

УДК 575:618.19-002:636.2.034

ВИКОРИСТАННЯ ІМУНОГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ КОРІВ, РЕЗИСТЕНТНИХ АБО ЧУТЛИВИХ ДО МАСТИТІВ

Т. М. Супрович¹, В. В. Влізло²

¹Подільський державний аграрно-технічний університет, Україна, м. Кам'янець-Подільський, 32316, вул. Т. Шевченка, 13, kokas2008@ukr.net

²Інститут біології тварин НААН, Україна, м. Львів, 79034, вул. В. Стуса, 38

У статті наведено можливість застосування молекулярно-генетичних методів з використанням головного комплексу гістосумісності в діагностиці маститів корів.

Проблема традиційної селекції ВРХ полягає у тривалості термінів оцінки корів. З появою генетичних маркерів з'явилася можливість прискорити темпи селекції. Відомо, що сприйнятливості корів до маститів — генетично обумовлена ознака. Це спрямовує зусилля дослідників на пошуки генетичних маркерів асоційованих зі стійкістю або схильністю корів до маститів. Стає можливим прогнозування прояву захворювання на ранньому етапі постнатального онтогенезу.

Для підвищення точності прогнозу варто сполучити декілька маркуючих ознак даної патології, оскільки стійкість до факторного захворювання (яким у більшості випадків є мастит) залежить від різноманітних механізмів патогенезу.

З відкриттям головного комплексу гістосумісності з'явилася перспектива виявляти молекулярно-генетичні маркери одразу ж після народження корови і на основі встановлених для популяції попередніми дослідженнями маркерів прогнозувати фенотипічний прояв захворювання в майбутньому.

Дослідження проведено на коровах української червоно-рябої молочної породи.

Для виявлення «інформаційних» антигенів класу I та алелів гена DRB3 BoLA-системи була сформована база з групи резистентних та сприйнятливих до захворювань вимені корів. Ідентифікація антигенів I класу BoLA-системи проводилася стандартним двоступінчатим мікроцитотоксичним тестом за Kissmeyer-Nielsen в модифікації для великої рогатої худоби. Спектр алелів гена BoLA-DRB3 вивчали за допомогою ПЛР. Комплексним аналізом «інформаційних» антигенів, виявлених в популяції, та за результатами статусметричного і біометричного аналізу встановлено BoLA-антигени асоційовані з маститом, які можуть бути запропоновані, як маркери зв'язані зі сприйнятливостю (W6 і A16) і резистентністю (A17 і A19) до захворювання. Біометричний аналіз частотного спектру алелів гена BoLA-DRB3 показав, що зі сприйнятливостю до захворювань вимені у корів червоно-рябої молочної породи асоціюються алелі гена BoLA-DRB3*07 і *08. Тісний зв'язок з резистентністю проявляють алелі *22 та *24.

Ключові слова: КОРОВИ, МАСТИТ, ГОЛОВНИЙ КОМПЛЕКС ГІСТОСУМІСНОСТІ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ, АНТИГЕНИ, АЛЕЛІ, СТАТУСМЕТРИЯ

THE USE OF IMMUNOGENETICS MARKERS FOR EXPOSURE OF COWS RESISTANT OR SENSIBLE TO MASTITIS

T. Suprovich¹, V. V. Vlizlo²

¹Podolsky State Agrarian Technical University, Kamenetz-Podolsk, 32316
T. Shevchenko str. 13, kokas2008@ukr.net

²Institute of animal biology NAAS, Lviv — 79034, 79034, V. Stusa str. 38

In the article the possibility of application of molecular-genetic methods is brought with the use of main complex of histocompatibility in diagnostics of cow mastitis.

The problem of conventional breeding cattle is the duration estimates cows. With the advent of genetic markers appeared to accelerate the pace of selection. It is known that susceptibility to mastitis cows — genetically conditioned trait. It directs research efforts to find genetic markers associated with resistance or susceptibility to mastitis cows. It becomes possible to predict the manifestation of the disease in the early stages of postnatal ontogenesis.

To improve the accuracy of prediction should combine several tagging signs of this disease, as disease resistance factor (which in most cases mastitis) depends on various mechanisms of pathogenesis.

With the discovery of major histocompatibility complex the prospect to identify molecular genetic markers immediately after birth and cows on the basis set for the populations of previous studies of markers to predict phenotypic expression of the disease in the future.

