

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы Муслимовой Жадыры Умирбеккызы на тему «ДНК маркеры резистентности к маститам у коров и методы их идентификации», представленной на соискание степени доктора философии (PhD) по образовательной программе 8D09101 – «Ветеринарная медицина»

Актуальность темы исследования. Устойчивость к маститам у коров - сложный полигенный феномен, определяемый влиянием нескольких генов. Исследования ассоциаций генов широко используются для определения распределения геномных вариантов, включая структуру общей генетической архитектуры для определения устойчивости к маститам. Патологии молочной железы крупного рогатого скота остается одним из самых распространенных и дорогостоящих заболеваний в молочной промышленности во всем мире.

Стратегия борьбы с этим заболеванием, такие как антибиотикотерапия, вакцинация, правильное содержание скота и улучшение питания, не увенчались успехом. Генетическая устойчивость к маститам была доказана несколькими независимыми исследованиями, проведенными на разных породах молочных коров. Полигенная природа этого признака подчеркнула необходимость исследования генов-кандидатов, ответственных за устойчивость к маститам. В исследованиях ученых обсуждалось потенциальное использование следующих SNP полиморфизмов в качестве генетических маркеров: TLR4, Lactoferrin, IL-8, CXCR1, CXCR2, CCL2, IL8, BPI, MBL, CACNA2D1, BRCA1, FEZL, SEMA5A.

По данным многих авторов, маститом у коров страдает 21–70% стада, а 8–16% коров болеют им два и более раз за период лактации. В зависимости от типа возбудителя в стаде субклинический мастит встречается в 2–20 раз чаще клинического. Для определения количества соматических клеток в молоке использовались калифорнийский маститный тест и кенотест. Молоко, показавшее положительную реакцию, было проверено с помощью теста на субклинический мастит.

Молочное скотоводство играет особо важную роль в обеспечении населения продуктами питания, необходимым условием его быстрого развития является здоровье маточного стада. Известно, что широкое распространение мастита является причиной снижения надоев и качества молока, не соответствующего ветеринарно-санитарным нормам.

Одним из приоритетов направления молочного животноводства является производство высококачественного молока, соответствующего санитарно-гигиеническим нормам и требованиям перерабатывающих предприятий. К основным показателям, характеризующим качество молока, относятся содержание жира, белка, лактозы, мочевины и соматических клеток. Состав жира, белка, лактозы и мочевины в основном зависит от кормления и

генетики коров, в то время как количество соматических клеток является показателем здоровья вымени.

Цель диссертационной работы. Проведение генотипирования 400 коров молочно-товарных ферм «Байсерке-Агро» и «Амиран» Талгарского района Алматинской области, по следующим локусам генов, ассоциированных с устойчивостью к субклиническому маститу: SELL, MX1, CXCR1, TLR6, BRCA1, MASP2, изучить ассоциативные связи аллелей этих генов с содержанием соматических клеток в молоке, их связь с устойчивостью к маститу, усовершенствовать методы лечения клинического и субклинического мастита на молочно-товарных фермах, выявить патогенные микроорганизмы в экссудате при мастите методом ПЦР.

Задачи исследований: 1. Изучение полиморфизмов SELL, MX1, CXCR1, с.+291C>T, CXCR1 +1093C>T SNP, связанных с устойчивостью к головне на молочно-товарных фермах «Амиран» и «Байсерке-Агро»;

2. Амплификация локусов генов TLR6, BRCA1, MASP2 у коров и определение генетических инструкций, взаимосвязи аллелей этих генов с количеством соматических клеток у коров;

3. Выявление патогенных микроорганизмов в клиническом и субклиническом клиническом материале у коров методом ПЦР, определение антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов;

4. Определение количества соматических клеток в молоке на молочной ферме «Амиран» с помощью прибора «FOSSOMATIC™» и исследование количества остатков антибиотиков в молоке;

5. Проведение работ по изучению распространенности профилактики и лечению клинического и субклинического мастита у коров на молочно-товарных фермах «Амиран» и «Байсерке-Агро».

