

ASOCIACIÓN GENÉTICA DEL GEN BOLA DRB3.2 CON MASTITIS EN VACAS HOLSTEIN Y BONXHOLSTEIN

GENETIC ASSOCIATION OF BOLA DRB3.2 GEN WITH MASTITIS IN HOLSTEIN AND BONXHOLSTEIN COWS

Genetic association of BoLA DRB3.2 gen with mastitis

Juan C Zambrano^{1*}, Julián Echeverri², Albeiro López-Herrera²

¹Universidad Nacional de Colombia sede Medellín *jczambranoa@unal.edu.co

²Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Producción Animal

Abstract

In bovines the major histocompatibility complex (MHC) is known as Bovine Leukocyte Antigen (BoLA) and some alleles of it has been associated with problems of udder health. In this study was evaluated the polymorphisms in the exon 2 of BoLA DRB3 gene in 91 cows, 66 Holstein and 25 cross breed BON x Holstein (BxH) from Paysandú Herd of the Universidad Nacional de Colombia. Using molecular techniques PCR-RFLP and sequencing, were identified 27 alleles, finding allelic frequencies from 0,8 to 15,9% in the Holstein cattle and from 2 to 20% in BxH cattle. Potential associations were determined using a statistic model to determine the effect of the genetic substitution, in which the allele BoLA DRB3.2*24 was the substitution allele. The alleles associated with subclinical mastitis were the allele DRB3.2*8 ($P < 0,10$) and *14 ($P < 0,01$) with susceptibility to subclinical mastitis, on the other hand the allele *33 was associated with resistance to this disease ($P < 0,01$). To clinical mastitis were not found significant associations.

Palabras clave:

Enfermedades
infecciosas
Complejo mayor
Histocompatibilidad

Keywords:

Infectious diseases
Major
histocompatibility
complex

Resumen

En bovinos el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) es conocido como antígeno leucocitario bovino (BoLA) y algunos de sus alelos han sido asociados con problemas de salud de la ubre. En este estudio se evaluaron los polimorfismos del exón 2 del gen BoLA DRB3 en 91 animales, 66 vacas de raza Holstein y 25 vacas del cruce de razas BON x Holstein (BxH) del Hato Paysandú de la Universidad Nacional de Colombia, en Medellín. Fueron identificados 27 alelos mediante PCR-RFLP y confirmados por secuenciación, encontrando frecuencias alélicas desde 0,8 hasta 15,9% en la raza Holstein y desde 2 hasta 20% en BxH. Se establecieron asociaciones potenciales utilizando un modelo estadístico para determinar el efecto de sustitución genética en el cual se empleó el alelo BoLA DRB3.2*24 como alelo de sustitución. Los alelos asociados con susceptibilidad a mastitis subclínica fueron DRB3.2*8 ($P < 0,10$) y el *14 ($P < 0,01$), de otro lado el alelo *33 fue asociado con resistencia a esta misma enfermedad ($P < 0,01$). Para mastitis clínica no se encontraron asociaciones significativas.

Introducción

La mastitis bovina se considera la enfermedad de mayor impacto económico en los hatos de lechería especializada, siendo la más frecuente y costosa en el mundo, generando pérdidas económicas representadas principalmente en: disminución de la producción y calidad de la leche, tratamiento de la enfermedad y descarte de animales afectados (Rainard y Riollet, 2006). Se estima que se pierde en cada hato más del 12% de la producción lechera por año por causa de esta enfermedad (Lorbacher, 1982). La selección de animales debe ser por tanto complementada con herramientas moleculares, que permitan la identificación de marcadores genéticos asociados con la salud de la ubre y otras afecciones de importancia económica. El gen DRB3 es considerado un marcador genético por tener un alto polimorfismo, principalmente en el exón 2 (DRB3.2), que codifica el sitio de unión a antígeno (Rostchild *et al.*, 2000). De este exón se han identificado al menos 121 alelos diferentes

(Wang *et al.* 2008), algunos de los cuales han sido asociados con susceptibilidad a enfermedades infecciosas como la mastitis bovina (Rupp y Boichard, 2003).

El propósito de este trabajo fue asociar los alelos BoLA DRB3.2 con susceptibilidad y/o resistencia a mastitis, en vacas de raza Holstein y del cruce de razas BON x Holstein (BxH) en un hato lechero de Antioquia.

Material y métodos

Fueron genotipificadas 91 vacas, 66 de raza Holstein y 25 del cruce BON x Holstein (BxH) para el exón 2 del gen DRB3 del BoLA. El DNA bovino fue obtenido de muestras de células mononucleares de sangre del cual se obtuvo el amplificado del exón 2 por PCR semianidada, empleando la metodología desarrollada por Van Eijk *et al.* (1992). Para determinar la presencia de mastitis clínica, toda la población (n=91) fue evaluada mediante un estudio retrospectivo de los registros clínicos del hato, y 47 vacas (35 Holstein y 12 BxH) de esta población fueron evaluadas para mastitis subclínica mediante la prueba de California Mastitis Test (CMT).

