

УДК 619:636.22/.28:616.7
© 2018

Т.М. СУПРОВИЧ,
доктор сільськогосподарських наук

Т.М. КАРЧЕВСЬКА,
кандидат ветеринарних наук

М.П. СУПРОВИЧ,
кандидат технічних наук

Р.В. КОЛІНЧУК,
асистент

Подільський державний аграрно-
технічний університет, Україна
вул. Т. Шевченка, 13,
м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ
МАРКЕРИ ЗАХВОРЮВАНOSTI
ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ
НА ФУЗОБАКТЕРІОЗ

*Наведено результати дослідження алелів гена **BoLA-DRB3.2**, які мають зв'язок із захворюванням корів на фузобактеріоз (некробактеріоз) і можуть слугувати як ДНК-маркери даного захворювання. Зразки крові взято в 173 здорових та 120 хворих корів. Алельний спектр гена **BoLA-DRB3.2** вивчали за допомогою ПЛР-ПДРФ. Алелі, які мають тісний зв'язок зі сприйнятливістю або стійкістю до фузобактеріозу, визначали за показниками частоти виявлення і ризику захворюваності (RR) з перевіркою за критерієм Пірсона (χ^2). Встановлено наявність чотирьох алелів (*16, *18, *23 та *51), які мають тісний зв'язок зі схильністю і три алеля (*01, *03 та *22), які асоціюються з резистентністю до даного захворювання.*

Ключові слова: некробактеріоз, головний комплекс гістосумісності, ген **BoLA-DRB3.2**, алелі.

Вступ. На тваринницьких фермах України фузобактеріоз (некробактеріоз) великої рогатої худоби реєструється щорічно. Економічні збитки від захворювання ґрунтуються на зниженні молочної продуктивності корів, на витратах для проведення лікувальних і профілактичних заходів та передчасного вибракування тварин [1, 2]. Причини захворювання мають багатofакторний характер: порушення технології утримання та норм годівлі тварин, безконтрольний імпорт худоби з інших країн та масова голштинізація вітчизняних порід [3, 4].

У зв'язку з цим стає очевидним необхідність опрацювання методичних підходів щодо оцінки генетичної схильності та резистентності тварини до даного захворювання.

На поверхні майже всіх клітин організму представлені молекули (білки), які мають назву антигенів головного комплексу гістосумісності (ГКГ) або МНС (*Major histocompatibility complex*). Молекули ГКГ виконують роль своєрідних "антен", що дозволяють організму розпізнавати власні та чужорідні клітини (бактерії, віруси, ракові клітини тощо) і за необхідності запустити

імунну відповідь, забезпечуючи утворення специфічних антитіл і видалення чужорідного агента з організму. Молекули ГКГ (клас I і клас II) кодуються генами МНС-системи (у великої рогатої худоби ВоLA-системою). Основною особливістю комплексу є значна полігенність (наявність декількох неалельних близько зчеплених генів, білкові продукти яких схожі в структурному відношенні і виконують ідентичні функції), а також яскраво виражений поліморфізм (наявність алельних форм одного і того ж гена). Полігенність і поліморфізм визначають антигенну індивідуальність особин виду [5]. З усього різноманіття генів ВоLA-системи найбільш унікальним є ген ВоLA-DRB3. Його особливість зумовлена формуванням імунної відповіді організму на вірусні та бактеріальні інфекції, що актуально для розгляду проблем стійкості до захворювань. Високий рівень поліморфізму гена дозволяє використовувати його як високоінформативний маркер для вивчення біорізноманіття великої рогатої худоби. Через свою близьку локалізацію до локусу гена лактоглобуліну поліморфізм гена ВоLA-DRB3 деякі дослідники пов'язують з молочною продуктивністю [6–8].

На сучасному етапі інтенсивно проводиться вивчення асоціацій поліморфізму гена ВоLA-DRB3 з різними захворюваннями, імунологічними ознаками, молочною продуктивністю, а також дослідження молекулярних механізмів, що зумовлюють подібні асоціації [9, 10].

Метою нашого дослідження було виявити ДНК-маркери за геном ВоLA-DRB3 у хворих на некробактеріоз корів української чорно-рябої молочної породи.

