

## ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНА *BOLA-DRB3* ПРИ МАСТИТАХ У КОРІВ

**Тетяна Супрович, Микола Супрович, Ліля Строяновська, Ігор Чорний**

Подільський державний аграрно-технічний університет, м.Кам'янець-Подільський

[suprovycht@gmail.com](mailto:suprovycht@gmail.com), [kokas2008@ukr.net](mailto:kokas2008@ukr.net), [stroanovskalilia@gmail.com](mailto:stroanovskalilia@gmail.com),

[chorniyigor78@gmail.com](mailto:chorniyigor78@gmail.com)

<https://doi.org/10.37406/sXXIcp.2021.v2.173>

### Вступ

Продуктивність молочного стада і якість молока залежить від багатьох факторів: спадковість, породність, фізіологічний стан, умови годівлі, утримання та використання тварин. Але серед факторів, які максимально зменшують вихід молока на першому місці знаходяться захворювання, безумовним лідером серед яких є мастити. Збитки, що завдаються захворюваннями молочної залози, оцінюються більшістю авторів, як значні [2, 27, 30].

Розрахунки проведені на основі статистичних показників про чисельність поголів'я та оціночні дані про частку корів хворих на мастити дають можливість в цілому охарактеризувати стан проблеми з цим захворюванням. Оцінка рівня захворюваності маститами за доступними літературними джерелами показує, що на сьогодні у світі в середньому дана хвороба спостерігається у 48% корів, з яких у 39% виявляється субклінічний перебіг захворювання, а у 9% тварин – клінічний [17].

В Європейському Союзі кількість хворих на мастит корів оцінюється в 6,9 млн. голів, що складає біля 30% усього дійного стада [10]. У північноєвропейській зоні (Данія, Фінляндія, Норвегія та Швеція), де облік захворюваності та лікування корів досить надійний, захворюваність клінічним маститом на одну корову в рік коливається від 20 до 40% [28].

Останнім часом з'явилося багато повідомлень про дослідження маститів в Азії [35, 37, 39]. Розповсюдження інтрамамарних інфекцій великої рогатої худоби в Індії значно залежить від ареалу поширення, умов утримання та годівлі тварин. Тому оцінка частоти захворюваності маститами коливається в широких межах від 29 до 78,5% у корів і від 27,4 до 70,3% у буйволиць. Аналіз попередніх досліджень в Пакистані показує, що висока поширеність клінічних і субклінічних маститів у ВРХ та буйволів складає в середньому біля 46,7%.

Проблема маститів великої рогатої худоби в Україні визначається вітчизняними дослідниками, як основна проблема тваринницької галузі. Внаслідок масового поширення захворювань вимені серед корів молочне скотарство та переробна промисловість зазнають значних економічних збитків через зниження молочної продуктивності, погіршення якості молока й молочних продуктів. За різними оцінками захворюваність корів в середньому сягає 30%, а в окремих господарствах при порушенні умов утримання, годівлі, відсутності належного ветеринарного обслуговування та ефективної селекційної роботи діагностується постійно [1, 3, 11, 16, 32].

Дослідження на молочнотоварних фермах ВРХ різних форм власності показали, що захворюваність корів маститом надто висока – 28,31%, причому клінічна форма перебігу становить 13,16%, а субклінічна – 86,84%, що в 6,6 рази більше. В громадському секторі було виявлено 36,9%, у фермерських господарствах – 25,96%, а в індивідуальних селянських господарствах – 8,1% корів, хворих маститом.

Доведено, що кількість корів, хворих маститом з субклінічним перебігом, щороку збільшується. Такий стан пояснюється тим, що в господарствах громадського і фермерського секторів корів не проводиться випас, не проводиться систематичне обстеження тварин на виявлення маститів, відсутні заходи боротьби та профілактики захворювання [19].

Одна з головних причин передчасного вибракування корів, які перехворіли маститами – це атрофія або індурація чвертей молочної залози. За цією причиною вибраковують до 30% корів. Скорочуються терміни продуктивного використання тварин. В наслідок цього середня тривалість життя корови не перевищує 5,5 - 6,5 років, а відповідно і продукцію від неї отримують лише 3,5 - 4 роки. Таким чином, від кожної корови, яка реалізується на м'ясо, недоотримають мінімум 3 - 4 теля і надій молока за 3 - 4 лактації [1, 3, 5, 19].

Захворюваність маститами в Україні складає трохи більше 30%. Порівняння з показниками інших країн показує, що поширення маститів в Україні є дещо меншим за середній світовий показник. Частоту маститів у вітчизняних стадах молочних корів можна зіставити з поширенням цього захворювання в США, Канаді, деяких країн Європи та Білорусі. Це стосується як клінічної, так і субклінічної форм перебігу захворювання [17].

Тим не менше, якщо порівнювати частоту маститів з країнами, які досягли значних успіхів в боротьбі з маститами (Швейцарія, Австрія, Швеція, Данія), в Україні існує резерв для подальшого покращення ситуації.

Серед вітчизняних порід найбільша кількість маститів визначається серед української чорно-рябої худоби. Загальна частка тварин цієї породи з різними формами маститу складає майже 35%, в тому числі, для випадків субклінічного (27,3%) та клінічного (12,6%) перебігу захворювання. Найбільший рівень маститів для української чорно-рябої молочної породи характерний для приватного сектору [19].

Українська червоно-ряба молочна порода характеризується найвищою резистентністю до маститів. Аналіз літературних джерел показує, що загальний рівень захворюваності на клінічні та субклінічні форми по частоті розповсюдження корелюють з аналогічними рівнями в середньому по країні (28,8 і 25,2%, відповідно), а от частка клінічних маститів у червоно-рябої породи найменша (3,62%) [17].

На сьогоднішній день, у зв'язку із скороченням чисельності поголів'я тварин на території країни, мало б спостерігатися зниження частки маститних корів, тому що, як правило, зі стада в першу чергу вибраковуються хворі тварини. Однак, навпаки, тенденції до зниження захворюваності корів маститами не спостерігається.

Є низка факторів, які цьому сприяють: організаційні, інформаційні, економічні, фахові тощо. Вплив цих факторів на рівень захворюваності піддається регулюванню, тобто при належному відношенні до причини можна скоротити негативні наслідки впливу.

Але є ще один фактор – генетичний, який виправити в процесі «експлуатації» тварини вже неможливо: якщо тварина генетично схильна до захворювання, то вона буде частіше хворіти за інших, і навіть висока продуктивність такої корови не перевершує витрат необхідних на лікування і втрат, пов'язаних з неякісним продуктом, який отримується від неї.

Тому пошук методів, які б забезпечили формування молочного стада генетично резистентними до маститів коровами має велике значення для програм спрямованих

на скорочення захворюваності молочної залози ВРХ. Одним із таких методів є пошук молекулярно-генетичного маркерів, які обумовлюють захворюваність тварин.

### Розділ 1.

З усього різноманіття генетичних маркерів ген BoLA-DRB3 є унікальним. Він є одним із самих поліморфних генів класу II головного комплексу гістосумісності великої рогатої худоби (BoLA). Головний комплекс гістосумісності – велика родина генів та відповідна область геному більшості хребетних, яка відіграє важливу роль у функціонуванні імунної системи, зокрема впливаючи на автоімунні реакції, прийняття трансплантатів та успіх репродукції. Відкриття та вивчення ГКГ стало головною подією в фундаментальній та прикладній імунології. Сучасні дослідження переконливо обґрунтували роль ГКГ-системи в забезпеченні генетичного гомеостазу в організмі, шляхом об'єднання факторів вродженого та адаптивного імунітету. Набір молекул ГКГ робить багатоклітинні організми унікальними в фізіологічних реакціях, включаючи поведінкові та гендерні їх особливості. Антигени, які забезпечують внутрішньовидові відмінності, позначаються як алоантигени, і коли вони включаються в процес відторгнення алогенних тканинних трансплантатів, то набувають назви антигенів тканинної сумісності (гістосумісності).

