

УДК 575.113.2

© 2010

Супрович Т.М., кандидат біологічних наук

Подільський державний аграрно-технічний університет

ВПЛИВ АНТИГЕНІВ І ТА II КЛАСУ BoLA-СИСТЕМИ НА ЗАХВОРЮВАНІСТЬ НЕКРОБАКТЕРІОЗОМ У ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ

Рецензент – кандидат біологічних наук О.О. Боднар

*Досліджено розподіл антигенів класу I BoLA-системи та алелей гена BoLA-DRB3 у здорових і хворих на некробактеріоз корів. Встановлено, що асоційованими із захворюванням є антигени W2, W31, A3 та A13. Антигени MSU A6 і A17, навпаки, проявляють «протективну» роль. У стійких корів найчастіше зустрічалися алелі BoLA-DRB3.2*18, *22; зовсім не виявлялися DRB3.2*8 та *10. У групі хворих тварин найчастіше виявлялися алелі BoLA-DRB3.2*23 та *26 і зовсім не виявлялися DRB3.2*14, *15 і *17.*

Ключові слова: велика рогата худоба, некробактеріоз, головний комплекс гістосумісності, алелі BoLA-DRB3, антигени класу I і II BoLA-системи.

Постановка проблеми. За останні роки в тваринницьких господарствах України погіршилася епізоотична ситуація щодо захворювання некробактеріозом великої рогатої худоби. Основними причинними факторами виникнення й поширення некробактеріозу на території України є порушення норм годівлі або зміна її типів, несприятливі умови утримання тварин, закупівля худоби з європейських держав із метою покращання молочних якостей корів місцевих порід [2, 5].

З огляду на згадані вище причинні фактори, проблема захисту великої рогатої худоби від захворювання на некробактеріоз є надзвичайно актуальною.

Аналіз останніх досліджень і публікацій, в яких започатковано розв'язання даної проблеми. Численні дослідження із вивчення етіології некробактеріозу ВРХ підтверджують суттєву роль супутньої мікрофлори, яка істотно ускладнює перебіг хвороби, що підтверджується даними вітчизняних і зарубіжних дослідників. Донині науковці не мають єдиної думки стосовно ефективності застосування вакцинних препаратів для щеплення худоби проти некробактеріозу [4]. Одним з імуногенетичних маркерів стійкості або сприйнятливості до даного факторного захворювання можуть служити антигени головного комплексу гістосумісності, які несуть ге-

нетичну інформацію про міру чутливості організму до етіологічних чинників різних патологій, властивих популяції. Позитивні зв'язки поширюються не лише на сам факт сприйнятливості до патологічного процесу, але й несе особливості патогенезу. Гени класу II ГКГ (гени імунної відповіді) найбільше залучені в асоціації з захворюваннями. Функція антигенів класу II полягає в тому, щоб представити чужорідні білки (після внутрішньоклітинного процесінгу) Т-клітинам, які далі стимулюють відповідну імунну відповідь (гуморального типу). Вивчаються асоціативні зв'язки між антигенами BoLA-системи і маститами, сприйнятливостю до вірусу лейкозу великої рогатої худоби, туберкульозу, паразитарними хворобами, вірусною діареєю тощо [1, 3].

Завдання дослідження: визначити розподіл антигенів класу I BoLA-системи та алелей гена BoLA-DRB3 у здорових і хворих на некробактеріоз корів і виявити «інформативні» антигени, що мають асоціативний зв'язок зі сприйнятливостю й стійкістю до захворювання.

Матеріали і методи досліджень. Експериментальні дослідження проводили на коровах української чорно-рябої молочної породи масою 450-500 кг із середнім надоем 5500 літрів за лактацію, які належали племінному господарству ТОВ «Козацька долина 2006» с. Вихрівка Дунаєвського району Хмельницької області. Матеріалом дослідження антигенів класу I BoLA-системи служили лімфоцити, виділені з периферичної крові тварин. Антигени гістосумісності визначали за допомогою мікроцитотоксичного тесту за Kissmeyer-Nielsen у модифікації для великої рогатої худоби. Препарати ДНК виділяли з цілісної крові з використанням сорбенту Nucleos (набір – Diatom™ DNA Prep 200 фірм Isogene Lab. Ltd, Москва) згідно з рекомендаціями виробника. ПЛР проводили в один або два етапи з використанням набору "GenePak™ PCR Core" (Isogene Lab. Ltd, Москва). Для одноетапної ПЛР використовували праймери HLO-30 і HLO-32. Для двохетапної: перший раунд – праймери

HLO-30 і HLO-31, другий раунд – праймери HLO-30 і HLO-32. Ампліфікацію проводили з використанням готових наборів Isogene Lab. Ltd (Москва) за стандартною схемою; рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації проводили з рестриктазами RsaI, HaeIII і BstYI (XhoII). Продукти реакції розділяли за допомогою електрофорезу в 4%-му агарозному гелі (TopVision™ LE GQ agarose, Fermentas, Латвія) у присутності бромистого етидію (5 мМ/мл) і тестували в УФ-світлі. Комп'ютерну обробку даних здійснювали за допомогою пакетів програм POPGENE 3.1 і

STATISTICA 6.0.

