

НОМЕНКЛАТУРА МАРКЕРОВ И КОНТРОЛЬ ОШИБОК ПЕРВОГО И ВТОРОГО РОДА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЭКСПЕРТИЗ ДОСТОВЕРНОСТИ ПРОИСХОЖДЕНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФРАГМЕНТНОГО АНАЛИЗА

© 2024 г. М. В. Модоров^{1, *}, И. В. Ткаченко¹, А. А. Клещева¹, М. Ю. Севостьянов¹

¹Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения
Российской академии наук, Екатеринбург, 620142 Россия

*e-mail: mmodorov@gmail.com

Поступила в редакцию 13.05.2024 г.

После доработки 18.06.2024 г.

Принята к публикации 09.07.2024 г.

Ошибочные записи родословных снижают качество племенной работы с крупным рогатым скотом, поэтому проведение генетических экспертиз достоверности происхождения стало неотъемлемой частью племенной работы. В течение многих лет на территории Российской Федерации экспертизы проводили с использованием иммуногенетических маркеров, однако совершенствование технологий и ужесточение требований регулятора привело к тому, что в последние годы на смену иммуногенетике приходят микросателлитные маркеры. В настоящее время отечественный протокол, четко регламентирующий процедуру проведения генетической экспертизы достоверности происхождения крупного рогатого скота с использованием микросателлитных локусов, отсутствует, что затрудняет работу испытательных лабораторий. В частности, требования к числу и номенклатуре генетических маркеров, которые должны быть использованы при проведении экспертиз, имеются только для скота, эмбрионов и спермопродукции, перемещаемых между государствами-членами Евразийского экономического союза. Отсутствуют требования к контролю ошибок первого (ложноположительные результаты) и второго (ложноотрицательные результаты) рода, учет которых необходим при формировании заключений экспертизы. В настоящей работе мы рассмотрим подходы к решению этих вопросов, предложенные Международным обществом генетики животных (ISAG), Международным комитетом регистрации животных (ICAR), Коллегией Евразийской экономической комиссии, а также отечественными нормативными документами, регламентирующими производство судебно-медицинских экспертиз, связанных с установлением родительства. По результатам обзора будут предложены номенклатура микросателлитных маркеров и протокол экспертизы, в который заложен контроль ошибок первого и второго рода. Особое внимание будет уделено описанию источников ошибок второго рода и необходимости их контроля при выдаче заключений.

Ключевые слова: *Bos taurus*, микросателлиты, селекция, ISAG, STR, индексы исключения родителей.

DOI: 10.31857/S0016675824120012 **EDN:** WAWXIF

К середине XX в. искусственное осеменение крупного рогатого скота прочно вошло в практику животноводства. При этом возросло количество ошибочных записей “отец — потомок”, что вносит значительное искажение как в оценку индексов наследования хозяйственно ценных признаков, так и в оценку качества быков по потомству [1, 2]. Для преодоления возникших трудностей в практику работы с племенным скотом вошли генетические тесты, использование которых позволило значительно снизить число ошибочных записей в

родословных. Вначале подобные тесты проводили с использованием иммуногенетических маркеров (групп крови). В настоящее время в качестве генетических маркеров используют STR-локусы (short tandem repeat, микросателлиты) либо SNP-локусы (single nucleotide polymorphism, однонуклеотидные полиморфизмы).

На территории РФ работа лабораторий, проводящих подтверждение достоверности происхождения скота с использованием генетических маркеров, в настоящее время требует получения

Свидетельства о регистрации в государственном племенном регистре. Ситуация изменилась с вступлением в силу Приказа Минсельхоза России № 336 от 2 июня 2022 г. “Об утверждении требований к видам племенных хозяйств”. Согласно пункту 8 данного Приказа к лабораториям молекулярно-генетической экспертизы в качестве дополнительного требования устанавливается “наличие документа об аккредитации в национальной системе аккредитации”.

К настоящему моменту отечественный ГОСТ либо методические указания, содержащие обязательные условия к процедуре подтверждения достоверности происхождения скота с использованием фрагментного анализа, отсутствуют. Это вносит значительную неопределенность при подготовке лабораторий к аккредитации, в связи с чем интерес представляет анализ требований, предъявляемых к данному типу анализов за рубежом, а также положений отечественных нормативных документов, регламентирующих производство судебно-медицинских экспертиз, связанных с установлением родительства. В настоящей работе мы рассмотрим вопросы, касающиеся научной составляющей проведения исследований достоверности происхождения крупного рогатого скота (обсуждение требований к лабораторным помещениям и организации менеджмента качества испытательных лабораторий в наши задачи не входит), а именно:

- 1) генетическая идентификация (выбор генетических маркеров, их числа и номенклатуры);
- 2) достоверность происхождения (сопоставление микросателлитных профилей с учетом контроля ошибок первого и второго рода, т. е. ложноположительных и ложноотрицательных результатов теста).

Цель настоящей работы – разработка протокола сопоставления генетических профилей предполагаемых родителей и потомка, в котором учтены интересы основных участников и выгодоприобретателей проводимых экспертиз, а именно племенной службы, сельхозпроизводителей, поставщиков спермопродукции и лабораторий, проводящих экспертизы.

*Обзор требований, предъявляемых
к проведению фрагментного анализа, связанного
с подтверждением родительства*

ISAG. Наиболее влиятельной международной организацией, определяющей тип, число и номенклатуру генетических маркеров, используемых в тестах для подтверждения достоверности происхождения сельскохозяйственных животных, является Международное общество генетики животных (International Society for Animal Genetics, ISAG). В частности, ISAG разрабатывает руководства по

управлению генетическими ресурсами сельскохозяйственных животных в интересах FAO (Food and Agriculture Organization, Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН) [3, 4].

К 2006 г. для проведения тестов на достоверность происхождения крупного рогатого скота ISAG было рекомендовано девять микросателлитных локусов: BM1824, INRA23, BM2113, SPS115, ETH10, TGLA122, ETH225, TGLA126 и TGLA227 [5]. В 2008 г. к ним было добавлено еще три локуса, а именно: BM1818, ETH3 и TGLA53 [6]. По состоянию на 2021-й год минимальное число STR-локусов, рекомендованных ISAG для подтверждения достоверности происхождения крупного рогатого скота, не изменилось, оно остается равным 12 [7]. Раз в два года ISAG разрабатывает правила и проводит сравнительные испытания (comparison tests), в ходе которых лаборатории получают пробирки с выделенной ДНК нескольких пород скота. Задачей лабораторий, добровольно участвующих в данном испытании, является корректная расшифровка неизвестных генотипов по 12 локусам, т. е. генетическая идентификация скота.

