

MONITOREO DE TERNEROS HOLANDO PORTADORES DE BLAD MEDIANTE CURVAS DE DISOCIACIÓN DE ALTA RESOLUCIÓN Y SECUENCIACIÓN

Branda Sica, Andrea¹; Federici, María Teresa¹; Giannitti, Federico²; Caffarena, Darío²; Schild, Carlos²; Casaux, Laura²; Briano, Carolina³; Dalla Rizza Marco¹; Llambí, Silvia⁴; Fraga Martín²; Riet, Franklin²; Dutra, Fernando³.

¹Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas, Canelones, Uruguay.

*E-mail: abranda@inia.org.uy

²Plataforma Salud Animal, INIA La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

³DILAVE "Miguel C. Rubino", Laboratorio Regional Este, Treinta y Tres, Uruguay.

⁴Cátedra de Genética, Facultad de Veterinaria, UdelaR, Uruguay.

Palabras clave: *Deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina, diagnóstico molecular, bovinos de leche, Holando.*

La deficiencia en la adhesión leucocitaria bovina (BLAD, OMIA 000595-9913) es una enfermedad de herencia autosómica recesiva que ha sido descrita a nivel mundial en la raza Holando. Esta enfermedad es causada por una mutación puntual A por G, nucleótido 383, en el exón 4 de la subunidad beta-2 integrina del gen CD18 (Shuster *et al*, 1992) donde se produce una sustitución del ácido aspártico por glicina en la posición 128 de la proteína del receptor (D128G) (Nagahata *et al*, 1997). Esta mutación afecta el funcionamiento de un receptor proteico de membrana en los leucocitos, impidiendo la migración de los neutrófilos desde los vasos sanguíneos al intersticio y, por consecuencia, la respuesta inmune contra las infecciones.

El objetivo de este trabajo fue realizar un monitoreo piloto de terneros Holando de Uruguay, para detectar portadores de CD18 D128G, mediante análisis HRM (*High Resolution Melting*) utilizando PCR tiempo en real y confirmación por secuenciación.

El ADN de los 52 terneros fue provisto por el DILAVE Treinta y Tres, a partir de muestras de sangre recolectadas en la Plataforma de Salud Animal de INIA, mediante una estrategia de muestreo no probabilística de conveniencia. Estas muestras provenían de terneros de 1-30 días, con o sin diarrea.

Para identificar la mutación CD18 D128G, se utilizaron 2 controles ADN heterocigotas portadores que fueron obtenidos del trabajo de Branda Sica *et al* (2016) y de la Dra. Silvia Llambí. Las muestras fueron analizadas mediante PCR en tiempo real con la aplicación HRM en *Rotor-Gene Q* (Corbett Research, Australia) con el intercalante fluorescente *EvaGreen* usando el kit *Type-it® HRM PCR* (QIAGEN) y un par de *primers* específicos (Mirck *et al*, 1995). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, 40 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a 55°C y 10 s a 72°C. Para la adquisición de datos de fluorescencia con la aplicación HRM se estableció un rango de temperatura de 65-95°C en incrementos de 0,1°C con 2 s en cada paso. Luego de la amplificación HRM del fragmento de 159 pb se normalizaron las lecturas de fluorescencia utilizando el *software Rotor Gene* versión 1.7.28 que permitió identificar las curvas de *melting* en la zona estable de fluorescencia (Figura 1). Luego, se normalizó con respecto a los controles, homocigota normal y heterocigota portador, y el *software* estableció el genotipo de cada muestra analizada con un porcentaje de confianza mayor a 90%.

Se enviaron 25 amplicones a secuenciar a MACROGEN (Korea) para confirmar los resultados obtenidos por PCR-HRM (Figura 2). Finalmente, se analizó la información obtenida de las 25 secuencias *reverse* con las secuencias consenso y de referencia del gen CD18 (ITGB2) utilizando las herramientas BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), BioEdit (*BioEdit-Sequence Alignment Editor*) MEGA 7.0.26 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*) (Figura 3) y *Geneious Pro Trial 4.7.5* disponibles en internet.

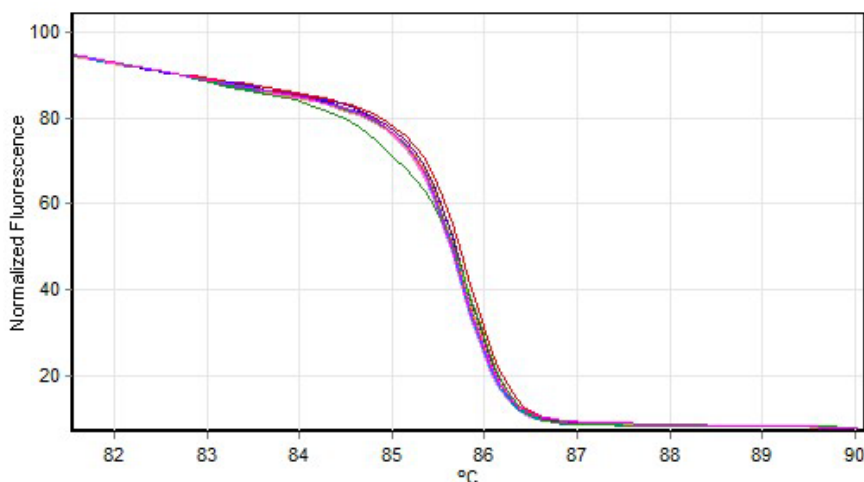


Figura 1: Normalización de las curvas de *melting* HRM de productos de PCR de 159 pb en función de la fluorescencia con respecto a la temperatura. Se observan 2 patrones de genotipos homocigotas sanos y heterocigota portador de CD18 D128G (línea verde).