Результати дослідження. За результатами клінічного і бактеріологічного досліджень була сформована група хворих на некробактеріоз тварин. Хворими вважали корів, у яких захворювання починалося з ураження кінцівок із подальшим прогресуванням патологічного процесу, при якому спостерігалися некротичні осередки на шкірі голови, шиї та тулубі. Дослідження антигенного спектру I класу BoLA-системи дав наступні результати (табл. 1).

1. Антигенний спектр головного комплексу гістосумісності при некробактеріозі

Вид антигена W(A)	Частота антигена, f		Критерій відповідності, χ^2	Ступінь ризику, RR	Етіологічна фракція, EF	Атрибутивний ризик, δ
	хворі (N = 22)	здорові (N = 28)				
W2*	0,227	0,036	4,281	7,941	0,122	0,199
W6	0,227	0,214	0,012	1,078	0,009	0,017
W8	0,182	0,286	0,729	0,556	-0,077	-0,145
W21	0,182	0,286	0,729	0,556	-0,077	-0,145
W10	0,182	0,143	0,139	1,333	0,026	0,045
W20	0,091	0,179	0,786	-2,174	-0,057	-0,107
W31*	0,364	0,107	4,723	4,762	0,184	0,287
W44	0,045	0,143	1,299	-3,500	-0,061	-0,114
W14	0,091	0,179	0,786	-2,174	-0,057	-0,107
W19	0,409	0,357	0,141	1,246	0,047	0,081
W15	0,273	0,250	0,033	1,125	0,017	0,030
A1	0,182	0,179	0,001	1,022	0,002	0,004
A2	0,136	0,107	0,100	1,316	0,019	0,033
A3*	0,545	0,214	5,864	4,400	0,290	0,421
A6*	0,091	0,393	5,838	-6,471	-0,229	-0,497
A7	0,045	0,143	1,299	-3,500	-0,061	-0,114
A8	0,182	0,143	0,139	1,333	0,026	0,045
A9	0,182	0,143	0,139	1,333	0,026	0,045
A10	0,182	0,179	0,001	1,022	0,002	0,004
A11	0,318	0,500	1,672	-2,143	-0,176	-0,364
A12	0,091	0,179	0,786	-2,174	-0,057	-0,107
A13*	0,455	0,179	4,468	3,833	0,221	0,336
A14	0,227	0,286	0,219	0,735	-0,044	-0,082
A15	0,318	0,286	0,062	1,167	0,026	0,045
A16	0,318	0,179	1,317	2,147	0,103	0,170
A17*	0,182	0,464	4,381	-3,900	-0,240	-0,527
A18	0,273	0,393	0,792	0,580	-0,102	-0,198
A19	0,273	0,429	1,299	0,500	-0,136	-0,273
A21	0,318	0,214	0,691	1,711	0,079	0,132
A22	0,273	0,286	0,010	0,938	-0,010	-0,018
A23	0,182	0,107	0,571	1,852	0,049	0,084
A24	0,455	0,286	1,524	2,083	0,148	0,236

Примітка: * $P \geq 0,95$ (за критерієм відповідності)

2. Характер розподілу "інформативних" *BoLA*-антигенів класу I у корів при некробактеріозі

Антигени та їх зв'язок із захворюваністю		Критерій відповідності, χ^2	Ступінь ризику, RR	Етіологічна фракція, EF	Атрибутивний ризик, δ
Несприят-ливі	W2	4,281	7,941	0,122	0,199
	W31	4,723	4,762	0,184	0,287
	A3	5,864	4,400	0,290	0,421
	A13	4,468	3,833	0,221	0,336
Сприят-ливі	A6	5,838	-6,471	-0,229	-0,497
	A17	4,381	-3,900	-0,240	-0,527