ICAR. Помимо ISAG, сертификацию лабораторий, проводящих подтверждение достоверности происхождения крупного рогатого скота, проводит ICAR (International Committee for Animal Recording, Международный комитет регистрации животных). ICAR рекомендует использовать тот же набор STR-маркеров, что и ISAG. Для аккредитации в ICAR лаборатории необходимо соответствовать более жестким требованиям, чем в ISAG, в частности, иметь сертификат аккредитации по ISO 17025. Кроме того, лабораториям необходимо проводить расчеты индексов исключения родителей (exclusion probability) как для каждого тестируемого локуса, так и для всей панели маркеров. Популяция, для которой проводят расчет индексов, должна быть охарактеризована по породной принадлежности и числу проанализированных голов, которых должно быть не менее 150 [8].

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии. Русскоязычным документом, определяющим номенклатуру локусов, используемых для подтверждения достоверности происхождения крупного рогатого скота, и требования к проводящим тесты лабораториям, является Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 2 июня 2020 г. № 74 “Об утверждении Положения о проведении молекулярной генетической экспертизы племенной продукции государств – членов Евразийского экономического союза” [9]. Согласно данному документу, проведение молекулярной генетической экспертизы осуществляется лабораториями, аккредитованными в государственных (национальных) системах аккредитации

государств — членов Евразийского экономического союза (далее государства — члены) либо ICAR (пункт 3).

Обязательной молекулярной генетической экспертизе подлежат племенные производители сельскохозяйственных животных (крупный рогатый скот, лошади, овцы, козы, свиньи, олени, верблюды), перемещаемые между государствами-членами, а также племенные производители и доноры эмбрионов сельскохозяйственных животных, спермопродукция и эмбрионы которых перемещаются между государствами-членами (п. 6). Молекулярная генетическая экспертиза племенной продукции осуществляется методом ДНК-типирования с использованием методик, разработанных с учетом рекомендаций ISAG, в соответствии с областью аккредитации лаборатории (п. 7). Проведение молекулярной генетической экспертизы с целью подтверждения достоверности происхождения племенной продукции осуществляется методом генотипирования STR-маркеров или SNP-маркеров (п. 9). Перечень STR-маркеров должен составлять не менее 12 STR-маркеров, включенных в базовую STR-панель ISAG.

В Приказе Минсельхоза России № 336 от 2 июня 2022 г. “Об утверждении требований к видам племенных хозяйств” номенклатура генетических маркеров, требуемых для проведения генетических тестов на достоверность происхождения скота, отсутствует [10]. Однако этот документ определяет группы крупного рогатого скота, для которых генетическая экспертиза достоверности происхождения должна быть проведена. Это скот, содержащийся в племенных заводах, племенных репродукторах и генофондных хозяйствах; молочные породы скота (100% ремонтного молодняка для реализации, 100% матерей быков-производителей), мясные породы скота (100% быков-производителей и коров быкопроизводящей группы).

Нормативная база, регламентирующая производство судебно-медицинских экспертиз, связанных с установлением родительства. В настоящее время (весна 2024 г.) на территории РФ действует Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 12 мая 2010 г. № 346н “Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации” [11]. Особенности порядка производства генетической экспертизы описаны в 84-м разделе данного документа. Согласно ему генетическая экспертиза по поводу спорного происхождения детей отвечает на вопросы:

1) исключается или не исключается отцовство, материнство данного индивидуума в отношении данного ребенка (плода);

2) если отцовство, материнство не исключается, то какова вероятность того, что полученный результат не является следствием случайного совпадения индивидуализирующих признаков неродственных лиц.

Данный документ не регламентирует число и номенклатуру используемых локусов, однако предъявляет требования к вероятностной оценке неисклученного родства (пп. 84.12.5 и 84.12.6). Принимается, что совпадение условно отцовских (нематеринских) аллелей в генотипе ребенка с аллелями, присутствующими в геноме предполагаемого отца, не означает доказанного отцовства. Вероятностная оценка неисклученного родства строго обязательна. Искомое условное значение вероятности отцовства соответствует байесовской постериорной вероятности при 50%-ной априорной вероятности отцовства. Уровень доказательности экспертного исследования в случае неисклучения отцовства, материнства должен составлять для полного трио (мать — ребенок — предполагаемый отец) при условии, что истинность другого родителя считается бесспорной, не ниже 99.90% (рассчитываемый как байесовская вероятность отцовства/материнства); не ниже 1000 (рассчитываемый как индекс отцовства PI). Для дуэта (ребенок — предполагаемый отец) в отсутствие другого родителя — не ниже 99.75% (рассчитываемый как байесовская вероятность отцовства/материнства); не ниже 400 (рассчитываемый как индекс отцовства PI). Согласно п. 84.12.7 при количественном анализе результата для расчета вероятности отцовства (материнства) следует учитывать этническую принадлежность обследуемых лиц. Кроме этого, в Приказе предъявляются требования к отрицательному заключению (п. 84.12.4). Для обоснованного вывода о безусловном исклучении отцовства, материнства аллели ребенка, не свойственные ни одному из указанных родителей, должны быть зарегистрированы как минимум в двух несцепленных локусах.

С 1 сентября 2024 г. на смену Приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 12 мая 2010 г. № 346н приходит Приказ № 491н от 25 сентября 2023 г. “Об утверждении Порядка проведения судебно-медицинской экспертизы” [12]. Приложение № 11 нового приказа посвящено “Правилам организации деятельности отделения генетической экспертизы и проведения генетической экспертизы”. Согласно этому документу, для вывода об исклучении отцовства или материнства аллели ребенка, не свойственные ни одному из предполагаемых родителей, регистрируются сразу в нескольких несцепленных локусах. Для вывода о том, какое лицо является родителем данного ребенка, необходима вероятностная оценка наблюдаемого

совпадения/несовпадения индивидуальных профилей полиморфизма ДНК сравниваемых биологических объектов в рамках интерпретационной модели противоположных версий: по умолчанию — версии несовпадения аллелей по причине нарушения базовых закономерностей их совпадения и версии аллельного несовпадения у не состоящих в родстве лиц. Расчетная вероятностная оценка рассматриваемых версий спорного родительства (исключение/неисключение отцовства или материнства) соответствует условной байесовской апостериорной вероятности при 50%-ной априорной вероятности родительства. При количественном анализе результата для расчета вероятности отцовства (материнства) учитывается этническая принадлежность обследуемых лиц. Методическое содержание и объем исполнения завершеного исследования спорного происхождения детей предусматривают в типовом случае анализа генотипирование у каждого из обследуемых лиц не менее 16 несцепленных полиморфных tandemных локусов-маркеров аутосомной ДНК.