Research is conducted on the cows of the Ukrainian red-pied breed. For the exposure of «informing» antigens of class I and alleles of gene

*of DRB3 BoLA-system was created base from the group of resistant and receptive to cows udder diseases. Authentication of antigens of class I of BoLA-system was conducted by a standard two-stage microcitotoxic test after Kissmeyer-Nielsen in modification for a cattle. Spectrum by the alleles of gene of BoLA-DRB3 studied by means of PCR-analysis. By the complex analysis of "informing" antigens, educed in population and on results statusmetric and biometric analysis was identified BoLA-antigens related to mastitis, which can be used as markers qualifying receptivity (W6 and A16) and resistance (A17 and A19) to the disease. Biometric analysis of frequency spectrum of alleles of gene of BoLA-DRB3 showed that with receptivity to cows udder diseases of red-pied breed is associated with alleles of gene of BoLA-DRB3*07 and *08. Close connection with resistance is shown by alleles *22 and *24.*

Keywords: COWS, MASTITIS, MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX, MOLECULAR-GENETIC MARKERS, ANTIGENS, ALLELES, STATUSMETRIYA

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ КОРОВ РЕЗИСТЕНТНЫХ ИЛИ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ К МАСТИТАМ

Т. М. Супрович¹, В. В. Влизло²

¹Подольский государственный аграрно-технический университет, Украина, г. Каменец-Подольский — 32316, ул. Т. Шевченко, 13, kokas2008@ukr.net

²Институт биологии животных НААН, Украина, г. Львов — 79034, ул. В. Стуса, 38

В статье приведена возможность применения молекулярно-генетических методов с использованием главного комплекса гистосовместимости в диагностике маститов коров.

Проблема традиционной селекции КРС заключается в длительности сроков оценки коров. С появлением генетических маркеров возникла возможность ускорить темпы селекции. Известно, что восприимчивость коров к маститам — генетически обусловленный признак. Это устремляет усилие исследователей на поиски генетических маркеров ассоциируемых с восприимчивостью или склонностью коров к маститам. Становится возможным прогнозирование

проявления заболевания на раннем этапе постнатального онтогенеза.

Для повышения точности прогноза лучше соединять несколько маркирующих признаков данной патологии, поскольку резистентность к факторному заболеванию (каким в большинстве случаев является мастит) зависит от разнообразных механизмов патогенеза.

С открытием главного комплекса гистосовместимости появилась перспектива выявлять молекулярно-генетические маркеры сразу же после рождения животного и на основании установленных для популяции предыдущими исследованиями маркеров прогнозировать фенотипическое проявление

заболевания в будущем.

*Исследование проведено на коровах украинской красно-пестрой молочной породе. Для выявления «информативных» антигенов класса I и аллелей гена DRB3 BoLA-системы была создана база из группы резистентных и восприимчивых к заболеваниям вымени коров. Идентификация антигенов I класса BoLA-системы проводилась стандартным двухступенчатым микроцитотоксическим тестом по Kissmeyer-Nielsen в модификации для крупного рогатого скота. Спектр аллелей гена BoLA-DRB3 изучали с помощью ПЦР. Комплексным анализом «информативных» антигенов, выявленных в популяции, и по результатам статусметрического и биометрического анализа определены BoLA-антигены связанные с маститом, которые могут быть предложены, как маркеры определяющие восприимчивость (W6 и A16) и резистентность (A17 и A19) к заболеванию. Биометрический анализ частотного спектра аллелей гена BoLA-DRB3 показал, что с восприимчивостью к заболеваниям вымени у коров красно-пестрой молочной породы ассоциируются аллели гена BoLA-DRB3*07 и *08. Тесную связь с резистентностью проявляют аллели *22 и *24.*

Ключевые слова: КОРОВЫ, МАСТИТ, ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ, АНТИГЕНЫ, АЛЛЕЛИ, СТАТУСМЕТРИЯ

За даними вітчизняних авторів [1, 2], захворювання корів на мастит охоплює від 10 до 70 % стада, а 8–16 % тварин хворіють двічі та більше впродовж лактації. Кількість корів, хворих на субклінічний мастит, у 3–5 разів перевищує кількість тварин із клінічними формами патології.

Встановлено, що сприйнятливість корів до маститів — генетично обумовлена ознака. За даними численних досліджень вона передається нащадкам [3, 4].

Основна проблема в селекції великої рогатої худоби на стійкість до маститів це тривалий термін оцінки корів, який може розтягуватися на декілька років. Скорочення тривалості оцінки дає

можливість підвищити темпи селекції. Тому основна задача дослідників — пошуки ознак, що маркують стійкість або схильність корів до маститів, причому таких, які б при достатній надійності дозволяли робити терміни оцінки мінімальними. Бажано сполучити декілька маркуючих ознак із цією патологією, оскільки стійкість до факторного захворювання (яким у більшості випадків є мастит) залежить від різноманітних механізмів патогенезу [5, 6].