Para determinar la asociación de cada alelo BoLA DRB3.2 con la presencia o ausencia de la enfermedad (mastitis clínica y mastitis subclínica) se utilizó el procedimiento LOGISTIC de SAS (SAS, 1998) con el modelo estadístico: $Y_{ijkl} = \mu + R_i + P_j + \sum_l b_l \text{BoLA}_{ijk} + e_{ijkl}$ para determinar el efecto de sustitución genética, de acuerdo con lo descrito por Batra *et al.* (1989) y utilizado en otras investigaciones como las de Sharif *et al.* (1998). En el modelo estadístico; Y_{ijkl} es la variable dependiente en este caso, $\text{Log}(P/1-P)$, donde P es la probabilidad de afección de la enfermedad (mastitis clínica o mastitis subclínica); μ es la media de la población; R_i es el efecto fijo del j-ésimo grupo genético, siendo: 1 Holstein y 2 BxH; P_j es el efecto fijo del j-ésimo número de partos, siendo: 1 vacas de uno y dos partos (1-2 partos) y 2: vacas de 3 o más partos; $\sum_l b_l$ es el sumatorio de los coeficientes de regresión del número de copias del l-ésimo alelo BoLA, BoLA_{ijk} es el número de copias (0,1 y 2) del alelo l BoLA ($l = 1 \dots 15$) presente en la vaca ijk (Los alelos con frecuencias menores al 2% fueron agrupados en una categoría denominada otros); e_{ijkl} es el término de error experimental.

El Odds Ratio (OR), o razón de posibilidades, y su intervalo de confianza, fue calculado según Lemeshow y Hosmer, (1984). Si el OR es mayor que 1, el factor es considerado como de alto riesgo según sea la variable analizada, presencia de la enfermedad con respecto al alelo de sustitución (alelo BoLA DRB3.2*24). Si OR es menor que 1, el factor puede interpretarse sin efecto sobre la enfermedad, ausencia de la enfermedad en comparación con el alelo de sustitución. Para determinar la significancia estadística de los OR se empleó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2).

Resultados

El porcentaje de animales afectados por mastitis subclínica se ubicó entre el 19,15% y el 67,5%, considerando un animal afectado el que presentó una, dos o tres cruces en cualquiera de los cuartos. El promedio general de afección de la enfermedad fue del 38,69% por cada muestreo. Para mastitis clínica, la frecuencia del número de vacas afectadas fue del 9,09, 4,76 y 13,19% para los años 2006, 2007 y 2008, respectivamente, indicando un efecto directo de las condiciones ambientales y de manejo presentes en los diferentes niveles de esta fuente de variación.

Tabla 1. ORs e intervalos de confianza de los alelos BoLA DRB3.2 asociados a mastitis subclínica (*ORs and confidence intervals of the BoLA DRB3.2 alleles associated with mastitis*)

Alelo	Odds Ratio	IC (95%)	Chi-cuadrado (χ^2)	Valor P
8	2,48*	1,33-4,65	3,698	0,054
14	3,75‡	1,71-8,22	6,702	0,009
33	0,39‡	0,17-0,92	13,272	0,001

* $P < 0,10$, ‡ $P < 0,01$

Para las asociaciones de los alelos BoLA DRB3.2 con mastitis, se encontraron resultados significativos con riesgo de sufrir afección por mastitis subclínica. El alelo BoLA DRB3.2*8 OR= 2,48 IC_{95%} (1,33-4,65), fue asociado ($P < 0,10$) con susceptibilidad a mastitis subclínica comparado con el alelo de sustitución (alelo BoLA DRB3.2*24), lo que significa que las vacas que portan el alelo 8 tienen 2,48 veces más riesgo de sufrir la enfermedad que las que portan el alelo 24; el alelo BoLA DRB3.2*14 OR= 3,75 IC_{95%} (1,71-8,22) fue asociado significativamente con susceptibilidad a mastitis subclínica, pero con mayor nivel de significancia ($P < 0,01$).

Por otro lado, el alelo BoLA DRB3.2*33 OR= 0,39 IC_{95%} (0,17-0,92) fue asociado ($P < 0,01$) con resistencia a mastitis subclínica comparado con el alelo de sustitución (Tabla1).

