1 Алм (82)	Аул	+	+	+	+
23	2 Коста	Аул	+	+	+	+
24	3 Коста	Аул	+	+	+	+
25	5 Коста	Аул	+	+	+	+
26	10 Коста	Аул	+	+	+	+
27	11 Коста	Аул	+	+	+	+
28	12 Коста	Аул	+	+	+	+
29	13Коста	Аул	+	+	+	+
30	14 Коста	Аул	+	+	+	+
31	19 Коста	Аул	+	+	+	+
32	20 Коста	Аул	+	+	+	+
33	1 Алм	Аул	+	+	+	+
34	10 Алм	Аул	+	+	+	+
35	19 Алм	Аул	+	+	+	+
36	40 Алм	Аул	+	+	+	+
37	75 Алм	Аул	+	+	+	+
38	95 Алм	Аул	+	+	+	+
39	98 Алм	Аул	+	+	+	+
40	99 Алм	Аул	+	+	+	+
41	112 Алм	Аул	+	+	+	+
42	128 Алм	Аул	+	+	+	+
43	165 Алм	Аул	+	+	+	+
44	186 Алм	Аул	+	+	+	+
45	189 Алм	Аул	+	+	+	+
46	219 Алм	Аул	+	+	+	+
47	237 Алм	Аул	+	+	+	+
48	1ВКО	Аул	+	+	+	+
49	2 ВКО	Аул	+	+	+	+
50	3 ВКО	Аул	+	+	+	+

51	4 ВКО	Аул	+	+	+	+
52	5 ВКО	Аул	+	+	+	+
53	6 Кар	Аул	+	+	+	+
54	7 Кар	Аул	+	+	+	+
55	8 Кар	Аул	+	+	+	+
56	9 Кар	Аул	+	+	+	+
57	10 Кар	Аул	+	+	+	+
58	11 Кар	Аул	+	+	+	+
59	12 Кар	Аул	+	+	+	+
60	13 Кар	Аул	+	+	+	+
61	14 Кар	Аул	+	+	+	+
62	15 Кар	Аул	+	+	+	+
63	16 Кар	Аул	+	+	+	+
64	17 Кар	Аул	+	+	+	+
65	18 Кар	Аул	+	+	+	+
66	19 Кар	Аул	+	+	+	+
67	20 Кар	Аул	+	+	+	+
68	21 ЗКО	Аул	+	+	+	+
69	22 ЗКО	Аул	+	+	+	+
70	23 ЗКО	Аул	+	+	+	+
71	24 ЗКО	Аул	+	+	+	+
72	25 ЗКО	Аул	+	+	+	+
73	26 ЗКО	Аул	+	+	+	+
74	27 ЗКО	Аул	+	+	+	+
75	28 ЗКО	Аул	+	+	+	+
76	29 ЗКО	Аул	+	+	+	+
77	30 ЗКО	Аул	+	+	+	+
78	31 ЗКО	Аул	+	+	+	+
79	32 ЗКО	Аул	+	+	+	+

80	33 ЗКО	Аул	+	+	+	+
81	34 ЗКО	Аул	+	+	+	+
82	35 ЗКО	Аул	+	+	+	+
83	36 ЗКО	Аул	+	+	+	+
84	37 ЗКО	Аул	+	+	+	+
85	38 ЗКО	Аул	+	+	+	+
86	39 ЗКО	Аул	+	+	+	+
87	40 ЗКО	Аул	+	+	+	+
88	41 ЗКО	Аул	+	+	+	+

Выявление больных бруцеллезом коров казахской белоголовой породы  
из разных регионов Казахстана