Матеріал та методи досліджень. Роботу виконували з 2012 по 2017 рік у господарствах Дунаєвського та Білогірського районів Хмельницької області. Діагноз на фузобактеріоз встановлювали на підставі епізоотологічних, клінічних та патологоанатомічних даних і результатів лабораторних аналізів. Дослідження проведені на зразках крові, взятих у 173 здорових та 120 хворих на фузобактеріоз корів української чорно-рябої молочної породи шляхом виявлення в їх генотипі алелів екзона 2 гена ВоLA-DRB3.

Виділення ДНК проводили з використанням наборів “DIAtomTMDNA Prep200” фірми ТОВ “Лабораторія Ізоген” згідно з вимогами виробника. Для визначення алелів гена ВоLA-DRB3 використано рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації (ПЛР-ПДРФ). Ампліфікацію фрагмента екзона 2 розміром 284 п.н. проводили в два етапи [11, 12] з використанням набору “GenePak™ PCR Core” (IsogeneLab. Ltd, Москва). Для першого раунду реакції використовували праймери: HLO-30 (5'-3': TCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC та HLO-31 (5'-3': ATTCGCGCTCACCTCGCCGCT). Як матрицю використовували 5 мкл ДНК, незалежно від її концентрації. Для другого раунду ПЛР використовували праймери: HLO-30 і HLO-32 (5'-3': TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC). Рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації проводили з використанням ендонуклеаз RsaI, HaeIII і BstYI (XhoII). Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 4%-вому агарозному гелі (TopVision™ LE GQ agarose, Fermentas, Канада) у присутності бромистого етидію (5 мМ/мл) і тестували в УФ-світлі. На основі патернів рестрикції виявляли 54 алельних варіанти гена ВоLA-DRB3. Порівняння ДНК-патернів, отриманих з використанням трьох рестрикційних ендонуклеаз RsaI, HaeIII і BstYI, дає змогу ідентифікувати 54 алелі гена ВоLA-DRB3.

Підрахунок частот алелів проводився з огляду на кількість гомозигот і гетерозигот, знайдених по відповідному алелю, за формулою

$$P(A) = \frac{2N_1 + N_2}{2n}, \quad (1)$$

де N_1 і N_2 – відповідно, число гомозигот і гетерозигот для досліджуваного алеля;

n – об'єм вибірки.

Критерій відповідності (χ^2) вказує на статистично значиму різницю між частотою знаходження аналізованого ВоLA-антигену серед хворих та здорових тварин і визначається за формулою

$$\chi^2 = \frac{N(ad - bc)^2}{(a + b)(a + c)(b + d)(c + d)}, \quad (2)$$

де a – сприйнятливі до захворювання тварини, що мають антиген;

b – резистентні до захворювання тварини-носії антигену;
c – сприйнятливі до захворювання тварини з відсутнім антигеном;
d – резистентні до захворювання тварини, які не мають антигену.

За мінімальний поріг недостовірності результатів у дослідженні біологічних об’єктів приймається $P < 0,05$, тому значимим алелем вважається той, критерій відповідності для якого перевищує значення 3,8.

Наявність асоціації між захворюванням і алелем виявляли на основі порівняння частот алелів у хворих і здорових корів за величиною відносного ризику (RR), яка відображає мультиплікативність асоціації. Величина RR показує, у скільки разів ризик розвитку захворювання є більшим за присутності в генотипі певного алеля, ніж за його відсутності,

$$RR = \frac{ad}{bc} \quad (3)$$

Результати дослідження та їх обговорення. Фузобактеріоз корів у господарствах визначали з урахуванням епізоотичної ситуації та на основі клінічних ознак. Захворюваність на фузобактеріоз у племінних господарствах Хмельницької області становила від 5,8 до 15,1 % загальної кількості дійного стада. За гнійно-некротичного ураження шкіри та прилеглих до неї сполучної й м’язової тканин, головним чином на нижніх частинах кінцівок, проводили відбір патологічного матеріалу для бактеріологічного дослідження (рис. 1).