Відбір тварини, резистентної до захворювання, можна проводити, використовуючи різні маркери. З відкриттям головного комплексу гістосумісності з'явилася перспектива на ранньому етапі постнатального онтогенезу прогнозувати стійкість або чутливість конкретної тварини до захворювання.

Головний комплекс гістосумісності (МНС) виконує цілий ряд функцій, із яких основними є: стимуляція утворення антитіл, реакція «трансплантат проти хазяїна», гени імунної відповіді, рестрикція імунної відповіді. Антигени МНС виконують роль поверхневих клітинних маркерів, які розпізнаються цитотоксичними Т-кілерами і Т-хелперами в комплексі антигенів. Продукти генів МНС класу I є трансплантаційні антигени, розташовані на поверхні всіх соматичних клітин. Особлива роль приділяється пошуку генів усередині МНС, що впливають на імунітет і резистентність до хвороб [7, 8].

Антигени гістосумісності несуть генетичну інформацію про ступінь чутливості організму до етіологічних факторів багатьох патологій, властивих популяції. У великої рогатої худоби МНС-система розташована на 23-й хромосомі і має назву BoLA-система (Bovine Lymphocyte Antigen). Виявлення позитивних асоціацій деяких антигенів BoLA-системи з маститами сприяло занесенню їх у список BoLA-залежних захворювань [9, 10].

За останнє десятиліття значно зросла зацікавленість дослідників до

вивчення можливого зв'язку між алелями екзона 2 гена BoLA-DRB3 та стійкістю (сприйнятливостю) корів різних порід до маститів. Накопичено значний об'єм даних про наявність і характер розподілу алелів цього гена для різних популяцій, що дає змогу проводити аналіз стосовно можливого їх використання у якості генетичних ДНК-маркерів до різних захворювань [11, 12].

Мета роботи полягала у вивченні ролі та результативності застосування молекулярно-генетичних методів з використанням головного комплексу гістосумісності в діагностиці маститів корів і в селекційно-племянній роботі для підвищення резистентності великої рогатої худоби.

Матеріали і методи

Виробничі дослідження проведено в племянних і товарних господарствах Хмельницької та Чернівецької областей. Клінічні мастити виявлялися щоденним оглядом корів під час кожного доїння спеціалістами господарства. Субклінічні мастити визначалися за допомогою реакції секрету з кожної долі на молочно-контрольній пластинці з 5 % мастидином.

За результатами багаторічного дослідження популяції корів української червоно-рябої молочної породи і постійного уточнення діагнозу сформована база з 250 корів, на основі якої проведено визначення «інформаційних» антигенів I класу BoLA-системи і досліджено поліморфізм алелів гена BoLA-DRB3 у зв'язку з резистентністю і сприйнятливостю до маститів.

Ідентифікація антигенів I класу BoLA-системи проводилася стандартним двоступінчатим мікроцитотоксичним тестом за Kissmeyer-Nielsen в модифікації для великої рогатої худоби [13].

Спектр алелів гена BoLA-DRB3 вивчали за допомогою ПЛР, яку проводили із застосуванням готових наборів «GenPakR PCR Core», TOB «Лабораторія Ізоген». Для рестрикційного

аналізу фрагмента екзона 2 гена BoLA-DRB3 використовували ендонуклеази рестрикції RsaI, HaeIII, BstYI (XhoII) фірм «Promega», «New England BioLabs» і HBO «СібЕнзим». Рестрикційні фрагменти розділяли за допомогою електрофорезу в 4 % агарозному гелі [13].

Аналіз отриманих результатів здійснювали за допомогою стандартних біометричних показників [7]. Індивідуальна оцінка схильності до захворювання проводилася методом статусметрії [14].

Результати й обговорення

Вивчення спектру експресії антигенів в групах сприйнятливих і стійких до маститів корів дозволяє виділити ряд «вагомих» за частотою виявлення антигенів. У наших дослідженнях у хворих на мастити тварин найчастіше виявлялися антигени W6 (0,77), W20 (0,584), A16 і A6 (по 0,558), A14 (0,513), W31 (0,504), A21 (0,496) та A19 (0,495). Антигени A7 (0,142), A1 (0,274), A8, A12 і A13 (по 0,31) мали найменшу частоту прояву.

У резистентних корів найчастіше виявляються антигени A19 (0,752), A17 (0,65), W19 (0,584) і A21 (0,489), найменше – W2 (0,204), A1 і A12 (0,27), A9 (0,277), A7 і A10 (по 0,285), A13 (0,285) і W21 (0,292).