Молекули ГКГ виконують роль своєрідних «антен», які дозволяють організму, розпізнавати власні та чужорідні клітини (бактерії, віруси, ракові клітини) і, при необхідності, запустити імунну відповідь, забезпечуючи утворення специфічних антитіл і видалення чужорідного агенту з організму.

Основна фізіологічна функція молекул МНС, що розташовані на поверхні клітинної мембрани, полягає в зв'язуванні пептидних фрагментів чужорідних білків і презентація їх Т-лімфоцитам. Без молекул МНС не можлива індукція клітинного імунітету.

Вивчення нуклеотидних послідовностей генів класу II BoLA-системи у великої рогатої худоби дозволило описати алелі гена DRB3 і виявити алелі, відповідальні за стійкість і сприйнятливність до маститу [13, 20].

Виробничі дослідження проводилися у племінних і товарних господарствах Хмельницької області. Господарства відрізнялися напрямом виробництва продукції, організацією племінної справи, умовами утримання і годівлі тварин, станом ветеринарно-зоотехнічного обслуговування. Субклінічні мастити визначалися за допомогою реакції секрету з кожної чверті на молочно-контрольній пластинці з 5%-м розчином мастидину відразу ж після доїння. Дослідження проводилися на спеціальних молочно-контрольних пластинках, що мають чотири лунки, у які надоюється секрет із кожної чверті по 1 мл і додається рівна кількість реагенту. При позитивній реакції утворюється згусток желеподібної консистенції. Така реакція свідчить про наявність у молоці не менше 500 тис. соматичних клітин на 1 мл. Клінічні мастити виявлялися щоденним оглядом корів під час кожного доїння спеціалістами господарства по стандартній методиці клінічного обстеження вимені. Визначалися пропорційність чвертей, больова чутливість, підвищення місцевої і загальної температури, набряклість, ущільнення вимені, наявність секреції і якості секрету: домішка крові, гною, зміна кольору, консистенції.

У роботі використано зразки крові від 162 голів корів української чорно-рябої молочної породи.

В основу дослідження різноманіття алелів гена BoLA-DRB3 покладено метод поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ). Метод ПДРФ (RFLP -

restriction fragment length polymorphism) – це спосіб дослідження геномної ДНК шляхом обробки її рестриктазами з наступним електрофоретичним розподілом отриманої суміші та визначенням довжин отриманих фрагментів після блот-гібридизації зі специфічним міченим зондом. Ендонуклеази мають строго специфічні місця розщеплення. Тому генетичні відмінності нуклеотидних послідовностей ДНК між індивідуумами (поліморфізм на рівні ДНК) приводить до різного розподілу сайтів рестрикції уздовж відповідних молекул ДНК і отримання продуктів рестрикції, в яких кількість і довжина гомологічних фрагментів буде різною. Таким чином, поліморфізм ДНК тестуватиметься як наявність ділянок рестрикції різної довжини. Перевагою цього типу маркерів є висока відтворюваність результатів, а також кодомінантний тип наслідування. ПДРФ-локуси можуть мати множинні алелі, що значно підвищує їх інформативність [4, 14].

Метод ПЛР-ПДРФ відноситься до ферментативних методів аналізу SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) і аналогічний методу ПДРФ, але в його основі лежить використання ПЛР. Рестрикції (однією або декількома рестриктазами) в цьому випадку піддаються продукти ампліфікації, а не ДНК геному. Завдяки простоті та надійності метод набув широкого поширення і широко використовується для аналізу алельного поліморфізму генів самих різних біологічних об'єктів [12, 14, 43].

Аналіз поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів включає наступні етапи:

- виділення геномної ДНК;
- рестрикція ДНК специфічною ендонуклеазою;
- електрофоретичний поділ утворених фрагментів ДНК;
- блот-гібридизація (ідентифікація фрагментів ДНК, що містять поліморфний сайт рестрикції).

При відсутності рестрикції в поліморфному сайті на електрофореграмах буде виявлятися один великий фрагмент, який відповідає по довжині послідовності ДНК між двома сусідніми константними сайтами рестрикції для тієї ж ендонуклеази. При наявності рестрикції на фореграмі буде присутній менший за розмірами фрагмент, який дорівнює відстані між поліморфним сайтом і одним з найближчих константних сайтів рестрикції [14, 44].

Виділення ДНК проводили з використанням наборів «DIAtomTMNAPRep 200» фірми ТОВ «Лабораторія Ізоген» згідно з вимогами виробника. Дозвіл на використання тварин затверджено Вченою радою Подільського державного аграрно-технічного університету у відповідності з Європейською конвенцією із захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

Рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації проводили з використанням ендонуклеаз RsaI, HaeIII і BstYI (XhoII). Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 4% агарозному гелі (TopVision™ LE GQ agarose, Fermentas, Канада) у присутності бромистого етидію (5 мМ/мл) і тестували в УФ-світлі (рис. 1).

Для визначення алелів гена BoLA-DRB3 було використано рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації (ПЛР-ПДРФ). Ампліфікацію фрагмента екзона 2 гена BoLA-DRB3 проводили в один чи два етапи з використанням набору «GenePak™ PCR Core» (Isogene Lab. Ltd, Москва). Для одноетапної ПЛР використовували праймери HLO-30 і HLO-32. Для двоетапної – для першого раунду HLO-30 і HLO-31, для другого раунду було використано праймери HLO-30 і HLO-32. Характеристика

праймерів: HLO-30 (5'-3': TCCTCTCTCTGCAGCACATTTCC); HLO-31 (5'-3': ATTCGCGCTCACC TCGCCGCT), HLO-32 (5'-3': TCGCCGCTGCACAGTGAAACTCTC).

Підрахунок частот алелів проводився з врахуванням кількості гомозигот і гетерозигот, знайдених по відповідному алелю за формулою [46]:

$$P(A) = \frac{2N_{1i} + N_{2i}}{2n}, \tag{1}$$

де  $N_{1i}$  і  $N_{2i}$  – відповідно, число гомозигот і гетерозигот для досліджуваного ( $i$ -того) алеля;

$n$  – об'єм вибірки.

Частота генотипів визначалася за формулою:

$$P(G) = N/n, \tag{2}$$

де  $N$  – число відповідних генотипів у вибірці.

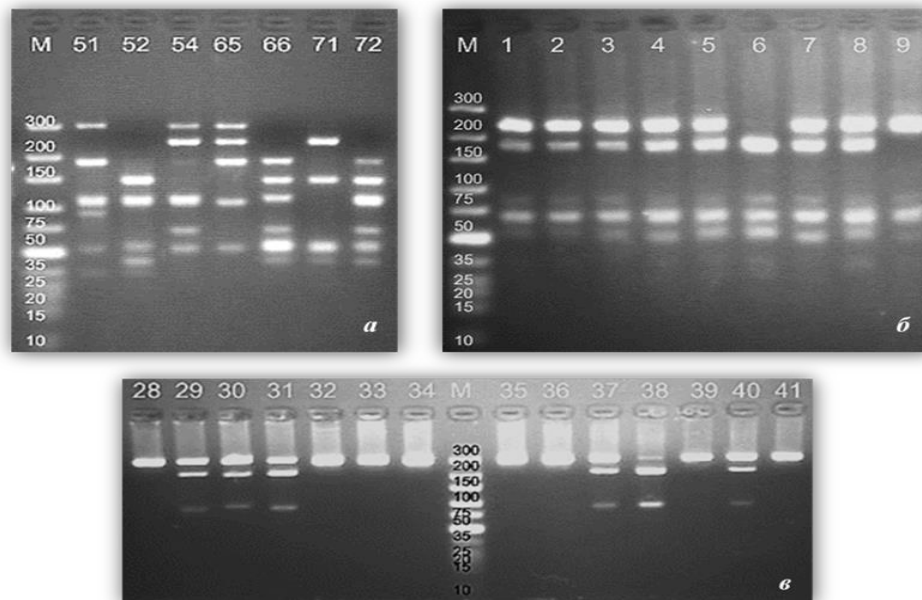


Рис.1. Електрофореграми продуктів ампліфікації ексона 2 гена BoLA-DRB3, отриманих на ДНК корів української чорно-рябої молочної породи з використанням ендонуклеаз *RsaI* (а), *HaeIII* (б) і *BstYI* (в).