№ п/п	№ проб	Порода КРС	Результаты серологических исследований			Результаты бактериологических
			РБП	РА	РСК	
1	6 ВКО	КБ	+	+	+	+
2	7 ВКО	КБ	+	+	+	+
3	8 ВКО	КБ	+	+	+	+
4	10 ВКО	КБ	+	+	+	+
5	11 ВКО	КБ	+	+	+	+
6	13 ВКО	КБ	+	+	+	+
7	14 ВКО	КБ	+	+	+	+
8	15 ВКО	КБ	+	+	+	+
9	16 ВКО	КБ	+	+	+	+
10	17 ВКО	КБ	+	+	+	+
11	20 ВКО	КБ	+	+	+	+
12	21 ВКО	КБ	+	+	+	+
13	22 ВКО	КБ	+	+	+	+
14	25 ВКО	КБ	+	+	+	+
15	26 ВКО	КБ	+	+	+	+
16	27 ВКО	КБ	+	+	+	+
17	28 ВКО	КБ	+	+	+	+
18	29 ВКО	КБ	+	+	+	+
19	30 ВКО	КБ	+	+	+	+
20	33 ВКО	КБ	+	+	+	+
21	35 ВКО	КБ	+	+	+	+
22	37 ВКО	КБ	+	+	+	+
23	40 ВКО	КБ	+	+	+	+

24	43 ВКО	КБ	+	+	+	+
25	45 ВКО	КБ	+	+	+	+
26	48 ВКО	КБ	+	+	+	+
27	98 ВКО	КБ	+	+	+	+
28	99 ВКО	КБ	+	+	+	+
29	100 ВКО	КБ	+	+	+	+
30	9 СХ	КБ	+	+	+	+
31	10 СХ	КБ	+	+	+	+
32	26СХ	КБ	+	+	+	+
33	27 СХ	КБ	+	+	+	+
34	28 СХ	КБ	+	+	+	+
35	29 СХ	КБ	+	+	+	+
36	30 КМ	КБ	+	+	+	+
37	31 КХ	КБ	+	+	+	+
38	32 СМ	КБ	+	+	+	+
39	33 СМ	КБ	+	+	+	+
40	5 Оп	КБ	+	+	+	+
41	7 Оп	КБ	+	+	+	+
42	1/9	КБ	+	+	+	+
43	2/9	КБ	+	+	+	+
44	3/9	КБ	+	+	+	+
45	3/9	КБ	+	+	+	+
46	4/9	КБ	+	+	+	+
47	5/9	КБ	+	+	+	+
48	6/9	КБ	+	+	+	+
49	7/9	КБ	+	+	+	+
50	8/9	КБ	+	+	+	+
51	9/9	КБ	+	+	+	+

Настоящим удостоверяется, что **ТАНИРБЕРГЕНОВА АКМАРАЛ АУЕЛХАНОВНА**

и **Воробьев Александр Львович; Тен Виктор Борисович; Алпысбаева Сабира Егизбаевна**

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 15970

(54) **ШТАММ БАКТЕРИЙ BRUCELLA ABORTUS 0071В, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ БРУЦЕЛЛЕЗНЫХ АНТИГЕНОВ**

(73) Патентообладатель

Дочернее государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский ветеринарный институт" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Научно-производственный центр животноводства и ветеринарии" Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан

(21) 2004/0200.1

(22) 20.02.2004

Председатель Комитета по правам  
интеллектуальной собственности  
Министерства юстиции Республики Казахстан



Н. Н. Сахипова



Настоящим удостоверяется, что ТАНИРБЕРГЕНОВА АКМАРАЛ АУЕЛХАНОВНА

и Воробьев Александр Львович; Тен Виктор Борисович; Мустафин Батыржан Муафинович

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 18053

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИГЕНА ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ  
БРУЦЕЛЛЕЗА

(73) Патентообладатель Дочернее государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский ветеринарный институт" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Научно-производственный центр животноводства и ветеринарии" Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан

(21) 2005/1303.1

(22) 18.11.2005

Председатель Комитета по правам  
интеллектуальной собственности  
Министерства юстиции Республики Казахстан