Частотний аналіз і порівняння між собою усього спектру антигенів гістосумісності за біометричними показниками, дозволили виявити асоціативний зв'язок із захворюваністю на мастити для наступних 5 антигенів класу I BoLA-A системи: W6 (RR=3,82; $\chi^2=23,7$), A16 (RR=2,41; $\chi^2=11,6$), W2 (RR=2,22; $\chi^2=7,78$), A6 (RR=2,06; $\chi^2=7,89$) і W31 (RR=2,01; $\chi^2=7,27$). За результатами дослідження сприятливими щодо резистентності до маститів корів є антигени BoLA A19 (RR=-3,08; $\chi^2=17,6$), A7 (RR=-2,41; $\chi^2=7,39$) і A17 (RR=-2,34; $\chi^2=10,8$) (табл. 1).

Таблиця 1

Біометричні показники антигенного спектру корів української червоно-рябої молочної породи та їх зв'язок із захворюваністю на мастити

Вид антигену (W,A)	Частота антигену, f	Критерій відповідності, χ^2	Ступінь ризику, RR	Атрибутивний ризик, AR	Етіологічна фракція, EF
W2	0,276	7,781	2,217	0,199	0,12
W6***	0,604	23,73	3,817	0,568	0,419
W8	0,424	0,001	1,006	0,002	0,001
W21	0,324	1,42	1,381	0,1	0,057
W10	0,360	0,949	0,772	-0,097	-0,051
W20*	0,496	6,398	1,913	0,279	0,175
W31**	0,412	7,271	2,014	0,254	0,157
W44	0,428	0,369	0,855	-0,069	-0,037
W14	0,380	0,061	0,938	-0,025	-0,013
W19*	0,524	4,366	0,586	-0,319	-0,153
W15	0,428	0,369	0,855	-0,069	-0,037
A1	0,272	0,006	1,022	0,006	0,003
A2	0,460	0,068	1,069	0,030	0,017
A3	0,388	0,231	0,882	-0,05	-0,027
A6**	0,460	7,895	2,060	0,287	0,181
A7**	0,220	7,387	-2,413	-0,2	-0,101
A8	0,336	0,638	0,806	-0,075	-0,04
A9	0,304	1,016	1,320	0,082	0,046
A10	0,300	0,339	1,175	0,047	0,027
A11	0,420	0,157	1,107	0,042	0,023
A12	0,288	0,475	1,213	0,054	0,031
A13	0,296	0,187	1,128	0,035	0,02
A14	0,472	1,41	1,353	0,134	0,078
A15	0,340	0,18	1,120	0,038	0,021
A16***	0,440	11,56	2,413	0,326	0,210
A17**	0,556	10,76	-2,336	-0,591	-0,256
A18	0,424	0,001	1,006	0,002	0,001
A19***	0,636	17,56	-3,084	-1,033	-0,386
A21	0,492	0,011	1,026	0,013	0,007
A22*	0,384	6,302	1,931	0,226	0,138
A23	0,480	0,004	0,985	-0,007	-0,004
A24	0,368	0,012	1,029	0,011	0,006

Примітка: * — $p \leq 0,95$; ** — $p \leq 0,99$; *** — $p \leq 0,999$; (за критерієм відповідності)

Методи популяційної генетики, які використовувалися для визначення «інформаційних» антигенів, мають принциповий недолік. Знаходиться одноваріантна модель, в якій необхідно виявити «головний» антиген серед десятків інших і зв'язати його з ознакою захворюваності або резистентності. Але схильність або стійкість до захворювання може розглядатися, як популяційна ознака тільки для певної групи тварин, об'єднаних на основі такої якості.

Важливішим, при практичному підході, є необхідність дати чітку

індивідуальну характеристику кожної тварини в стаді, відносно резистентності чи сприйнятливості до захворювання. Така оцінка визначається персональним набором антигенів кожної тварини. Перехід від популяційного аналізу до визначення індивідуальної оцінки проводиться на основі статусметрії [14].

У результаті статусметричного обробітку даних отримано набір з 11 інформативних антигенів і лінійна модель, що дозволяє визначити імунний статус корови (Z), яка має наступний вигляд:

$Z = -0,2117 - 1,6349W6 - 1,2684A16 - 0,7301W2 - 0,6912W21 - 0,6362W31 + 0,6051A8 + 0,6542W15 + 0,7231W10 + 0,9428A17 + 1,3582A7 + 1,5255A19$.

Для альтернативних станів «хворі-здорові» визначені умовні одиниці об'єкту $\alpha_1 = -0,036$ і $\alpha_2 = 0,014$. При $Z < -0,036$ — тварина сприйнятлива до маститів, а при $Z > 0,014$ — резистентна, якщо $-0,036 \leq Z \leq 0,014$ — рішення невизначене.