Материалы и методы исследований. В качестве материала для генотипирования были использованы образцы крови от коров голштинской породы (n=129) по локусу гена SELL (SNP с.567C>T) с животноводческой фермы ТОО «Байсерке-Агро». Образцы крови для генотипирования по локусу генов MX1 (n=164), CXCR1, с.+291C>T (n=42), CXCR1 +1093C>T (n=164) были получены из молочной фермы ТОО «Амиран». Данные хозяйства расположены в Талгарском районе Алматинской области, средний надой молока на этих молочных фермах составляет 9000-9500 кг за лактацию. Для выделения ДНК кровь собирали из яремной вены, а в некоторых случаях и из хвостовой вены, в объеме 2 мл в вакуумные пробирки, содержащие ЭДТА. Выделение геномной ДНК из крови проводилось в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра при Казахском национальном аграрном исследовательском университете двумя методами: классическим фенольным методом и с использованием коммерческого набора PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, согласно инструкции производителя. Качество выделенной ДНК измеряли с помощью метода микроспектрофотометрии NanoDrop™ 2000, а чистоту ДНК определяли по индикаторам A260/A280. Для определения генотипов

коров в локусах генов *SELL*, *MX1*, *CXCR1* были использованы последовательности праймеров, описанные в литературе.

Для проведения генотипирования по локусам генов *TLR6* и *BRCA1* использовались замороженные образцы крови чистопородных коров голштинской породы из фермерского хозяйства ТОО «Амиран», расположенного в Талгарском районе Алматинской области, а для локуса гена *MASP2* – биологические материалы от коров из молочно-товарной фермы «Амиран» того же района. Предложенные последовательности праймеров были использованы для генотипирования коров в локусах генов *TLR6* и *BRCA1*, а конкретные последовательности праймеров были выбраны с помощью программы Primer 3 для обнаружения аллелей гена *TLR6*.

Выявление патогенных микроорганизмов у коров, больных маститом, проводилось методом ПЦР. На начальном этапе экспериментальной работы использовались экспресс-тесты для выявления клинического и субклинического мастита, а также производился сбор секрета и экссудата из молочных желез, а также слизи из влагалищного отверстия и влагалища для молекулярно-генетических исследований. Выделение ДНК из клинического материала проводили фенольным методом или с помощью коммерческого набора. Биологический материал для ПЦР был собран от коров молочно-товарных ферм в 2023 году, а выделение ДНК проводилось в лаборатории «Зеленой биотехнологии и клеточной инженерии» Казахстанско-Японского инновационного центра КазНАЗУ. Пробы молока отбирались в стерильные пробирки во время утренней дойки и в течение 2-3 часов доставлялись в референтную лабораторию молочной продукции КазНАИУ.

Экспериментальные работы по определению количества соматических клеток и остатков антибиотиков в молоке проводились в марте-мае 2023 года на молочной ферме, расположенной в Алматинской области. Исследование проводилось на коровах голштинской породы с удоем 8500–9000 кг молока за лактацию. Для выявления субклинического мастита на молочной ферме использовались экспресс-тесты компаний *Delaval mastitis test* и *Kenotest*. Результаты экспресс-оценки качества молока основывались на изменении цвета исследуемого материала и образовании желеобразного сгустка. Тестирование на субклинический мастит проводилось ежеквартально с использованием набора для тестирования на мастит компании *DeLaval*. Определение количества соматических клеток в молоке (количество соматических клеток в молоке) проводилось с использованием лабораторного оборудования *FOSSOMATIC™*

Основные положения, выносимые на защиту:

- Результаты исследований по генотипированию, проведенных на коровах голштинской породы на молочно-товарных фермах «Амиран» и «Байсерке Агро» по следующим локусам генов: *L*-селектин, *TLR6*, *MX1*, *CXCR1*, *BRCA1*, *MASP2*, *CATHL2*, сведения о степени ассоциации аллелей этих генов с устойчивостью к клиническим и субклиническим заболеваниям у коров;

- Распространенность клинического и субклинического мастита у коров на молочно-товарных фермах «Амиран» и «Байсерке Агро», а также эффективность применяемых в производстве методов вакцинации. Результаты использования мультиплексной ПЦР для выявления микроорганизмов в клинических материалах с целью оценки вида, состава, патогенных свойств и антибиотикорезистентности микробов в клинических материалах у коров;

- Определение количества соматических клеток у отдельных коров, в их индивидуальных порциях молока и в общем объеме собранного молока на молочно-товарных фермах «Амиран» и «Байсерке Агро», количественное значение этих показателей у здоровых и больных клиническим и субклиническим маститом;

- Результаты определения остаточного количества антибиотиков в образцах молока, взятых у коров: хлорамфеникол, стрептомицин, группа тетрациклинов, группа β -лактамов;

- Результаты исследований эффективности различных схем лечения клинического и субклинического мастита у коров на молочно-товарных фермах «Амиран» и «Байсерке Агро», а также механизмы их действия.