Для оцінки довжин фрагментів використано маркер молекулярних мас «GeneRuler™ Ultra Low Range DNA Ladder» фірми «Fermentas», Литва. Зверху вказані номери зразків крові.

Ступінь відносного ризику захворюваності ( $RR$  – *relatively risk*) визначає ймовірність розвитку захворювання в тварин, які мають відповідний алель в порівнянні з тваринами, у яких він відсутній:

$$RR = \frac{f_b(1-f_k)}{f_k(1-f_b)} = \frac{ad}{bc}, \tag{3}$$

де  $f_b$  - частота носіїв гена серед хворих тварин;

$f_k$  - частота носіїв гена у здорових тварин.

$a$  - хворі тварини, що мають ген (алель);

$b$  - здорові тварини носії гена;

$c$  - хворі тварини, в яких немає гена;

$d$  - здорові тварини, в яких немає гена.

Значення  $RR$  показує у скільки разів ризик розвитку захворювання є більшим в присутності певного алеля в генотипі, ніж при його відсутності [20]. Якщо значення  $RR \leq 0,5$ , то наявність алеля в генотипі тварини вказує на тісний зв'язок з резистентністю до хвороби. У цьому випадку, для виділення позитивної асоціації, значення відносного ризику визначається як  $1/RR$  з протилежним знаком.

Критерій відповідності ( $\chi^2$ ) вказує на статистично значиму різницю між частотою знаходження алеля серед хворих та здорових тварин і визначається за формулою:

$$\chi^2 = \frac{N(ad - bc)^2}{(a + b)(a + c)(b + d)(c + d)}, \quad (4)$$

Цей тест є окремим випадком критерію Пірсона. Для двох альтернатив – *тварини: хворі ↔ здорові; алель: присутній ↔ відсутній* – при числі ступенів свободи рівному  $dF = 1$  значення  $\chi^2$  складуть ( $p$  - довірна ймовірність або гранична похибка вибірки): для  $p = 0,95 \rightarrow \chi^2 = 3,84$ ; для  $p = 0,99 \rightarrow \chi^2 = 6,63$ ; для  $p = 0,999 \rightarrow \chi^2 = 10,8$  [9].

Статистичний обробіток даних проводили в стандартному пакеті «Microsoft Excel 2013» з використанням власних програм та інтегрованих надбудови GenAlEx 6.503 (<http://biology-assets.anu.edu.au/GenAlEx/Download.html>). Перевірку на нормальність розподілу частот алелів виконано за критерієм Шапіро-Уїлка (Shapiro-Wilk) та критерієм згоди Колмогорова-Смірнова (Kolmogorov-Smirnov). Аналіз за цими показниками виконано в стандартному пакеті IBM SPSS Statistics V24.0 ([https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/ru/SSLVMB\\_24.0.0/spss/product\\_landing.html](https://www.ibm.com/support/knowledgecenter/ru/SSLVMB_24.0.0/spss/product_landing.html)).

## Розділ 2.

Українську чорно-рябу молочну породу розводять у всіх областях України. Загальний масив породи становить 2565 тис. голів, у т. ч. 1800 тис. корів і 960 бугаїв-плідників [7]. Вона є найбільш поширеною в зоні Поділля. В даному регіоні сформувались відріддя, у яких переважають представники європейської селекції: голландська і німецька. Кровність голштинів тут менша, ніж по породі в цілому. Тому тварини західного внутріпородного типу наближаються до центрально-східного, поступаючи йому дещо за молочною продуктивністю. Проведення селекційно-плеємної роботи з чорно-рябою породою на Поділлі привело до створення подільського типу української чорно-рябої молочної породи.

Сучасна українська чорно-ряба молочна порода характеризується, як відкрита динамічна популяція широкого ареалу, різноманітна за своєю генеалогічною структурою і не вирівняна за типом. Генетична різноманітність зумовлює велику кількість фенотипічних ознак, в тому числі і пов'язаних із стійкістю та сприйнятливістю до різних захворювань. Зважаючи на те, що головною господарсько-корисною ознакою породи є молочна продуктивність, яка в значній мірі залежить від захворювань вимені, важливим напрямком подальшого поліпшення породи являється розробка заходів зі зменшенням сприйнятливості корів чорно-рябої породи до маститів.

Для вивчення поліморфізму і виявлення ДНК-маркерів резистентності (сприйнятливості) до маститів серед алелів гена *BoLA-DRB3* у корів даної породи було відібрано 100 проб крові від здорових тварин та 62 проби від корів з діагнозом хронічний мастит.

Результати дослідження для загальної вибірки представлено в табл. 1.

Таблиця 1

**Розподіл частот алелів *BoLA-DRB3* у загальній групі корів української чорно-рябої молочної породи (n = 162)**

Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$	Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$
*01	5	0,015	0,685	*21	6	0,019	0,749
*02	8	0,025	0,862	*22	39	0,12	1,808
*03	19	0,059	1,305	*23	6	0,019	0,749
*04	7	0,022	0,808	*24	38	0,117	1,788
*07	16	0,049	1,204	*25	2	0,006	0,435
*08	24	0,074	1,455	*26	14	0,043	1,13
*10	17	0,053	1,239	*28	25	0,077	1,482
*11	5	0,015	0,685	*31	2	0,006	0,435
*12	12	0,037	1,049	*32	10	0,031	0,961
*13	17	0,053	1,239	*36	10	0,031	0,961
*15	6	0,019	0,749	*37	11	0,034	1,006
*16	2	0,006	0,435	*41	2	0,006	0,435
*18	8	0,025	0,862	*42	2	0,006	0,435
*20	3	0,009	0,532	*48	8	0,024	0,862

Встановлено, що у корів української чорно-рябої молочної породи визначається 28 алелів (середня частота 3,57%) з 54 описаних методами ПЛР-ПДРФ і алель-специфічної ПЛР для гена *BoLA-DRB3*.

«Інформативними» з частотою понад у 5% в загальній групі виявлялися 7 алелів. Найчастіше у цій вибірці визначався алель *BoLA-DRB3*\*22 – 39 випадків. Його виявлено у 31 (19,1%) тварини. Алель \*24 визначено у 34 корів (21%) але завдяки тому, що він частіше проявляється в гомозиготному стані його частка в дослідженій вибірці склала лише 11,7% (38).

Межу інформативності у  $P(A) \geq 5\%$  перевищили, також, алелі: \*28 – 25 випадків (7,7%), \*08 – 24 випадки (7,4%), \*03 – 19 випадків (5,9%), \*10 і \*13 – по 17 випадків (5,3%). Сумарна частота 7 найбільш поширених алелів склала 59,6%. Найменше варіантів по 2 (0,6%) знайдено для алелів \*16, \*25, \*31, \*41 і \*42.