Проанализированные материалы позволяют говорить о том, что к настоящему времени существует консенсус в номенклатуре микросателлитных маркеров, используемых для проведения экспертиз на достоверность происхождения крупного рогатого скота, а именно использование не менее 12 локусов базовой панели ISAG. В то же время в отличие от требований, предъявляемых к проведению судебно-медицинских экспертиз, контроль ошибок первого и второго рода у крупного рогатого скота не регламентирован.

Источники ошибок при сравнении генотипов предполагаемых родителей и потомка

При проведении экспертизы достоверности происхождения крупного рогатого скота необходимо контролировать ошибки первого и второго рода. Ошибка первого рода (ложноположительное заключение) — ситуация, в которой подтверждается родительство особи, которая родителем не является. Ошибка второго рода (ложноотрицательное заключение) — выдача отрицательного заключения на настоящего родителя. При проведении судебно-медицинских экспертиз для контроля ошибки первого рода вводятся пороговые значения индексов байесовской вероятности отцовства/материнства либо индекса отцовства (PI). Кроме этого, в Приказе № 491н от 25 сентября 2023 г. вводится требование к минимальному числу локусов, используемых для анализа. Для контроля ошибки второго рода вывод об исключении отцовства или материнства может быть сделан в случае наличия у ребенка аллелей, не свойственных ни одному из предполагаемых родителей, сразу в нескольких несцепленных локусах (минимум двух).

В исследованиях крупного рогатого скота для контроля ошибки первого рода ICAR требует рассчитывать индексы исключения родителей, однако в просмотренных документах нам не удалось найти порогового значения индексов, превышение которого необходимо для оформления заключений. Контроль ошибки второго рода у крупного рогатого скота при использовании панели STR-маркеров, по-видимому, не проводится. Однако при использовании для анализа SNP-маркеров допускается, что подтверждение родительства происходит при отсутствии общих аллелей в двух из 186 протестированных локусов, при несовпадении аллелей в трех — пяти локусах предполагаемый родитель получает статус “сомнительный” (doubtful) и только при несовпадении более пяти локусов родитель исключается [8].

*Индексы исключения родителей
(контроль ошибки первого рода или выдача ложноположительных заключений)*

Наличие общих аллелей по каждому исследованному локусу у предполагаемого родителя и потомка может быть объяснено двумя способами:

- 1) потомок происходит от предполагаемого родителя;
- 2) аллели у анализируемых индивидов совпали случайно.

Высокая вероятность случайного совпадения аллелей у предполагаемого родителя и потомка приведет к высокой частоте ложноположительных экспертных заключений, подтверждающих происхождение крупного рогатого скота (т. е. к статистической ошибке первого рода). Для контроля этой ошибки при проведении судебно-медицинских экспертиз требуется рассчитать индекс байесовской вероятности отцовства/материнства либо индекс отцовства (PI). Эти индексы рассчитываются с учетом частоты встречаемости каждого обнаруженного аллеля в популяции (этноте) [13–15]. Таким образом, при использовании единой панели генетических маркеров в каждой проведенной экспертизе эта вероятность требует отдельного расчета.

ICAR следует иному подходу и для контроля ошибки первого рода предлагает рассчитывать индексы исключения родителей [8]. Формулы, позволяющие оценить эти индексы, приведены на сайте ISAG [16], более подробную информацию об этих формулах можно найти в работе Джеймсона и Тэйлора [17]. Эти индексы характеризуют locus (а не аллель), поэтому могут быть рассчитаны для определенной популяции единойжды. По сути индексы исключения родителей показывают вероятность того, что у случайно отобранных в

популяции особей в тестируемом локусе не будет сходного аллеля [18].

Отметим, что значительную путаницу при использовании индексов исключения родителей вносит то, что в публикации Джеймсона и Тэйлора все они называются просто “Р”, без какого-либо дополнительного буквенного или цифрового обозначения. В настоящей работе вслед за разработчиками программы GenAlEx 6.5 [19] мы будем называть эти индексы $P1$, $P2$, $P3$, что соответствует последовательности написания формул в работе [17].

1. Формула, используемая для расчета индекса исключения родителей, определяется тем, какие особи были выбраны для сравнения генотипов. В наиболее простом случае проводят сравнение генотипов потомка и **одного** предполагаемого родителя (данные о втором родителе в этом тесте не важны, формула 1, индекс $P2$).

$$P2 = 1 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^2 + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^3 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^4, \quad (1)$$

где p_i — частоты аллелей в тестируемом локусе.

2. Во второй ситуации тестируется происхождение потомка от двух предполагаемых родителей (индекс $P3$, формула 2), т. е. вероятность отсутствия у потомка хотя бы одного аллеля, один из которых сходен с аллелем предполагаемого отца, а другой с аллелем предполагаемой матери:

$$P3 = 1 + 4 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 4 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^6 - 8 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 8 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right) + 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^3 \right)^2, \quad (2)$$

где p_i — частоты аллелей в тестируемом локусе.

В практической работе лабораторий, специализирующихся на проведении генетических экспертиз на достоверность происхождения крупного рогатого скота, абсолютное большинство тестов описывается двумя вышеприведенными формулами.

3. Формула 3 (индекс $P1$) применима в ситуации установления отцовства, когда проверке подлежит не два родителя, а только один (например, в происхождении ребенка от матери сомнений нет, а вот отец сомнения вызывает). При этом известны генотипы всей триады: потомок, известный родитель и предполагаемый родитель. В практической работе по проведению генетических экспертиз на достоверность происхождения крупного рогатого скота с подобной ситуацией мы не сталкивались,

однако при проведении судебно-медицинских экспертиз этот индекс может быть использован:

$$P1 = 1 - 2 \sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2 \sum_{i=1}^n p_i^4 - 3 \sum_{i=1}^n p_i^5 - 2 \left(\sum_{i=1}^n p_i^2 \right)^2 + 3 \sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3, \quad (3)$$

где p_i — частоты аллелей в тестируемом локусе.

