

DIAGNOSTICO A NIVEL COLECTIVO DE PORTADORES DE LA DEFICIENCIA DE ADHESION LEUCOCITARIA BOVINA (BLAD)

Vazquez, F.; Romero, A.; Zaragoza, P.; Osta, R.; Marcos, S. y Elduque, C.

Laboratorio de Genética Bioquímica. Facultad de Veterinaria. Miguel Servet 177. 50013 Zaragoza.

INTRODUCCION

En la actualidad, la mortalidad de terneros en granjas de leche supone graves pérdidas económicas. Algunos autores, indicaron que en ganado Holstein, un 7,7 % de mortalidad se producía al nacimiento (JAMES y cols., 1984) y en un 36 % de los casos el agente etiológico era desconocido y se atribuía la muerte a diarrea (MORIN y cols., 1976). En muy pocos de estos casos, se ha diagnosticado como causa de estas muertes de terneros (principalmente de la raza Holstein), el denominado "Síndrome de Granulocitopatía Bovina" (NAGAHATA y cols., 1987). Este síndrome parece tener un modelo de herencia recesiva (TAKAHASHI y cols., 1987) y caracterizado clínicamente por infecciones de tejidos blandos, heridas mal cicatrizadas, neutrofilia progresiva, anomalías en la fagocitosis y motilidad intestinal. Hoy se sabe que dicho síndrome está relacionado con la enfermedad de la raza Holstein objeto de la presente memoria: BLAD ó LAD bovino.

Las técnicas reproductivas actualmente utilizadas como la inseminación artificial (I. A.) y el trasplante de embriones (T. E.) se están haciendo extensivas prácticamente a todas las explotaciones bovinas de nuestro país. Dichas técnicas pueden difundir una enfermedad hereditaria rápidamente, aunque el número de animales portadores o enfermos sea escaso.

Es preciso señalar también que la mayor parte del semen de calidad que se utiliza en nuestros circuitos de inseminación, procede de sementales Holstein importados de Estados Unidos o Canadá, países en los cuales, según un estudio reciente, el 17 % de los mejores toros del ranking de sementales poseen esta anomalía genética (SHUSTER y cols., 1992).

Puesto que hasta ahora no había un sistema eficaz para la detección de los animales portadores de la enfermedad, estos toros no han sido eliminados del mercado, con lo cual sus dosis seminales o embriones obtenidos podrían estar inundando de genes portadores de la enfermedad nuestra cabaña vacuna.

Hoy se sabe que el Síndrome de Granulocitopatía Bovina se debe a un defecto de la expresión de la proteína CD18 causado, por una secuencia anormal en el gen. Este defecto origina la falta de la subunidad α en una integrina β_2 (proteína que atraviesa la membrana plasmática) de las membranas de los neutrófilos aislados de animales enfermos (SHUSTER y cols., 1992). Todo ello origina una alteración en el transporte de los leucocitos desde la sangre a los lugares de infección (SMITH y cols., 1989).

En el alelo raro, aparecen dos puntos de mutación, una silente y otra que origina la sustitución de una Adenina por una Guanina en la posición 28. Esto origina el cambio del aminoácido Glicina por Acido Aspártico en la posición 128 (D128 G) de la secuencia de la proteína que codifica el gen (KEHRLI y cols., 1992).

En este trabajo presentamos las pruebas necesarias para el diagnóstico del BLAD a nivel individual y a partir de muestras "colectivas", es decir conseguir que a partir del análisis de una sola muestra que contiene material genómico de distintos individuos (recogido a partir de un tanque de leche en

una explotación de vacas) conocer si existe algún animal portador, con objeto de abaratar los costes y evitar el análisis individual, si el diagnóstico es negativo.

MATERIAL Y METODOS

Se han testado 120 animales de raza Frisona (80 machos y 40 hembras). La extracción del DNA se realizó a partir de sangre, semen y leche (VAZQUEZ, 1994). La leche se recogió siempre a mitad del ordeño, ya que existen variaciones en cuanto a la composición de la leche y número de células somáticas de un mismo animal en función del momento de ordeño en el que se toma la muestra. Aproximadamente 250ng de DNA fueron utilizados en la amplificación.

El método de diagnóstico consiste en la amplificación específica de un fragmento del gen CD18 (58bp) mediante PCR. Cada reacción de amplificación presentó un volumen final de 50 µl que contienen 60 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 0.01p. 100 de gelatina y 0.1 p. 100 Triton X-100, 10 mM MgCl₂, 75 pm de cada oligonucleótido cebador, 2 µl de mezcla de dNTP (5 mM) y una unidad de Taq DNA polimerasa. Los oligonucleótidos son los descritos por (Cadwell, comunicación personal), y la temperatura de hibridación fué 69° C. El producto amplificado se puede digerir con distintas enzimas de restricción. Así, cuando el enzima de restricción es Taq I la temperatura de incubación es 65°C., esta enzima reconoce la secuencia $T \overline{C} G A$. Si por el contrario la enzima de restricción usada es Hae III la temperatura de incubación es 37°C. y reconoce la secuencia $G G \overline{C} C$. La visualización de la amplificación y digestión se realizó en agarosa al 4% y 5%, respectivamente (debido a que el fragmento es pequeño, es necesario aumentar la concentración del gel).

RESULTADOS Y DISCUSION

En las condiciones de nuestro estudio se han obtenido tras la amplificación de muestras individuales, un fragmento del gen CD18 de 58bp. El fragmento amplificado al digerir con la enzima de restricción *Taq I*, reconoce en el alelo D128 un lugar de restricción ($T \overline{C} G A$) en la posición 25 lo que origina dos fragmentos de 33 y 25 b. p. El alelo D128G (mutación) no presenta lugar de corte, dando en este caso un fragmento de 58bp. A partir de estos resultados se han podido diferenciar claramente tres genotipos esperados en todos los individuos, según el control dialélico de este gen (KHERLI y cols., 1990) : D128/D128: dos bandas de 33 y 25 b. p.; D128/D128G: tres bandas de 58, 33 y 25 b. p.; D128G/D128G: una banda de 58 b. p.