Результати дослідження поліморфізму в групі сприйнятливих до маститів корів приведено в табл. 2. В цій групі тварин виявлено 24 алеля (середня частота 4,17%). Варіанти \*16, \*25, \*31 і \*36 не виявлялися взагалі.

З частотою понад 5% визначено 5 алелів. Найбільш поширеним у сприйнятливих до маститів тварин виявився варіант *BoLA-DRB3*\*24 – 20 випадків (16,1%). З 62 протестованих тварин його знайдено у 17 (27,4%). Також часто визначалися алелі \*28 – 12 (9,7%), \*26 – 10 (8,1%), \*22 – 9 (7,3%) і \*03 – 8 випадків (6,5%). Малопоширеними серед маститних корів були алелі \*01, \*20 та \*42 (по 0,8%). Інші 19 алелів зустрічалися рідко. Сумарна частота їх виявлення склала 46,4%.

Алель \*24 найбільше зустрічається в гомозиготному стані. Генотип *BoLA-DRB3*\*24\*24 виявився найбільш поширеним у хворих на мастит тварин (37,5%).

Таблиця 2

**Розподіл частот алелів VoLA-DRB 3 у сприйнятливих до маститів корів української чорно-рябої молочної породи ( $n = 62$ )**

Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$	Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$
*01	1	0,008	0,803	*20	1	0,008	0,803
*02	2	0,016	1,131	*21	4	0,032	1,587
*03	8	0,065	2,206	*22	9	0,073	2,330
*04	2	0,016	1,131	*23	2	0,016	1,131
*07	6	0,048	1,927	*24	20	0,161	3,303
*08	6	0,048	1,927	*26	10	0,081	2,445
*10	5	0,040	1,767	*28	12	0,097	2,655
*11	4	0,032	1,587	*32	2	0,016	1,131
*12	6	0,048	1,927	*37	3	0,024	1,380
*13	2	0,016	1,131	*41	2	0,016	1,131
*15	4	0,032	1,587	*42	1	0,008	0,803
*18	6	0,048	1,927	*48	6	0,048	1,927

Серед корів стійких до маститів виявлено 27 алелів (табл. 3). Середня частота прояву – 3,7%. Жодного разу не виявлявся варіант \*41. Алель \*48 генотиповано лише в одній корови. З частотою  $P(A) \geq 5\%$  виявлено 8 випадків.

Серед ідентифікованих алелів найбільш часто зустрічався варіант VoLA-DRB3.2\*22 (15%). У 6 корів він утворював гомозиготи (40% від усієї кількості виявлених гомозигот). Також даний варіант найчастіше виявлявся і серед стійких до маститів тварин. Його носіями були 24 корови (24%).

Алелі \*24 і \*08 достатньо часто виявлялися у гетерозиготному генотипі – по 18 випадків (9,0%), \*13 – 15 випадків (7,5%), \*28 – 13 випадків (6,5%), \*10 – 12 випадків (6,0%), \*08 – 10 випадків (5,0%).

Таблиця 3

**Розподіл частот алелів VoLA-DRB 3 у корів української чорно-рябої молочної породи резистентних до маститів ( $n = 100$ )**

Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$	Алелі	Кількість алелів	Частота, $P(A)$	$SE, \%$
*01	4	0,02	0,99	*21	2	0,01	0,704
*02	6	0,03	1,206	*22	30	0,15	2,525
*03	11	0,055	1,612	*23	4	0,02	0,990
*04	5	0,025	1,104	*24	18	0,09	2,024
*07	10	0,05	1,541	*25	2	0,01	0,704
*08	18	0,09	2,024	*26	4	0,02	0,990
*10	12	0,06	1,679	*28	13	0,065	1,743
*11	1	0,005	0,499	*31	2	0,01	0,704
*12	6	0,03	1,206	*32	8	0,04	1,386
*13	15	0,075	1,862	*36	10	0,05	1,541
*15	2	0,01	0,704	*37	8	0,04	1,386
*16	2	0,01	0,704	*42	1	0,005	0,499
*18	2	0,01	0,704	*48	2	0,01	0,704
*20	2	0,01	0,704				

Алель VoLA-DRB3.2\*10 чотири рази було виявлено у гомозиготному стані, що склало 26,7% від усіх генотипів у тварин стійких до маститів і 2 гомозиготи для алеля



\*08 (13,3%). Ще 3 алеля (\*07, \*08 і \*10) виявлялися в гомозиготному генотипі. Сумарна частота 19 малопоширених алелів склала 34,5%.

Узагальнені дані визначення алелів, які у корів української чорно-рябої молочної породи виявляються з частотою понад 5%, приведено на рис. 2.

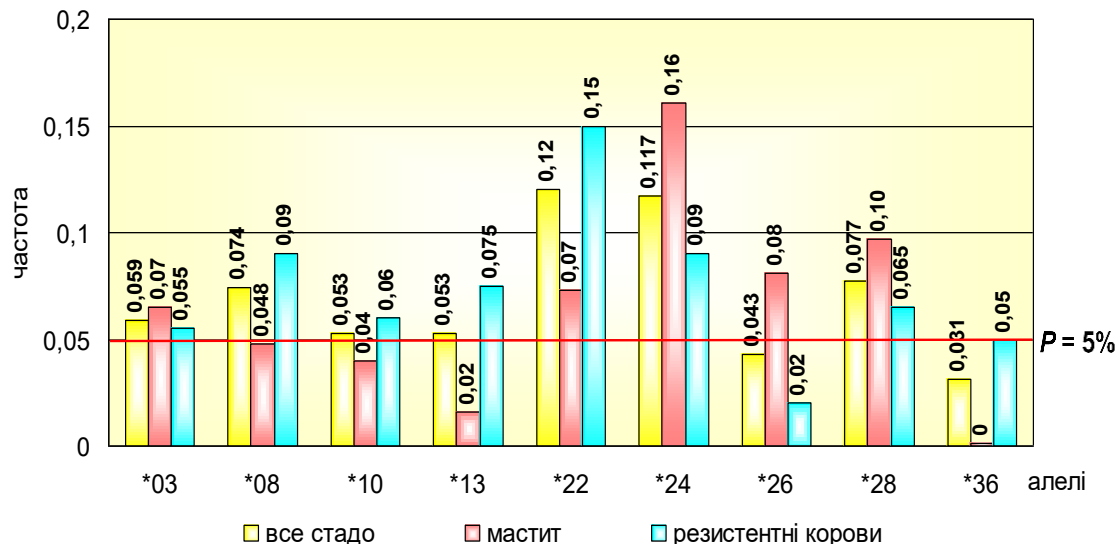


Рис. 2. Розподіл «інформативних» алелів у корів української чорно-рябої молочної породи за частотою визначення (показано алелі, для яких  $P(A) \geq 5\%$  хоча б в одній дослідній вибірці)

Таким чином, встановлено, що у представленій породі тварин з частотою понад 5% хоча б одній з дослідних вибірок (сприйнятливі, резистентні, загальна група) визначається 9 алелів BoLA-DRB3.2. Серед них виділяються 4 алеля, які присутні у всіх трьох вибірках: \*03, \*22, \*24 і \*28. Ще три «інформативних» алеля визначаються більш ніж у кожній 20-ї корови одночасно у стійких до маститів корів і в загальній вибірці: 08, \*10 і \*13.

Показник частоти знаходження алелів гена BoLA-DRB3 відображає їх розподіл у популяції. Дана ознака є якісною, тому що відображає частку алеля у відповідній вибірці. Але, як правило, її недостатньо для встановлення достовірних зв'язків в системі «алель – захворювання», тобто неможливо достовірно стверджувати, що нами встановлено ДНК-маркер асоційований з маститами ВРХ. На це вказують ряд авторів, які проводили аналогічні дослідження на інших породах корів [15, 31, 37, 40].