С ростом значения индекса растет его информативность для решения задач по проведению генетических экспертиз на достоверность происхождения крупного рогатого скота. Если в исследовании использовано несколько (n) локусов, то для оценки индексов исключения родителей с использованием всей панели маркеров может быть применена формула:

$$P = 1 - \prod_{k=1}^n (1 - P_k), \quad (4)$$

где P_k — значение индекса в каждом тестируемом локусе.

В табл. 1 приведены рассчитанные значения индексов исключения родителей для популяции племенного голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской области. Для расчетов использована база данных, включающая генотипы 24544 голов скота, расшифровка которых была проведена в лаборатории молекулярно-генетической экспертизы Уральского НИИСХ — филиала ФГБНУ УрФАНЦ УрО РАН в период с 2017 по 2021 г. Методика генотипирования и описание популяции приведены нами ранее [20].

Индекс $P3$ для панели, включающей 12 рекомендованных ISAG локусов, составляет 0.999999705. Это значение позволяет сформировать ожидания относительно результатов 10 миллионов сравнений генотипов, случайно взятых из популяции отцов, матерей и потомка. Результаты 9 999 997 подобных сравнений покажут, что хотя бы в одном локусе триады отец — мать — потомок для потомка нельзя будет подобрать аллели, наследуемые от предполагаемого отца и предполагаемой матери. В трех оставшихся тестах в каждом локусе потомка будет обнаружен аллель, сходный с аллелем предполагаемого отца и предполагаемой матери (ложноположительное сходство).

Значение индекса $P2$ для панели, включающей 12 рекомендованных ISAG локусов, составляет 0.9946. Это значение показывает, что при сравнении генотипов, случайно взятых из популяции матери и потомка, в 9946 тестах из 10000 будет получен результат, в котором хотя бы в одном локусе не будет обнаружен общий аллель, а в 54 оставшихся тестах общий аллель будет обнаружен во всех

Таблица 1. Индексы исключения родителей в популяции голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской области по данным изменчивости 24544 голов. Значения индексов приведены для каждого локуса, для панели из 12 локусов, рекомендованных ISAG, а также панели из 15 локусов, входящих в набор COrDIS Cattle

Локус	Индексы исключения родителей		
	<i>P1</i>	<i>P2</i>	<i>P3</i>
BM1824*	0.47	0.30	0.65
BM2113*	0.55	0.37	0.74
ETH3*	0.44	0.27	0.62
ETH10*	0.58	0.40	0.77
ETH225*	0.44	0.27	0.63
INRA23*	0.53	0.35	0.71
SPS115*	0.34	0.18	0.53
TGLA53*	0.71	0.55	0.88
TGLA122*	0.68	0.52	0.86
TGLA126*	0.33	0.19	0.50
TGLA227*	0.66	0.48	0.84
BM1818*	0.35	0.21	0.52
Csrm60	0.42	0.25	0.61
Cssm66	0.52	0.34	0.72
Ilsts006	0.40	0.24	0.57
12 локусов	0.999868	0.9946	0.99999705
15 локусов	0.999978	0.9979	0.999999986

Примечание. * – локус включен в базовую панель ISAG.

локусах. Это же касается пары предполагаемый отец – потомок.

Высокие значения индексов *P3*, полученные для панели, включающей как 12, так и 15 локусов, на наш взгляд, позволяют проводить не только подтверждение достоверности происхождения, но и восстановление пары родителей (подбор родителей на основании данных о генотипах скота в стаде). Уровни значений индексов *P2* позволяют проводить подтверждение достоверности происхождения в популяции, но недостаточны для восстановления родителя. Отметим, что индексы исключения родителей у локальных пород скота во многих случаях ниже, чем у голштинской породы либо голштинизированного скота [21].

Контроль ошибки второго рода (ложноотрицательные заключения)

Причинами отсутствия общих аллелей у родителя и потомка могут быть *de novo* мутации, главным образом изменение в числе мотивов микросателлита, мутации в последовательности ДНК, комплементарной последовательности праймера, ошибки генотипирования, путаница при отборе проб и составлении описей.

Мутационный процесс. Частота мутаций в динуклеотидных микросателлитных локусах у человека составляет 7.88×10^{-5} на поколение или одно событие на 12690 проведенных локус-тестов. Наиболее часто мутационное событие заключается в изменении числа мотивов микросателлита на один, при этом четкой линейной связи числа повторов с числом мутационных событий для динуклеотидных повторов не отмечено [22]. Если принять сходный уровень скорости мутационного процесса у человека и крупного рогатого скота, то при использовании панели, включающей 12 микросателлитных локусов, мы вправе ожидать около одного мутационного события примерно на 1000 (1×10^{-3}) проведенных тестов (точнее на 1058 тестов, 12690 событий / 12 локусов в тесте = 1058). Таким образом, при выставлении требований к 100%-ному совпадению аллелей во всех 12 локусах крупного рогатого скота ложноотрицательные результаты будут получены в каждом тысячном сравнении родителя и потомка либо в каждом 500-м тесте при сравнении двух родителей и потомка. Отметим, что в одном из миллиона проведенных тестов ($1 \times 10^{-3} \times 1 \times 10^{-3} = 1 \times 10^{-6}$) вследствие мутационного процесса будет наблюдаться несовпадение аллелей в двух локусах.

