

Wpływ polimorfizmu genu BoLA-DRB3 na występowanie mastitis u krów^{*)}

GRAŻYNA SENDER, AGNIESZKA KORWIN-KOSSAKOWSKA, BARBARA GRALAK

Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN, 05-552 Wólka Kosowska, Jastrzębiec

Sender G., Korwin-Kossakowska A., Gralak B.

Polymorphism of BoLA-DRB3 gene in relation to mastitis in cattle

Summary

Polymorphism of the BoLA-DRB3 gene was identified in blood samples collected from 130 cows. The somatic cell count in the milk was ascertained monthly during one test day, and indicated any inflammations of the udder. The purpose of the study was to investigate the relation of the BoLA - DRB3 locus with an elevated somatic cell count in cow milk. Allele BoLA DRB3.2*16 was significantly ($p < 0.01$) associated with a decrease in the somatic cell count in cow milk, whereas the presence of the BoLA DRB3.2*23 allele in homozygous and heterozygous cows was associated with a significant ($p < 0.01$) increase in somatic cell count. The latter group of cows had the highest somatic cell count in their milk. BoLA DRB3 alleles are considerably promising as potential markers for mastitis resistance or susceptibility but more studies in this area are necessary, including bacteriological examinations of the udder.

Key words: mastitis, genetic markers, BoLA-DRB3

Wieloletnia selekcja bydła mlecznego w kierunku wysokiej wydajności mleka doprowadziła do wzrostu częstości zachorowania krów na zapalenie wymienia. Konsekwencją występowania chorób wymienia są, między innymi, wysokie koszty leczenia krów (4). Względy ekonomiczne doprowadziły do zmiany kryteriów selekcji bydła mlecznego. W ostatnich latach zaczęto wybierać do rozrodu zwierzęta nie tylko wysoko wydajne, ale również mniej podatne na choroby, szczególnie choroby wymienia. Jednak zdrowie zwierząt należy do cech niskoodziedziczalnych. Dodatkowo niektóre z chorób, jak na przykład zapalenie wymienia, ujawniają się tylko u jednej płci. Wszystko to powoduje, że tradycyjne metody selekcji są w przypadku podatności na choroby mało efektywne. Wydaje się, że wyższą efektywność selekcji bydła mlecznego w kierunku poprawy zdrowia wymienia można będzie uzyskać, prowadząc selekcję wspomaganą markerami genetycznymi. Poszukiwanie markerów genetycznych obejmuje, między innymi, poszukiwanie genów, których produkty wpływają bezpośrednio na poziom badanej cechy (12).

Główny kompleks zgodności tkankowej u ssaków odgrywa ważną rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. U bydła geny głównego kompleksu zgodności tkankowej zwanego BoLA (bovine lymphocyte

antigen) znajdują się na 23 chromosomie. Wyodrębniono geny BoLA klasy I oraz II. Produkty tych genów występują na limfocytach T (BoLA klasy I) oraz limfocytach B, T, makrofagach płucnych, monocytach, komórkach gruczołu mlekowego i nabłonkowych w oskrzelach (BoLA klasy II) (2). Regulują one immunologiczne rozpoznanie antygenów. Produkty genów BoLA klasy II odgrywają ważną rolę podczas prezentacji antygeny limfocytom T oraz wpływają na liczbę i rodzaj komórek T (1).

W obrębie genów BoLA klasy II zidentyfikowano za pomocą analizy molekularnej (metodą RFLP) 12 loci w tym 4 loci klasy II a takie jak: DQA, DQB, DRA, DRB. W regionie tym obserwowany jest duży polimorfizm. W locus BoLA-DRB3 w eksonie 2 zidentyfikowano 90 alleli (11). W genie tym ekson 2 jest ważny funkcjonalnie, ponieważ koduje miejsce wiązania peptydów i w związku z tym wpływa na możliwość immunologicznego rozpoznawania obcych białek. Z powodu tak istotnej funkcji w układzie odpornościowym zainteresowano się BoLA-DRB3 jako potencjalnym genem kandydującym podatności na choroby (7-9). Szczególnie zainteresowano się zależnością pomiędzy genem BoLA-DRB3 a występowaniem mastitis u krów (5, 9, 10, 13). Dotychczasowe badania wskazują na powiązanie dwóch alleli BoLA-DRB3.2*16 i BoLA-DRB3.2*23 z występowaniem stanu zapalnego wymienia u krów.