Для виявлення достовірних зв'язків між алелями та чутливістю корів до маститів проведено статистичний обробіток за формулами приведеними в другому розділі. Визначено біометричні показники, які дозволяють:

- оцінити ступінь достовірності досліджуваних альтернатив – наявність-відсутність алеля у стійких і сприйнятливих тварин;
- встановити, чи існує мультиплікативна взаємодія між фактором і подією, тобто між наявністю алеля і станом корови (резистентна – сприйнятлива).

Про випадковість або дійсність виявленого розподілу алелів у зв'язку із захворюваністю маститами судять за критерієм відповідності. Визначення  $\chi^2$  проводили за формулою 2.6.

Наявність асоціації між захворюванням і алелем виявляли на основі порівняння

частот алелів у хворих і здорових корів. Показником відмінності частот визначення алелів у групах сприйнятливих і стійких до маститів тварин служить величина відносного ризику (RR), яка відображає мультиплікативність асоціації. Величина RR показує у скільки разів ризик розвитку захворювання є більшим у разі присутності в генотипі певного алеля, ніж при його відсутності. При розрахунках відносного ризику використано формулу 3.

Результати розрахунку біометричних показників з поправкою Вульфа-Холдейна і перевіркою на достовірність малих вибірок за  $\chi^2$  представлено в табл. 4.

Значимими за критерієм  $\chi^2$  є вісім алелів BoLA-DRB3, які мають достатній рівень достовірності для досліджених біологічних об'єктів. Рівень довірчої ймовірності дослідження  $p = 0,99$  проявляють алелі \*26 ( $\chi^2 = 7,13$ ) і \*36 ( $\chi^2 = 6,61$ ). Шість алелів мають мінімальний поріг достовірності  $p = 0,95$ : \*13 ( $\chi^2 = 5,65$ ), \*22 ( $\chi^2 = 5,02$ ), \*18 і \*48 ( $\chi^2 = 4,82$ ), \*24 ( $\chi^2 = 4,33$ ) і \*11 ( $\chi^2 = 3,8$ ).

Таблиця 4

**Біометричні показники поліморфізму алелів гена BoLA-DRB3 корів української чорно-рябої молочної породи та їх зв'язок з маститами**

Алелі	P(A)	$\chi^2$	RR	Перевірка достовірності по $\chi^2$			
				$\frac{(a+b) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(a+b) \times (b+d)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (a+c)}{N}$	$\frac{(c+d) \times (b+d)}{N}$
*01	0,0154	0,729	-2,54	1,91	2,99	<b>60,1</b>	<b>96,9</b>
*02	0,0247	0,627	0,522	3,06	4,74	<b>58,9</b>	<b>95,1</b>
*03	0,0586	0,134	1,2	<b>7,27</b>	<b>11,4</b>	<b>54,7</b>	<b>88,3</b>
*04	0,0216	0,291	0,633	2,68	4,19	<b>59,3</b>	<b>95,7</b>
*07	0,0494	0,004	0,964	<b>6,12</b>	<b>9,48</b>	<b>55,9</b>	<b>90,1</b>
*08	0,0741	2,1	-2,05	<b>9,19</b>	<b>13,0</b>	<b>52,8</b>	<b>85,2</b>
*10	0,0525	0,631	0,643	<b>6,51</b>	<b>9,76</b>	<b>55,5</b>	<b>89,5</b>
*11 <sup>1</sup>	0,0154	3,8	6,83	1,91	3,18	<b>60,1</b>	<b>96,9</b>
*12	0,037	0,755	1,68	4,59	<b>7,41</b>	<b>57,4</b>	<b>92,6</b>
*13 <sup>1</sup>	0,0525	5,65	-5,29	<b>6,51</b>	<b>9,13</b>	<b>55,5</b>	<b>89,5</b>
*15	0,0185	2,13	3,38	2,30	3,78	<b>59,7</b>	<b>96,3</b>
*16	0,0062	1,26	-3,17	0,77	1,21	<b>61,2</b>	<b>98,8</b>
*18 <sup>1</sup>	0,0247	4,81	5,25	3,06	<b>5,14</b>	<b>58,9</b>	<b>95,1</b>
*20	0,0093	0,032	0,803	1,15	1,83	<b>60,9</b>	<b>98,2</b>
*21	0,0185	2,13	3,38	2,30	3,78	<b>59,7</b>	<b>96,3</b>
*22 <sup>1</sup>	0,1204	5,02	-2,52	<b>14,9</b>	<b>19,0</b>	<b>47,1</b>	<b>75,9</b>
*23	0,0185	0,064	0,8	2,3	3,63	<b>59,7</b>	<b>96,3</b>
*24 <sup>1</sup>	0,1173	4,33	2,17	<b>14,5</b>	<b>23,9</b>	<b>47,5</b>	<b>76,5</b>
*25	0,0062	1,26	-3,17	0,77	1,21	<b>61,2</b>	<b>98,3</b>
*26 <sup>2</sup>	0,0432	7,13	4,62	<b>5,36</b>	<b>9,16</b>	<b>56,6</b>	<b>91,4</b>
*28	0,0772	1,18	1,61	<b>9,57</b>	<b>15,3</b>	<b>52,4</b>	<b>84,6</b>
*31	0,0062	1,26	-3,17	0,77	1,21	<b>61,2</b>	<b>98,8</b>
*32	0,0309	1,51	-2,61	3,83	<b>5,80</b>	<b>58,2</b>	<b>93,8</b>
*36	0,0309	6,61	-14,5	3,83	<b>5,56</b>	<b>58,2</b>	<b>93,8</b>
*37 <sup>2</sup>	0,034	0,604	0,585	4,21	<b>6,45</b>	<b>57,8</b>	<b>93,2</b>
*41	0,0062	3,27	8,31	0,77	1,26	<b>61,2</b>	<b>98,8</b>
*42	0,0062	0,118	1,62	0,77	1,23	<b>61,2</b>	<b>98,8</b>
*48 <sup>1</sup>	0,0247	4,81	5,25	3,06	<b>5,14</b>	<b>58,9</b>	<b>95,1</b>

<sup>1</sup>  $p \geq 0,95$ ; <sup>2</sup>  $p \geq 0,99$ ;

За критерієм відносного ризику значимі асоціації зі схильністю чи стійкістю до маститів мають 17 алелів. На зв'язок із захворюваністю ( $RR \geq 2$ ) вказують 8 алелів, а саме: \*41 ( $RR = 8,31$ ), \*11 ( $RR = 6,83$ ), \*18 і \*48 ( $RR = 5,25$ ), \*26 ( $RR = 4,62$ ), \*15 і \*21 ( $RR = 3,38$ ) та \*24 ( $RR = 2,17$ ); на зв'язок зі стійкістю до маститів ( $RR \leq -2$ ) вказують наступні 9 алелів: \*36 ( $RR = -14,5$ ), \*13 ( $RR = -5,29$ ), \*16 і \*25 та \*31 ( $RR = -3,17$ ), \*32 ( $RR = -2,61$ ), \*01 і \*22 ( $RR = -2,52$ ) та \*08 ( $RR = -2,05$ ).

