

Международной научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых, Витебск, 25–26 апреля 2024 года. – Витебск : ВГАВМ, 2024. – С. 52-55. 2. Бакирова, И. А. Этиология и ранняя профилактика омфалита телят / И. А. Бакирова, М. А. Казанина // Аграрная наука на Севере - сельскому хозяйству : сб. мат-в VI Всероссийской научно-практической конференции (с международным участием), Сыктывкар, 26 апреля 2024 года. – Киров : Межрегиональный центр инновационных технологий в образовании, 2024. – С. 347-350.

УДК 612.017.1:575.1

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФНЫХ ВАРИАНТОВ ГЕНОВ ТОЛЛ-ПОДОБНЫХ РЕЦЕПТОРОВ 2 И 4 - ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МАРКЕРОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА К ПАРАТУБЕРКУЛЁЗНОЙ И МАСТИТНОЙ ИНФЕКЦИИ**

**Калашников А.Е., Калашников В.Е.**

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт племенного дела» (ВНИИПлем Минсельхоза России), п. Лесные Поляны, Российской Федерации

*Необходима разработка методологических подходов к прогнозированию резистентности крупного рогатого скота к инфекционным заболеваниям на основе генетических маркеров. Проведён анализ SNP в генах TLR2 и TLR4 у представителей холмогорской и голштинской пород крупного рогатого скота. Объектом исследования послужил образцы племенного поголовья холмогорской и голштинской пород. Установлены генетические вариации, связанных с резистентностью к паратуберкулезу. Выявлены ассоциации для гена TLR4: rs8193046 связан со снижением соматической контаминации ( $p=0,0005$ ), rs8193060 — с частотой мастита ( $p=0,0086$ ). Полиморфные варианты генов TLR2 и TLR4 представляют ценность как молекулярно-генетические маркеры резистентности к паратуберкулезной инфекции. Разработанная методика ПЦР-РТ-ПДФР диагностики позволит проводить масштабное генотипирование и использовать маркеры для создания селекционных программ. Ключевые слова: TLR-рецепторы, паратуберкулез, генетическая резистентность, ПЦР-диагностика, крупный рогатый скот.*

**MOLECULAR-GENETIC STUDY OF POLYMORPHIC VARIANTS OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2 AND 4 GENES AS POTENTIAL MARKERS OF RESISTANCE TO PARATUBERCULOSIS AND MASTITIS IN CATTLE**

**Kalashnikov A.E., Kalashnikov V.E.**

All-Russian Research Institute of Animal Breeding (VNIIPlem of the Ministry of Agriculture of Russia), Lesnye Polyany, Russian Federation

*The development of methodological approaches to predicting resistance of cattle to infectious diseases based on genetic markers is required. An analysis of single*

*nucleotide polymorphisms (SNPs) in the TLR2 and TLR4 genes was conducted in representatives of the Kholmogory and Holstein cattle breeds. The study involved samples from breeding stock of the Kholmogory and Holstein breeds. Genetic variations associated with resistance to paratuberculosis were identified. Associations for the TLR4 gene were revealed: rs8193046 is associated with reduced somatic cell count ( $p=0.0005$ ), rs8193060 is associated with mastitis incidence ( $p=0.0086$ ). Polymorphic variants of the TLR2 and TLR4 genes are valuable as molecular genetic markers of resistance to paratuberculosis infection. The developed real-time PCR-RFLP diagnostic method will enable large-scale genotyping and the use of markers in breeding programs.* **Keywords:** TLR receptors, paratuberculosis, genetic resistance, PCR diagnostics, cattle.

**Введение.** Актуальность исследования обусловлена необходимостью разработки методологических подходов к прогнозированию резистентности крупного рогатого скота к инфекционным заболеваниям на основе генетических маркеров. Особое внимание в работе уделено полиморфизмам генов Toll-подобных рецепторов (TLR) как ключевых компонентов системы иммунного ответа.

Ранее проведённые исследования установили корреляцию между полиморфными вариантами TLR2 (10095G>T, T385G) и снижением показателей соматической контаминации, а также частоты клинических проявлений паратуберкулёза. Выявлены значимые ассоциации между восприимчивостью к *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* и следующими генетическими маркерами: мутацией *lle680Val*, полиморфизмом 1903 T/C гена TLR2, SNP TLR4 (rs8193046, rs8193060).

При исследовании генотипа TLR2 1903 TT зафиксирована гиперэкспрессия интерлейкина 12p40, интерлейкина 1 $\beta$  и усиленная пролиферация Т-клеток. Полученные результаты подтверждены ПЦР-скринингом, который обосновал целесообразность использования четырёх полиморфизмов TLR2 и TLR4 в качестве маркеров врождённой резистентности к инфекционным заболеваниям.