^{*)} Badania finansowana z grantu KBN 2PO6D03026 oraz tematu statutowego IGHZ PAN, S I - 1.7.

Celem badań było określenie wpływu polimorfizmu genu BoLA-DRB3 na liczbę komórek somatycznych w mleku krów.

Materiał i metody

Badaniami objęto 130 krów utrzymywanych w oborze należącej do Instytutu Genetyki i Hodowli Zwierząt PAN w Jastrzębcu. Zwierzęta włączone do badań utrzymywano w dobrych warunkach środowiskowych, żywiono w sposób pozwalający na osiągnięcie wysokiej wydajności mlecznej. Do określania stanu zdrowia wymienia posłużyły wyniki comiesięcznych badań liczby komórek somatycznych (wskaźnik zapalenia wymienia) oznaczone w próbkach mleka pobieranych w czasie kontroli użyteczności mlecznej badanych zwierząt. Ocena stanu zdrowia wymienia przeprowadzono na podstawie nie mniej niż pięciu oznaczeń liczby komórek somatycznych w próbkach mleka w czasie co najmniej jednej laktacji.

Próbki krwi pobrane od krów posłużyły do określenia polimorfizmu genów BoLA DRB3. DNA izolowano z leukocytów krwi wykorzystując gotowy zestaw do izolacji DNA firmy Promega (Wizard Genomic DNA Purification Kit). Genotypowanie BoLA DRB3 przeprowadzono za pomocą metody MPT-PCR (multi-primer target PCR) wykorzystującej cztery startery. Reakcje MPT PCR przeprowadzono w termocyklerze „Engine MJ Research”. Ustalono następujący program amplifikacji DNA: cykl wstępny trwający 15 minut przy temperaturze 95°C, cykl właściwy składający się z 30 powtórzeń temperatur: 95°C przez 30 sekund, 56°C przez 90 sekund, 72°C przez 90 sekund oraz cykl końcowy trwający 10 minut przy temperaturze 72°C. Metoda ta pozwoliła zidentyfikować na podstawie jednej reakcji PCR i elektroforezy w 2,5% żelu agarozowym równocześnie obecność alleli BoLA DRB3.2*16 i BoLA DRB3.2*23 w całej populacji badanych zwierząt bez stosowania enzymów restrykcyjnych (6). W metodzie tej zastosowano dwa startery zewnętrzne pozwalające na amplifikację eksonu 2 o długości 395 par zasad (pz) oraz dwa wewnętrzne do jednoczesnej amplifikacji wymienionych powyżej alleli. Startery dobrano na podstawie publikacji (6). Zastosowanie metody MPT-PCR z czterema starterami pozwoliło na zidentyfikowanie w żelu agarozowym trzech możliwych fragmentów: eksonu o długości 395 pz u wszystkich zwierząt, fragmentu o długości 196 pz (występuje allel BoLA DRB3.2*23) i fragmentu o długości 151 pz (występuje allel BoLA DRB3.2*16). Fragment o długości 395 pz jest dodatkowo wewnętrzną kontrolą reakcji PCR.

Opracowanie statystyczne materiału miało na celu wykazanie zależności pomiędzy genotypem badanego genu a liczbą komórek somatycznych. Do obliczeń wykorzystano procedurę GLM pakietu SAS. W modelu statystycznym analizującym logarytm liczby komórek somatycznych w mleku badanych krów uwzględniono: genotyp badanych zwierząt, powtarzalność wyników dotyczących zwierzęcia zagnieżdżonego w genotypie, numer laktacji, rok i sezon badania oraz regresje na dni laktacji i na wydajność mleka. Istotność różnic pomiędzy poziomem liczby komórek somatycznych w grupach krów reprezentujących różne genotypy DRB3 wykonano za pomocą testu Duncana.