Научные результаты, их обоснованность и новизна.

В рамках диссертационной работы впервые изучены ДНК-маркеры, ассоциированные с устойчивостью к клиническому и субклиническому маститу в крупных стадах ($n < 400$) коров голштинской породы, изучен уровень заболеваемости маститом аллелей этих генов, а также проведена ПЦР-идентификация патогенных микроорганизмов в экссудате при клиническом мастите и определение их антибиотикорезистентности.

В целом, в ветеринарии существует множество факторов, обеспечивающих устойчивость к инфекционным и неинфекционным заболеваниям, в том числе иммунитет, колостральный иммунитет у молодых животных, устойчивость, зависящая от вида и возраста животного, а также иммунитет, возникающий в результате вакцинации. Одним из важнейших из этих факторов является генетика. В диссертационной работе были изучены следующие SNP полиморфизмы, ассоциированные с клинической и субклинической устойчивостью к маститам у коров: *SELL*, *MX1*, *CXCR1*, с. +291C>T, *CXCR1* +1093C>T, *TLR6*, *BRCA1*, *MASP2*. В популяции коров исследуемой группы по данным генным локусам определяли распределение генетических вариантов, баланс генов и связь между аллелями генов и количеством соматических клеток в молоке. Микробиологические методы обычно используются для выявления патогенных микроорганизмов в молоке и других патологических экссудатах, но в данной работе для выявления патогенных микроорганизмов и оценки устойчивости этих патогенных микроорганизмов к антибиотикам применялась ПЦР.

Практическая значимость диссертационной работы заключается в том, что в молочных хозяйствах ежемесячно проводился мониторинг по определению распространенности клинических и субклинических форм мастита у коров, диагностировался субклинический мастит с помощью экспресс-методов, а также использовался метод определения количества соматических клеток в

молоке для оценки функционального состояния молочных желез. В клинической практике метод ПЦР использовался для определения возбудителя, его микробиологического состава и устойчивости к антибиотикам. Определение вида микроорганизма и проведение лечения по результатам определения его антибиотикорезистентности позволяет улучшить результаты терапии.

Соответствие основным направлениям развития науки или государственным программам.

Диссертационная работа выполнена в рамках следующих проектов грантового финансирования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан: ИРН AR09057988 «Создание методов выявления скрытых генетических мутаций у крупного рогатого скота и управление процессом устранения наследственных дефектов», (2021-2023 гг.). ИРН AP19674808 «Изучение генетики казахстанской местной породы крупного рогатого скота и создание генетических паспортов с использованием полногеномного секвенирования», (2023-2025). ИРН AP22682970 «Изучение полиморфизмов SNP, связанных с количеством соматических клеток в молоке у молочных коров», (2024-2026).

Описание вклада докторанта в подготовку каждой публикации. По материалам диссертации опубликовано 24 научных работ, 1 статья в журнале «Reproduction in Domestic Animals» на тему «Genotyping of Holstein Cows by SELL, MX1 and CXCR1 Gene Loci Associated With Mastitis Resistance», 2024; 59:e14713 <https://doi.org/10.1111/rda.14713>, входит в базу данных Scopus, два патента на изобретение РК, 3 статьи в журналах Комитета по обеспечению качества в сфере науки и высшего образования Министерства науки и высшего образования Республики Казахстан:

- Ғылым және білім, Наука и образование, Science and education журналында «Результаты генотипирования коров голштинской породы по локусам генов TLR6, BRCA1, ассоциированных с резистентностью к маститам». Том 1 № 2 (75) (2024): стр 69-83

- Ғылым және білім, Наука и образование, Science and education журналында «Практическое значение определения SCC и остаточного количества антибиотиков в молоке и детекция патогенной микрофлоры методом ПЦР», Том 1 № 4 (77) (2024): стр 126-136

- Ғылым және білім, Наука и образование, Science and education, «Голштейн тұқымдас сиырларды MX1, CXCR1 ген локустары бойынша генотиптеу нәтижелері және осы ген аллелдерінің сиырларда желінсауға төзімділікпен байланысы» Том 1 № 1-1 (78) 2025 б. 3-15

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 119 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследований, заключения, предложения для производства, списка использованных источников, приложений. Диссертация иллюстрирована 22 таблицами, 21 рисунками. Список литературы включает 176 источника.