Фузобактеріоз дистальних відділів кінцівок, як правило, ускладнювався гнійно-гнильною мікрофлорою. Нами було виявлено, що з 32 проб патологічного матеріалу *Fusobacterium necrophorum* виділявся у 9 випадках з десяти (табл. 1).

Відзначимо, що збудник не завжди ріс на живильних середовищах, але біологічна проба на кролях завжди була позитивною. Чисту культуру *Fusobacterium necrophorum* отримували саме за допомогою біологічної проби.

У наших дослідженнях у вибірках корів на основі патернів рестрикцій, визначених за



Рис. 1. Ураження копита за фузобактеріозу

1. Мікробні асоціації за фузобактеріозу корів

Показники	Виділені мікроорганізми	
	кількість	%
Усього досліджено проб	32	100,0
Виявлено чистих культур мікроорганізмів:	81	-
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	29	90,6
<i>Staphylococcus aureus</i>	21	65,6
<i>Clostridium</i> spp.	11	34,3
<i>Escherichiacoli</i>	7	21,8
<i>Streptococcus</i> spp.	5	15,6
Інші	8	25

допомогою ендонуклеаз RsaI, XhoII (BstYI) і HaeIII, виявлені алельні варіанти гена BoLA-DRB3 (рис. 2).

У результаті досліджень встановлено, що в корів української чорно-рябої молочної

породи визначається 37 алелів зі середньою частотою знаходження 2,7 % із 54 описаних методами ПЛР-ПДРФ для гена BoLA-DRB3 (табл. 2). Достатньо широкий алельний спектр ґрунтується на особливості створення вітчизняної породи. У ній присутні генотипи декількох відрідів – голландської, естонської, литовської, чорно-рябої московської та інших селекцій, а на завершальному етапі формування відбулась і продовжується масштабна голштинізація худоби, тому наявність 37 алелів гена BoLA-DRB3 відповідає генеалогії даної породи. З частотою більшою ніж у 5 % у загальній популяції реєстрували 7 алелів. Найбільш поширеним виявився алель BoLA-DRB3.2*24 (11,9 %). Поріг у 5 % перевищили алелі BoLA-DRB3.2: *22 (9,9 %), *08, *16 і *28 (7–7,5 %), *03 (6,3 %) та *23 (5,8 %). Найменше, з частотою 0,17 %, виявлявся алель *05. Ще 5 алелів визначалися досить рідко: *19, *20, *29, *31 та *39 (по 0,3 %).

На основі критерію відповідності та відносного ризику захворюваності встановлено алелі BoLA-DRB3.2, які асоціюються із резистентністю та захворюваністю дослідженого стада тварин на фузобактеріоз (табл. 2). За критерієм RR ризику значимі асоціації зі схильністю чи стійкістю до фузобактеріозу проявляють 20 алелів. На зв'язок зі захворюваністю ($RR \geq 2$) вказують 9 алелів, а саме: *51 (13,4), *16 (8,49), *19 та *39 (7,32), *23 (6,88), *18 (4,59), *14 (3,7), *25 та *35 (2,91). На резистентність до фузобактеріозу ($RR \leq -2$) вказують 11 алелів: *03 (-6,83), *22 (-4,22), *45 (-3,54) та алелі *01, *05, *12, *26, *32, *36, *41 і *48 (від -2,1 до -2,7).

Значимими за критерієм χ^2 є сім алелів BoLA-DRB3.2, які мають достатній рівень вірогідності для досліджених біологічних об'єктів. Рівень довірчої ймовірності дослідження $p = 0,999$ проявляють алелі: *03 (15,9), *16 (34,0), *23 (23,5) та *22 (16,8). Три алелі мають мінімальний поріг достовірності $p = 0,95$: *18 (5,99), *51 (5,84) і *01 (4,88).