Wyniki i omówienie

W populacji badanych krów stwierdzono frekwencje alleli BoLA DRB3.2*16 i BoLA DRB3.2*23 (tab. 1) zbliżone do podawanych w piśmiennictwie w odniesieniu do populacji krów rasy holsztyńskiej (3, 5, 13, 14). W populacji 1100 krów w Stanach Zjed-

Tab. 1. Frekwencja alleli BoLA DRB3.2

Allele BoLA DRB3.2	Frekwencja (%)
23	10,0
16	14,2
Pozostałe	75,8

noczonych stwierdzono frekwencję allelu BoLA DRB3.2*16 wynoszącą 10,01% i allelu BoLA DRB3.2*23 na poziomie 9,1% (3). Również w Stanach Zjednoczonych w badaniach częstość występowania alleli w *locus* BoLA DRB3.2 w dwóch liniach 186 krów holsztyńskich, kontrolnej i selekcionowanej w kierunku wysokiej wydajności mleka stwierdzono, frekwencję allelu BoLA DRB3.2*16 wynoszącą 1% i 6% oraz frekwencję allelu BoLA DRB3.2*23 na poziomie 6% i 8%; w zależności od linii. Frekwencja tych alleli była wyższa w linii selekcionowanej w kierunku wysokiej wydajności mleka (14). W podobnych badaniach w grupie 835 krów w Kanadzie stwierdzono częstość występowania alleli BoLA DRB3.2*16 i BoLA DRB3.2*23 wynoszącą odpowiednio 9,2% i 6,4% (13). W innych badaniach w grupie 137 krów rasy holsztyńskiej w Stanach Zjednoczonych frekwencja allelu BoLA DRB3.2*16 wyniosła 6,56%, natomiast BoLA DRB3.2*23 – 8,61% (5). Frekwencje przedstawione w tabeli 1 zostały określone w populacji mniejszej niż wyniki uzyskane przez innych autorów (3, 13). Populacja polskich krów rasy holsztyńskiej była podobnej wielkości jak w badaniach Starkenburg i wsp. (14) oraz Kelm i wsp. (5).

W tab. 2 przedstawiono kształtowanie się liczby komórek somatycznych w zależności od genotypu w *locus* BoLA DRB3.2. Najniższą liczbę komórek somatycznych stwierdzono w grupie krów będących nosicielami allelu BoLA DRB3.2*16. Grupa ta różniła się

Tab. 2. Zależność pomiędzy liczbą komórek somatycznych a genotypem w *locus* BoLA DRB3.2 (n – allel niezidentyfikowany) ($\bar{x} \pm se$)

Genotyp BoLA DRB3.2	n	Liczba komórek somatycznych (log)
16/n	31	5,59 ^a ± 0,45
23/n	20	6,37 ^b ± 0,51
16/23	6	6,41 ^b ± 0,48
n/n	73	5,72 ^a ± 0,36

Objaśnienie: a, b – średnie oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $p \leq 0,01$

W grupie krów będących nosicielami allelu BoLA DRB3.2*23 oraz heterozygot DRB3.2*16/DRB3.2*23 stwierdzono najwyższą liczbę komórek somatycznych,

istotnie ($p < 0,01$) od grupy krów charakteryzujących się wystąpieniem allelu BoLA DRB3.2*23 oraz krów heterozygotycznych pod względem wymienionych alleli.

istotnie wyższą ($p < 0,01$) niż w grupie krów charakteryzujących się występowaniem pozostałych alleli BoLA DRB3.2 (tab. 2).