Мутационный процесс может привести к изменениям в последовательности ДНК, комплементарной последовательности праймера. Следствием мутации может стать либо снижение высоты пика, либо его выпадение (так называемые нуль-аллели). В этом случае гетерозиготный генотип будет считан как гомозигота. Маркером нуль-аллелей может быть отклонение числа наблюдаемых генотипов от их числа, рассчитанного с использованием уравнения Харди–Вайнберга, в сторону увеличения доли гомозигот либо, если нуль-аллели встретятся в гомозиготе, отсутствие пиков в данном локусе. В случае наследования нуль-аллеля генотип потомка будет выглядеть как гомозигота по аллелю, унаследованному от другого родителя. На рис. 1 рассмотрены гипотетические примеры ошибок второго рода, связанных с наличием нуль-аллелей. Отметим, что часть этих ошибок может быть связана с использованием наборов реагентов различных производителей. При этом как ISAG, так и ICAR вводят номенклатуру праймеров [4, 8], однако последовательности праймеров в производимых в РФ

[illegible]

Рис. 1. Гипотетический пример ошибок второго рода (ложноотрицательное заключение о происхождении потомка от заявленных родителей), связанных с присутствием мутаций в последовательности ДНК, комплементарной последовательности праймера. В первом тесте при определении генотипа быка (♂), коровы (♀) и потомка (F1) был использован набор реагентов “а”, в состав которого входит праймер, в месте комплементарного связывания которого с матрицей ДНК у быка произошла мутация (показана стрелкой). В результате мутации фрагмент размером 66 пн не амплифицируется (нуль-аллель). Генотип быка, обозначенный числом мотивов во фрагменте, будет прочитан как “10 / 10” (гомозигота), хотя фактически его генотип “8 / 10” (гетерозигота). Генотип коровы с использованием этого набора реагентов читается без ошибок “4 / 12”. Потомок наследует аллель “8” быка и аллель “4” коровы. При расшифровке генотипа потомка этим же набором реагентов считывается генотип “4 / 4”, так как аллель “8” не амплифицируется из-за мутации в месте комплементарного связывания праймера с матрицей ДНК (вариант F1^а). Получившиеся данные позволяют сделать заключение об отсутствии в данном локусе общих аллелей у быка и потомка. В другой лаборатории использовали генетические паспорта родителей, а генотип потомка анализировали с использованием другого набора реагентов “b”. В наборе реагентов “b” для анализа данного локуса разработчики включили другие праймеры, комплементарные иным последовательностям матричной ДНК, в результате чего у потомка читаются оба аллеля как “4”, так и “8” (F1^b). Однако и в этой ситуации будет сделан вывод об отсутствии в данном локусе общих аллелей у быка и потомка.

коммерческих наборах реагентов, предназначенных для мультиплексного анализа микросателлитных маркеров крупного рогатого скота, а именно: COrDIS Cattle (ООО “Гордиз” [23]) и Gene Profile Cattle (НПК Синтол [24]), являются коммерческой тайной разработчиков.

Ошибки расшифровки. При анализе больших массивов данных ошибки неизбежны. В случае анализа изменчивости микросателлитов они могут быть связаны с малым числом копий выделенной ДНК, присутствием загрязнения в ходе ПЦР, низким качеством электрофореза, плохой калибровкой генетического анализатора и т. п. Оценить

частоту встречаемости этих ошибок достаточно проблематично.

Отдельно следует рассмотреть ошибки, связанные с многоплодной беременностью у коров. Около 90% дизиготных близнецов крупного рогатого скота имеют в эмбриональный период плацентарные сосудистые связи, в результате чего происходит взаимный обмен первичными кровеобразующими клетками, которые приживляются в кроветворной ткани [1]. Для клеток крови таких животных характерен химеризм, т. е. клетки их крови состоят из генетически разнородных клеток, происходящих от двух зигот. В случае различного пола эмбрионов это приводит к появлению фримартинизма, с последующей выбраковкой телок из племенного генофонда [25]. В случае многоплодной беременности двумя телочками животные могут оставаться в стаде и проходить генетические тесты. При выделении ДНК близнецов из крови фореграмма выглядит как образец, загрязненный одним другим образцом, при этом высота пиков может заметно различаться (рис. 2, а). Фактически подобное “загрязнение” произошло в утробе матери, поэтому все присутствующие у потомков аллели встречаются и у родителей. При выдаче генотипов близнецов есть соблазн включить в генетический паспорт аллели, соответствующие наиболее высокому пику. В случае если близнец анализируется как потомок, это не кажется плохим решением, так как все аллели потомка соответствуют аллелям родителей. Но когда подобные генетические паспорта предоставляются фермером в качестве генотипов родителей, довольно часто оказывается, что потомки наследуют аллели, высота пиков которых на фореграмме едва выше уровня “шума” (рис. 2). В случае проведения тестов в одной лаборатории такие случаи могут быть “расследованы”, однако при работе с генетическими паспортами, полученными из иных лабораторий, “феномен близнецов” может привести к выдаче ложноотрицательных заключений.

Согласно нашим прямым оценкам, на территории Свердловской области в период с 2000 по 2020 г. появление двух живых телок было отмечено чуть более чем в 1% отелов племенного голштинизированного черно-пестрого скота [26]. Таким образом, стволовые клетки крови более 2% популяции телок региона могут быть химерами и представлять сложности для расшифровки генотипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активное перемещение спермопродукции, эмбрионов и поголовья крупного рогатого скота между странами и регионами одной страны делает целесообразной унификацию генетических маркеров, используемых для проведения тестов на достоверность происхождения животных. Наиболее влиятельной международной организацией,

определяющей тип, число и номенклатуру данных маркеров, является ISAG. На сегодняшний день ISAG рекомендует использовать панель, включающую не менее 12 микросателлитных локусов, а именно: BM1824, INRA23, BM2113, SPS115, ETH10, TGLA122, ETH225, TGLA126, TGLA227, BM1818, ETH3 и TGLA53. Эти же локусы входят в панели маркеров, рекомендованных к использованию ICAR и Коллегией Евразийской экономической комиссии. На территории РФ производят два коммерческих набора реагентов, предназначенных для мультиплексного анализа микросателлитных маркеров крупного рогатого скота, а именно: COrDIS Cattle (ООО “Гордиз” [23]) и Gene Profile Cattle (НПК Синтол [24]). В эти наборы, помимо локусов, рекомендованных ISAG, включены дополнительные маркеры, а именно: Csrn60, Csm66, Ilst006 (COrDIS Cattle) и Csrn60, Csm66, Ilst006, HAUT27 (Gene Profile Cattle). Целесообразность использования для проведения экспертиз на достоверность происхождения скота всех входящих в набор генетических маркеров, либо только 12 локусов, рекомендованных ISAG, определяет вероятность совершения ошибки первого или второго рода при сопоставлении микросателлитных профилей и выдаче заключений о подтверждении либо исключении предполагаемых родителей.