Асоційованим із захворюванням вважається алель, для якого виконується умова  $RR \geq 2$  і  $\chi^2 > 3,8$ . Всього нараховується 5 таких алелів: \*11 ( $RR = 6,83$ ;  $\chi^2 = 3,8$ ), \*18 ( $RR = 5,25$ ;  $\chi^2 = 4,82$ ), \*24 ( $RR = 2,17$ ;  $\chi^2 = 4,33$ ), \*26 ( $RR = 4,62$ ;  $\chi^2 = 7,13$ ) і \*48 ( $RR = 5,25$ ;  $\chi^2 = 4,8$ ). Три з них не витримують перевірку на обмеженість вибірки. Із-за цього обмеження не можна вважати асоційованими із сприйнятливістю до маститів наступні алелі: \*11 ( $P(A) = 0,0154$ ), \*18 і \*48 ( $P(A) = 0,0247$ ).

Асоційованим із стійкістю до захворювання вважається алель, для якого виконується умова  $RR \leq -2$  і  $\chi^2 > 3,8$ . Всього налічується 3 таких алеля: \*13 ( $RR = -5,29$ ;  $\chi^2 = 5,65$ ), \*22 ( $RR = -2,52$ ;  $\chi^2 = 5,02$ ) і \*36 ( $RR = -14,5$ ;  $\chi^2 = 6,61$ ). Для алеля \*36 ( $P(A) = 0,031$ ) не виконується перевірка виконана по формулі 2.7, що не дозволяє вважати значимим його зв'язок зі стійкістю корів до маститів.

Таким чином, дослідження поліморфізму гена *BoLA-DRB3* у корів української чорно-рябої молочної породи показує, що у даної популяції виявляється два алеля, які мають тісний зв'язок із сприйнятливістю корів до маститів. Це алелі *BoLA-DRB3.2*: \*24 ( $RR = 2,17$ ;  $P(A) = 0,117$ ;  $\chi^2 = 4,33$ ) і \*26 ( $RR = 4,62$ ;  $P(A) = 0,043$ ;  $\chi^2 = 7,13$ ).

Даним дослідженням встановлено наявність також двох алелів, які вказують на статистично значимий зв'язок зі стійкістю корів до маститів. Це алелі *BoLA-DRB3*: \*13 ( $RR = -5,29$ ;  $P(A) = 0,053$ ;  $\chi^2 = 5,65$ ) і \*22 ( $RR = -2,52$ ;  $P(A) = 0,12$ ;  $\chi^2 = 5,02$ ).

Необхідно звернути увагу на алелі \*18 і \*48, які мають високі показники відносного ризику, достатню достовірність по  $\chi^2$ , але не витримують перевірку по критерію відповідності на обмеженість розміру вибірки і тому, що рідко виявляються у здорових тварин. Таке обмеження, як правило, витримує перевірку для малих вибірок за точним одностороннім критерієм Фішера, при незначному зниженні загальної достовірності дослідження. У зв'язку зі стійкістю до маститів необхідно також перевірити на силу асоціації алель *BoLA-DRB3*\*08 ( $RR = -2,05$ ;  $P(A) = 0,074$ ), який не має достатньої точності за критерієм відповідності ( $p < 0,95$ ) але відповідає вимогам достовірності за іншими обмеженнями.

Результати перевірки за критерієм Фішера та оцінки сили асоціації за коефіцієнтом взаємної спряженості Пірсона приведено в табл. 5.

Таблиця 5

**Перевірка алелів *BoLA-DRB3* на значимість асоціативних зв'язків з маститами**

Алелі	$P(A)$	$\chi^2$	$RR$	$\frac{(a+b)(a+c)}{N}$	Критерій Фішера	Коефіцієнт Пірсона
схильність						
*18	<b>0,0247</b>	4,81	5,25	<b>3,06</b>	0,0308	<b>0,17</b>
*48	<b>0,0247</b>	4,81	5,25	<b>3,06</b>	0,0308	<b>0,17</b>
резистентність						
*08	0,074	<b>2,1</b>	-2,05	9,19	<b>0,0658</b>	<b>0,113</b>

Примітка. Жирним шрифтом виділено показники, які не відповідають критеріям достовірності

За критерієм Фішера достатню силу зв'язку з маститом мають алелі BoLA-DRB3\*18 і \*48 ( $P < 0,05$ ). Але перевірка за коефіцієнтом Пірсона вказує на слабкість виявленої асоціації. Тому пропонувати ці алелі до використання як ДНК-маркери чутливості до захворювань маститами корів української чорно-рябої молочної породи необхідно тільки після додаткових досліджень на більших вибірках тварин.

Алель BoLA-DRB3\*08 не витримує перевірку за точним критерієм Фішера ( $P > 0,05$ ) і має дуже низьку силу асоціації за коефіцієнтом Пірсона, що виключає його зі списку потенціальних ДНК-маркерів.

Запропоновано декілька гіпотез, що пояснюють механізми зчеплення хвороб з МНС [6, 8, 29].

1. Рецепторна гіпотеза, згідно якої певні антигени системи є рецепторами для вірусів, що полегшують їх фіксацію і проникнення в клітину. Хвороботворний агент взаємодіє безпосередньо з певними антигенами, маючи схильність до них, що полегшує проникнення вірусу в клітину та ініціює патогенез.

2. Гіпотеза молекулярної «мімікрії», полягає в тому, що деякі мікроорганізми несуть поверхневі специфічності, ідентичні МНС структурам макроорганізму господаря. Внаслідок чого розвивається толерантність до даних мікроорганізмів, розпізнавання не відбувається, що й обумовлює розвиток захворювання.

3. Гіпотеза про модифікації (зміни) аутологічного (власного) антигену (altered self), згідно якій модифікований аутологічний антиген розпізнається імунною системою як чужий (non self), що призводить до зриву толерантності.

4. Гіпотеза про вплив гіпотетичного Ir-гена на схильність до захворювань (порушення селекції антигенних детермінант, порушення супресії, опосередкованої Т-лімфоцитами).

Існує думка, що резистентність і сприйнятливність – це дві протилежності одного явища. Але насправді це два дискретних і незалежних явища [24]. Резистентність – це стійкість організму до дії різних факторів, а сприйнятливність до інфекції – це здатність макроорганізму реагувати на впровадження мікробів розвитком різних форм інфекційного процесу.

Розрізняють видову та індивідуальну сприйнятливність. Видова сприйнятливність властива всім особинам даного виду. Індивідуальна сприйнятливність – це схильність окремих індивідів до виникнення у них різних форм інфекційного процесу під дією мікробів. Найімовірніше, що сприйнятливність до хвороби успадковується як моногенна ознака, тобто допускається залучення одного гена, на відміну від резистентності, яка, вірогідно, успадковується як полігенна ознака [36].

Генетичний контроль імунної відповіді здійснюється великою групою генів за допомогою регулювання гостроти та характеру клітинних взаємодій між макрофагами, Т- і В-лімфоцитами.

Встановлено, що антигени, які кодується головною генетичною системою гістосумісності – МНС-антигени, мають величезне значення для імунологічного розпізнавання і взаємодії клітин в імунній відповіді. Кожен з генів МНС вносить свій вклад в особливості фенотипічного прояву імунної відповіді [21]. Для пояснення можливих механізмів взаємозв'язку МНС із захворюваннями висунуто два постулати [18, 25, 33]:

1. Зчеплення локусу «disease» і МНС, що знаходяться на одній хромосомі
2. Асоціація з певним МНС-антигеном.

Найчастіше зв'язок виявляється у формі асоціацій.

Функції антигенів ГКГ, пов'язані із забезпеченням імунної відповіді на чужорідні антигени, обумовлюють численні асоціації з конкретними захворюваннями. Значну роль в цьому відіграє високополіморфний другий екзон гена *BoLA-DRB3*, який кодує  $\beta$ 1-домен антигенів класу II і формує будову щілини Бьоркмана, що зумовлено необхідністю зв'язуванням широкого спектру чужорідних антигенів.