W badaniach genów determinujących podatność na zapalenie gruczołu mlekowego stwierdzono powiązanie allelu BoLA DRB3.2*16 z wyższą wartością hodowlaną liczby komórek somatycznych ($p < 0,05$) (5). Stwierdzono również wzrost częstości klinicznej postaci *mastitis* u osobników z allelem BoLA DRB3.2*8. Natomiast odwrotną zależność zanotowano u osobników z allelem BoLA DRB3.2*11 i BoLA DRB3.2*23. Podobne wyniki uzyskali inni autorzy, a mianowicie powiązanie allelu BoLA DRB3.2*16 z częstszym niż u innych zwierząt występowaniem liczby komórek somatycznych powyżej 500 000 w co najmniej jednym badaniu w czasie laktacji (3). Natomiast w badaniach kanadyjskich wykazano wpływ allelu BoLA DRB3.2*16 na obniżenie liczby komórek somatycznych w mleku krów rasy holsztyńskiej. Znalezione również istotną zależność pomiędzy allelem DRB3.2*23 a częstszym niż u innych krów występowaniem klinicznych przypadków zapalenia wymienia wywołanych bakteriami *E. coli* (13). Podobne wyniki w stosunku do allelu BoLA DRB3.2*16 uzyskali inni autorzy (14). Stwierdzili oni również istotny spadek liczby komórek somatycznych w grupie krów będących nosicielkami tego allelu.

Możliwe są dwa wyjaśnienia tłumaczące zgodność wyniku uzyskanego w niniejszej pracy z badaniami jednej grupy autorów (13, 14), zaś sprzeczność z wynikami badań innych autorów (3, 5). Jednym z wyjaśnień rozbieżności wyników jest wystąpienie w różnych populacjach zwierząt różnych sprzężeń genu BoLA DRB3.2 z innymi *loci* BoLA lub innymi *loci* mającymi wpływ na odpowiedź immunologiczną na infekcję. Drugim możliwym wyjaśnieniem rozbieżności wyników jest obecność różnych bakterii wywołujących stany zapalne wymienia w badanych populacjach zwierząt. Ten sam allel może być powiązany ze spadkiem lub wzrostem liczby komórek somatycznych, w zależności od tego, czy stan zapalny wymienia jest wywołany na przykład gronkowcem złocistym czy też paciorkowcem bezmleczności. Konieczne są więc dalsze badania wykraczające poza zakres oceny stanu zdrowia wymienia tylko na podstawie liczby komórek somatycznych. Znalezienie powiązania pomiędzy allelami genu BoLA DRB3.2 a występowaniem *mastitis* spowodowanego różnymi patogenami pozwoli na wyjaśnienie pewnych wątpliwości przed zaproponowaniem wybranych alleli w obrębie *locus* BoLA DRB3.2 jako genu odpowiedzialnego za zdrowotność wymienia.

Piśmiennictwo

1. *Batra T. R., Lee A. J., Gavora J. S., Stear M. J.*: Class I alleles of the bovine major histocompatibility system and their association with economic traits. *J. Dairy Sci.* 1989, 72, 2115-2124.
2. *Buczek J., Deptuła W., Gliński Z., Jarosz J., Stosik M., Wernicki A.*: Immunologia porównawcza i rozwojowa zwierząt. Wyd. Naukowe PWN, 2000, 277-345.