Cuando el fragmento amplificado se digiere con la enzima de restricción *Hae III* en el alelo D128 reconoce un lugar de corte ($G G \overline{C} C$) en la posición 9, lo que origina dos fragmentos de 9 y 49 b. p. El alelo D128G presenta dos lugares de corte en la posición 9 y 28, lo que origina tres fragmentos de 9, 19 y 30 b. p. A partir de estos resultados se han podido diferenciar claramente tres genotipos esperados en todos los individuos según el control dialélico de este gen : D128/D128: dos bandas de 49 y 9 b. p.; D128/D128G: cuatro bandas de 49, 30, 19 y 9 bp.; D128G/D128G: tres bandas de 30, 19 y 9bp.

El diagnóstico "colectivo" a partir de una muestra de leche del tanque refrigerado que contiene leche de una explotación, nos permitiría conocer de una manera rápida y económica la existencia de alguna vaca portadora en la explotación. A partir del DNA extraído de la leche obtenida de un tanque de refrigeración que contenía la leche del ordeño de 40 vacas, se ha conseguido una buena amplificación del

fragmento que tras la digestión con las enzimas de restricción Hae III y Taq I se observa el patrón de restricción, para cada uno de los dos enzimas, correspondiente al de un animal portador, con una intensidad de bandas inferior al que corresponde a un sólo individuo. Esto significa que al menos una de las vacas es portadora del alelo mutado.

Estos resultados indican que en el caso de que tras un diagnóstico "colectivo" de una muestra de leche del tanque de refrigeración, el análisis resulte negativo, no será necesario realizar un diagnóstico individual de cada una de las vacas en producción. Por el contrario si el análisis fuese positivo sería aconsejable testar mediante una análisis individualizado a todas las vacas.

Esta medida esta justificada debido a que se están utilizando sementales portadores de esta enfermedad en los circuitos de I. A. y por lo tanto hay que asegurarse de que ninguna vaca portadora se insemina con uno de estos sementales.

Estos resultados pueden significar un gran avance desde el punto de vista práctico para el diagnóstico y control de la enfermedad en la cabaña vacuna española. Sin embargo, para ello sería necesario continuar las experiencias para determinar el nivel de sensibilidad del análisis (máxima dilución a la que el diagnóstico puede realizarse). Al hacerlo, es preciso tener en cuenta que en la proporción DNA portador/DNA sano presente en el tanque no solo influirá el número de animales sanos y portadores sino también el número de células somáticas en leche de cada uno de los individuos que se ordeñan.

BIBLIOGRAFIA

- JAMES, R.E., MCGILLIARD, M.L., HARTHMANN, D.A. (1984). "Calf mortality in Virginia Dairy Herd Improvement herds". *J. Dairy Sci.*, **67**:908-911.
- KEHRLI, M.E. Jr., SCHMALSTIEG, F.C., ANDERSON, D.C. (1990). "Molecular definition of the bovine granulocytopeny syndrome: Identification of deficiency of the Mac-1 (CD11b/CD18) glycoprotein". *Am.J. Vet. Res.*, **51**(11): 1826-1836. (1990).
- KEHRLI, M.E. Jr., SHUSTER, D.E., ACKERMANN, M.R. (1992), -a-. "Leucocyte adhesion deficiency among Holstein cattle". *Cornell Vet.*, **2**:103-109.
- KEHRLI, M.E. Jr., SHUSTER, D.E., DIETZ, M., ACKERMANN, M.R., GILBERT, R., POHLENZ, J. (1992) -B-. Bovine Leukocyte adhesion deficiency (BLAD) among Holstein cattle: Molecular biology, immunology, and clinical phenotypes. *XXIII International Conference on Animal Genetics. Interlaken*: 44.
- MORIN, M., LARIVIERE, S., LALLIER, R. (1976) "Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea". *Can. J. Com. Med.*, **40**: 228-240.
- NAGAHATA, H., NODA, H., TAKAHASHI, K., KUROSAWA, T., SONODA, M. (1987). "Bovine granulocytopeny syndrome: Neutrophil dysfunction in Holstein Friesian calves". *J. Vet. Med. A.*, **34**: 445-451.
- SHUSTER, D.E., KEHRLI, M.E. Jr., ACKERMANN, M.R., GILBERT, R.O. (1992). "Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle". *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **89**: 9225-9229.
- SMITH, C.W., MARLIN, S. D., ROTHLEIN, R. (1989) "Role of ICAM-1 in the adherence of human endothelial cells in vitro". In: "Structure and function of molecules involved in leukocyte adhesion". New York: *Springer-Verlag*: 170-189.
- SMITH, C.W., MARLIN, S. D., ROTHLEIN, R., TOMAN, C., ANDERSON, D.C. (1989). "Comparative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro". *J. Clin. Invest.*, **83**: 2008-2017.
- TAKAHASHI, K., MIYAGAWA, K., ABE S. (1987). "Bovine granulocytopeny syndrome of Holstein-Friesian calves and heifers". *Jpn. J. Vet. Sci.*, **49**: 733-736. 1987.
- VAZQUEZ, F. (1994). Detección de portadores de enfermedades hereditarias mediante biotecnología genética. Aplicación a un ejemplo concreto: BLAD (Deficiencia de Adhesión leucocitaria bovina). Memoria de Licenciatura. Facultad de Veterinaria de Zaragoza.