

поверхности сосковой резины доильных аппаратов и станкового оборудования зависит от соблюдения технологического регламента санитарно-гигиенического ухода за доильным оборудованием, уровня автоматизации системы циркуляционного промывания и использования современных щелочных и кислотных моющих и дезинфицирующих средств.

Ключевые слова: сосковая резина, станочное оборудование, загрязненность, бактериальное обсеменение, молоко, соматические клетки.

Danye is resulted about the estimation of the sanitary-technological state of nipple rubber and machine equipment of milking options of different types. It is set that the cleanness of internal surface of nipple rubber of milking vehicles and machine equipment depends on the observance of technological regulation of sanitary-hygenic care of milking equipment, level of automation of the system of the circulation washing and use modern alkaline and acid washings and cleansers facilities.

Key words: teat rubber, machine equipment, pollution, bacterial pollution, milk, somatic cells.

Дата надходження в редакцію: 1504.2013 р.
Рецензент: д.с.-г.н., професор Г. П. Котенджи

УДК 636.2.034:616.155.392

ФОРМУВАННЯ ПОПУЛЯЦІЇ МОЛОЧНОЇ ХУДОБИ, СТІЙКОЇ ДО ЛЕЙКОЗУ

Р. В. Ставецька, к.с.-г.н., доцент;

О. В. Дубін, к.с.-г.н., докторант.

Білоцерківський національний аграрний університет

За допомогою полімеразної ланцюгової реакції можна виділити тварин генетично стійких чи сприйнятливих до вірусу лейкозу великої рогатої худоби (за геном BoLA-DRB3). Із п'яти досліджених стад української чорно-рябої молочної породи у двох виявлені корови, вражені вірусом лейкозу. Встановлено, що більшість вражених корів мають спільне походження (належать до лінії Чіфа 1427381) і характеризуються вірогідно вищим надоем порівняно із здоровими тваринами ($P \geq 0,95$). Впровадження цієї методики у селекційну практику дасть змогу створювати стада вільні від лейкозу.

Ключові слова: молочна худоба, вірус лейкозу великої рогатої худоби, ген BoLA-DRB3, стійкість до лейкозу, молочна продуктивність.

Постановка проблеми. Лейкоз великої рогатої худоби (ВЛВРХ) є одним із найпоширеніших захворювань молочної худоби, що завдає значного економічного збитку не тільки внаслідок смертності, недоодержання продуктів тваринництва, витратами на проведення протилейкозних заходів, але й небезпеки втрати унікального генфонду, оскільки хвороба уражає передусім високопродуктивних корів.

Аналіз останніх досліджень. ВЛВРХ – хронічна інфекційна хвороба, що викликається РНК-вмісним вірусом родини Retroviridae, який класифікується як вірус лейкозу великої рогатої худоби. Це захворювання може протікати безсимптомно або проявлятися лімфоцитозом і злоякісними утвореннями у кровотворних та інших органах [9]. Перші випадки ВЛВРХ у нашій країні були офіційно зареєстровані в 1965 році, і з цього часу відбувається неухильне зростання захворюваності, а численні спроби впоратися з поширенням інфекції в більшості випадків виявляються безуспішними [7].

За повідомленням В. А. Альпакина і соавт. [1] у деяких господарствах Росії інфікування худоби вірусом ВЛВРХ складає 90 %. Лейкоз становить 57 % від всіх інфекційних захворювань і спричиняє зниження продуктивності: у хворих

тварин надій знижується на 5,5–10,2 %, у інфікованих – на 2–7 %.

В Україні на початок 2008 року зареєстровано 207 неблагополучних пунктів щодо лейкозу великої рогатої худоби. Благополучними є 14 областей, серед яких: Закарпатська, Івано-Франківська, Львівська та інші, в них протягом останніх 7 років не виявлено лейкозу. Найбільш неблагополучними є Київська, Харківська, Донецька області та АР Крим [2].