Для контроля ошибки первого рода ICAR и ISAG рекомендуют использовать индексы исключения родителей, однако нам не удалось найти пороговые значения индексов, превышение которых необходимо для выдачи заключения. Оценка индекса $P3$ в популяции голштинизированного черно-пестрого скота Свердловской области при использовании панели, включающей 12 локусов, рекомендованных ISAG, составляет 0.99999705 (табл. 1). На наш взгляд, столь высокое значение индекса не только не требует использования в тесте дополнительных генетических маркеров, но также позволяет проводить восстановление родословной потомка. Значение индекса $P2$ для этой же популяции составляет 0.9946. Эта величина не столь велика, в связи с чем расширение панели генетических маркеров, используемых при сравнении генотипов одного предполагаемого родителя и потомка, является целесообразным. При расширении панели маркеров стоит учитывать, что большинство генетических паспортов быков, выданных за пределами РФ, не включают в себя информацию об изменчивости “дополнительных” локусов, входящих в наборы COrDIS Cattle и Gene Profile Cattle. В связи с этим актуальным становится вопрос о возможности восстановления генотипов быков по “дополнительным” маркерам на основании информации о генотипах подтвержденных потомков и их матерей подобно тому, как это происходило в эпоху иммуногенетики [1]. Альтернативным вариантом

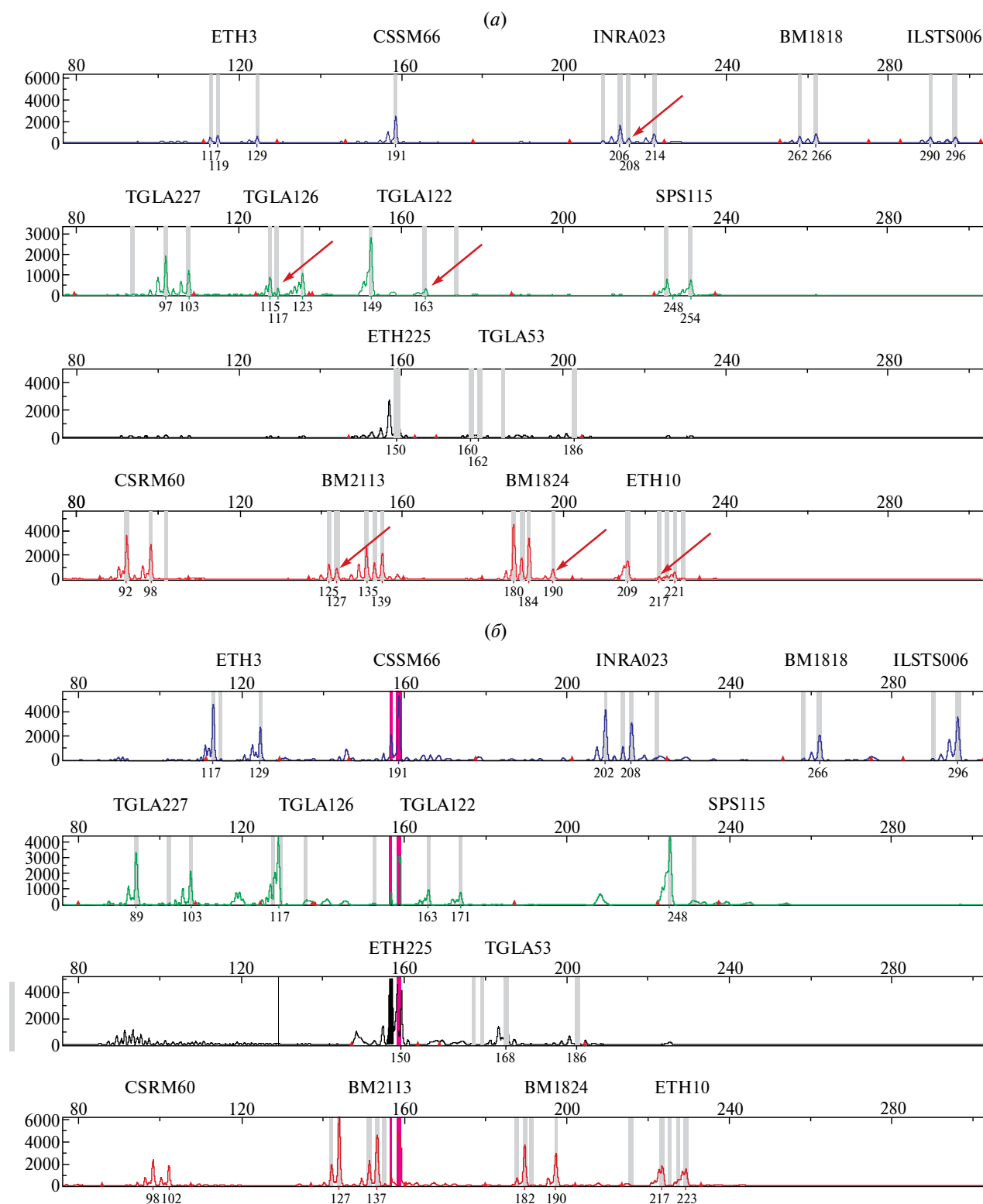


Рис. 2. Результаты фрагментного анализа, проведенного с использованием набора реагентов COrDIS Cattle. *a* – предполагаемая мать (дизиготный близнец с химерными клетками крови); *б* – тестируемый потомок (одноплодная беременность). Для каждого фрагмента потомка можно подобрать фрагмент, присутствующий у предполагаемой матери, однако во многих локусах потомок наследовал аллель, высота фрагмента которого у матери была относительно низкой (такие аллели показаны красными стрелками).

получения генотипов быков является использование ДНК, выделенной из спермы.

Рекомендации по контролю ошибки второго рода для тестов, выполненных с использованием STR-маркеров, ISAG и ICAR не дают. Однако ICAR имеет такие рекомендации для тестов, проводимых с использованием панели SNP-маркеров. При этом предлагаются три исхода тестов: родитель подтвержден, родитель сомнителен, родитель исключен. С учетом высокой скорости мутационного процесса, трудностей с выявлением нуль-аллелей и химеризма стволовых клеток крови у близнецов мы считаем, что контроль ошибки второго рода при использовании панели STR-маркеров необходим.

При установлении пороговых величин для контроля ошибок первого и второго уровня оправдано рассмотреть интересы всех участников и выгодоприобретателей экспертиз на достоверность происхождения крупного рогатого скота:

1. Племенная служба. В интересах племенной службы производить выдачу племенных свидетельств только на тех потомков, которые “бесспорно” произошли от предполагаемых родителей. Это требование соответствует высоким значениям индекса исключения родителей при 100%-ном совпадении аллелей во всех тестируемых локусах.