  
М.О. Айкенов

Настоящим удостоверяется, что ТАНИРБЕРГЕНОВА АКМАРАЛ АУЕЛХАНОВНА

и Тен Виктор Борисович; Воробьев Александр Львович; Алпысбаева Сабир Егизбаевна

является(ются) автором(ами) изобретения

(11) 19392

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВОФАГОВОЙ ИММУННОЙ СЫВОРОТКИ

(73) Патентообладатель - Дочернее государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Научно-исследовательский ветеринарный институт" Республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения "Научно-производственный центр животноводства и ветеринарии" Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан

(21) 2006/0737.1

(22) 28.06.2006

Председатель Комитета по правам  
интеллектуальной собственности  
Министерства юстиции Республики Казахстан



М.О. Айкенов

**УТВЕРЖДАЮ**

Директор Костанайского  
филиала РККП «РВЛ»,  
доктор ветеринарных наук

*Мустафин* М.К. Мустафин  
«*10*» *сентября* 2005 г.

**А К Т**

производственных испытаний бруцеллезного антигена, содержащего  
специфический фаг

Костанай, 2005

## А К Т

10 сентября 2005 года

г. Костанай

Мы, ниже подписавшиеся: главные специалисты отдела диагностики РГКП «РВЛ» Байсеев Г.А., Богословская И.В., и авторы предлагаемого изобретения «Способ приготовления антигена для серологической диагностики» В.Б. Тен, А.А. Танирбергенова, Мустафин Б. М провели в сравнительном аспекте серологическое исследование на инфекционный эпидидимит № 172 баранов-производителей, принадлежащих ТОО «Сулукольский» Аулиекольского района Костанайской области, где отмечались единичные случаи положительно реагирующих на инфекционный эпидидимит среди баранов-производителей.

Серологическое исследование сывороток крови проводили в РДСК с биофабричным овисным антигеном серия № 01.05, госконтроль № 01-05, изготовлен ТОО «ДАУА» 01.2005г и в РДСК с бруцеллезным антигеном, содержащим специфический фаг.

В результате серологического исследования антигеном серия №5, содержащим фаг выделили 5 положительно реагирующих животных (инвентарные № 5010, 5017, 5091, 5021, 5115).

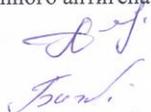
В РДСК с биофабричным антигеном число позитивных реакции равно 2 (инвентарные № 5010, 5115), и все они совпадали с показаниями полученными на опытный антиген, однако последний выявил на 60% больше реагирующих животных.

Для подтверждения чувствительности бруцеллезного антигена, содержащего специфический фаг провели убой 2 животных, реагирующих положительно на опытный антиген и отрицательно на биофабричный, с последующим бактериологическим исследованием. В результате из патологического материала от этих 2 баранов изолировали эпизоотические культуры бруцелл вида *V.ovis*.

## Заключение.

1. Установлено, что бруцеллезный антиген, содержащий специфический фаг способен выявлять животных, отрицательно реагирующих с биофабричным овисным антигеном.
2. При бактериологическом исследовании патматериала от животных, дающих положительное показание с антигеном, содержащим специфический фаг выделили эпизоотические культуры *V.ovis*, что свидетельствует о высокой чувствительности данного антигена.

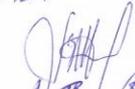
Подписи



Байсеев Г.А.



Богословская И.В.



Тен В.Б.



Танирбергенова А.А.



Мустафин Б.М.

## А К Т

г.Костанай

15 сентября 2005 г

Мы, нижеподписавшиеся: главные специалисты отдела диагностики РГКП «РВЛ» Баисеев Г.А, Богословская И.В, и авторы предлагаемого изобретения «Способ приготовления антигена для серологической диагностики» В.Б. Тен, А.А. Танирбергенова, Мустафин Б.М провели серологическое исследование сывороток крови \_415\_\_ овец, принадлежащие ТОО «Сулукольский» Аулиекольского района Костанайской области (благополучному по бруцеллезу и другим инфекционным заболеваниям) бруцеллезным антигеном, содержащим специфический фаг, с целью изучения специфичности указанного препарата.