Основним і єдиним методом боротьби із ВЛВРХ є вибракування хворих та ізоляція інфікованих корів, тому важливою є своєчасна та точна діагностика інфекції [6]. На сьогодні перспективним є використання сучасних молекулярно-генетичних підходів на основі ПЛР (полімеразної ланцюгової реакції).

У багатьох лабораторіях вчені ведуть пошук різних варіантів генів, які можуть прямо або побічно сприяти боротьбі з даною інфекцією. Встановлено, що розвиток лейкозу визначається головним комплексом гістосумісності (система BoLA-DRB3 – Bovine Lymphocyte Antigen), за стійкість чи сприйнятливість організму тварин до лейкозу відповідає ген BoLA-DRB3 [3].

Даний ген кодує білки, які розміщені на поверхні В-лейкоцитів і забезпечують пізнавання Т-

хелперами вірусних антигенів. Найбільш поліморфною ділянкою цього гена є екзон 2, який кодує домен β1. У цьому домені є короткі амінокислотні послідовності – мотиви, які визначають відношення алеля до лейкозу. Так, присутність мотиву ER (Glu-Agr) та RK (Arg-Lys) в позиціях 70–71 обумовлює стійкість до лейкозу. Мотиви VDTY (Val-Asp-Thr-Tyr), VDTV (Val-Asp-Thr-Val) та VDRV (Val-Asp-Val) в позиціях 75–78 того ж домена асоціюються із сприйнятливістю до лейкозу [5].

Постановка завдання. Зростання захворюваності на лейкоз і економічні збитки, які він завдає, змушують шукати нові, ефективні підходи до вирішення проблеми відбору великої рогатої худоби з підвищеною резистентністю до збудника лейкозу. Діагностика ВЛВРХ методом полімеразної ланцюгової реакції дасть змогу виявляти тварин із бажаними мотивами у гені BoLA-DRB3. Використання генетично стійких до лейкозу тварин сприятиме більш ефективному формуванню племінного ядра у стаді та групи ремонтного молодняка.

Тому метою наших досліджень був моніторинг стад молочної худоби щодо виявлення вірусу лейкозу великої рогатої худоби за допомогою методу ПЛР та можливість використання даної методики у формуванні стад молочної худоби, стійких до лейкозу.

Методика досліджень. До дослідження із діагностики вірусу лейкозу великої рогатої худоби включені п'ять господарств Білоцерківського району Київської області, де утримують тварин української чорно-рябої молочної породи. Зокрема, племзаводи ТОВ АФ «Матюші» (n=31), ТОВ «Сухоліське» (n=32), СВК ім. Щорса (n=32) і ТДВ «Терезине» (n=31), а також стадо науково-навчального дослідного центру Білоцерківського національного аграрного університету (n=30).

Предметом досліджень були проби крові корів, які завершили першу лактацію, і на момент взяття проб знаходились на другій лактації. Кров брали з хвостової вени із наступною консервацією гепарином (з розрахунку 25 МО препарату на 1 мл крові). Дослідження проведені згідно з Інструкцією з проведення тестування племінних тварин за ДНК-маркерами: Наказ Міністерства аграрної політики України від № 197 від 01.06.2004 р.

Виділення ДНК проведено за методикою M. J. Carter, I. D. Milton [8] у модифікації О. В. Дубіна, Т. М. Димань [4]. Концентрацію препаратів ДНК визначали із використанням спектрофотометра СФ-26. Ампліфікацію проводили на ампліфікаторі «Терцик» (Росія) у такому температурному режимі: початкова денатурація – 4 хв. за температури 940С; 38 циклів: 30 с за 940С, 30 с за 610С, 30 с за 720С; термінальна елонгація – 5 хв. за 720С.

Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 67 мМ Tris-HCl (рН 8,8), 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,01 %

Tween-20, 0,2 мМ дНТФ, 1,0 од. Таг-полімерази, 50 нг ДНК, 2,0 мМ MgCl₂ та по 0,2 мкМ кожного з праймерів. Для ампліфікації специфічної ділянки гену капсидної оболонки вірусу лейкозу великої рогатої худоби розміром 250 н.п. використовували праймери: BoLV1 (5'-GGTCACATATGATTGCGAGC-3') та BoLV2 (5'-ACAGAGGGAACCCAGTCACT-3'). Як позитивний контроль полімеразної ланцюгової реакції використовували ДНК тварин, позитивних на вірус лейкозу за результатами ІФА-аналізу.

Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили у 2%-му агарозному гелі за використання 1×TBE-буферу. Молекулярну масу продуктів ампліфікації визначали за маркером GeneRuler 1 kb Ladder («Fermentas», Литва) та комп'ютерної програми Gel Explorer («Літех», Росія).

Статистична обробка результатів досліджень виконана згідно методів статистичного аналізу на ПК за допомогою пакета статистичних функцій табличного редактора MS Excel.

Основний матеріал дослідження. Лейкоз найбільш поширений серед великої рогатої худоби. Це захворювання діагностують на всіх континентах світу. На лейкоз хворіють як молоді, так і дорослі тварини незалежно від породи. У даний час однією з найбільш відомих методик ліквідації лейкозу є виділення із стада хворих особин, ізольоване вирощування здорових та дотримання зооветеринарних заходів. У той же час на сьогодні до селекційних методів боротьби з цим захворюванням долучаються генетичні. Зокрема, все більшої актуальності набувають дослідження, що дають змогу виявляти поліморфізм за стійкістю або сприйнятливістю до ВЛВРХ на рівні ДНК, для цього лише достатньо знати нуклеотидну послідовність і локалізацію необхідної ділянки ДНК.

Для дослідження стійкості чи сприйнятливості до ВЛВРХ корів української чорно-рябої породи нами були сформовані вибірки у п'яти господарствах Київської області. Провівши діагностику ВЛВРХ методом полімеразної ланцюгової реакції, ми у трьох досліджених господарствах (ТОВ АФ «Матюші», ННДЦ БНАУ, ТДВ «Терезине») не виявили корів, вражених даним вірусом (табл. 1, рис. 1, 3, 5).

Таблиця 1

Результати досліджень корів української чорно-рябої молочної породи на носійство ВЛВРХ

Господарства	Всього корів, голів	Здорові, голів	Носії ВЛВРХ, голів
ТОВ АФ «Матюші»	31	31	0
ТОВ «Сухоліське»	32	24	8
ННДЦ БНАУ	30	30	0
СВК ім. Щорса	32	31	1
ТДВ «Терезине»	31	31	0
Всього	156 (100 %)	147 (94 %)	9 (6 %)

У стаді СВК ім. Щорса була виявлена одна корова, вражена ВЛВРХ (рис. 4, корова № 31), у ТОВ «Сухоліське» 8 голів (рис. 2, корови № 2, 7, 14, 17, 20, 24, 26, 29), що складає 6 % вибірки. У всіх досліджених корів ВЛВРХ був у гетерозиготному стані. Доцільно наголосити, що отримані дані співпадають із результатами, які отримані у результаті планових досліджень на лейкоз стад молочної худоби. Зокрема, у минулому ТОВ «Сухоліське» мало статус стада неблагополучного за лейкозом. На сьогодні даний статус знято, проте, як показують наші дослідження, у стаді перебувають тварини гетерозиготні за ВЛВРХ, тобто загроза спалаху цього захворювання у даному

господарстві існує і донині. Щоб уникнути цього до корів ТОВ «Сухоліське» необхідно підбирати бугаїв-плідників із бажаними мотивами у гені BoLA-DRB3, тобто генетично стійких до вірусу лейкозу.

Проаналізувавши походження корів, у яких був виявлений ВЛВРХ, було встановлено, що із 8 вражених корів у ТОВ «Сухоліське» 7 корів належать до лінії Чіфа 1427381, у тому числі чотири із них є дочками бугая-плідника Рона 2232, дві – Маркоса 131801949 і одна корова є дочкою бугая-плідника Лучка 2375. Вищезазначена генеалогічна належність вражених ВЛВРХ корів вказує на генетичну схильність до даного захворювання.