Відповідно до знаку індексів у лінійній моделі антигени W6, A16, W2,

W21, W31 є несприятливими, тобто їх присутність у фенотипі тварини вказує на її схильність до маститів, а антигени — A8, W15, W10, A17, A7 і A19) є сприятливими, тобто їх наявність визначає резистентність корів до захворювання. Антигени ранжовано відповідно до впливу на резистентність до маститу за коефіцієнтом B_i (табл. 2). Антиген W6 є найбільш несприятливим, а A19 сприятливим відносно стійкості до маститів.

Таблиця 2

Характер розподілу «інформаційних» BoLA-антигенів у корів червоно-рябої української породи

BoLA антигени (W,A)		f	B_i	χ^2	RR	AR	EF
«несприятливі»	W6	0,604	-1,6349	23,7	3,82	0,568	0,419
	A16	0,44	-1,2684	11,6	2,41	0,326	0,21
	W2	0,276	-0,7301	7,78	2,22	0,199	0,12
	W31	0,412	-0,6362	7,27	2,01	0,254	0,157
«сприятливі»	A17	0,556	0,9428	10,8	-2,34	-0,591	-0,256
	A7	0,22	1,3582	7,39	-2,41	-0,2	-0,101
	A19	0,636	1,5255	17,6	-3,08	-1,033	-0,386

Таким чином, комплексний аналіз статистичних, біометричних і статусметричних показників, отриманих на дослідній вибірці з 250 корів червоно-рябої української породи, дозволили виявити ряд BoLA-антигенів, які можуть бути запропоновані як маркери, асоційовані з маститами.

При популяційному аналізі породи найбільш важливими для виявлення асоціативного зв'язку з маститом будуть антигени W6 і A16, а для зв'язку з із проявом резистентності — антигени A17 і A19.

При індивідуальному аналізі схильності до захворювання найбільша ймовірність захворіти маститами буде у корів, для яких у власному фенотипі переважатимуть антигени W6, A16, W2, W31 і W21. Якщо в індивідуальному наборі матимуть перевагу антигени A19,

A7, A17, A8, W15 і W10, то слід очікувати високу резистентність корови до маститу. У будь-якому випадку, індивідуальний прояв схильності до захворювання чи навпаки буде залежати від кількості та якості (величина коефіцієнту впливу) антигенів, які виявляються в особистому наборі кожної тварини.

Характер розподілу алелів гена BoLA-DRB3 вивчали за допомогою ПЛР. У цьому дослідженні для ампліфікації ексона 2 гени BoLA-DRB3 використовували двохетапний метод проведення ПЛР із застосуванням праймерів HLO-30, HLO-31 і HLO-32. Порівняння ДНК-патернів, отриманих з використанням трьох рестрикційних ендонуклеаз RsaI, HaeIII і BstYI (XhoII), дозволяє ідентифікувати 54 аллеля гена BoLA-DRB3 (рис. 1).

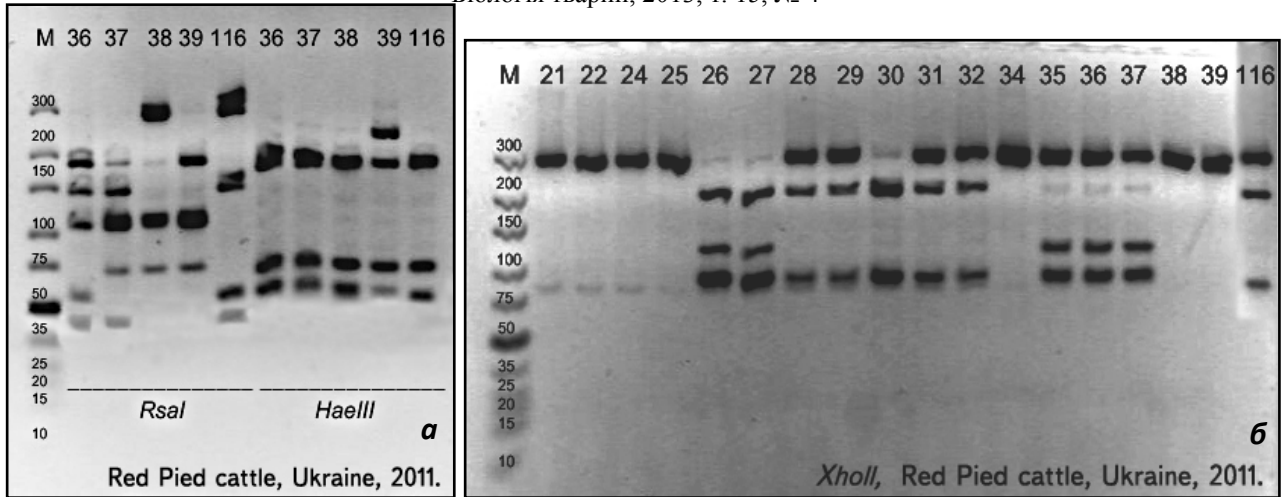


Рис. 1. Рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації ексона 2 гена BoLA-DRB3, отриманих на ДНК корів червоно-рябїї породи з використанням різних ендонуклеаз: *a* — *RsaI* і *HaeIII*; *б* — *XhoII*