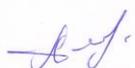
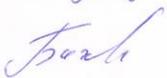
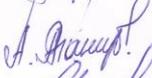
Исследовали 415 сыворотки крови (экспертизы № 14 от 14 09 2005 г) в РДСК с опытным антигеном. Для контроля использовали биофабричный овисный антиген серия № 01,05, госконтроль № 01-05, изготовлен ТОО «ДАУА» 01 2005 г в этой же реакции.

В результате постановки серологической реакции, как с опытным, так и с биофабричным антигенами, во всех случаях получили отрицательные показания.

## Заключение.

Антиген, содержащий специфический фаг является специфичным, о чем свидетельствуют отрицательные результаты исследования сывороток крови здоровых животных.

Подписи

 Баисеев Г.А.  
 Богословская И.В.  
 Тен В.Б.  
 Танирбергенова А.А.  
 Мустафин Б.М.

УТВЕРЖДАЮ

Директор Алматинского областного филиала РГП  
«Центральная ветеринарная лаборатория» КР МСХ  
Канаева Д.А.  
«10» сентября 2006г.

АКТ

испытания эффективности фагосодержащего антигена для  
серологических реакции при диагностике бруцеллеза животных

Мы, ниже подписавшиеся: заведующий отделом диагностики болезней сельскохозяйственных животных Алматинского областного филиала РГП «ЦВЛ» РК МСХ Адилбаева Г.Р., ведущий специалист этого отдела Есходжаев О.У. и заведующий отделом бруцеллеза ДГП «НИВИ», доктор ветеринарных наук, профессор Тен В.Б., а так же научный сотрудник этого же отдела Адамбаева А.А., составили настоящий акт в том, что в сравнительном аспекте нами проведены испытания эффективности фагосодержащего антигена.

Исследованию были подвергнуты сыворотки крови полученные от МРС принадлежащих частным секторам Илийского района и Капчагайского региона Алматинской области (Кербулакский вет уч. экспертиза № 826 510 от 8.06.2006г; п. Екпинди экспертиза № 1444 974 от 8.09.2006г; Междулы экспертиза № 1319 877 от 14.08.2006г; Акшй, Куртстрой экспертиза № 1224 882 от 14.08.2006г.) с различной эпизоотической ситуацией по бруцеллезу, которые исследовали в сравнительном аспекте, по общепринятой методике в реакции длительного связывания комплемента (РДСК) с биофабричным овисным антигеном (эпидидимитный набор серия № 01 Б-01, 03.06г. изготовлен ЖШС «ДАУА» Вита-СТ; комплемент ЗАО «Биолек» Украина С 93 К 863; ср.хр. 3 года; г. вып. 05.06) и одновременно с разработанным в ДГП «НИВИ» фагосодержащим антигеном.

Результаты исследований представлены в таблице.

Название ветеринарного участка	Количество голов	Результаты реакции					
		РДСК с разработанным фагосодержащим антигеном			РДСК с биофабричным овисным антигеном		
		Пол.	Отр.	Сом.	Пол.	Отр.	Сом.
Кербулакский	45	9	36		6	37	2
Екпинди	7	1	6		6	6	1
Междулы	47	2	45		1	46	
Акшй Куртстрой	8		8			8	

Из данных таблиц видно, что из 107 следуемых проб сыворотки крови в РДСК с опытным антигеном положительно реагировало 12

проб, а в РДСК с биофабричным овисным антигеном 7 проб сывороток и 3 пробы сомнительно, в том числе положительные результаты совпадали с обоими антигенами с 10 пробами сывороток.

Из числа животных отрицательно реагировавших в РДСК с биофабричным овисным антигеном, но положительно с опытным фагосодержащим антигеном провели убой 1 животного еще 1 животного сомнительно реагировавшего с биофабричным овисным антигеном, но положительно с опытным антигеном, и с последующим бактериологическим исследованием. В результате из патологического материала от этих 2 животных изолировали эпизоотические культуры бруцелл, что подтверждает положительные показания диагностического теста.