Рис. 1 – Діагностика ВЛВРХ методом ПЛР корів ТОВ АФ «Матюші»: М – маркер молекулярної маси, ПК – позитивний контроль ПЛР, 1–31 – досліджені тварини

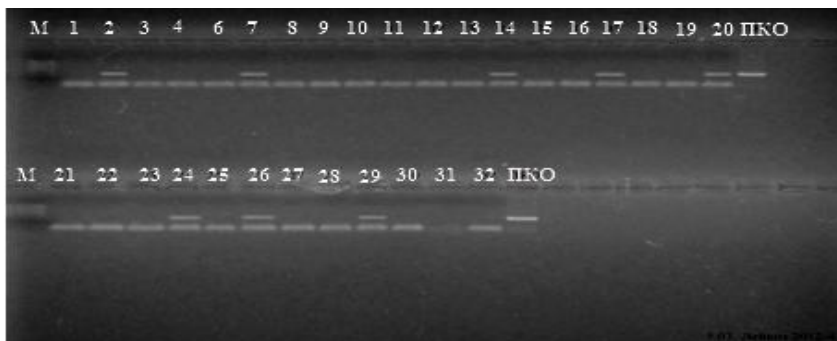


Рис. 2 – Діагностика ВЛВРХ методом ПЛР корів ТОВ «Сухоліське»: М – маркер молекулярної маси, ПК – позитивний контроль ПЛР, 1–32 – досліджені тварини

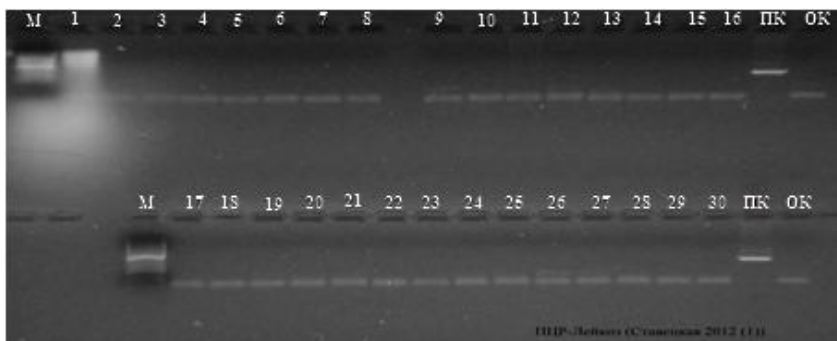


Рис. 3 – Діагностика ВЛВРХ методом ПЛР корів ННДЦ БНАУ: М – маркер молекулярної маси, ПК – позитивний контроль ПЛР, 1–30 – досліджені тварини

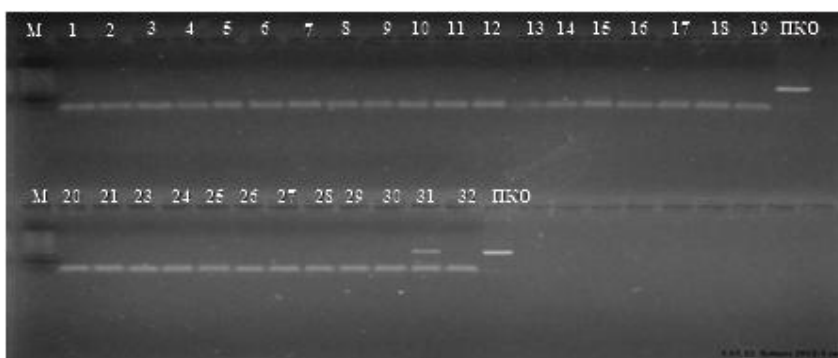


Рис. 4 – Діагностика ВЛВРХ методом ПЛР корів СВК ім. Щорса: М – маркер молекулярної маси, ПК – позитивний контроль ПЛР, 1–32 – досліджені тварини