2. Сельхозпроизводитель может иметь две цели. Во-первых, подтверждение того, что спермопродукция происходит от быков, заявленных поставщиком. Это требование соответствует высоким значениям индекса исключения родителей при 100%-ном совпадении аллелей во всех тестируемых локусах. Во-вторых, получение племенного свидетельства на всех заявленных телят, т. е. контроль ложноотрицательных заключений (ошибки второго рода).

3. Поставщики спермопродукции также заинтересованы в контроле ошибки второго рода (выдаче ложноотрицательных заключений).

4. Испытательные лаборатории, проводящие экспертизы, заинтересованы в достоверности выдаваемых экспертиз. На наш взгляд, для этого должны быть соблюдены следующие условия:

4.1) должен проводиться контроль ошибок как первого, так и второго рода, что определяется как фундаментальными основами популяционной генетики, так и несовершенством генетического метода, используемого при проведении экспертиз;

4.2) необходимо иметь возможность получения доступа к первичным файлам генетической идентификации крупного рогатого скота, проведенной в других лабораториях, что особенно важно для быков. На наш взгляд, в едином реестре данных по генотипам крупного рогатого скота к генотипу быка должен быть приложен файл, полученный на генетическом анализаторе, и положительный

контрольный образец (*.fsa). Данное требование значительно снизит количество ошибочных идентификаций быков;

4.3) совершенствование протоколов определения генетической идентификации близнецов.

Мы предлагаем следующий протокол сопоставления генетических профилей (экспертизы на достоверность происхождения).

Этап I. Задача этапа – подтверждение достоверности происхождения потомка от каждого из родителей.

1. Производится сравнение аллелей в локусах предполагаемого отца и потомка:

- если во всех локусах присутствуют общие аллели и индекс исключения родителей $P2 > 0.99$, то родитель подтверждается;

- если общие аллели отсутствуют в двух локусах и более, то родитель исключается;

- если общие аллели отсутствуют в одном локусе, родителю присваивается статус “сомнительный”, см. пункт 3.

2. Пункт 1 проводится для предполагаемой матери.

3. Предполагаемые родители со статусом “сомнительный” подвергаются расширенному анализу. В случае если генетический паспорт “сомнительного” родителя получен из другой лаборатории и возможность проверить первичный файл отсутствует, то статус “сомнительный” меняется на “подтвержден”. Таким образом, мы трактуем возможные опечатки и ошибки расшифровки в пользу сельхозпроизводителя. Если генотип сомнительного родителя получен в нашей лаборатории, то первичные данные проверяются, после чего статус “подтвержден” может быть присвоен в трех случаях:

- аллели потомка и “сомнительного” родителя отличаются на один мотив микросателлита (предполагаем, что имела место мутация);

- аллели потомка и “сомнительного” родителя находятся в гомозиготе (возможен нуль-аллель);

- “сомнительный” родитель – дизиготный близнец, и при проверке его генотипа отмечены низкие фрагменты, соответствующие фрагментам тестируемого потомка.

4. Если ничего из перечисленного в пункте 3 не отмечено, при этом у “сомнительного” родителя и потомка имеется информация об изменчивости “дополнительных” (не входящих в базовую панель ISAG) локусов (минимум трех), то эти дополнительные локусы добавляются в анализ. Если во всех дополнительных локусах у “сомнительного” родителя и потомка имеются общие аллели, то статус предполагаемого родителя меняется на “подтвержден”. В иных случаях статус меняется на “исключен”.

Этап II. Задача этапа — подтверждение достоверности происхождения потомка от пары родителей (у потомка и предполагаемых родителей в каком-либо локусе может быть один аллель, совпадающий с аллелями обоих родителей, в этом случае будет подтвержден каждый родитель по отдельности, однако пара родителей может быть не подтверждена).

5. Если предполагаемый отец и предполагаемая мать имеют статус “подтвержден”, то проводится сравнение генотипа потомка с генотипами пары родителей:

— если во всех локусах присутствуют общие аллели и индекс исключения родителей $P3 > 0.9999$, то родители подтверждаются;

— если общие аллели отсутствуют в двух локусах и более, то родители исключаются;

— если общие аллели отсутствуют в одном локусе, статус родителей — “сомнительные”. При наличии дополнительных локусов они включаются в анализ. При наличии общих аллелей в “дополнительных” локусах родители подтверждаются, при несовпадении аллелей хотя бы в одном дополнительном локусе родители исключаются.

6. Допустимо восстановление аллелей в “дополнительных” локусах быков при наличии в выборке не менее чем 10 его потомков и их матерей, имеющих общие аллели в триаде “отец — мать — потомок” во всех 12 локусах базовой панели ISAG.

Слабым местом предложенного протокола является проведение тестов дизиготных близнецов с использованием ДНК, выделенной из крови. Актуальной задачей является совершенствование протокола, позволяющего эффективно анализировать подобные образцы для проведения экспертиз на достоверность происхождения крупного рогатого скота.

Исследования выполнены в рамках Государственного задания № 0532-2023-0006.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта животных.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические рекомендации по исследованию и использованию групп крови в селекции крупного рогатого скота. Дубровицы.: Отдел научно-техн. информации, 1974. 40 с.
2. Лазарева Ф.Ф., Сухова Л.Г. Использование групп крови для подтверждения достоверности происхождения крупного рогатого скота // Тр. УралНИИСХОЗА. 1983. Т. 35. С. 8—14.
3. ISAG/FAO. Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MODAD): Recommended Microsatellite Markers. FAO. Italy, Rome: 2004.
4. FAO. Molecular Genetic Characterization of Animal Genetic Resources. FAO. Italy, Rome: 2011.
5. ISAG Conference 2006. Cattle Molecular Markers and Parentage Testing Workshop. [Электронный ресурс] URL: https://www.isag.us/Docs/ISAG2006_CMMPT.pdf (дата обращения: 02.04.2024).
6. ISAG Conference 2008. Cattle Molecular Markers and Parentage Testing Workshop. [Электронный ресурс] URL: https://www.isag.us/Docs/ISAG2008_CattleParentage.pdf (дата обращения: 02.04.2024).
7. ISAG 2021. Cattle Molecular Markers and Parentage Testing. [Электронный ресурс] URL: https://www.isag.us/Docs/Workshop_report_CMMPT_2021.pdf (дата обращения: 02.04.2024).
8. ICAR guidelines. Section 4 — DNA technology. Version: February 2022. [Электронный ресурс] URL: <https://www.icar.org/Guidelines/04-DNA-Technology.pdf> (дата обращения 02.04.2024).
9. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 2 июня 2020 г. № 74 “Об утверждении Положения о проведении молекулярной генетической экспертизы племенной продукции государств — членов Евразийского экономического союза” [Электронный ресурс] URL: <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/74125607> (дата обращения 02.04.2024).
10. Приказ Министерства сельского хозяйства Российской Федерации от 02.06.2022 № 336 “Об утверждении требований к видам племенных хозяйств” [Электронный ресурс] URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202208300022> (дата обращения 02.04.2024).
11. Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 12 мая 2010 г. № 346н “Об утверждении Порядка организации и производства судебно-медицинских экспертиз в государственных судебно-экспертных учреждениях Российской Федерации” [Электронный ресурс] URL: <https://base.garant.ru/12177987/> (дата обращения 02.04.2024).
12. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 25.09.2023 № 491н “Об утверждении Порядка проведения судебно-медицинской экспертизы” [Электронный ресурс] URL: <http://publication.pravo.gov.ru/>