**Цель и задачи исследования.** Исследование было направлено на выявление иммуногенетических маркеров врождённой резистентности крупного рогатого скота к паратуберкулёзной инфекции для их последующей интеграции в современные программы геномной селекции.

В рамках проекта проводилась идентификация аллельных вариантов генов TLR2 и TLR4, ассоциированных с устойчивостью к инфекционным заболеваниям. Выполнена оценка влияния выявленных генотипов на параметры иммунного ответа и клинико-лабораторные показатели. Разработана стандартизированная методика ПЦР-диагностики для массового генотипирования.

Результаты исследования позволили определить спектр генотипов TLR2/TLR4, связанных с повышенной резистентностью к инфекциям. Создан валидированный ПЦР-протокол для скрининговой диагностики. Сформирована база генетических маркеров для селекционных программ.

Внедрение полученных данных в ветеринарную практику способствовало оптимизации профилактических мероприятий и рационализации антибиотикотерапии в животноводстве, что привело к снижению заболеваемости животных.

**Материалы и методы исследований.** В ходе популяционно-генетического исследования выполнен комплексный анализ однонуклеотидных замен в генах Толл-подобных рецепторов (TLR2 и TLR4) у крупного рогатого скота различных пород. Методология исследования включала полимеразную цепную реакцию (ПЦР), секвенирование и биоинформационическую обработку данных.

Материалом для исследования послужили гематологические образцы племенного поголовья (быки-производители и коровы) холмогорской и голштинской пород из Архангельской области. Методологический комплекс предусматривал изоляцию ДНК, ПЦР-диагностику методами ПЦР-РТ, PCR-RFLP и электрофоретическую визуализацию рестрикции.

Проведён анализ четырёх локусов на 8-й хромосоме, ассоциированных с генами TLR4 и TLR2. Статистический анализ выявил следующие значения значимости по фенотипу: для локуса (TLR4, 4142 позиция RS8193046, паратуберкулез) [1] —  $P=0,0005$ , для локуса (TLR4, 4344 RS 8193060, паратуберкулез и мастит) [2] —  $P=0,0086$ , для локуса (TLR4, 2122 RS 55617172, паратуберкулез) [2] —  $P=0,27$ . TLR2 (позиция 2324 RS41830058, паратуберкулез) [3]. Четвёртый локус TLR2 (позиция 2324 RS41830058) [3] продемонстрировал связь с миорным аллельным полиморфизмом.

**Результаты исследований.** В ходе популяционно-генетического исследования выполнен комплексный анализ однонуклеотидных замен в генах Toll-подобных рецепторов (TLR2 и TLR4) у крупного рогатого скота различных пород. Методология исследования включала полимеразную цепную реакцию (ПЦР), секвенирование и статистическую обработку данных.

Материалом для исследования послужили гематологические образцы племенного поголовья (быки-производители и коровы) холмогорской и голштинской пород из Архангельской области. Методологический комплекс предусматривал изоляцию ДНК, ПЦР-диагностику, ПЦР-РТ, PCR-RFLP, рестрикционный анализ и электрофоретическую визуализацию.

Объектом исследования послужили гематологические образцы племенных нетелей и коров холмогорской и голштинской пород из ведущих племенных хозяйств Архангельской области. Методологический комплекс включал изоляцию ДНК из образцов крови, ПЦР-диагностику, методики ПЦР-РТ и PCR-RFLP, рестрикционный анализ и электрофоретическое разделение в 3% агарозном геле.

По результатам исследования определены характеристики полиморфизма и аналитические параметры для всех изученных локусов (таблица). Длины рестрикционных фрагментов для четырех рестриктаз и маркеров: *AcI* (4142): 384-384, 297, 87 пар оснований; *AluI* (4344): 447-447, 318, 129; *EcoRV* (2122): 245-245, 182, 63; *CviAI* (2324): 495-495, 388, 107.

В ходе молекулярно-генетического анализа популяции крупного рогатого скота голштинской породы (CHLM) выявлены закономерности распределения генетических маркеров. При исследовании локуса 2122 и локуса 2324 установлено равновесное распределение аллельных вариантов с частотами 0,446/0,554 и 0,519/0,481 соответственно.

Анализ локуса 4344 показал значительное отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, характеризующееся преобладанием второго аллеля (частота 0,77) над первым (частота 0,23). Максимальные показатели гетерозиготности зафиксированы у маркеров 2122 и 2324, минимальные — у маркера 4344.