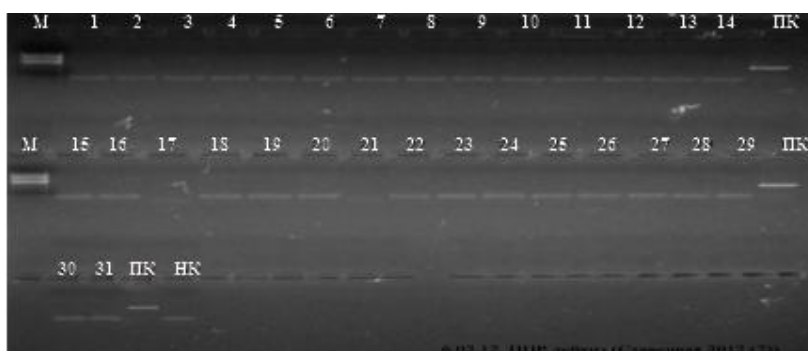


Рис. 5 – Діагностика ВЛВРХ методом ПЛР корів ТДВ «Терезине»: М – маркер молекулярної маси, ПК – позитивний контроль ПЛР, 1–31 – досліджені тварини.

У результаті власних досліджень виявлені суттєві відмінності як за величиною надою, так і масовою часткою жиру в молоці у корів досліджених стад (табл. 2).

Таблиця 2

Молочна продуктивність досліджених корів

Господарства	Надій за 305 днів першої лактації, кг				Масова частка жиру, %			
	n	здорові	n	носії ВЛВРХ	n	здорові	n	носії ВЛВРХ
ТОВ АФ «Матюші»	31	6453±110,2	–	–	31	3,34±0,013	–	–
ТОВ «Сухоліське»	24	5117±167,6	8	5601±165,6*	24	3,60±0,010***	8	3,51±0,019
ННДЦ БНАУ	30	3881±100,9	–	–	30	3,63±0,014	–	–
СВК ім. Щорса	31	7941±280,9	1	5517	31	3,42±0,030	1	3,59
ТДВ «Терезине»	31	7308±120,2	–	–	31	3,79±0,018	–	–

Примітка: * – $P \geq 0,95$; ** – $P \geq 0,99$; *** – $P \geq 0,999$.

Найнижчим надоем за першу лактацію характеризуються первістки ННДЦ БНАУ – 3881 кг, найвищим – первістки СВК ім. Щорса і ТДВ «Терезине» (+3427–4060 кг порівняно із ННДЦ БНАУ). При цьому у корів ТДВ «Терезине» відмічається найвища масова частка жиру в молоці – 3,79 %. У ТОВ «Сухоліське» надій корів, вражених ВЛВРХ, був вірогідно вищим за надій здорових тварин (+484 кг) ($P \geq 0,95$), а за масовою часткою жиру вражені корови вірогідно поступались здоровим (–0,09 %) ($P \geq 0,999$). Отримані результати співпадають з літературними даними щодо враження вірусом лейкозу в першу чергу високопродуктивних тварин. Показники продуктивності корови, враженої ВЛВРХ у стаді СВК ім. Щорса, не можуть бути вірогідними через обмеженість вибірки.

Висновки. Так як ВЛВРХ виявлений у су-

часних стадах молочної худоби, тому поряд із профілактичними ветеринарними заходами доцільно проводити селекційну роботу із підвищення резистентності молочної худоби до лейкозу. Визначення у геномі тварин алелей гену BoLA-DRB3, які відповідають за формування імунної відповіді на вірус лейкозу великої рогатої худоби, дасть змогу проводити відбір бугаїв-плідників, стійких до лейкозу, більш ефективно формувати племінне ядро у стаді та групу ремонтного молодняка. Це потребує попереднього моніторингу популяції молочної худоби за даною ознакою. Збереження і накопичення бажаних алелей у потомстві підвищуватиме стійкість молочної худоби до ВЛВРХ, а це сприяє відтворенню спадково стійких до захворювання тварин і, в кінцевому підсумку, оздоровленню всього стада.