- docu-ment/0001202310250009 (дата обращения 02.04.2024).
13. Методические указания Минздрава РФ № 98/253 от 19.01.1999 года “Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства” [Электронный ресурс]
URL: <https://docs.cntd.ru/document/556354310> (дата обращения 02.04.2024).
 14. Животовский Л.А. Критические замечания на “Методические указания” П.Л. Иванова “Использование индивидуализирующих систем на основе полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) ДНК в судебно-медицинской экспертизе идентификации личности и установления родства” // Сиб. мед. журн. 2001. № 2. С. 85–86.
 15. Пименов М.Г., Культин А.Ю., Кондрашов С.А. Научные и практические аспекты криминалистического ДНК-анализа: Учебное пособие. М.: ГУ ЭКЦ МВД России, 2001. 144 с.
 16. ISAG. Exclusion probability in parentage tests [Электронный ресурс]
URL: https://www.isag.us/Docs/consignment-forms/Exclusion_probability.pdf (дата обращения 02.04.2024).
 17. Jamieson A., Taylor St.C.S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion // Animal Genetics. 1997. V. 28. P. 397–400.
doi: 10.1111/j.1365-2052.1997.00186.x
 18. Хедрик Ф. Генетика популяций. М.: Техносфера, 2003. 592 с. (Hedrick P.W. Genetics of population. Jones and Barlet Publ., Inc., 1999.)
 19. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. 2006. V. 6. № 1. P. 288–295.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
 20. Модоров М.В., Ткаченко И.В., Грин А.А. и др. Генетическая структура популяции голшти-низированного черно-пестрого скота на территории Урала // Генетика. 2021. Т. 57. № 4. С. 437–444.
<https://doi.org/10.1134/S1022795421040104>
 21. Van de Goor L.H.P., Koskinen M.T., van Haeringen W.A. Population studies of 16 bovine STR loci for forensic purposes // Int. J. Legal Med. 2011. V. 125. P. 111–119.
doi: 10.1007/s00414-009-0353-8
 22. Steely C.J., Scot Watkins W., Baird L., Jorde L.B. The mutational dynamics of short tandem repeats in large, multigenerational families // Genome Biology. 2022. V. 23. Article number: 253.
<https://doi.org/10.1186/s13059-022-02818-4>
 23. CORDIS Cattle. Набор реагентов для мультиплексного анализа 15-ти микросателлитных маркеров крупного рогатого скота [Электронный ресурс]
URL: <https://gordiz.ru/wp-content/uploads/2023/12/instrukciya-cordis-cattle-231205.pdf> (дата обращения 02.04.2024).
 24. Набор “Gene Profile Cattle” для генетической паспортизации и определения родства крупного рогатого скота [Электронный ресурс]
URL: <https://www.syntol.ru/catalog/reagenty-dlya-geneticheskikh-analizatorov/geneprofile-cattle.html> (дата обращения 02.04.2024).
 25. Kozubska-Sobocińska A., Smołucha G., Danielak-Czech B. Early diagnostics of freemartinism in Polish Holstein-Friesian female calves // Animals. 2019. V. 9. № 11. Article number: 971.
doi: 10.3390/ani9110971
 26. Модоров М.В., Файрушина К.Р., Клещева А.А. и др. Воспроизводство племенного голштинизированного черно-пестрого скота в Свердловской области // Достижения науки и техники АПК. 2022. Т. 36. № 8. С. 67–71.
doi: 10.53859/02352451_2022_36_8_67

Markers Nomenclature and Type I and II Errors Control in Cattle Parentage Exclusion Expertise with Microsatellite Markers

M. V. Modorov^{1, *}, I. V. Tkachenko¹, A. A. Kleshcheva¹, M. Yu. Sevost'yanov¹

¹*Ural Federal Agrarian Scientific Research Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
Yekaterinburg, 620142 Russia*

**e-mail: mmodorov@gmail.com*

Erroneous pedigree records reduce the quality of breeding work with cattle; therefore, parentage exclusion expertise has become an integral part of breeding work. For many years on the territory of the Russian Federation, the expertise was carried out using immunogenetic markers, but the improvement of technologies and tightening of regulatory requirements has led to the process of replacement of immunogenetics by microsatellite markers. At present there is no domestic protocol clearly regulating the procedure of cattle parentage exclusion expertise using microsatellite loci, which makes laboratory work more difficult. In particular, the requirements for the number and nomenclature of genetic markers which are used in the genetic expertise are only available for cattle, embryos and semen products being transported across the Eurasian Economic Union. There are no regulations for errors I (false positives) and II (false negatives) types control, which must be taken into account when forming expert judgements. In this paper we will review the approaches to addressing these issues proposed by the International Society for Animal Genetics (ISAG), the International Committee for Animal Recording (ICAR), the Collegium of the Eurasian Economic Commission, as well as domestic regulatory documents governing the production of forensic medical tests related to parentage exclusion expertise. Based on the results of the review, a nomenclature of microsatellite markers and a parentage exclusion protocol will be proposed, in which errors I and II type control are carried out. Special attention will be paid to the description of the sources of II type error and the necessity of its control.

Keywords: *Bos taurus*, microsatellites, selection, ISAG, STR, parentage exclusion.