Асоційованим зі захворюванням вважається алель, для якого виконується умова $RR \geq 2$ і $\chi^2 > 3,8$. Усього налічується 4 таких алеля: *16 ($\chi^2 = 34,0$; $RR = 8,49$), *18 ($\chi^2 =$

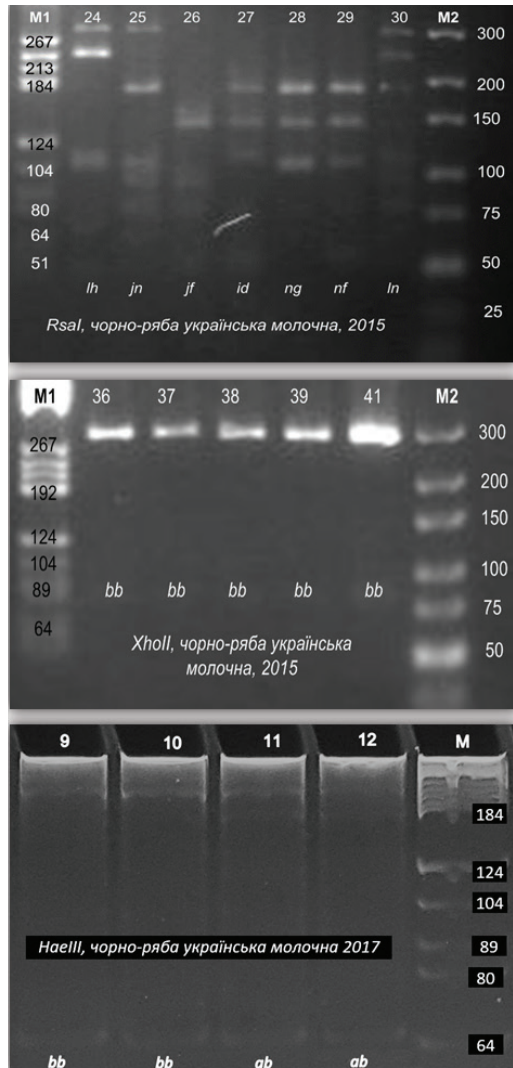


Рис. 2. Фрагменти електрофореграм продуктів ампліфікації ексона 2 гена BoLA-DRB3, отриманих на ДНК корів:
зверху вказані номери корів,
знизу – варіанти ДНК-патернів.
M – маркери молекулярних мас

2. Біометричні показники алелів BoLA-DRB3 корів української чорно-рябої молочної породи у зв'язку зі захворюваністю на фузобактеріоз

Алелі BoLA-DRB 3.2	Частота P(A)	Критерій відповідності χ^2	Ризик захворюваності RR	Алелі BoLA-DRB 3.2	Частота P(A)	Критерій відповідності χ^2	Ризик захворюваності RR
*01	0,0478	4,882	-2,768	*22	0,0990	16,817	-4,224
*02	0,0119	0,455	0,569	*23	0,0580	23,523	6,885
*03	0,0631	15,913	-6,836	*24	0,1195	1,456	1,394
*04	0,0102	0,147	0,716	*25	0,0051	0,829	2,915
*05	0,0017	0,696	-2,096	*26	0,0205	1,317	-2,140
*06	0,0119	0,777	1,954	*28	0,0751	0,115	0,892
*07	0,0444	0,474	0,744	*29	0,0034	0,068	1,445
*08	0,0700	0,377	0,808	*31	0,0034	0,068	1,445
*10	0,0324	0,011	1,052	*32	0,0154	1,348	-2,488
*11	0,0256	0,380	0,709	*35	0,0051	0,829	2,915
*12	0,0222	1,798	-2,393	*36	0,0239	2,318	-2,648
*13	0,0273	0,055	1,129	*37	0,0239	0,022	1,086
*14	0,0119	2,754	3,717	*39	0,0034	2,903	7,321
*15	0,0102	0,147	0,716	*41	0,0068	0,427	-2,100
*16	0,0734	34,082	8,493	*42	0,0051	0,073	0,718
*18	0,0205	5,997	4,595	*45	0,0102	1,494	-3,542
*19	0,0034	2,903	7,321	*48	0,0068	0,427	-2,100
*20	0,0034	0,068	1,445	*51	0,0068	5,846	13,403
*21	0,0171	0,004	0,960	-	-	-	-

5,99; RR = 4,59), *23 ($\chi^2 = 23,5$; RR = 6,88) та *51 ($\chi^2 = 5,84$; RR = 13,4).