Дослідження з цього важливого генетичного регіону були розглянуті раніше багатьма вченими і дотепер продовжується вивчення асоціацій поліморфізму гена *BoLA-DRB3* з різними захворюваннями, в тому числі і з маститами [22, 23, 26, 36, 41, 42].

Останнє дослідження японських дослідників для 714 голів з 26 стад голштинської породи [47] дещо уточнює результати типування і встановлення асоціацій в порівнянні з даними отриманими раніше [46]. З'ясовано що алелі *DRB3.2\*08* і *DRB3.2\*16* пов'язані зі сприйнятливістю, а *DRB3.2\*22*, *DRB3.2\*23* і *DRB3.2\*24* – з резистентністю до маститів.

Деякі автори узагальнюють попередні дослідження асоціацій «алель - мастит» і виділяють ряд «вагомих» алелів для наступного аналізу. У роботі [45] з резистентністю до маститу пов'язуються алелі \*07, \*11, \*13, \*18, \*27, із сприйнятливістю – \*16, \*23, \*26. Алелі \*08, \*22, \*24 мають невизначений статус, тобто для них відмічається наявність протилежних асоціацій (для одних популяцій вони проявляють себе у зв'язку зі стійкістю, у других – із захворюваністю до маститів).

При дослідженні польської голштинської худоби ( $n = 525$ ) для встановлення асоціацій між алелями *DRB3* локусу і вмістом соматичних клітин в молоці, автори, опираючись на результати попередніх наукових робіт, вказують на інформативність двох алелів *BoLA-DRB3.2\*16* і *\*23* в зв'язку з маститами та проявом їх наслідків для племінної цінності корів та SCC. Якщо дані алелі вважати генетичними маркерами для встановлення фенотипічної стійкості (сприйнятливості) до маститів, то аналіз любого стада спрощується, так як достатньо вивчати в популяції всього три генотипи – \*16/\*A, \*23/\*A і \*16/\*23 (де \*A – любий алель, що типується в популяції) [38].

Власними дослідженнями встановлено, що в українській чорно-рябої молочної породи асоційованими з маститами є алелі *BoLA-DRB3.2\*24* і *\*26*. Резистентність до захворювання асоціюється з алелями \*13 і \*22.

Аналіз сукупності даних різних авторів та власного дослідження показує, що більшість алелів заявлених як маркери стійкості або сприйнятливості до маститів, проявляють себе по різному в залежності від належності до тієї чи іншої популяції молочних корів. Лише невелика кількість алелів *DRB3* локусу (так звані «чисті») не «перехресчуються» за ознакою хворий-здоровий у різних порід ВРХ (\*14, \*26 \*01, \*52, \*26 у випадку асоціації зі сприйнятливістю до маститів та \*33, \*27, \*02, \*10, \*15, \*51 у випадку асоціації зі стійкістю до маститів). Як правило «чисті» алелі виявляються у місцевих, рідкісних або некомерційних порід, таких як Зебу, Сістані, Blanco Orejinegro тощо. В такій ситуації віднайти один або декілька маркерів пов'язаних з маститами для всієї популяції молочних корів неможливо. Очевидно, що аналіз необхідно вести для окремих популяцій і знаходити та використовувати генетичні маркери на основі алелів гена *BoLA-DRB3.2* винятково індивідуально для кожної вивченої популяції.

## Висновки

Встановлено, що у корів української чорно-рябої молочної породи визначається 28 алелів (середня частота знаходження 3,57%) з 54 описаних методами ПЛР-ПДРФ і алель-специфічної ПЛР для гена BoLA-DRB3, який кодує антигени класу II головного комплексу гістосумісності великої рогатої худоби.

З частотою більшою ніж у 5% виявлялися 9 алелів BoLA-DRB3: \*03, \*08, \*10, \*13, \*22, \*24, \*26, \*28, \*36. Найменше варіантів по 2 (0,6%) знайдено для алелів \*16, \*25, \*31, \*41 і \*42.

В групі сприйнятливих до маститів корів виявлено 24 алеля (середня частота 4,17%). З частотою понад 5% визначалися 5 алелів BoLA-DRB3: \*24, \*28, \*26, \*22 і \*03. Варіанти \*16, \*25, \*31 і \*36 в даній групі не виявлялися взагалі.

Серед корів стійких до маститів знайдено 27 алелів. З  $P(A) \geq 5\%$  виявлялися 8 алелів BoLA-DRB3.2\*: 22, \*24, \*08, \*13, \*28, \*10, \*03 і \*36. Жодного разу не знайдено варіант \*41.

Встановлено, що у корів української чорно-рябої молочної породи тісний зв'язок із сприйнятливістю корів до маститів мають два алеля BoLA-DRB3: \*24 ( $RR = 2,17$ ;  $P(A) = 0,117$ ;  $\chi^2 = 4,33$ ) і \*26 ( $RR = 4,62$ ;  $P(A) = 0,043$ ;  $\chi^2 = 7,13$ ), а на асоціацію з резистентністю вказують варіанти: \*13 ( $RR = -5,29$ ;  $P(A) = 0,053$ ;  $\chi^2 = 5,65$ ) та \*22 ( $RR = -2,52$ ;  $P(A) = 0,12$ ;  $\chi^2 = 5,02$ ).

### Список використаних джерел

- [1] Байдевятова Ю. В., Байдевятов Ю. А. Серозний мастит у корів (поширеність, діагностика і терапія). *Вісник Сумського національного аграрного ун-ту. Ветеринарна медицина*. Суми, 2011. Вип.1 (28). С. 81-86.
- [2] Вальчук О., Столюк В. Мастит корів – ефективні шляхи вирішення проблеми. *Здоров'я продуктивних тварин*. 2009. №4. С. 30-34.
- [3] Глазко В. И. Молекулярная биология для животноводства. *Farm animals*. 2012. №1. С. 24-29.
- [4] Джупина С. И. Причины заболеваемости и профилактика некробактериоза. *Ветеринария*. 2005. №7. С. 7-10.
- [5] Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология. Киев : ООО «Полиграф Плюс». 2006. 481 с.
- [6] Єфіменко М. Я., Буркат В. П., Бойко В. П. Скотарство молочне: українська чорно-ряба молочна. URL: <http://agroua.net/animals/catalog/ag-1/a-2/ab-80/> (дата звернення: 15.12.2019).
- [7] Зарецкая Ю. М., Хамаганова Е. Г., Губарев М. И. Иммунология и иммуногенетика человека : монография. Москва : Триада-фарм, 2002. 135 с.
- [8] Крюков В. И. Генетика. Часть 5. Статистические методы изучения изменчивости : учебное пособие для сельскохозяйственных вузов. Орёл : Изд-во ОрёлГАУ. 2006. 208 с.
- [9] Паневник В. В., Супрович Т. М. Етіологічні чинники маститів корів української чорно-рябої молочної породи. *Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького*. 2016. Т.18, №3(70).
- [10] Пешук Л. В. Проблема маститу в стадах великої рогатої худоби молочного напрямку. *Вісник аграрної науки*. 2001. №9. С.32-35.
- [11] Смоляр В. С. Профілактика маститів при доїнні корів. *Тваринництво України*. 2002. № 11. С.8-9.
- [12] Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров,