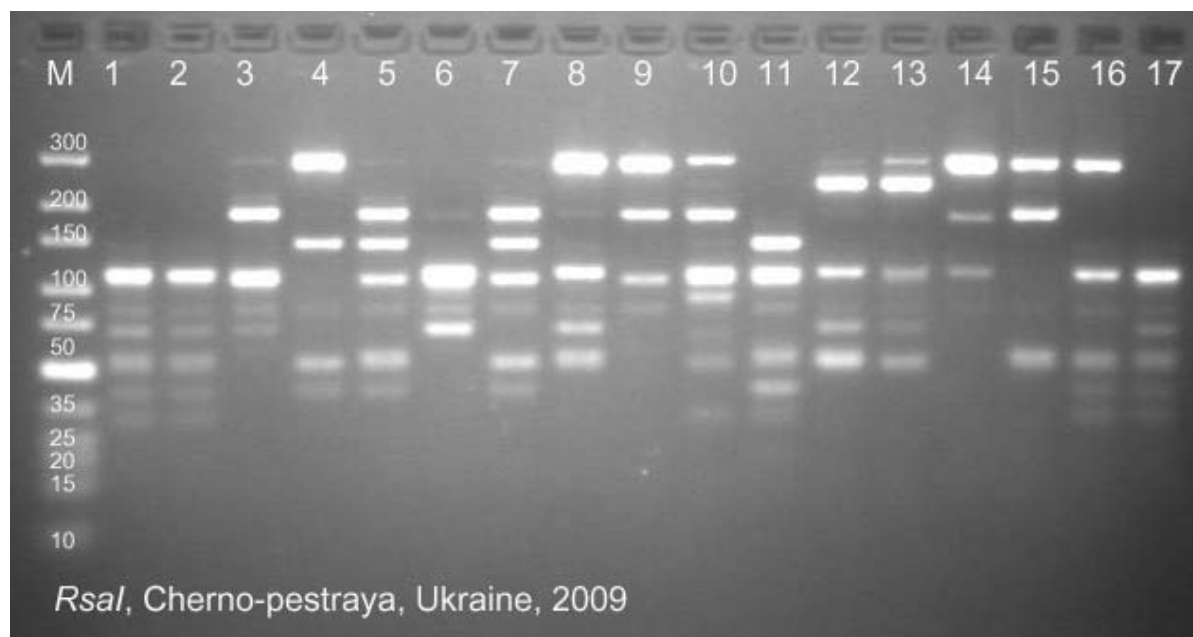


Рис. 1. Електрофореграма у 4%-му агарозному гелі ампліфікованих фрагментів ДНК після рестрикції з *Rsa I*

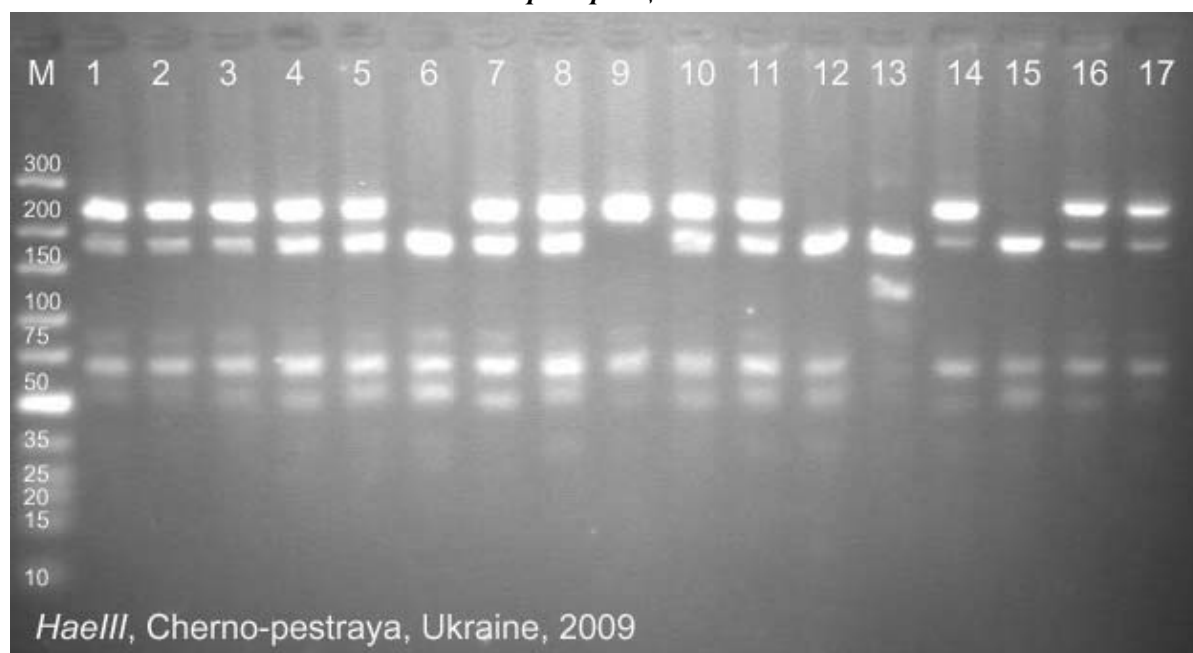


Рис. 2. Електрофореграма у 4%-му агарозному гелі ампліфікованих фрагментів ДНК після рестрикції з *Hae III*



Рис. 3. Електрофореграма у 4%-му агарозному гелі ампліфікованих фрагментів ДНК після рестрикції з *Bst YI*

У групі здорових тварин найчастіше виявлялися антигени MSU A11, A17 та A19. Найменшу „питому” вагу мали антигени W2, MSU A2 та A23. У хворих корів найчастіше визначалися антигени W19, MSU A3 та A13, найменше – W44, W14, MSU A6 та A7. Статистична значима різниця між знаходженням антигенів у сприйнятливих і резистентних корів існує для 6 антигенів (W2, W31, A3, A6, A13 і A17). Для інших антигенів різниця між їх значимістю у хворих і резистентних тварин не є достовірною.