Перспективою подальших розвідок є вив-

чення впливу генетичних факторів на стійкість чи | сприйнятливність організму тварин до ВЛВРХ.

Список використаної літератури:

1. Апалькин В. А. Лейкоз крупного рогатого скота / В. А. Апалькин, М. И. Гулюкин, Н. И. Петров. – Санкт-Петербург.: Петролазер, 2005. – 106 с.
2. Білик Р. І. Ветеринарно-санітарна оцінка молока при лейкозі великої рогатої худоби : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. вет. наук : спец. 16.00.09 «Ветеринарно-санітарна експертиза» / Р. І. Білик. – К., 2009. – 21 с.
3. Генетические механизмы устойчивости и чувствительности к лейкозу у айрширской и черно-пестрой пород крупного рогатого скота, установленные на основании распределении аллелей гена BoLA-DRB3 / И. Г. Удина, Е. Е. Карамышева, С. О. Туркова [и др.] // Генетика. – 2003. – Т. 39. – № 3. – С. 383–396.
4. Дубін О. В. Ідентифікація вірусу лейкозу великої рогатої худоби за допомогою полімеразної ланцюгової реакції / О. В. Дубін, Т. М. Димань // Аграрні вісті. – 2008. – № 3. – С. 32–33.
5. Мохаммад А. М. Дифференциация пород крупного рогатого скота по гену BoLa-DRB3 главного комплекса гистосовместимости и ISSR-маркерам: дис. ... кандидата биол. наук : 03.00.15 / Мохаммад Абади Мохаммадреза. – М., 2005. – 112 с.
6. Новак Н. Б. Біотехнологічні аспекти генетичного вдосконалення показників молочної продуктивності великої рогатої худоби: автореф. дис. на здобуття наукового ступеня канд. с.-г. наук: спец. 03.00.20 «Біотехнологія» / Н. Б. Новак. – Київ, 2010. – 20 с.
7. Трофимов О. В. Продукты эндонуклеазного расщепления ДНК как молекулярные маркеры лейкоза крупного рогатого скота [Электронный ресурс] / О. В. Трофимов // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 1. – Режим доступа к журн. : www.science-education.ru/101-5427.
8. Carter M. J. An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles / M. J. Carter, I. D. Milton // Nucleic Acids Res. – 1993. – Vol. 21. – P.1044–1046.
9. Gillet N. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human / N. Gillet, A. Florins, M. Boxus // Retrovirology. – 2007. – Vol. 16. – P. 4–18.

С помощью полимеразной цепной реакции можно выделить животных генетически устойчивых или восприимчивых к вирусу лейкоза крупного рогатого скота (за геном BoLA-DRB3). Из пяти исследованных стад украинской черно-пестрой молочной породы в двух обнаружены коровы, пораженные вирусом лейкоза. Установлено, что большинство пораженных коров имеют общее происхождение (принадлежат к линии Чифа 1427381) и характеризуются достоверно высшими удоями по сравнению со здоровыми животными ($P \geq 0,95$). Внедрение этой методики в селекционную практику позволит создавать высокопродуктивные стада свободные от лейкоза.

Ключевые слова: молочный скот, вирус лейкоза крупного рогатого скота, ген BoLA-DRB3, устойчивость к лейкозу, молочная продуктивность.

Using polymerase chain reaction helps to choose the animals genetically resistant or susceptible to the bovine leukemia virus (for gene BoLA-DRB3). From the researched herds of Ukrainian Black and White dairy breed found two herds, where cows infected by leukemia virus. In this research were found, that the most of the infected cows have a common origin (belonging to the line of Chief 1427381) and have higher milk yield compare to healthy animals ($P \geq 0,95$). The introduction of this technique in selection system will provide the creating of dairy herds with high productivity and free of bovine leukemia virus.

Key words: dairy cattle, bovine leukemia virus, gene BoLA-DRB3, resistance to bovine leukemia, milk productivity.

Дата надходження в редакцію: 12.04.2013 р.

Рецензент: д.с.-г.н., професор Ю. В. Бондаренко