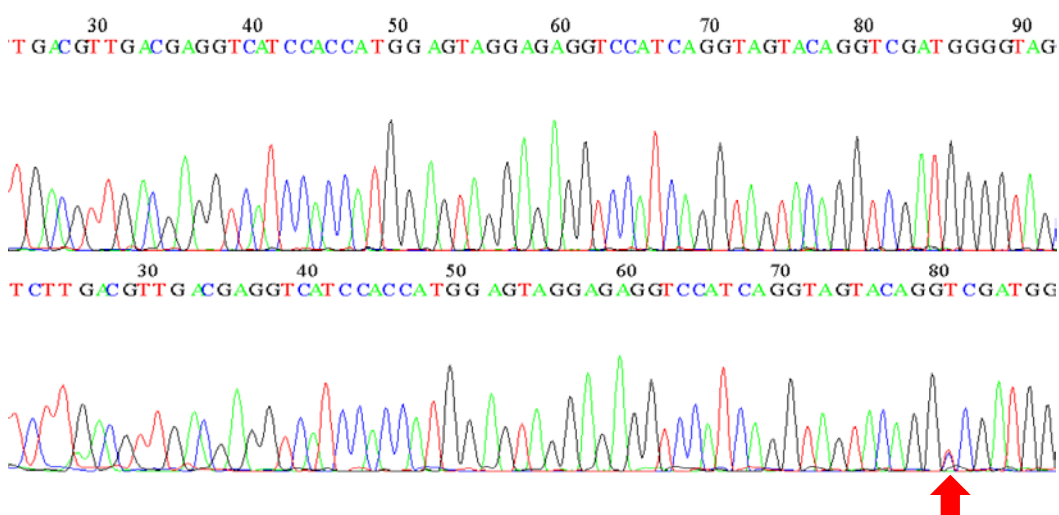


Figura 2: Electrofenogramas de las secuencias *reverse* de un ternero homocigota sano (arriba) y una vaca control portadora de CD18 D128G (abajo). Se observa en la posición 81 la superposición de los nucleótidos T y C (picos rojo y azul, respectivamente).

En total 52 terneros fueron analizados mediante PCR-HRM y 25 confirmados por secuenciación, no encontrándose animales homocigotas recesivos ni heterocigotas portadores de CD18 D128G.

El análisis por PCR-HRM es un método no invasivo para la detección de la mutación con alta sensibilidad y rapidez (<1,5 horas) que puede implementarse como estrategia de monitoreo, lo

cual es de gran importancia a nivel diagnóstico, ya que permite detectar los genotipos homocigotas normales y heterocigotas portadores de CD18 D128G, evitando así la diseminación de esta mutación en rodeos de bovinos Holando en Uruguay.

Actualmente se está generando un relevamiento en mayor escala para esta mutación mediante PCR-HRM, secuenciación y validando diferentes plataformas de genotipado (paneles 50K de *GeneSeek*, *ArBost*, y/o *CD Genomics*). Con esta información se está generando un Banco de ADN de individuos portadores y de casos clínicos diagnosticados como enfermos de CD18 D128G, entre otros desórdenes hereditarios asociados a la mortalidad de terneros Holando Uruguayo.



Figura 3: Alineamiento de las secuencias *reverse* de los terneros homocigotas sanos con la secuencia de referencia del gen CD18 (ITGB2) mostrando la posición del SNP en código IUPAC (línea 30) utilizando la herramienta MEGA 7.0.26. En las secuencias control portadoras de CD18 D128G (líneas 19 y 21) se observa el nucleótido T, pero analizando visualmente el electrofenograma se observa la superposición de los picos T y C.

Referencias bibliográficas

1. Branda Sica A, Federici MT, Dutra F, Romero A, Briano C, Dalla Rizza M, Llambí S. 2016. Identificación de terneras Holando portadoras de BLAD y Citrulinemia en la región Este de Uruguay por PCR-RFLP y Secuenciación. *Veterinaria* (Montevideo) 52(202):23-27.
2. Mirck M, Von Banniseht W, Tiumermans-Besselink J, VanLuijk J, Buntjer J, Lenstra L. 1995. Optimization of the PCR test for the mutation causing bovine leukocyte adhesion deficiency. *Cell and Mol. Biology* 41: 695-698.
3. Nagahata H, Miura T, Tagaki K, Ohtake M, Noda H, Yasuda T, Nioka K. 1997. Prevalence and allele frequency estimation of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein-Friesian cattle in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 59(4):233-238.
4. Shuster DE, Bosworth BT, Kehrli ME. 1992. Sequence of the Bovine CD18-Encoding cDNA Comparison with the Human and Murine Glycoproteins. *Gene* 114:267-271.