У результаті дослідження методами ПЛР-ПДРФ і алель-специфічної ПЛР встановлено, що в червоно-рябїї популяції визначається 22 алелі з 54 відомих для гена

BoLA-DRB3.2, який кодує антигени II класу ГКГ великої рогатої худоби. Аналіз відповідних алелів за біометричними показниками показаний у таблиці 3.

Таблиця 3

Біометричні показники алельного спектру корів української червоно-рябїї породи та їх зв'язок із захворюваністю на мастити

Алелі BoLA-DRB 3.2	Алелі		Критерій відповідності (χ^2)	Ризик захворюваності (RR)	Перевірка вірогідності по (χ^2)			
	кількість	частота			(a+b)* (a+c)/N	(a+b)* (b+d)/N	(c+d)* (a+c)/N	(c+d)* (b+d)/N
*01	18	0,077	1,13	1,74	8,92	9,69	49,08	49,92
*03	12	0,051	1,56	2,2	5,95	6,46	52,05	52,95
*04	3	0,013	0,36	2,07	1,49	1,54	56,51	57,49
*07**	36	0,154	8,21	3,31	17,85	22,46	40,15	40,85
08	11	0,047	5,05	5,24	5,45	6,21	52,55	53,45
*09	3	0,013	0,325	0,5	1,49	1,49	56,51	57,49
*10	11	0,047	0,12	1,25	5,45	5,64	52,55	53,45
*11	22	0,094	0,814	0,65	10,91	10,34	47,09	47,91
*12	3	0,013	0,36	2,07	1,49	1,54	56,51	57,49
*15	4	0,017	0,0	1,02	1,98	2,02	56,02	56,98
*16	12	0,051	0,334	0,7	5,95	5,85	52,05	52,95
*20	3	0,013	0,36	2,07	1,49	1,54	56,51	57,49
*22***	31	0,131	11,11	-4,66	14,87	11,03	43,13	43,87
24	20	0,087	4,52	-2,96	10,41	8,97	47,59	48,41
*25	6	0,026	0,0	1,02	2,97	3,03	55,03	55,97
*27	6	0,026	2,74	-5,28	2,97	2,82	55,03	55,97
*28	8	0,034	1,03	-2,08	4,46	4,31	53,54	54,46
*32	4	0,017	0,325	0,5	1,49	1,49	56,51	57,49
*35	3	0,013	3,03	-7,25	1,49	1,44	56,51	57,49
*42	11	0,047	0,12	1,25	5,45	5,64	52,55	53,45
*43	3	0,013	3,13	7,51	1,49	1,59	56,51	57,49
45	4	0,017	4,21	9,83	1,98	2,15	56,02	56,98

Примітка : * — $P \geq 0,95$; ** — $P \geq 0,99$; *** — $P \geq 0,999$ (за критерієм відповідності)

За критерієм відносного ризику на «сильні» взаємозв'язки із сприйнятливістю чи стійкістю корів до маститів вказують 13 алелів. Значимий зв'язок із стійкістю до маститів ($RR \leq -2$) мають 5 алелів: *35 ($RR = -7,25$), *27 ($RR = -5,28$), *22 ($RR = -4,66$), *32 ($RR = -2,61$), *24 ($RR = -2,96$) та *28 ($RR = -2,08$). Значимими за критерієм χ^2 є п'ять алелів BoLA-DRB3.2, які мають рівень вірогідності понад 95 %. Найвищий рівень довірчої ймовірності у дослідженні $P = 0,999$ зафіксовано для алеля *22 ($\chi^2 = 11,1$). Ще один алель *22 має поріг достовірності $P = 0,99$ ($\chi^2 = 8,21$). Інших три алеля мають мінімальну межу вірогідності біологічних об'єктів $P = 0,95$: *08 ($\chi^2 = 5,05$), *24 ($\chi^2 = 4,52$) і *45 ($\chi^2 = 4,21$).

Вірогідно асоційованим із захворюванням вважається алель, для якого виконується умова $RR \geq 2$ $\chi^2 > 3,8$. Всього нараховується 3 таких алелів: *07 ($RR = 3,31$; $\chi^2 = 8,21$), *08 ($RR = 5,24$; $\chi^2 = 5,05$) і *45 ($RR = 9,83$; $\chi^2 = 4,21$). Для алеля *45 не виконується перевірка на обмеження використання критерію відповідності при мінімальних частотах знаходження ознаки.