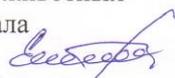
При сравнительном изучении показаний РДСК установлено, что бруцеллезный фагосодержащий антиген, способен выявлять животных, отрицательно реагирующих с биофабричным овисным антигеном, что так же повышает достоверность показаний и способствует правильной постановке диагноза на бруцеллез.

В результате проведенных бактериологических исследований патматериала от животных, дающих положительное показание с фагосодержащим антигеном выделили эпизоотические культуры *B. ovis*, что свидетельствует о высокой чувствительности данного антигена.

Заведующий отделом диагностики  
болезней сельскохозяйственных животных  
Алматинского областного филиала  
РГП «ЦВЛ» РК МСХ

 Адилбаева Г.Р.

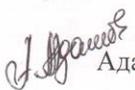
Ведущий специалист отдела диагностики  
болезней сельскохозяйственных животных  
Алматинского областного филиала  
РГП «ЦВЛ» РК МСХ

 Есходжаев О.У.

Заведующий отделом бруцеллеза,  
доктор ветеринарных наук, профессор

 Тен В.Б.

Научный сотрудник отдела бруцеллеза

 Адамбаева А.А.



Утверждаю  
 Директор Атырауского филиала  
 РГП «Юго-Западный научно-  
 производственный центр  
 сельского хозяйства»

кандидат биологических наук  
*Ж. Аралбаев* Аралбаев Ж.

« 22 » *ав* 200 *г.*

#### Акт

испытания эффективности фагосодержащего антигена  
 в пробирочной реакции агглютинации (РА)  
 при диагностике инфекционного эпидидимита баранов

Мы, нижеподписавшиеся, члены комиссии в составе заведующего отделом ветеринарии Атырауского филиала РГП «ЮЗНПЦСХ», кандидата ветеринарных наук Абулхайрова Г. Ш., старшего научного сотрудника Есимовой Ж., научного сотрудника Сулейманова С., заведующего отделом бруцеллеза ДГП «НИВИ», доктора ветеринарных наук, профессора Тен В. Б., научного сотрудника этого отдела Адамбаевой А. А. составили настоящий акт в том, что нами проведены испытания эффективности фагосодержащего антигена путем исследования сывороток крови баранов в пробирочной реакции агглютинации.

В условиях лаборатории Атырауского филиала РГП «ЮЗНПЦСХ» были исследованы сыворотки крови, полученные от баранов из различных по эпизоотическому состоянию хозяйств по инфекционному эпидидимиту, которые обследовались одновременно по общепринятому тесту – в реакции длительного связывания комплемента (РДСК) с овисным антигеном.

Результаты исследований представлены в таблице.

Вид животного	Количество голов	Результат реакций			
		РА с разработанным фагосодержащим овисным антигеном		РДСК с овисным антигеном	
		пол.	отр.	пол.	отр.
МРС	929	16	913	11	918

Из полученных данных таблицы видно, что из 929 исследованных проб сывороток крови баранов в пробирочной реакции агглютинации с испытуемым фагосодержащим антигеном положительно реагировали 16 проб, с биофабричным овисным антигеном в РДСК – 11.

Исследования сывороток крови МРС показало, что положительно показывающие с испытуемым фагосодержащим антигеном совпали с результатами РДСК в 11 случаях. При бактериологическом исследовании выделена бруцеллезная культура *Br. ovis*.

При сравнительном изучении показаний вышеперечисленных реакций установлено, что при исследовании на инфекционный эпидидимит с фагосодержащим антигеном, разработанным в ДГП «НИВИ», он оказался высокоспецифичным и активным препаратом, так как выявлял большее количество реагирующих животных, чем биофабричный овисный антиген в РДСК.