**Таблица - Распределение аллельных и генотипических частот однонуклеотидных полиморфизмов генов Toll-подобных рецепторов (TLR2 и TLR4) в популяционной выборке крупного рогатого скота**

Порода	Аллель/ Маркер	2122 - 55617172	2324 - 41830058	4142 - 8193046	4344 - 8193060
CHLM	n	65	26	50	50
	Аллель 1	0,446	0,519	0,53	0,23
	Аллель 2	0,554	0,481	0,47	0,77
HO	n	38	20*	13*	2*
	Аллель 1	0,474	0,6	0,692	0,25
	Аллель 2	0,526	0,4	0,308	0,75

Определение эффективного размера популяции выявило значения  $N_e=1,879$  для CHLM и  $N_e=1,815$  для HO, что свидетельствует об ограниченной численности популяции и возможной генетической изоляции.

Выявлена выраженная породная специфика полиморфных вариантов генов TLR2 и TLR4, влияющая на иммунореактивность животных. Результаты исследования имеют существенное значение для разработки селекционных подходов по формированию популяций крупного рогатого скота с повышенной резистентностью к инфекционным агентам.

**Заключение.** Исследование показало высокую диагностическую ценность полиморфных вариантов генов TLR2 и TLR4 как молекулярно-генетических маркеров резистентности крупного рогатого скота к паратуберкулёзной инфекции. Полученные данные создают основу для разработки научно обоснованных селекционных подходов, направленных на повышение устойчивости животных к инфекционным агентам. Выявлена значительная межпородная гетерогенность в распределении аллельных вариантов генов TLR2 и TLR4.

Ранее были установлены статистически значимые корреляции для гена TLR4: полиморфизм rs8193046 показал достоверную связь со снижением соматической контаминации ( $p=0,0005$ ), а rs8193060 еще дополнительно ассоциирован с частотой развития клинического мастита ( $p=0,0086$ ). Для маркеров TLR2 (rs55617172 и rs41830058) статистически значимых ассоциаций не выявлено. Разработанная методика ПЦР-диагностики позволяет проводить масштабное генотипирование популяционных выборок.

#### **Грантовая поддержка.**

Исследование проведено в рамках НИОКР Минсельхоза России №125052106295-8.

**Литература.** 1. Genetic association of polymorphisms in bovine TLR2 and TLR4 genes with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in Indian cattle population / Satish Kumar [et al.] // Veterinary research communications. – 2019. – Vol. 43 (2). – P. 105-114. doi:10.1007/s11259-019-09750-2. 2. Single nucleotide polymorphism of SLC11A1, CARD15, IFNG and TLR2 genes and their association with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in native Indian cattle population / Tarun Sadana, [et al.] // Indian J. Biotechnol. – 2015. - № 14. – P. 469-475. 3. Susceptibility to paratuberculosis infection in cattle is associated with single nucleotide polymorphisms in Toll-like receptor 2 which modulate immune responses

against *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* / A. Koets [et al.] // Preventive veterinary medicine. – 2010. - Vol. 93 (4). – P. 305-15. doi:10.1016/j.prevetmed.2009.11.008.

УДК 619.616.99:636.5

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ БАЙКОКСА И САЛИНОКСА ПРИ ЭЙМЕРИОЗЕ ЦЫПЛЯТ

Калина Л.А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

*Исследования по изучению эффективности противоэймериозных препаратов байкокса и салинокса показали, что их применение способствуют постепенному снижению интенсивности инвазии и в конечном итоге полному прекращению выделения ооцист из организма птицы. При применении салинокса ооцисты эймерий перестали выделяться на 19 день исследований, при использовании байкокса это произошло на 27 день. Ключевые слова: эймериоз, цыплята, интенсивность инвазии, ооцисты.*

## COMPARATIVE EFFECTIVENESS OF BAYCOX AND SALINOX IN CHICKEN EIMERIASIS

Kalina L.A.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*Studies on the effectiveness of the anti-eimeria drugs Baycox and Salinox showed that their use contributes to a gradual reduction in the intensity of infestation and ultimately to the complete cessation of oocyst excretion. With Salinox, eimeria oocyst excretion ceased on day 19 of the study, while with Baycox, this occurred on day 27. Keywords: eimeriosis, chickens, infestation intensity, oocysts.*

**Введение.** Птицеводство является наиболее интенсивной отраслью сельского хозяйства, что обеспечивается созданием высокопродуктивных кроссов птицы и внедрением высокоинтенсивных технологий выращивания и содержания птицы. Перевод птицеводства на промышленную основу позволяет увеличить количество получаемой продукции и снизить затраты на ее производство. Это одна из самых доходных и эффективных отраслей животноводства, так как биологические особенности птицы позволяют быстро размножать ее, содержать большими группами, получать продукцию в короткие сроки, использовать разнообразные кормовые ресурсы и, наконец, широко применять механизацию и автоматизацию трудоемких процессов [1, 3].

Перевод птицеводства на промышленную основу позволяет увеличить количество получаемой продукции и снизить затраты на ее производство. Это одна из самых доходных и эффективных отраслей животноводства, так как биологические особенности птицы позволяют быстро размножать ее, содержать