Асоційованим із резистентністю до захворювання вважається алель, для якого ви-

конується умова $RR \leq -2$ і $\chi^2 > 3,8$. Відповідно до неї виявлено три алелі BoLA-DRB3.2: *01 (RR = -2,76; $\chi^2 = 4,88$), *03 (RR = -6,83; $\chi^2 = 15,91$) та *22 (RR = -4,22; $\chi^2 = 16,81$).

Висновки

Таким чином, вивчення розподілу алелів екзона 2 гена BoLA-DRB3 у корів української чорно-рябої молочної породи здорових і хворих на фузобактеріоз дозволило виявити чотири алелі (*16, *18, *23 та *51), які мають тісний зв'язок зі схильністю і три алелі (*01, *03 та *22), які асоціюються з резистентністю до даного захворювання. Враховуючи те, що дослідження проводили безпосередньо на ДНК крові тварин, вияв-

лені алелі BoLA-DRB3 доцільно використовувати як ДНК-маркери під час аналізу схильності чи стійкості корів до фузобактеріозу.

Отримані дані переконують у подальшому вивченні поліморфізму алелів гена BoLA-DRB3 у вітчизняних порід великої рогатої худоби з метою дослідження асоціативних зв'язків між алелями та захворюванням на фузобактеріоз.

Бібліографія

1. Основні причини виникнення некробактеріозу та захист від нього великої рогатої худоби в умовах сьогодення / В.П. Риженко, Г.Ф. Риженко, О.І. Горбатюк, В.О. Андріяшук, С.М. Бслік, О.М. Жовнір // Ветеринарна біотехнологія. – 2009. – № 14. – С. 257–277.
2. Етіопатогенетичні особливості формування мікробіоценозу за некробактеріозу тварин / О.І. Горбатюк, О.М. Жовнір, В.О. Андріяшук, О.В. Рудой, Т.О. Мазигула // Ветеринарна медицина. – 2013. – Вип. 97. – С. 173–175.
3. Улько Л.Г. Ефективність лікувально-профілактичних заходів за асоційованих бактеріозів кінцівок у великої рогатої худоби / Л.Г. Улько // Ветеринарна медицина. – 2013. – Вип. 97. – С. 257–259.
4. Ставецька Р. Голштинізація: коли зупинитися [Електронний ресурс] / Р. Ставецька // The Ukrainian Farmer. – Режим доступу: <http://www.pressreader.com/ukraine/the-ukrainian-farmer/20151209/283003988740772>.
5. The Major Histocompatibility Complex in Bovines: A Review / Y.D. Behl, N.K. Verma, N. Tyagi [et al.] // International Scholarly Research Network: ISRN Veterinary Science. – 2012. – Article ID 872710. – 12 p.
6. Сулимова Г.Е. ДНК-маркери в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // Успех и соврем. биология. – 2004. – Т. 124, № 3. – С. 260–271.
7. Особливості розповсюдження алелів гену BoLA-DRB3 у сірої української породи великої рогатої худоби / Т.М. Супрович, Н.Б. Мохначова, М.П. Супрович, Н.М. Фурса // Розведення і генетика тварин. – 2017. – Вип. 54. – С. 221–228.
8. Выявление возможных причин и последствий распространения отдельных аллельных вариантов локуса BoLA-DRB3 в группах голштинского и айрширского скота / Н.В. Ковалюк, В.Ф. Сацук, А.В. Матвиенко, Е.В. Мачульская // Генетика. – 2010. – V. 46(3). – P. 429–432.
9. Rupp R. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins / R. Rupp, A. Hernandez, B.J. Mallard // Dairy Science. – 2007. – V. 90(2). – P. 1029–1038.
10. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle / S. Sharif, B.A. Mallard, B.N. Wilkie [et al.] // Animal Genetics. – 1998. – № 29. – P. 185–193.
11. Van Eijk M.J. Extensive Polymorphism of the BoLA-DRB3 Gene Distinguished by PCR-RFLP / M.J. Van Eijk, J.A. Stewart-Haynes, J.E. Beever // Animal Genetics. – 1992. – V. 23(6). – P. 483–496.
12. Сулимова Г.Е. 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” / Г.Е. Сулимова, В.В. Зинченко. – М.: Изд-во “Цифровичок”, 2011. – 95 с.