Para los alelos BoLA DRB3.2 no se encontraron asociaciones significativas con alto o bajo riesgo de sufrir mastitis subclínica, comparado con el alelo de sustitución (alelo BoLA DRB3.2*24)

Discusión

Para mastitis clínica, se encontró una incidencia anual del 11,76% en vacas multíparas y del 4,60% en vacas de uno y dos partos. En general, la incidencia anual de mastitis clínica para el hato fue del 9,2% teniendo en cuenta los registros clínicos del mismo. Igualmente Sharif *et al.* (1998), encontraron resultados similares para mastitis severa (caracterizada por signos sistémicos y locales, tales como: inflamación de la ubre, leche anormal, fiebre y anorexia), con una frecuencia del 9,3%.

Para mastitis subclínica, se encontró una frecuencia del 26,4% para vacas de uno y dos partos, y del 45,86% en vacas multíparas. Starkenburg *et al.* (1997), determinaron una incidencia de mastitis subclínica mediante el Recuento de Células Somáticas RCS del 25% para vacas de primer parto, 35% en vacas de segundo parto y 29% en vacas de tercer parto, en un periodo de una lactancia; lo cual confirma la alta incidencia de la enfermedad en los hatos de lechería especializada.

En cuanto a la asociación de los alelos BoLA DRB3.2, se encontró una asociación significativa ($P < 0,10$) del alelo 8 con mayor riesgo de adquirir mastitis subclínica, comparado con el alelo de sustitución y este resultado fue consistente con los obtenidos por Starkenburg *et al.* (1997) quienes encontraron asociación significativa del alelo 8 con un incremento agudo elevado del RCS en vacas Holstein de segundo parto. En el estudio realizado por Pashmi *et al.* (2009), igualmente encontraron una asociación del alelo 8 con incremento en el RCS, indicando una alta probabilidad de ocurrencia de mastitis subclínica.

El alelo 14 fue asociado con susceptibilidad a mastitis subclínica ($P < 0,01$) y no se encontraron reportes de este alelo por otros autores, siendo, por tanto, un reporte nuevo el presentado en este estudio, al igual que para el alelo 33 que presentó asociación altamente significativa con resistencia a mastitis subclínica ($P < 0,01$).

Agradecimientos

Este artículo fue parte del proyecto: Correlación entre mastitis clínica y subclínica con las variantes genotípicas del gen BoLA DRB3.2, presentes en las vacas y novillas de primer parto del hato lechero de la hacienda Paysandú de La Universidad Nacional de Colombia, código QUIPU 20101006713, financiado por la Dirección de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia sede Medellín.

Bibliografía

- Batra, T.R., Lee, A.J., Gavora, J.S. and Stear, M.J. 1989. Class I alleles of the bovine major histocompatibility system and their association with economic traits. *Journal of Dairy Science*, 72:2115-2124.
- Lemehow, S. and Hosmer, D.W. 1984. Estimating odds ratio with categorically scaled covariates in multiple logistic regression analysis. *American Journal of Epidemiology*, 119:147-151.
- Lorbacher, H. 1982. La mastitis bovina. Universidad de Antioquia, Departamento de Salud Pública, Folleto marzo, pp. 5-62.
- Pashmi, M., Qanbari, S., Ghorashi, S.A., Sharif, A.R., Simianer, H. 2009. Analysis of relationship between bovine lymphocyte antigen DRB3.2 alleles, somatic cell count and milk traits in Iranian Holstein population. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126 (4):296-303.
- Rainard, P. and Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland - Review article. *Journal of Veterinary Research*, 37: 369-400
- Rothschild, M.F., Skow, L., Lamont, S.J. 2000. The major histocompatibility complex and its role in disease resistance and immune responsiveness. En: *Breeding for disease resistance in farm animals*. 2nd edition. Ed Axford RFE, Bishop SC, Nichols FW Owen JB. CABI publishing, pp.73.
- Rupp, R. and Boichard, D. 2003. Genetics of resistance to mastitis in dairy cattle. *Journal of Veterinary Research*, 34:671-688.
- SAS Institute.1998. SAS/STAT User's Guide: Statistics. Version 8.4th ed. Cary. North Carolina.
- Sharif, S., Mallard, B.A., Wilkie, B.N., Sargeant, J.M., Scott, H.M., Dekkers, J.C. and Leslie K.E. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*, 29: 185-193.

- Starkenbug, R.J, Hansen L.B., Kehrli, J.R, Chester-Jones, H. 1997. Frequencies and Effects of Aternative DRB3.2 Allels of bovine lymphocyte antigen for Holstein in milk selection and control lines. *Journal of Dairy Science*, 80:3411-3419.
- Van Eijk, M.J.T., Stewart-Haynes, J.A. and Lewin, H.A. 1992. Extensive polymorphism of the BoLA-DRB3 gene distinguished by PCR-RFLP. *Animal Genetics*; 23: 483.
- Wang, K., Sun, D. and Zhang, Y. 2008. Sequencing of 15 new BoLA-DRB3 Alleles. *International Journal of Immunogenetics*, 35:331-332.