3. *Dietz A. B., Cohen N. D., Timms L., Kehrli M. E.*: Bovine lymphocyte antigen class II alleles as risk factor for high somatic cell counts in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1997, 80, 406-412.
4. *Jones W. P., Hansen L. B., Chester-Jones H.*: Response of health care to selection for milk yield of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 3137-3142.
5. *Kelm S. C., Detilleux J. C., Freeman A. E., Kehrli M. E., Dietz A. B., Fox L. K., Butler J. E., Kasckovics I., Kelley D. H.*: Genetic association between parameters of innate immunity and measures of mastitis in periparturient Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 1997, 80, 1767-1775.
6. *Ledwidge S. A., Mallard B. A., Gibson J. P., Jansen G. B., Jiang Z. H.*: Multi-primer target PCR for rapid identification of bovine DRB3 alleles. *Anim. Genet.* 2001, 32, 219-221.
7. *Maillard J. C., Chantal I., Berthier D., Sidibe I., Razafindraibe H.*: BoLA-DRB/DQB haplotypes as molecular markers of genetic susceptibility and resistance to bovine dermatophilosis. *Proc. 27th Internat. Conf. on Animal Genetics*, July 22-26, 2000 Minneapolis, Minnesota, s. 62.
8. *Mejdell C. M., Lie O., Solbu H., Arnet E. F., Spooner R. L.*: Associations of major histocompatibility complex antigens (BoLA-A) with AI bull progeny test results for mastitis ketosis and fertility in Norwegian cattle. *Anim. Genet.* 1994, 25, 99-104.
9. *Ostergard H., Kristensen B., Andersen S.*: Investigations in farm animals of association between the MHC system and disease resistance and fertility. *Livest. Prod. Sci.* 1989, 22, 49-53.
10. *Schukken Y. H., Mallard B. A., Dekkers J. C. M., Leslie K. E., Stear M. J.*: Genetic impact on the risk of intramammary infections following *Staphylococcus aureus* challenge. *J. Dairy Sci.* 1994, 77, 639-647.
11. *Sena L., Schneider M. P. C., Brenig B., Honeycutt R. L., Womack J. E.*: Polymorphisms in MHC-DRA and DRB alleles of water buffalo (*Bubalus bubalis*) reveal different features from cattle DR alleles. *Anim. Genet.* 2003, 34, 1-10.
12. *Sender G., Korwin-Kossakowska A., Stepińska U.*: Wykorzystanie markerów genetycznych w programie zwalczania mastitis. *Medycyna Weterynaryjna* 2003, 59, 853-856.
13. *Sharif S., Mallard B. A., Wilkie B. N., Sargeant J. M., Scott H. M., Dekkers J. C. M., Leslie K. E.*: Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Anim. Genet.* 1998, 29, 185-193.
14. *Starkenburg R. J., Hansen L. B., Kehrli M. E., Chester-Jones H.*: Frequencies and effects of alternative DRB3.2 alleles of bovine lymphocyte antigen for holsteins in milk selection and control lines. *J. Dairy Sci.* 1997, 80, 3411-3419.

Adres autora: doc. dr hab. Grażyna Sender, ul. Główna 26, 05-500 Żabieniec; e-mail: g.sender@ighz.pl

WHELAN A. O., COAD M., PECK Z. A. A., CLIFFORD D., HEWINSON R. G., VORDERMEIER H. M.: Wpływ testu skórniego i przechowywania próbki przez dobę na wyniki rozpoznania gruźlicy bydła w oparciu o badanie krwi. (Influence of skin testing and overnight sample storage on blood-based diagnosis of bovine tuberculosis). *Vet. Rec.* 155, 204-206, 2004 (7)

W rozpoznaniu gruźlicy bydła jest stosowany test *in vitro* polegający na pomiarze poziomu INF- γ po 24 godz. po stymulacji hodowli pełnej krwi bydła przy użyciu tuberkuliny PPD. Celem badań było określenie wpływu tuberkulinowego testu skórniego oraz przechowywania próbki krwi przez dobę na wyniki testu *in vitro* u 10 cieląt w wieku 6 miesięcy rasy fryzysko-holsztyńskiej, zakażonych doświadczalnie *Mycobacterium bovis*. Sześć cieląt zakażono dawką 4×10^5 , cztery dawką 2×10^6 terenowego izolatu *M. bovis* (VLA-Weybridge). Test tuberkulinizacji z tuberkulina PPD bydłca lub ptasia wykonano po 15 tyg. po zakażeniu, a test INF- γ z krwią pobraną przed tuberkulinizacją i po 3 oraz 10 tyg. po tuberkulinizacji. Próbkę krwi badano w teście *in vitro* po 8 godz. po ich pobraniu oraz po 20-24 godz. po przechowywaniu w około 20°C. U wszystkich zakażonych cieląt tuberkulinizacja wypadła dodatnio. Badanie sekcyjne wykonane po 24 tyg. po zakażeniu wykazało obecność zmian gruźliczych płucach i węzłach chłonnych górnych dróg oddechowych. Porównanie wyników testu INF- γ wykonanego przed i po tuberkulinizacji wykazało obniżenie nasilenia testu przeprowadzonego po tuberkulinizacji.