Зав. отделом ветеринарии  
АФ РГП «ЮЗНПЦСХ»,

кандидат ветеринарных наук:



Г. Ш. Абулхаиров

Старший научный сотрудник:



Ж. Н. Есимова

Научный сотрудник:



С. Г. Сулейманов

Зав. отделом бруцеллеза  
ДГП «НИВИ»,  
доктор ветеринарных наук,  
профессор:



В. Б. Тен

Научный сотрудник:



А. А. Адамбаева

Вид животного	Количество голов	Результат реакции	
		РА с фагосодержащим антигеном	РАСК с биофабричным антигеном
100	100	16	100

Из полученных данных таблицы видно, что при исследовании с фагосодержащим антигеном в пробе с-ной реакции выявлено 16 животных, а при исследовании с биофабричным антигеном в пробе с-ной реакции выявлено 100 животных. Это свидетельствует о том, что фагосодержащий антиген является более специфичным и активным препаратом, чем биофабричный овисный антиген в РДСК.

Утверждаю

Директор Атырауского филиала  
РГКП «Республиканская  
ветеринарная лаборатория»

Даулетьярова А.

«  »    200   г.



испытания эффективности фагосодержащего антигена  
в пробирочной реакции агглютинации (РА)  
при диагностике инфекционного эпидидимита баранов

Мы, нижеподписавшиеся члены комиссии в составе сотрудников Атырауского областного филиала РГКП «Республиканская ветеринарная лаборатория» Уанова К., Жумабаевой Г., Кайсағалиевой Р., заведующего отделом ветеринарии Атырауского филиала РГП «ЮЗНПЦСХ», кандидата ветеринарных наук Абулхайрова Г. Ш., старшего научного сотрудника Есимовой Ж., заведующего отделом бруцеллеза ДГП «НИВИ», доктора ветеринарных наук, профессора Тен В. Б., научного сотрудника этого отдела Адамбаевой А. А. составили настоящий акт в том, что в сравнительном аспекте нами проведены испытания эффективности фагосодержащего антигена.

Результаты исследований представлены в таблице.

Вид животного	Количество голов	Результат реакций			
		РА с разработанным фагосодержащим овисным антигеном		РДСК с овисным антигеном	
		пол.	отр.	пол.	отр.
МРС	1936	28	1908	22	1914

Из полученных данных таблицы видно, что из 1936 исследованных проб сывороток крови в РА МРС с испытуемым фагосодержащим антигеном положительно реагировали 28 проб, а в РДСК с биофабричным овисным антигеном 22 пробы сывороток, в том числе 22 пробы с положительными показаниями реагировали и с опытным антигеном в РА.

Из числа животных, отрицательно реагировавших в РДСК, но положительно с опытным фагосодержащим антигеном в РА провели убой 6 животных с последующим бактериологическим исследованием, при этом в 5 случаях (83,3%) выделена культура бруцелл вида *Br. ovis*, что подтверждает положительные показания диагностического теста.

При сравнительном изучении показаний вышеперечисленных реакций установлено, что бруцеллезный фагосодержащий антиген способен выявить животных, отрицательно реагирующих с биофабричным овисным антигеном.

Так же, пробирочная реакция агглютинации с фагосодержащим антигеном проста и не трудоемка по исполнению, не уступает по

результативности в сравнении с овисным антигеном, при этом были выделены эпизоотические культуры *Bt. ovis*, что свидетельствует о высокой чувствительности данного антигена.

Сотрудники Атырауского филиала РГКП «РВЛ»:



Уанов К.



Жумабаева Г.

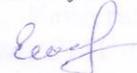
Кайсагалиева Р.

Зав. отделом ветеринарии  
АФ РГП «ЮЗНПЦСХ»,  
кандидат ветеринарных наук:



Г. Ш. Абулхайров

Старший научный сотрудник:



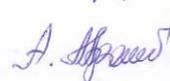
Ж. Н. Есимова

Зав. отделом бруцеллеза  
ДГП «НИВИ»,  
доктор ветеринарных наук,  
профессор:



В. Б. Тен

Научный сотрудник:



А. А. Адамбаева