- их свойства и области применения. *Успехи современной биологии*. 2004. №3. С.260-271.
- [13] Сулимова Г. Е. ДНК-маркеры в изучении генофонда пород крупного рогатого скота. *Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства*. Москва : Наука, 2006. С.138-166. ISBN: 5-02-035646-8.
- [14] Сулимова Г. Е., Зинченко В. В. Анализ полиморфизма ДНК с использованием метода полимеразной цепной реакции : методическое пособие к практикуму «ДНКмаркеры для генетической паспортизации и улучшения геномов животных хозяйственно ценных видов». Москва : Цифровичок, 2011. 94 с. ISBN: 5915870414.
- [15] Сулимова Г. Е., Удина И. Г., Шайхаев Г. О., Захаров И. А. ДНК-полиморфизм гена BoLA-DRB3 у крупного рогатого скота в связи с устойчивостью и восприимчивостью к лейкозу. *Генетика*. 1995. Т.31. №9. С. 1294-1299.
- [16] Супрович Т. М. Дослідження поліморфізму гена BoLA-DRB3 у корів сприйнятливих та стійких до маститів. *Тваринництво України*. 2013. №12. С.14-19.
- [17] Супрович Т. М. Молекулярно-генетичний аналіз головного комплексу гістосумісності в зв'язку зі стійкістю та сприйнятливістю до маститів у корів : дис. ... д-ра с.-г. наук : 03.00.15 / Інститут розведення і генетики тварин. Чубинське, 2014. 386 с.
- [18] Уорд Ф. Е., Эймс Д. Б. Лейкоцитарные антигены человека и заболевания. Иммуногенетика человека / ред. С. Литвин. Москва, 1994. Т.1. С. 373-393.
- [19] Харенко М. І. Байдевятова О.М. Особливості перебігу клінічного маститу в корів різних порід в умовах господарств Сумської області. *Збірник наук праць*. Біла Церква. №62. 2009. С.7-11.
- [20] Хлесткина Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т.17. №4/2. С. 1044-1054.
- [21] Amorena B., Stone W.H. Bovine Lymphocyte Antigens (BoLA): Aserologie, genetic and histocompatibility antigen. *Tissue Antigens*. 1980. V.16. №3. pp. 212-225.
- [22] 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.
- [23] Dietz A. B., Cohen N. D., Timms L., Kehrl M. E. Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factors for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 1997. V.80(2). pp. 406-412.
- [24] Dube S., Dolcini G., Abbott L., Mehta S., Dube D., Gutierrez S., Ceriani C., Esteban E., Ferrer J., Poiesz B. The complete genomic sequence of a BLV strain from a Holstein cow from Argentina. *Virology*. 2000. V.277(2). pp.379-386.
- [25] Ghodke Y., Joshi K., Chopra A., Patwardhan B. HLA and disease. *European Journal of Epidemiology*. 2005. V.20(6). pp. 475-488.
- [26] Gutiérrez S. E., Esteban E. N., Lützelshwab C. M., Juliarena M. A. Major histocompatibility complex-associated resistance to infectious diseases: the case of bovine leukemia virus infection. *Trends and Advances in Veterinary Genetics*. 2017. pp. 101-126.
- [27] Hagnestam C., Emanuelson U., Berglund B. Yield Losses Associated with Clinical Mastitis Occurring in Different Weeks of Lactation. *Journal of Dairy Science*. 2007. V.90 (5). pp. 2260-2270.

- [28] Halasa T., Huijps K., Osteras O., Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management : a review. *Veterinary Quarterly*. 2007. №29(1). pp. 18-31.
- [29] Harrison C. J. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood Reviews*. 2001. V.15(1). pp. 49-59.
- [30] Holland J. K., Hadrich J. C., Wolf C. A., Lombard J. Economics of Measuring Costs Due to Mastitis-Related Milk Loss. *Agricultural and Applied Economics Association (AAEA) : AAEA & WAEA Joint Annual Meeting, July 26-28, San Francisco, California*. 2015. pp. 2-18.
- [31] Kulberg S., Heringstad B., Guttersrud O. A., Olsaker I. Study on the association of BoLA-DRB3.2 alleles with clinical mastitis in Norwegian Red cows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2007. V.124(4). pp. 201-207.
- [32] Ljubeckij W. J., Walczuk A. A. Rozszerzanie si mastitis wid wysokoprodukcyjnych krw w niektrych gospodarstwach Obwodu Kijowskiego. *Problemy w rozrodzie wyda – dzi i jutro : materialy konferencyjne, midzynarodowa sesja naukowa*. Polanica Zdrj. 2004. S. 92-94.
- [33] McShane R. D., Gallagher D. S., Newkirk H., Taylor J. F., Burzlaff J. D., Davis S. K., Skow L. C. Physical localization and order of genes in the class I region of the bovine. *Animal Genetics*. 2001. V.32(5). pp. 235-239.
- [34] Mohammadi A., Nassiry M. R., Mosafer J. et al. Distribution of BoLA-DRB3 Allelic Frequencies and Identification of a New Allele in the Iranian Cattle Breed Sistani (*Bos indicus*). *Genetika*. 2009. T.44. №2. C.198-202.
- [35] Sharif A. M., Muhammad U., Muhammad G. Mastitis control in dairy production. *Journal of agriculture & social sciences*. 2009. №5. P.102-105.
- [36] Sharif S. The bovine major histocompatibility complex: immunogenetic study of the BoLA-DRB3 locus and disease associations : A Thesis of Doctor of Philosophy. The University of Guelph. 1999. 165 p.
- [37] Sharma N., Rho G. J., Hong Y., Kang T., Lee H., Hur T., Jeong D., Rho G., Hong Y., Kang T., Lee S.-H., Hur Y. Bovine mastitis: an Asian perspective. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2012. V.7. pp. 454-476.
- [38] Sender G., Galal K., Hameid K. et al. Association of the BoLA-DRB3 alleles with estimated breeding value for somatic cell count in Polish dairy cattle. *Archiv fur tierzucht*. 2008. V. 51. № 2. pp.111-119.
- [39] Sudhan N. A., Sharma N. Mastitis – an important production disease of dairy animals. *SMVS' Dairy year book*. 2010. 15 p.
- [40] Sun L., Song Y., Riaz H., Yang L. Effect of BoLA-DRB3 exon 2 polymorphisms on lameness of Chinese Holstein cows. *Molecular Biology Reports*. 2013. V. 40(2). pp. 1081-1086. doi:10.1007/s11033-012-2150-6.
- [41] Suprovych T. M., Suprovych M. P., Koval T. V., Karchevska T. M., Chepurna V.A., Chorny I. O., Berezhanskyi A. P. BoLA-DRB3 gene as a marker of susceptibility and resistance of the Ukrainian black-pied and red-pied dairy breeds to mastitis. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2018. V 9(3). pp. 363-368.
- [42] Takeshima S. N., Miyasaka T., Polat M., Kikuya M., Matsumoto Y., Mingala C. N., Villanueva M. A., Salces A. J., Onuma M., Aida Y. The great diversity of major histocompatibility complex class II genes in Philippine native cattle. *Meta Gene*. 2014. № 2. pp. 176-190.
- [43] Thiel T., Kota R., Grosse I., Stein N., Graner A. SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development. *Nucleic Acids Research*. 2004. V. 32 (1) P.



5.

- [44] Van Eijk M. J. T., Stewart-Haynes J. A., Lewin H. A. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*. 1992. V.23 (6). pp. 483-496.
- [45] Zambrano J. C., Echeverri J., Lopez-Herrera A. Alleles of the BoLA DRB3.2 gene are associated with mastitis in dairy cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 2011. V. 24 (2). pp. 145-156.
- [46] Yoshida T., Mukoyama H., Furuta H. et al. Association of BoLA-DRB3 alleles identified by a sequence-based typing method with mastitis pathogens in Japanese Holstein cows. *Anim. Sci. J.* 2009. V. 80. № 5. pp. 498-509.
- [47] Yoshida T., Furuta H., Kondo Y., Mukoyama H. Association of BoLA-DRB3 alleles with mastitis resistance and susceptibility in Japanese Holstein cows. *Anim. Sci J.* 2012. V. 83. № 5. pp. 359-366.