Для виявлення “інформативних” антигенів проведено статистичний аналіз отриманих результатів за наступними біометричними показниками: ступінь відносного ризику захворюваності (RR), етіологічна фракція (EF), атрибутивний ризик (δ). Статистична обробка результатів тестування корів за антигенним спектром Головного комплексу гістосумісності показав, що несприятливими, або асоційованими з захворюванням на некробактеріоз є антигени W2, W31, A3 та A13 (табл. 2).

3. Розподіл частот алелей гена *BoLA-DRB3* у популяції корів української чорно-рябої молочної породи

Патерн по Rsa I, Bst YI, Hae III	Номер алеля	P, %	Патерн по Rsa I, Bst YI, Hae III	Номер алеля	P, %
aaa	1	2,34	lbb	20	0,78
bba	2	0,78	lbe	21	2,34
bbb	3	7,03	mba	22	8,59
caa	4	2,34	nba	23	1,56
ecc	7	6,25	nbb	24	14,84
faa	8	1,56	oab	26	3,13
fda	9	1,56	obb	28	12,50
fba	10	6,25	lab	32	1,56
gea	11	0,78	lba	36	2,34
haa	12	4,69	oba	37	3,91
hba	13	3,91	aba	41	0,78
iba	15	2,34	nbf	42	0,78
jbd	16	0,78	waa	47	0,78
lbf	18	1,56	xba	50	3,91

Антигени MSU A6 і A17 проявляють, навпаки, «протективну» роль; за наявності їх в організмі тварини залишалися стійкими, навіть якщо в фенотипі спостерігалися «несприятливі» антигени.

Розподіл алелей гена BoLA-DRB3 у корів української чорно-рябої молочної породи подано у табл. 3.

У популяції корів української чорно-рябої молочної породи найчастіше виявлялися алелі BoLA-DRB3.2*24 (14,84%), *28 (12,50%), *22 (8,59%) та *3 (7,03%), сумарна частота яких становить 43%. Частка алелей із частотами менше 5% (22 алеля) склала у сумі 44,5 %.

У стійких корів найчастіше зустрічалися алелі BoLA-DRB3.2*18 (0,208), *22 (0,208), зовсім не виявлялися DRB3.2*8 та *10. У групі хворих тварин найчастіше виявлялися алелі BoLA-

DRB3.2*23 та *26 (0,167) й зовсім не виявлялися DRB3.2*14, *15 та *17.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Отримані дані про наявність антигенів класу I BoLA-системи, що мають достовірний зв'язок із захворюванням на некробактеріоз та генетичний поліморфізм алелей BoLA-DRB3 локусу у стійких та сприйнятливих корів української чорно-рябої молочної породи, є цінним діагностичним тестом і дають можливість у ветеринарній медицині зменшити захворюваність на некробактеріоз у господарстві, а у тваринництві використовувати як розділ селекційно-генетичної програми для направленої селекції корів, стійких до даного захворювання.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Генофонды сельскохозяйственных животных: генетические ресурсы животноводства России / Отв. ред. И.А. Захаров // Ин-т общ. генетики им. Н.И. Вавилова РАН. – М. : Наука, 2006. – 462 с.
2. Риженко В.П. Анаеробні інфекції сьогодні і в майбутньому /В.П. Риженко // Ветеринарна біотехнологія. – 2006. – Бюл. № 9. – С. 227-235.
3. Слепченко А.Р. Главный комплекс гистосовместимости сельскохозяйственных животных: иммуногенетические и популяционные аспекты / А.Р. Слепченко // Успехи современной генетики. – 1994. – Вып. 19. – С. 178-205.
4. Специфическая профилактика инфекционных заболеваний конечностей КРС и овец в Российской Федерации / Панасюк С.Д., Кириллов Л.В., Сидорчук А.А. [и др.] // Сб. научн. трудов ВГНКИ. – 2005. –Т. 66 – С.265-279.
5. J.D. Behl, N.K. Verma, S.P. Ahlawat Characterization of Genetic polymorphism of the Bovine Lymphocyte Antigen DRB3.2 locus in Kankrej Cattle (Bos indicus) / Journal of Dairy Science . – 2007, Vol. 90. – № 6. – P. 2297-3301.