Достовірно асоційованим із стійкістю до захворювання вважається алель, для якого виконується умова $RR \leq -2$ і $\chi^2 > 3,8$. Всього налічується 2 таких алеля: *22 ($RR = -4,66$; $\chi^2 = 11,1$) і *24 ($RR = -2,96$; $\chi^2 = 4,16$).

Таким чином, вивчення експресії екзона 2 гена BoLA-DRB3 у корів червоно-рябої молочної української породи показує, що для неї виявляються алелі, які мають тісний зв'язок із сприйнятливістю корів до маститів:

*07 ($RR = 3,31$; $P(A) = 0,154$; $\chi^2 = 8,21$);

*08 ($RR = 5,24$; $P(A) = 0,047$; $\chi^2 = 5,05$).

і два алеля зі стійкістю корів до захворювань вимені:

*22 ($RR = -4,66$; $P(A) = 0,131$; $\chi^2 = 11,1$);

*24 ($RR = -2,96$; $P(A) = 0,087$; $\chi^2 = 4,16$).

Висновки

1. Встановлено асоціативний зв'язок з маститами у корів української червоно-рябої молочної породи для наступних 6 антигенів головного комплексу гістосумісності: W6 ($RR = 3,82$; $\chi^2 = 23,7$), A16 ($RR = 2,41$; $\chi^2 = 11,6$), W2 ($RR = 2,22$; $\chi^2 = 7,78$), A6 ($RR = 2,06$; $\chi^2 = 7,89$) і W31 ($RR = 2,01$; $\chi^2 = 7,27$). Стійкість до маститів обумовлюється антигенами

BoLA-системи: A19 ($RR = -3,08$; $\chi^2 = 17,6$), A7 ($RR = -2,41$; $\chi^2 = 7,39$) і A17 ($RR = -2,34$; $\chi^2 = 10,8$).

2. У результаті статусметричного обробітку отримана модель імуногенетичного статусу (Z) для кожної вивченої тварини: при значенні $Z < -0,036$ тварина чутлива до маститів, а при $Z > ,014$ — резистентна. «Сприятливі» антигени — W10, W15, A7, A8, A17 і A19, «несприятливі» — W2, W6, W21, W31 і A16.

3. Комплексним аналізом «інформаційних» антигенів, виявлених у популяції корів української червоно-рябої породи, за результатами статусметричного та біометричного аналізу встановлено BoLA-антигени головного комплексу гістосумісності асоційовані з маститами, які можуть бути запропоновані, як маркери асоційовані зі сприйнятливістю (W6 і A16) і резистентністю (A17 і A19) до захворювання.

4. Біометричний аналіз частотного спектру алелів гена BoLA-DRB3 у корів червоно-рябої молочної породи показав, що зі сприйнятливістю до захворювань вимені асоціюються алелі гена BoLA-DRB3*07 ($RR = 3,31$; $\chi^2 = 8,21$) і *08 ($RR = 5,24$; $\chi^2 = 5,05$). Тісний зв'язок з резистентністю проявляють алелі *22 ($RR = -4,66$; $\chi^2 = 11,1$) та *24 ($RR = -2,96$; $\chi^2 = 4,16$).

Високий рівень поліморфізму виявлених алелів дозволяє використовувати їх у якості ДНК-маркерів при селекції, зокрема щодо стійкості до захворювання корів на мастити.

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані про антигени класу I BoLA-системи та алелі BoLA-DRB3.2, вірогідно зв'язані з захворюванням молочної залози у корів української червоно-рябої молочної породи, можуть слугувати імуногенетичними маркерами в наступних дослідженнях цієї популяції тварин, резистентних до захворювання на мастити, для створення молочного стада стійкого до захворювання вимені, а також використовуватись для встановлення

генетично схильних до захворювання вимені тварин у період раннього постнатального онтогенезу з можливістю подальшого вибракування їх з молочного стада.

1. Baidevliatova Yu.V., Kharenko M.I., Baidevliatov Yu.A. Poshyrennia mastytu u koriv riznykh porid zalezno vid viku ta funktsionalnoho stanu molochnoi zalozy [The cows of different breeds have distribution of mastitis depending on age and functional state of suckling gland] *Trudy Visnyk Sumskoho nats. ahrarnoho un-tu — Announcer of the Sumy national agrarian university*. 2009. no. 6 (25), pp. 2–16 (in Ukrainian).

2. Liubetskyi V. Y., Valchuk O. A. Rozpovsiudzhennia mastytu sered vysokoproduktyvnykh koriv [Distribution of mastitis is among high-performance cows]. *Trudy Naukovyi visnyk NAU — Scientific announcer NAY*. 2005, no. 89, pp. 294–297 (in Ukrainian).

3. Dudok A. R. Stiikist koriv ukrainskoi chervonoii molochnoi porody do mastytu [Firmness of cows of the Ukrainian red suckling breed is to mastitis]. *Trudy Visnyk ahrarnoi nauky Prychornomia — Announcer of agrarian science of black sea Region*. 2007, no. 1(39), pp. 187–191 (in Ukrainian).

4. Borozdina E. K. Glavnyy kompleks gistosovmestimosti krupnogo rogatogo skota [Main complex of histocompatibility of cattle]. Moscow, MEI Publ., 1993. 120 p. (In Russian)

5. Yepishko T. I., Yepishko O. A., Skulovets M. V., Yatsyna O. A. DNK-dyagnostika vzbuditeley i markery geneticheskoy ustoychivosti k mastitam [DNA-diagnostics of causative agents and markers of genetic firmness is to mastitises]. *Trudy Sb. nauch. trudov «Selskoye khozyaystvo — problemy i perspektivy» — Collection of scientific labours «Agriculture is problems and prospects»*, 2010, pp. 63–69 (In Belarus).

6. Zahorodnii A. P., Rudyk I. A., Nedvyha M. M., Oleshko V. P. Seleksiia molochnoi khudoby za produktyvnistiu ta stiikistiu do mastytu [A selection of suckling cattle is after the productivity and firmness to mastitis]. *Trudy Visnyk Bilotserkivskoho derzh. ahrar. un-tu — Announcer of the Bila tserkva state agrarian university*. 2006, no. 42, pp. 21–23 (in Ukrainian).

7. Ernst L. K., Shishkov V. P., Orlova A. R. [i dr.] Molekulyarno-geneticheskiye i statisticheskiye metody izucheniya Glavnogo kompleksa gistosovmestimosti krupnogo rogatogo skota v svyazi s ustoychivostyu i vospriimchivostyu k leykozam : metod.

Rekomendatsii [Molecular-genetic and statistical methods of study of the Main complex of histocompatibility of cattle in connection with stability and receptivity to the leucosis: method. Recommendations]. Moscow, MEI Publ., 1998. 29 p. (In Russian).

8. Lewin H. A. Genetic organization, polymorphism, and function of the bovine major histocompatibility complex. In The major histocompatibility complex region of domestic animal species (L.B. Schook & S.J. Lamont, eds). CRC Series in Comp. Imm. CRC Press, Boca Raton, Florida. 1996, Ch.4. P.65–98.

9. T. Yoshida, H. Mukoyama, H. Furuta [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, P. 498–509.

10. Galal K., Hameed A., Sender G., Mayntz M. Major histocompatibility complex polymorphism and mastitis resistance — a review. *Animal Sci. Papers and Reports*. 2006. V. 24. № 1, P. 11–25.

11. Sulimova G.E. DNK-markery v izuchenii genofonda porod krupnogo rogatogo skota [DNA-markers are in the study of gene pool of breeds of cattle] *Trudy Genofondy selskokhozyaystvennykh zhivotnykh: geneticheskoye resursy zhivotnovodstva — Gene pools of agricultural animals : genetic resources of stock-raising*, 2006, pp. 138–166 (In Russian).

12. Rupp R., Hernandez A., Mallard B. A. Association of bovine leukocyte antigen (BoLA) DRB3.2 with immune response, mastitis, and production and type traits in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 2007, V. 90 (2), P. 1029–1038.

13. Sulimova G. E., Zinchenko V. V. Analiz polimorfizma DNK s ispolzovaniyem metoda polimeraznoy tsepnoy reaktsii: metodicheskoye posobiye k praktikumu «DNK-markery dlya geneticheskoy pasportizatsii i uluchsheniya genomov zhivotnykh khozyaystvenno tsennykh vidov» [Analysis of polymorphism DNA with the use of method of PCR-analysis: methodical manual to practical work «DNA-markers for the genetic passport system and improvement of genomes of animals economic valuable kinds»]. Moscow, MEI Publ., 2011. 94 p. (In Russian).

14. Razorenova T. S. Statusmetriya kak instrument postroyeniya funktsionalnykh modeley klassifikatsii i analiza sostoyaniy slozhnykh ob'yektov [Statusmetriya as an instrument of construction of functional models of classification and analysis of the states of difficult objects] *Trudy Nauchno-tekhnicheskoye vedomosti SPbGTU — Scientific and technical lists of SPbGTU*. 1998, no. 2, pp. 132–137. (In Russian)